

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DOS ALIMENTOS**

**ERVA-MATE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Liana Pedrolo Canterle**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2005**

# **ERVA-MATE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

**por**

**Liana Pedrolo Canterle**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Weber do Canto**

**Co-Orientadora: Luisa Helena Rychecki Hecktheuer**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2005**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ERVA-MATE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

elaborada por  
**Liana Pedrolo Canterle**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Luisa Helena Rychecki Hecktheuer, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)  
(Co-Orientadora)

**Neidi Garcia Penna, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)

**Margareth Linde Athayde, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)

Santa Maria, 11 de fevereiro de 2005.

**Canterle, Liana Pedrolo, 1980**

**C229e**

**Erva-mate e atividade antioxidante / por Liana Pedrolo Canterle ; orientadora Marta Weber do Cantos, co-orientadora Luisa Helena Rychecki Heckteuer. – Santa Maria, 2005.**

xi, 99 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

1. Tecnologia de alimentos 2. Erva-mate 3. *Ilex paraguayensis* 4. Atividade antioxidante 5. Ensaio biológico 6. Ensaio químico I. Canto, Marta Weber, orient. II. Heckteuer, Luisa Helena Rychecki, co-orient. III. Título

CDU: 663/664:633.77

Ficha catalográfica elaborada por  
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

---

© 2005

Todos os direitos autorais reservados a Liana Pedrolo Canterle. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua Thomas Fortes, n. 126, Bairro Alto da Boa Vista, Santiago, RS, 97700-000  
Fone (0xx)55 2512556; Fax (0xx) 2208353; End. Eletr: [lianape@smail.ufsm.br](mailto:lianape@smail.ufsm.br)

---

## **DEDICATÓRIA**

A meu noivo Rafael, pelo amor, apoio e confiança no sucesso de meu trabalho. A meus pais, Ademar e Neiva, pelo incentivo e segurança que me transmitiram, sempre acreditando em minha capacidade, o que tornou tudo mais fácil. A ambos, por fazer a distância e a saudade valerem a pena.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por fazer tudo dar certo em minha vida e sempre iluminar meu caminho.

A Universidade Federal de Santa Maria, por todas as oportunidades oferecidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, representado pelas professoras Neidi G. Penna e Luisa H. R. Hecktheuer, pela oportunidade e amizade, e a secretária Lia, pelos serviços prestados.

Ao Depto. de Tecnologia e Ciência de Alimentos (DTCA), pela estrutura física oferecida.

À Chefe do DTCA, professora Rosamélia Berleze, pela compreensão e amizade.

À minha orientadora Marta W. do Canto, pela confiança, pela dedicação, pelo carinho, por tudo que me ensinou, e, principalmente, pelo seu exemplo, que vou levar para a vida toda.

À minha co-orientadora Luisa H. R. Hecktheuer, pela amizade, coerência e apoio em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

A Marialene e Maria Otilde, funcionárias do DTCA, pela amizade e por sempre estarem dispostas a ajudar.

As estagiárias Viviane, Ana Cristina, Ariane e Magda, pela disponibilidade e colaboração.

A minha “nona”, pelas orações que ajudaram que meus sonhos se tornassem possíveis.

A minha Dinda, por acreditar no meu sucesso.

A CAPES, pela bolsa concedida.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria

### ERVA-MATE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Autora: Liana Pedrolo Canterle

Orientadora: Marta Weber do Canto

Co-Orientadora: Luisa Helena Rycheki Hecktheuer

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 11 de fevereiro de 2005, CCR - Sala Cláudio  
Antônio Mussoi, - 3110 - Prédio 42.

*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate, é uma espécie nativa da América do Sul e tem sua área de ocorrência natural restrita ao Brasil, Paraguai e Argentina. É um produto que ainda tem muito a ser melhorado, principalmente, em termos dos seus usos industriais, a nível internacional. Antioxidantes são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos óxido-redutivos desencadeados pelos radicais livres, impedindo os danos gerados por eles, sendo largamente empregados em alimentos, medicamentos e cosméticos, e recentemente, estão sendo usados também em terapias antioxidantes em doenças onde radicais livres estão implicados. Este trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade antioxidante do produto erva-mate tipo chimarrão utilizando amostras provenientes do estado do RS e SC, nos meses de junho, julho e agosto, através de ensaios biológicos e químicos. O estudo biológico foi realizado em células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com amostras de erva-mate em presença dos agentes estressores apomorfina e paraquat durante o metabolismo aeróbico (multiplicação celular). Os resultados obtidos indicam que a capacidade antioxidante das amostras varia significativamente em função do tipo e concentração do agente estressor, das concentrações das amostras, do tipo de erval (nativo ou reflorestado) e do estado produtor (RS e SC). Entre os estados, o RS apresentou maior efeito antioxidante *in vivo*, onde ervais reflorestados foram mais eficientes como protetores celulares, o contrário ocorreu no estado de SC. A avaliação química se baseou na determinação da Atividade Antioxidante Total (Hidrofílica e Lipofílica), onde se verificou a capacidade da amostra em sequestrar o radical ABTS, do Poder Redutor, onde o íon ferro produzido na reação redox forma um produto colorido quando reage com o radical DPPH, com absorção máxima à 525 nm, e do Efeito Sequestrante de Radicais DPPH, baseada na capacidade do antioxidante em doar hidrogênio para o radical DPPH provocando a varredura deste do meio de reação, modificando a cor da solução. Os valores encontrados nas análises *in vitro* mostram que a capacidade antioxidante da maioria das amostras variou significativamente em função do estado produtor e do tipo de erval nos três meses de análise (junho, julho e agosto). A Atividade Antioxidante Hidrofílica foi maior em agosto para todas as amostras, variando entre 0,1336-0,5627 mM Equivalentes de Trolox, para a Lipofílica houve grande variação entre os meses de análise, com os valores ficando entre 4,9516-27,6685  $\mu$ M Equivalentes de Trolox. Para as demais análises químicas, todas as amostras mostraram maior atividade antioxidante em junho, entre 4,4373-12,4082 mM Equivalentes de Quercetina para Poder Redutor e 4,0221-11,1393 mM Equivalentes de Trolox para Efeito Sequestrante de Radicais DPPH. Os resultados foram obtidos através da construção de curvas padrão, tratados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) e pós-Teste de Tukey utilizando o programa *Microsoft Excel*. Todos os testes foram realizados em triplicata. Concluiu-se que a erva-mate, ingerida na forma de chimarrão, possui realmente um ótimo efeito antioxidante quando comparado à outros produtos naturais de ação já comprovada, em sistemas químicos e biológicos, e que esta propriedade pode ser explorada visando a diversificação das formas de consumo, o que facilitaria a expansão da cultura pelo país.

Palavras-chaves: *Ilex paraguariensis*, atividade antioxidante, ensaio biológico, ensaio químico.

## ABSTRACT

Master's degree Dissertation  
Postgraduate Course in Food Science and Technology  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### YERBA-MATE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

Author: Liana Pedrolo Canterle

Adviser: Marta Weber do Canto

Co Adviser: Luisa Helena Rycheki Hecktheuer

Place and Date of Defese: Santa Maria, February 11, 2005, CCR – Hall Cláudio  
Antônio Mussoi, - 3110 – 42<sup>th</sup> block.

*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoliaceae), popularly known as yerba-mate, is a native species of South America and has its area of natural occurrence restricted to Brazil, Paraguay and Argentina. It is a product that still has a lot to be improved, mainly, in terms of its industrial uses, in international level. Antioxidants are compounds that work as blockers of the oxide-reducers processes unchained by the free radicals, impeding the damages generated by them, being widely used in food, medicines and cosmetics, and recently, they are also being used in antioxidant therapies in diseases where free radicals are implicated. This work has as objective to evaluate the antioxidant capacity of the product yerba-mate “chimarrão” type, using samples of the RS and SC, in the months June, July and August, through biological and chemical assays. The biological study was accomplished in eucariotic cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* treated with yerba-mate samples in presence of the apomorphine and paraquat dichloride agents during the aerobic metabolism (cellular multiplication). The obtained results indicate that the antioxidant capacity of the samples varies significantly in function of the type and concentration of the stressor agents, the concentrations of the samples, the mate type (native or cultivated) and of the producer state (RS and SC). Between the states, RS state presented higher antioxidant effect *in vivo*, where reforested mate were more efficient as cellular protectors, the opposite happened in SC state. The chemical evaluation was based on the determination of the Total Antioxidant Activity (Hydrophilic and Lipophilic), where the capacity of the sample in to sequester the ABTS radical, the Reducing Power, where the iron ion produced in the redox reaction forms a colored product when it reacts with the DPPH radical, with maximum absorption to 525 nm, the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical sequestering effect, based on the capacity of the antioxidant in donating hydrogen for the DPPH radical provoking the sweeping of it of the middle of reaction, modifying the color of the solution were verified. The found values in the analyses *in vitro* show that the antioxidant capacity in the majority of the samples varied significantly in function of the producer state and of the mate type in the three months of analysis (June, July and August). Hydrophilic Antioxidant Activity was higher in August for all the samples, varying between 0,1336-0,5627 mM equivalent of Trolox, for Lipophilic there was a higher variation among the months of analysis, with the values being between 4,9516-27,6685 mM equivalent of Trolox. For the other chemical analyses, all the samples showed higher antioxidant activity in June, among 4,4373-12,4082 mM equivalent of quercetin to Reducer Power and 4,0221-11,1393 mM equivalent of Trolox the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical sequestering effect. The results were obtained through the construction of standard curves, treated statistically through variance analysis (ANOVA) and Tukey's post test using *Microsoft Excel software*. All tests were performed in triplicate. It was concluded that the yerba-mate, ingested in “chimarrão” form, really has a great antioxidant effect when compared to other natural products with already proven action, in chemical and biological systems, and that this property can be explored seeking the diversification in the consumption ways, fact that would facilitate the expansion of the culture in the country.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*, antioxidant activity, biological assay, chemical assay.



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Valores de sobrevivência da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tratada com erva-mate nativa e reflorestada dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, colhidas no mês de junho, em presença dos agentes estressores apomorfina e paraquat durante metabolismo aeróbico.....	44
TABELA 2 – Valores de sobrevivência da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tratada com erva-mate nativa e reflorestada dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, colhidas no mês de julho, em presença dos agentes estressores apomorfina e paraquat durante metabolismo aeróbico.....	45
TABELA 3 – Valores de sobrevivência da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tratada com erva-mate nativa e reflorestada dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, colhidas no mês de agosto, em presença dos agentes estressores apomorfina e paraquat durante metabolismo aeróbico.....	46

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>GRÁFICO 1</b> - Diferenças da Atividade Antioxidante Hidrofílica entre os tipos de ervais.....	60
<b>GRÁFICO 2:</b> Diferenças da Atividade Antioxidante Lipofílica entre os tipos de ervais.....	61
<b>GRÁFICO 3:</b> Diferenças de Poder Redutor entre os tipos de ervais.....	63
<b>GRÁFICO 4:</b> Diferenças de Efeito Seqüestrante de Radicais DPPH entre os tipos de ervais.....	64

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A – TABELA 1:</b> Atividade Antioxidante Hidrofílica das amostras nativas e reflorestadas de erva-mate dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.....	95
<b>ANEXO B – TABELA 2:</b> Atividade Antioxidante Lipofílica das amostras nativas e reflorestadas de erva-mate dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.....	95
<b>ANEXO C – TABELA 3:</b> Poder Redutor das amostras nativas e reflorestadas de erva-mate dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.....	96
<b>ANEXO D – TABELA 4:</b> Efeito Seqüestrante de Radicais DPPH das amostras nativas e reflorestadas de erva-mate dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.....	96
<b>ANEXO E – GRÁFICO 5 -</b> Diferenças de Atividade Antioxidante Hidrofílica entre os meses de análise.....	97
<b>ANEXO F – GRÁFICO 6 -</b> Diferenças de Atividade Antioxidante Lipofílica entre os meses de análise.....	97
<b>ANEXO G – GRÁFICO 7 -</b> Diferenças de Efeito Seqüestrante de Radicais DPPH entre os meses de análise.....	98
<b>ANEXO H – GRÁFICO 8 -</b> Diferenças de Poder Redutor entre os meses de análise.....	98

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	05
<b>ABSTRACT</b> .....	06
<b>LISTADE TABELAS</b> .....	07
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	08
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	09
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
<b>2.1 Atividade Antioxidante <i>in vivo</i></b> .....	15
<b>2.1.1 Antioxidantes</b> .....	15
<b>2.1.2 Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio</b> .....	16
2.1.2.1 Radical superóxido ( $O^{\cdot-}_2$ ) .....	17
2.1.2.2 Radical hidroxila ( $OH^*$ ).....	18
2.1.2.3 Oxigênio singlete ( $O_2^{\cdot}$ ).....	18
<b>2.1.3 Agentes Estressores</b> .....	18
2.1.3.1 Apomorfina.....	19
2.1.3.2 Paraquat.....	19
<b>2.1.4 Danos causados pelas Espécies Reativas do Oxigênio</b> .....	19
<b>2.1.5 Mecanismos Antioxidantes</b> .....	20
<b>2.2 Atividade Antioxidante <i>in vitro</i></b> .....	22
<b>2.2.1 Propriedades Antioxidantes do Extrato Aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i></b> ....	23
<b>2.2.2 Antioxidantes na indústria de alimentos</b> .....	24
<b>2.2.3 Fitoquímicos, quimioprotetores e nutracêuticos</b> .....	24
<b>2.2.4 Compostos fenólicos e flavonóides</b> .....	25
<b>2.2.5 Erva-mate e Câncer</b> .....	27

<b>2.3 Ervais nativos e reflorestados</b>	29
<b>3. ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	30
<b>3.1 Artigo 1: Avaliação da Atividade Antioxidante da Erva-mate em Sistemas Biológicos</b> .....	31
<b>3.2 Artigo 2: Avaliação da Atividade Antioxidante da Erva-mate em Sistemas Químicos</b> .....	54
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	70
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	81
<b>6. SUGESTÕES</b> .....	82
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	83
<b>8. ANEXOS</b> .....	95

## 1. INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate, tem sua área de ocorrência natural restrita a 3 países: Brasil, Paraguai e Argentina. No Brasil, está dispersa principalmente nos Estados do Paraná (PR), Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS), Mato Grosso do Sul (MS), São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG). O RS, na década de 70, foi o maior produtor brasileiro, respondendo por 50% da produção, sendo que atualmente sua participação fica em torno de 25% (Winge et al., 1995). Da produção anual de 650.000 toneladas (Maccari & Santos, 2000), aproximadamente 80% são consumidos no mercado interno, ficando os 20% restantes para a exportação, 81% para o Uruguai, 15% para o Chile, e 3% para a Alemanha e o Paraguai. Em termos de importação, 75% procedem do Paraguai e 25% da Argentina (Anuário Brasileiro da Erva-Mate, 1999).

A erva-mate é uma árvore nativa da América do Sul e a maior parte da erva extraída provém de ervais nativos ou adensados, explorados por pequenos produtores, que se reúnem em cooperativas para o processamento ou a comercializam com grandes indústrias produtoras de erva-mate do sul do país. A relevância do caráter social da atividade ervateira é demonstrada pelos indicadores das propriedades rurais, com um total de aproximadamente 180.000 produtores, gerando cerca de 710.000 postos de trabalho diretos, com um volume de recursos da ordem de 180 milhões de reais por ano. A implantação e manutenção de ervais em áreas de preservação da Mata Atlântica são uma importante atividade agrícola com vistas ao desenvolvimento sustentado das populações que habitam essas regiões (Deser, 2002).

O parque industrial ervateiro no Brasil é constituído predominantemente por unidades de pequena capacidade operacional, sendo 750 empresas processadoras (RS: 398, PR: 209, SC: 118, MS: 25), com uma capacidade operacional instalada superior a 400.000 quilos/hora de erva-mate em folha. No RS, das 398 empresas processadoras de erva-mate, 135 são micro-empresas, 237 de pequeno porte e 26 de médio/grande porte, distribuídas em vários municípios (Anuário Brasileiro da Erva-Mate, 1999).

De acordo com o Projeto Plataforma Tecnológica da Erva-Mate do Paraná (2000) (PADCT Erva-Mate), a erva-mate, quando comparada com outros tipos de plantas e/ou produtos industrializados, é um produto centenário que se encontra em fase embrionária de descobertas, principalmente, em termos dos seus usos industriais, a nível internacional. Para Campos (1996), o desenvolvimento tecnológico da erva-mate e derivados requer investimentos em pesquisa, para a modernização e otimização dos processos de produção, para a busca de uma maior qualidade e diversificação de produtos, para que desta forma, possa ocorrer a busca de novos mercados, nacionais e internacionais.

A erva-mate apresenta variações em sua qualidade e no conjunto de suas características, principalmente físico-químicas, devido a influências de alguns fatores como, a idade das árvores e das folhas, a época de colheita, os tipos de ervais (nativos ou reflorestados), os sistemas de cultivo, a região produtora, e as formas de beneficiamento e armazenamento. O produto 'Erva-Mate Tipo Chimarrão', nos estados onde é conhecido, encontra-se associado aos usos, expectativas e costumes dos consumidores, onde, características organolépticas e sua influência na saúde humana são os principais fatores relevantes (SAAP, 1997).

Para Kroon & Williamson (1999) e Melo & Guerra (2002), nos últimos 20 anos houve um incremento de pesquisas na busca de determinados tipos de alimentos que possuíssem substâncias biologicamente ativas que trouxessem benefícios à saúde ou efeitos fisiológicos desejáveis (Park et al., 1997), e com isso um estilo de vida mais saudável. Neste contexto, inserem-se os antioxidantes, porque os mesmos podem retardar o dano oxidativo de tecidos aumentando suas defesas naturais (Tsuda et al., 1998).

As partes aéreas de *Ilex paraguariensis* são usadas para preparar um chá como bebida, o mate. O mate é consumido como duas infusões diferentes: uma é preparada pela adição simples de água quente ao material seco da planta (chá) e a outra é preparada por adições repetidas de água aquecida no mesmo material (chimarrão). Ambas as preparações permitem a extração quase completa dos componentes solúveis em água. Na América do Sul, aproximadamente 30% da população bebe mais que 1 litro/dia desta bebida. Também pode ser consumido na forma de “tererê”, o qual é semelhante ao chimarrão, no entanto, o mate é ligeiramente torrado e deixado em repouso durante 8 meses em local seco para só então ser consumido com água fria. Muito tempo antes de ser conhecida a sua composição química, já os indígenas utilizavam a erva-mate não só atraídos pelo paladar da bebida preparada, mas principalmente por conhecerem suas virtudes, em que se destacava a propriedade de aumentar a resistência à fadiga e por mitigar a sede ou a fome. A *Ilex paraguariensis* também é usada na medicina popular para o tratamento de artrites, digestão lenta, doença no fígado, dor de cabeça, reumatismo, e obesidade, entre outros (Filip et al., 2000).

Filip et al. (2000) analisou a atividade antioxidante de plantas preparadas como mate. Observou que a *I. paraguariensis* apresentava uma maior atividade antioxidante que as outras *Ilex spp* consumidas na América do Sul, e que a mesma era preservada no mate, o que permitiu especular que o consumo regular desta bebida poderia contribuir para melhorar significativamente as defesas antioxidantes humanas. Gugliucci & Stahl (1995) e Gugliucci (1996) observaram que extratos de *I. paraguariensis* causaram uma diminuição na oxidação

da lipoproteína humana de baixa-densidade (LDL), em ambos sistemas *in vitro* e *in vivo*. Para Kono et al. (1997), Nardini et al. (1997) e Kerry & Rice-Evans (1999), algumas das propriedades terapêuticas destas plantas são atribuídas ao alto conteúdo de derivados cafeoil, ácido cafêico e seus derivados, pois os mesmos exibem propriedade antioxidante em sistemas biológicos e químicos. Todavia, necessita-se de um conhecimento mais aprofundado a respeito da propriedade antioxidante e/ou poder seqüestrante de radicais livres dos extratos de *Ilex paraguariensis* (Schinella et al., 2000).

Para Frankel (1993) e Melo & Guerra (2002), a atividade antioxidante de um composto proveniente de uma fonte natural é influenciada por diversos fatores, como: país ou região na qual a planta foi cultivada, o solvente e a técnica de extração empregada, e ainda, a forma em que a amostra encontrava-se para análise, se em pó, em extrato ou como uma fração isolada.

Por tudo isto, é importante conhecer qual a real participação da atividade antioxidante da erva-mate e o seu impacto na saúde, bem como, a influência do processo de fotossíntese sofrido pela planta oriunda de ervais nativos (maior grau de sombreamento) ou reflorestados (menor grau de sombreamento). Conseqüentemente, o conhecimento das diferenças em termos de propriedade antioxidante da 'Erva-Mate Tipo Chimarrão', vem nos trazer a oportunidade de contribuirmos para um maior conhecimento da ação desta planta sobre as defesas antioxidantes da população dos dois estados maiores consumidores de Chimarrão (RS e SC).

Portanto, o objetivo deste trabalho é fundamentalmente verificar a atividade antioxidante dos compostos presentes no produto 'Erva-Mate Tipo Chimarrão', através de ensaios químicos e biológico, e a possível existência de diferenças entre os tipos de ervais (nativos e reflorestados) e diferenças regionais entre os dois principais estados produtores e consumidores desta bebida, o Rio Grande do Sul e Santa Catarina.



## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 – Atividade Antioxidante *in vivo*:**

A oxidação lipídica, uma das principais causas de deterioração em alimentos, acarreta alterações profundas em sua qualidade, com implicações fisiopatológicas para os seres humanos. O interesse no emprego de antioxidantes de fontes naturais que aumentam a vida de prateleira dos alimentos está consideravelmente aumentado pela preferência dos consumidores por ingredientes naturais, e preocupações com os efeitos tóxicos dos antioxidantes sintéticos (Schwarz et al., 2001). A determinação da atividade antioxidante de produtos naturais teve início com Chipault et al. (1952) em especiarias, ingredientes utilizados em alimentos desde os primórdios da história, não somente para melhorar ou ressaltar as características organolépticas dos alimentos, mas também, para preservá-los.

#### 2.1.1 Antioxidantes

Antioxidantes, de acordo com a ‘Food and Drug Administration’ (FDA), são substâncias usadas para preservar alimentos através do retardo da deterioração, rancidez e descoloração decorrentes da autooxidação (Adegoke et al., 1998). No entanto, como a ação dos antioxidantes não se restringe apenas a inibição da peroxidação dos lipídios, mas também a oxidação de outras moléculas, como proteínas, e o ácido desoxirribonucléico (DNA), dentre outras, pode-se definir antioxidantes, de modo mais amplo, como substâncias que, em pequenas concentrações (0,01% ou menos), em presença de substratos oxidáveis, retardam ou previnem significativamente a oxidação dos mesmos (Halliwell, 1996). Deve atender aos seguintes requisitos: ser compatível com o substrato, não conferir odor ou sabor estranhos ao produto, ser efetivo durante o período de armazenamento do produto alimentício, ser estável ao processo de aquecimento, e ser facilmente incorporado ao alimento (Melo & Guerra, 2002).

Todavia, do ponto de vista químico, os antioxidantes são compostos aromáticos que contêm pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos [como o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT), largamente utilizados pela indústria de alimentos] ou naturais [substâncias bioativas, como compostos organossulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos] (Kitts, 1994). De acordo com Rajalakshmi & Narasimhan (1995), os antioxidantes não podem reverter o processo oxidativo e nem prevenir a rancidez hidrolítica.

No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres, moléculas ou fragmentos de moléculas que possuem elétrons livres, dito não pareados, em sua órbita externa. Os elétrons livres dessas moléculas as tornam quimicamente instáveis e, portanto, bastante reativas (Cheeseman & Slater, 1996). Os radicais livres gerados *in vivo* reagem com o DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras (Jacob & Burri, 1996), possivelmente por desestabilização das membranas (Mora et al., 1990), dano no DNA (Takabe et al., 2001), e oxidação da lipoproteína de baixa-densidade (LDL), e de acordo com Ramarathnam et al. (1995), a autooxidação dos ácidos graxos insaturados que compõem a membrana celular, é apontada como o processo oxidativo de maior ocorrência no organismo humano. Espécies reativas de nitrogênio também parecem contribuir para patologias cardiovasculares. O peroxinitrito, um potente oxidante gerado pela reação do óxido nítrico com o íon superóxido no endotélio vascular, induz a oxidação do LDL (Leeuwenburgh et al., 1997) e a disfunção pró-inflamatória do miocárdio mediada por citoquinina (Ferdinandy et al., 2000; Wang et al., 2002). A nitrotirosina, um produto da nitração de proteína por espécies reativas de nitrogênio está presente em lesões ateroscleróticas humanas (Beckmann et al., 1994). Devido a isso, a significância dos antioxidantes na dieta e o seu suposto papel na intervenção e profilaxia de doenças cardiovasculares tem sido de interesse considerável (Heim et al., 2002).

Para Rice-Evans et al. (1997), atualmente, existe um interesse crescente em fitoquímicos como componentes bioativos de alimentos, onde o papel de frutas, vegetais e vinho tinto na prevenção de doenças tem sido atribuído em parte a propriedade antioxidante de seus constituintes polifenólicos. E muitos destes, constituintes da dieta ou derivados de plantas, são antioxidantes mais efetivos *in vitro* que as vitaminas E e C, e desta forma, podendo contribuir significativamente para o efeito protetor *in vivo*.

### 2.1.2 Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio

O termo radical livre existe desde os primórdios da química de Lavoisier, onde foi usado para designar ‘um grupo de elementos que mantinha sua identidade através de uma série de reações’, como por exemplo o radical metila (Felippe Jr & Percário, 1991). Atualmente, os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos que possuem um elétron desemparelhado na última camada ocupando um único orbital atômico ou molecular (Halliwell & Gutteridge, 2000).

A presença de um elétron desemparelhado confere a estas espécies duas propriedades características: o paramagnetismo, uma vez que produzem facilmente um campo magnético; e a alta reatividade, relacionada com o tempo de meia vida da reação que é de microssegundos. O elétron desemparelhado é convencionalmente representado por um ponto sobrescrito ( $R^\bullet$ ) a direita da estrutura (Slater, 1984).

Os radicais livres resultam de processos de fissão homolítica ou de reações de transferência de elétrons. Em geral, são formados por absorção de radiação (ultravioleta ou visível); por reações redox (reações de transferência de elétrons não-enzimáticas e reações catalisadas por metais); ou processos de catálise enzimática (Slater, 1984).

Várias substâncias podem ser definidas como radicais livres, porém o maior interesse é pelas espécies reativas do oxigênio (ERO) (Felippe Jr. & Percário, 1991; Halliwell & Chirico, 1993; Adegoke et al., 1998).

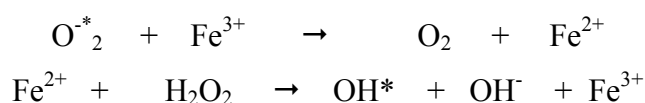
As espécies reativas do oxigênio e outros radicais livres podem ser produzidos por fontes endógenas e exógenas. As fontes exógenas de geração de ERO incluem radiação, fumo, estresse, alguns medicamentos e outras substâncias como xenobióticos, compostos azo aromáticos e biperidil (Halliwell, 1987).

No organismo, as ERO são produzidas na fagocitose e como consequência do metabolismo celular normal. Cerca de 95% do oxigênio consumido pelas células segue a cadeia de transporte de elétrons para formar energia e água. No entanto, em 5% das vezes ocorrem erros no processo de redução do  $O_2$ , formando as ERO (Beckman & Ames, 1998).

#### 2.1.2.1 Radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ )

O radical  $O_2^{\bullet -}$  é formado no organismo principalmente através da cadeia de transporte de elétrons ou por ação de células fagocitárias (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) para defesa contra microorganismos invasores. Seu envolvimento em sistemas biológicos foi descoberto em 1969 a partir da descoberta da superóxido dismutase (SOD), enzima que cataliza a dismutação de  $O_2^{\bullet -}$  em  $H_2O_2$  (Babior, 1997).

Nos organismos biológicos o  $O_2^{\bullet -}$  participa na reação de Haber-Weiss gerando oxigênio e ferro reduzido, o qual cataliza a reação de Fenton formando o radical hidroxila (Babior, 1997), como mostrado, respectivamente, abaixo:



Acredita-se que a membrana mitocondrial, considerada a maior fonte de  $O_2^{\bullet -}$ , é impermeável ao mesmo (Boveris, 1998). Porém, o  $O_2^{\bullet -}$  é dismutado pela SOD para  $H_2O_2$  que

atravessa membranas com facilidade por ser uma molécula neutra (Halliwell & Gutteridge, 2000). Desta forma, o principal determinante da toxicidade do superóxido às células é a disponibilidade e a localização de íons metálicos que possam catalisar a formação de radical hidroxila (Felippe & Percáio, 1991).

A exposição das células ao radical superóxido gera danos ao DNA, as proteínas e aos lipídios (Halliwell & Chirico, 1993).

#### 2.1.2.2 Radical hidroxila (OH\*)

O radical hidroxila, extremamente lesivo para as células, é cerca de  $10^{14}$  vezes mais reativo do que o íon hidroxila (Felippe & Percáio 1991). A capacidade deste radical em lesar as células é superior aos demais ERO já que o organismo não dispõe de um sistema enzimático de defesa contra o radical hidroxila (Halliwell & Gutteridge, 2000).

O radical OH\* é produzida pela reação de Haber-Weiss/Fenton. Após a formação do OH\*, este reage imediatamente com qualquer molécula biológica como: carboidratos, aminoácidos, fosfolipídios e bases do DNA, produzindo radicais secundários de reatividade variável. Alguns dos radicais lipídicos formados a partir do radical hidroxila são mais instáveis e mais reativos do que os próprios radicais hidroxila (Halliwell & Gutteridge, 2000).

#### 2.1.2.3 Oxigênio singlete (O<sub>2</sub>' )

O oxigênio singlete é gerado a partir do oxigênio molecular por ganho de energia. Esta espécie pode ser formada em várias reações radicalares e iniciar outras delas, por isso vem sendo muito estudado. O oxigênio singlete difere do oxigênio no estado molecular porque não apresenta restrição na transferência de elétrons, sendo altamente reativo (Beckman & Ames, 1998; Halliwell & Gutteridge, 2000).

O O<sub>2</sub>' causa danos às proteínas devido a oxidação de grupos essenciais de aminoácidos, principalmente do triptofano, metionina, histidina e resíduos de cisteína (Halliwell & Gutteridge, 2000). O O<sub>2</sub>' também é responsável por dar início à peroxidação lipídica, produzindo novos radicais peroxil e alcóxil.

#### 2.1.3 Agentes Estressores

Como já descrito, vários agentes químicos e físicos podem gerar ERO, como por exemplo, o fumo, radiação, stresse, etc. No entanto, com o objetivo de estudar os efeitos oxidantes e antioxidantes em células eucarióticas e procarióticas, alguns compostos capazes

de gerar ERO vem sendo utilizados (Henriques et al., 2001). Entre eles estão a apomorfina e o paraquat.

#### 2.1.3.1 Apomorfina

O alcalóide isoquinolínico apomorfina (5,6,6a,7-tetra-hidro-6 metil 4-H dibenzoquinolina-10-11-diol) é capaz de lesar as células devido à formação de espécies reativas de oxigênio bastante estáveis, como as quinonas e semiquinonas e radical superóxido (Blum et al., 2000).

#### 2.1.3.2 Paraquat

Os danos causados pelo herbicida paraquat (1,1-dimetil-4,4'-bipiridina) 'in vivo' e em células isoladas dependem da reação do paraquat com o  $O_2$ . A redução do paraquat pela presença de NADPH gera o cátion radical paraquat ( $PQ^{*\cdot}$ ) que estimula a peroxidação lipídica. O radical formado pode se complexar com o ferro, reduzindo-o, ou reagir com o  $O_2$  para formar  $O_2^{*\cdot}$ . O balanço entre as reações do paraquat que geram ferro reduzido ou radical peróxido depende da concentração de  $O_2$  no sistema. A alta taxa de  $O_2$  favorece a formação de superóxido (Halliwell, 1987).

A habilidade do paraquat de causar peroxidação lipídica e dano ao DNA são potencializados por adição de sais de ferro. Isso sugere que o radical  $OH^*$  também esteja envolvido na toxicidade do paraquat (Halliwell & Gutteridge, 2000).

#### 2.1.4 Danos causados pelas Espécies Reativas do Oxigênio

Embora as ERO desempenhem um papel fundamental no organismo, como por exemplo, na fagocitose, o interesse maior está no estudo dos seus efeitos nocivos. Quando há um desequilíbrio entre as ERO e os compostos antioxidantes do organismo, pode ocorrer o ataque das ERO aos mais diversos componentes biológicos gerando várias alterações teciduais que estão implicadas em inúmeros processos patológicos, como por exemplo: câncer, processos isquêmicos, demência senil, diabetes, enfermidades pulmonares e pancreáticas, cirrose, esclerose múltipla, artrite reumatóide, aterosclerose, doenças cardiovasculares e enfermidades do sistema nervoso central (Vicedo & Correias, 1997).

O mecanismo pelo qual as ERO lesam as células é bastante complexo. Pela sua alta reatividade e a própria capacidade de aceitar elétrons estes compostos modificam a estrutura e/ou função das moléculas alvo. Os alvos endógenos destes oxidantes são principalmente

quatro classes de macromoléculas biológicas: lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos e proteínas (Beckman & Ames, 1998).

Os ácidos graxos poliinsaturados são mais sensíveis a oxidação devido ao maior número de duplas ligações. O dano causado pelas ERO aos lipídios poliinsaturados é o mais estudado e conhecido e é chamado peroxidação lipídica (Halliwell & Chirico, 1993).

Na presença de ERO os lipídios insaturados reagem com o oxigênio para produzir radicais alquila e peroxila que se propagam por uma cadeia de radicais livres e formam hidroperóxidos como produtos primários. Esse processo é comumente descrito em termos de iniciação, propagação e terminação (Adegoke et al., 1998).

A etapa de iniciação pode ocorrer pela presença de metal catalisador, altas temperaturas, exposição à luz e oxigênio ou pela ação de hidroperóxidos. A peroxidação lipídica resulta em uma mistura complexa de hidroperóxidos e produtos secundários de oxidação, incluindo peróxidos cíclicos. Estes produtos podem interagir com proteínas, membranas e enzimas, resultando em efeitos indesejáveis para célula (Slater, 1984). O malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica, mostrou-se mutagênico para linhagens de *Salmonella thyphimurium* no teste Salmonella/microsoma (teste de Ames) (Maron & Ames, 1983).

A peroxidação lipídica pode ocorrer em alimentos gordurosos (Stevenson et al., 1984), e em sistemas biológicos (Adegoke et al., 1998). A oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados em alimentos tem recebido muita atenção, já que resulta em redução do tempo de vida de prateleira, na perda da qualidade e na alteração dos valores nutricionais dos alimentos (Zambizi, 1999).

Em sistemas biológicos a peroxidação lipídica ocorre principalmente em membranas, onde o conteúdo de ácidos graxos insaturados é relativamente alto (Adegoke et al., 1998).

### 2.1.5 Mecanismos Antioxidantes

De um modo geral, os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos.

O organismo dispõe de um sistema celular de defesa contra as ERO que são produzidas na cadeia respiratória. São as chamadas defesas antioxidantes primárias, que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). A enzima superóxido dismutase é responsável por catalisar a reação de radicais superóxido com formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser eliminado por ação de outras enzimas como a catalase e a glutatona peroxidase (Eaton,

1991). Existem duas formas da SOD: um dímero que contém cobre e zinco (CuZn SOD) que se encontra no citosol e na matriz, e um tetrâmero que contém manganês (Mn SOD) que se encontra predominantemente na matriz (Halliwell, 1996).

A glutathiona peroxidase tem ação não específica sobre peróxido de hidrogênio e pode eliminar também peróxidos orgânicos através de uma reação que necessita de glutathiona (GSH) como fonte de equivalentes redutores (Halliwell & Gutteridge, 2000).

A catalase é a enzima responsável por inativar o  $H_2O_2$ . Nesta reação uma das duas moléculas de peróxido de hidrogênio é oxidada a hidrogênio molecular, e a segunda é reduzida a água.

Especificamente, na levedura *S. cerevisiae* encontram-se duas enzimas superóxido dismutases : a SodCuZn (codificada por SOD 1), que se localiza no citoplasma e é um homodímero com um  $Cu^{2+}$  e um  $Zn^{2+}$  (Steinman, 1980); e a SodMn, que é codificada no núcleo pelo gene SOD2. Duas catalases, uma citosólica e uma peroxissomal codificadas pelos genes CTT1 e CTA1, respectivamente, também foram identificadas. No decorrer do projeto de sequenciamento do genoma da levedura *S. cerevisiae*, foram identificados três genes que codificam para prováveis GPx, corroborando dados anteriores que encontraram atividade de glutathiona peroxidase neste organismo. Também estão presentes na levedura *S. cerevisiae* os genes necessários para sintetizar glutathiona (Inoue et al., 1998).

Os antioxidantes não enzimáticos podem ser definidos como quaisquer substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, comparadas as de um agente oxidante, são capazes de prevenir a oxidação do substrato (Halliwell & Gutteridge, 2000).

De acordo com seu mecanismo de ação os antioxidantes podem ser classificados como terminadores de radicais livres (reagem com radicais livres interrompendo a propagação da cascata de reações); como varredores de oxigênio (desativam o oxigênio singlete que pode iniciar uma nova cadeia de propagação de radicais livres); ou como quelantes de íons metálicos capazes de catalisar a peroxidação lipídica (Sánchez-Moreno et al., 1999).

Atualmente a utilização de antioxidantes, principalmente não enzimáticos, estende-se aos mais diferentes produtos, como alimentos, cosméticos e medicamentos.

Em alimentos, os antioxidantes são utilizados com a finalidade de retardar as reações químicas e transformações ocorridas durante o armazenamento, de modo a permitir o consumo por longos períodos de tempo. O uso intencional de antioxidantes nos alimentos é justificado quando estes melhoram a sanidade do produto, são comprovadamente não tóxicos aos níveis consumidos e não apresentam efeito cumulativo (Shahidi, 2000).

Em cosméticos, os antioxidantes aumentam a duração do produto, auxiliam na proteção contra os danos causados pela radiação ultra-violeta e combatem os danos causados pelos radicais livres evitando ou diminuindo a destruição tissular (Zulli et al.,2000).

Os antioxidantes sintéticos são mais baratos, de boa qualidade e apresentam grande atividade antioxidante. No entanto, em doses elevadas podem interferir com a saúde do consumidor (Sortwell, 1995). Atualmente, o seu uso vem sendo bastante discutido e há várias pesquisas para verificar as suas vantagens e desvantagens em relação a saúde do consumidor (Shahidi & Wanasundara, 1992). O butil-hidroxitolueno (BHT) e o propilgalato (PG) são exemplos de antioxidantes sintéticos.

Por outro lado, o uso de antioxidantes naturais para melhorar a estabilidade oxidativa dos produtos tem recebido atenção especial, já que, cada vez mais, tem-se evitado o uso de produtos que contenham aditivos sintéticos (Frankel, 1993).

Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para obter uma medição, seja qualitativa ou quantitativa, da capacidade antioxidante de compostos, tanto através de testes sem a utilização de células (testes químicos) ou utilizando culturas celulares (testes biológicos).

O fato de a levedura *Saccharomices cerevisiae* ser um dos microorganismos mais estudados do ponto de vista genético e metabólico, fez com que ela se tornasse em um dos microorganismos mais utilizados em testes biológicos (Henriques et al., 2001). Desta forma, testes em células eucarióticas da levedura *Saccharomices cerevisiae*, assumem um importante papel na verificação da capacidade antioxidante de compostos naturais, como a erva-mate.

## **2.2 – Atividade Antioxidante *in vitro*:**

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro, envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo, abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (Namiki, 1990, Simic & Javanovic, 1994, Soares, 2002).

Radicais livres estão envolvidos na propagação da oxidação lipídica, e muitas outras espécies de radicais de diferentes reatividades são formadas. Radicais relativamente estáveis (DPPH, ABTS, etc.) são freqüentemente preferidos em ensaios de atividade seqüestrante de radicais. Estes radicais têm sido muito utilizados em estudo de compostos simples, extratos de plantas e alimentos (Koleva et al., 2002).



### 2.2.1 Propriedades Antioxidantes do Extrato Aquoso de *Ilex paraguariensis*

Schinella et al. (2000) investigou as propriedades antioxidantes de um extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e, usando sistemas geradores de radical-livre, verificou que o extrato inibiu a peroxidação lipídica enzimática e não enzimática em microsomas hepáticos de ratos, dependente de concentração, com valores de IC<sub>50</sub> (concentração na qual ocorre 50% de inibição da oxidação lipídica) de 18 µg/mL e 28 µg/mL, respectivamente. O extrato, ainda, inibiu a peroxidação de membranas de células vermelhas sanguíneas (eritrócitos) induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com um IC<sub>50</sub> de 100 µg/mL e exibiu propriedades seqüestrante de radicais para ânion superóxido (IC<sub>50</sub> = 15 µg/mL) e radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

A atividade antioxidante de infusão a base de erva-mate observada nos diferentes trabalhos mostra-se importante independente da metodologia analítica empregada ou da origem da erva-mate. Conhecer a composição quantitativa e qualitativa dos compostos bioativos presentes em bebidas a base de erva-mate e a educação para o seu consumo pode trazer benefícios à população (Bastos & Torres, 2003).

As recentes descobertas sobre os mecanismos de oxidação que ocorrem nas células, responsáveis por uma série de condições patológicas como aterosclerose, câncer e diabetes estimularam o aparecimento de grande número de pesquisas sobre a ação de substâncias antioxidantes, presentes naturalmente em alguns alimentos, as quais seriam capazes de agir como protetoras dos organismos vivos frente a esse processo de oxidação. Produtos naturais contendo compostos fenólicos e condimentos têm sido objeto dessas pesquisas. (Chipault et al., 1952; Weisburger, 1999; Karakaya et al., 2001, Thomas, 2000; Soares, 2002; Mancini-Filho & Moreira, 2003).

Gugliucci & Menini (2003) relataram a prevenção da inibição de plasminogênio e antitrombina I induzidos por metilglicoxal por extrato (infusão) de erva-mate. Esse processo (inibição de plasminogênio e antitrombina) está relacionado com complicações vasculares decorrentes de diabetes desencadeadas pela reação de Amadori que resultam de dicarbonilas como a deoxiglicoxona, metilglicoxal e glicoxal por processos oxidativos. Gorzalczany et al. (2001) avaliaram o efeito colerético e a propulsão intestinal após a ingestão de mate e os resultados confirmam a atividade hepatoprotetora e digestiva atribuída a essa bebida.

Baisch et al. (1998) verificaram o efeito vasodilatador de infusões de erva-mate em ratos e sugerem que essas bebidas contêm compostos que podem causar vasorelaxamento endotélio-dependente.

### 2.2.2 Antioxidantes na indústria de alimentos

O emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto a sua inocuidade-toxicidade. Atualmente, as pesquisas tem-se direcionado no sentido de encontrar compostos naturais que exibam esta propriedade funcional, os quais, poderão substituir os sintéticos ou realizar associações com estes, com o intuito de diminuir a sua quantidade nos alimentos. Dentre os compostos fenólicos bioativos (chamados fitoquímicos) naturalmente presentes nos vegetais, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos e o tocoferol que podem atuar como agentes redutores, seqüestradores de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete e/ou exibir, simultaneamente, mais de uma dessas funções. Estes compostos apresentam atividade antioxidante diferenciada em função do substrato lipídico em que atuam e das características químicas inerentes a cada um deles (Melo & Guerra, 2002). Esta ação pode ser desenvolvida como aceptores de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia provocada por estes radicais livres, além da atuação nos processos oxidativos catalizados por metais, tanto *in vitro*, como *in vivo* (Cintra & Mancini Filho, 1996; Williamson et al., 1998 e Soares, 2002).

Em paralelo, é aceito que a maior ingestão de frutas e legumes pode ajudar prevenir a ocorrência de várias patologias (Hertog et al., 1995). A possibilidade que os antioxidantes presentes na dieta humana possam ser responsáveis por tais efeitos benéficos, tem incentivado uma quantidade significativa de pesquisas, buscando verificar o conteúdo de antioxidantes, o efeito em vários alimentos e bebidas (Frankel, 1993; Vinson et al., 1995), assim como os mecanismos responsáveis por tais efeitos (Lotito & Fraga, 1999).

### 2.2.3 Fitoquímicos, quimioprotetores e nutracêuticos

De acordo com Harris & Haggerty (1993), o termo "fitoquímicos" engloba muitos compostos químicos encontrados em plantas com diversas atividades, e os termos "nutracêutico" (Ulbricht, 1993) ou "quimioprotetores", descrevem praticamente o mesmo ou similar fenômeno, ou seja, uma substância que pode ser considerada um alimento ou parte de um alimento, que proporciona efeitos benéficos à saúde, prevenindo o surgimento de algumas doenças crônicas (como câncer e desordens cardiovasculares). O termo nutracêutico, inclui ainda o "tratamento ou cura de doenças" (Pszczola, 1992; Labell, 1993; Fuleki, 1993). Todavia, o termo quimioprotetores é o mais frequentemente usado na literatura científica atual e é uma estratégia clínica para bloquear ou reverter a carcinogênese, antes do desenvolvimento do câncer invasivo (Lippman et al., 1994; Stavric, 1994).

#### 2.2.4 Compostos fenólicos e flavonóides

Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando uma série de dificuldades, devido a diversidade de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas), a grande polaridade e reatividade, e a susceptibilidade à ação de enzimas (Soares, 2002).

Para Namiki (1990), Melo & Guerra (2002), a propriedade antioxidante de especiarias e de outros vegetais, se deve, principalmente, a seus compostos fenólicos. A maioria destes compostos, com exceção do tocoferol, possuem grupos funcionais ativos na posição *orto*, enquanto que nos antioxidantes sintéticos, com exceção dos galatos, esses grupos encontram-se na posição *para*, sem que haja mudança na sua ação.

A presença dos compostos fenólicos em plantas tem sido estudada por diversos autores, em razão da sua participação em processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma de vários alimentos, da atividade farmacológica e nutricional, e da capacidade para inibir a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (Peleg et al., 1998).

A erva-mate apresenta altas concentrações de ácidos clorogênicos e de flavonóides, que passam para a bebida durante o processo de infusão da erva (Bastos & Torres, 2003).

Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por apresentarem um anel benzênico, um grupamento carboxílico, um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, o que lhe confere propriedades antioxidantes, tanto para os alimentos como para o organismo, e por isso, recomendados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e de outras doenças (Ferguson & Harris, 1999).

Os flavonóides possuem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6, sendo os compostos de maior diversificação do reino vegetal. Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor freqüência, as auronas, chalconas e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (Soares, 2002). O estudo das propriedades sequestrantes de radicais livres, em termos de flavonóides, tem permitido a sua caracterização como um antioxidante de ocorrência natural (Rice-Evans et al., 1997). A avaliação *in vitro* e *in vivo* de flavonóides, tem demonstrado a existência de propriedades antioxidantes e antimutagênicas, assim como, sua capacidade de reduzir o risco de doenças cardiovasculares e apoplexia (Peterson & Dwyer, 1998).

De um modo geral, os flavonóides realizam a inibição da fase I das enzimas que ativam a carcinogênese, a proliferação de células cancerígenas, a formação de estrogênio do tipo II que está envolvido com a regulação do crescimento celular, e a genotoxicidade das radiações gama, bem como, a formação de DNA defeituoso quando submetido a exposição de benzopireno (Peterson & Dwyer, 1998). Entre os flavonóides, a quercetina é o composto mais comumente estudado.

O chá preto e o verde (*Camellia sinensis*), contrariamente às informações da década passada, eram considerados mutagênicos em testes específicos de mutagenicidade com *Salmonella*; entretanto, atualmente, em testes mais específicos, existe a evidência que não somente antimutagênicos, mas também anticarcinogênicos, particularmente o chá verde. Um número de pesquisadores tem identificado a Epigalo-Catequina Galato (EGCG) como o principal componente antimutagênico e anticarcinogênico do chá verde (Katiyar et al., 1992; Yang & Wang, 1993). Chen, & Ho (1997) e Nishida et al. (1994) verificaram em vários sistemas biológicos, que os polifenóis extraídos do chá verde apresentavam efeitos anticarcinogênicos. A EGCG no chá verde, mostrou atividade anticarcinogênica no estágio de iniciação do tumor e na formação de danos no DNA, tal como, no seqüestro de radicais livres e no aumento da atividade antioxidante (Stavric, 1994).

Os efeitos benéficos da bebida chá em relação ao colesterol plasmático, lipídios plasmáticos, e pressão sanguínea foram encontrados em dois estudos em seres humanos, um no Japão e o outro na Noruega (Kono et al., 1997). Stavric (1994), reportou que a ingestão simultânea de chá com produtos alimentícios proporcionou uma nitrosação no interior do estômago de humanos, com efeitos benéficos.

Ramarathnam et al. (1995) observaram em estudos com ratos, os efeitos benéficos de componentes do chá verde, principalmente as catequinas, tanto na inibição e iniciação do câncer, quanto na supressão do crescimento de células tumorais. Chá verde também tem efeitos benéficos na regulação dos níveis de colesterol sanguíneo. Um rápido aumento nos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi observado no plasma sanguíneo de ratos alimentados com dieta rica em gordura, enquanto que, os ratos alimentados com a mesma dieta suplementada com 1% de catequinas, o principal antioxidante do chá verde, notavelmente reduziu os níveis de colesterol LDL. As catequinas de chá verde, acredita-se ainda, que regulam a pressão sanguínea e podem ajudar a diminuir os níveis de glicose sanguínea.

### 2.2.5 Erva-mate e Câncer

A literatura científica internacional mostra os resultados de pesquisas e revisões que procuram consolidar o benefício de consumir infusões de *Camellia sinensis*, produto popularmente consumido no Brasil como chá preto e em menor proporção como chá verde. Esses trabalhos mostram que bebidas a base dessa planta, ricas em compostos fenólicos, promovem a saúde e previnem doenças (Hertog et al., 1995).

Ao contrário do acima exposto, a literatura científica internacional apresenta várias pesquisas que visam identificar se há uma relação entre o consumo de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na forma de chimarrão, isto é, infusão da erva com água quente servida em cuias e sugada com o auxílio de uma bomba de metal, com a alta incidência de câncer de esôfago observada em populações que tradicionalmente consomem essa bebida, notadamente o Brasil, Uruguai e Argentina. Ao lado desses trabalhos que indicam os possíveis malefícios do consumo do chimarrão, outros trabalhos apontam para os benefícios de bebidas a base de erva-mate em função de seu alto conteúdo em ácidos fenólicos (Bastos & Torres, 2003).

A incidência de câncer de esôfago é grande nas regiões em que as pessoas consomem erva-mate na forma de chimarrão. O coeficiente padronizado de mortalidade de câncer de esôfago no Rio Grande do Sul é de 14,3/100.000 habitantes entre os homens e 4,2/100.000 habitantes entre as mulheres. Países como o Uruguai e a Argentina também são áreas de alta mortalidade devido ao câncer de esôfago quando comparadas com os dados da Organização Mundial de Saúde. Na Europa e na América do Norte essas taxas são menores do que 6/100.000 habitantes para os homens e 3/100.000 habitantes para as mulheres (Barros et al., 2000). Segundo Pinto et al. (1994) o consumo de chimarrão, independente de outros fatores de risco como consumo de álcool e fumo, responde por cerca de 20% dos casos de câncer de esôfago ocorridos na região Sul e Sudeste da América do Sul.

Alguns estudos sugerem que a alta temperatura em que a bebida é ingerida que pode atingir valores superiores a 60°C em algumas localidades no Sul do Brasil, seria o único fator de risco (Barros et al., 2000; Muñoz et al., 1987), enquanto outros sugerem que substâncias presentes na infusão de erva-mate são potencialmente carcinogênicas ou potencializam a ação da lesão causada pelo consumo freqüente de grandes volumes de chimarrão, cujo consumo médio, per capita é de 1,26 litros/dia em algumas localidades, podendo chegar até 6 L (Barros et al., 2000).

Vassalo et al. (1985) estudaram a associação do hábito da população em consumir chimarrão com a incidência de câncer de esôfago no Uruguai entre os anos de 1979- 1984. Foram controlados outros fatores de risco como o consumo de álcool e o hábito de fumar.

Observou-se que a ingestão de álcool e o fumo apresentaram grande influência no desenvolvimento dessa enfermidade em homens, o que não foi observado para mulheres. O consumo de chimarrão (em quantidade e frequência) apresentou efeito significativo de forma independente com razão de chances de 6,5 e 346. Os autores sugerem que produtos do processamento seriam responsáveis pelo desenvolvimento dessa enfermidade, ao lado do efeito da alta temperatura de ingestão do chimarrão. Em trabalho mais recente, verificou-se a presença de altos teores de compostos carcinogênicos, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, que contaminam a erva-mate durante o seu processamento, em que se utiliza a queima de madeira nas etapas de sapeco e secagem (Camargo & Toledo, 2002). A presença desses compostos, que são contaminantes, e não os compostos fenólicos naturalmente presentes, poderiam ser coadjuvante no processo da doença.

De Stefani et al. (1991) concluíram, após analisar dados de 111 incidentes de câncer de bexiga no Uruguai, contra 222 controles, que o efeito combinado do uso de tabaco negro e a ingestão de mate respondem pelo alto índice de mortalidade observado naquele país por esse tipo de câncer.

A erva-mate é consumida sob outras formas, como o tererê que constitui a bebida obtida pela maceração da erva em água fria ou gelada, forma como é ingerida, principalmente na região Centro-Oeste do Brasil ou ainda sob a forma de chá mate, sendo essa bebida produzida a partir da infusão da erva-mate que sofreu processo de torrefação e, cuja temperatura de ingestão, frequência e volume ingeridos são menores relativamente do que aqueles do chimarrão. A maior parte da erva-mate produzida na América do Sul destina-se ao consumo na forma de chimarrão, no entanto, o mercado para bebidas a base de chá-mate tem crescido a cada ano, seja pelos benefícios à saúde que começam a ser veiculados pela mídia, seja pelo lançamento de novos produtos com maior aceitação pelo público, como as bebidas prontas para beber aromatizadas com aroma natural de frutas (maçã, pêssego). A Alemanha é um grande importador da erva-mate produzida no Brasil, a qual é vendida como chá medicinal (Bastos & Torres, 2003).

O consumo de bebidas a base de erva-mate remonta de centenas de anos e sua utilização na medicina popular e por herboristas é recomendada para artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de líquido, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas. As xantinas cafeína, teobromina, teofina e os compostos fenólicos como ácido clorogênico, ácido cafeico e flavonóides são responsáveis por vários dos efeitos farmacológicos citados (Bastos & Torres, 2003).

Um problema freqüentemente enfrentado pela indústria da erva-mate é a adulteração da erva mate (*Ilex paraguariensis*) com outras espécies do gênero *Ilex* que apresentam reduzido ou nenhum teor de compostos com ação farmacológica, como as xantinas e os ácidos fenólicos. Um outro aspecto que merece atenção relaciona-se ao processamento da erva-mate, especificamente na etapa de sapeco realizada para diminuir o teor de água das folhas e inativar enzimas e depois na secagem, momentos em que se utiliza calor proveniente da queima de madeira que pode contaminar o material com compostos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Camargo & Toledo, 2002). A substituição da madeira por gás liquefeito de petróleo ou gás natural é uma alternativa tecnologicamente viável, porém diminui a qualidade sensorial da erva-mate (Bastos & Torres, 2003).

### **2.3 – Ervais nativos e reflorestados:**

A erva-mate pode ser produzida em dois sistemas distintos: os ervais reflorestados e os ervais nativos. Além dessa variação, os ervais reflorestados diferem entre si em função do espaçamento de plantio adotado e/ou da presença de culturas agrícolas intercaladas. Enquanto isso, os ervais nativos podem estar em diferentes graus de sombreamento/mistura com árvores da floresta original, inclusive reduzidos a ervais isolados em áreas agrícolas mecanizadas, ou em pastagens. A exploração pode ser de poucos anos à um século, originando efeitos diferenciados no vigor das erveiras e na resposta a tratamentos agrônômicos (Carpanezzi, 1995).

O mercado de erva-mate é bastante restrito a região sul do Brasil, sua produção é basicamente proveniente do extrativismo. Portanto, torna-se fundamental estabelecer uma política de manejo sustentável para os ervais nativos. Esta política deve ser adequada a realidade social, ecológica, cultural e econômica de cada região (Deser, 2002).

Para prevenir riscos sanitários, garantir padrões de qualidade e preservar as áreas com erva-mate, a atual legislação pertinente para processamento industrial e comercialização, normatiza desde a área produtiva até atingir o consumidor final, sendo determinada pelo Ministério da Saúde, Ministério da Fazenda, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (Carpanezzi, 1995).

### **3. ARTIGOS CIENTÍFICOS**



### 3.1 ARTIGO 1

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDATIVA DA ERVA-MATE EM SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**Liana Pedrolo Canterle<sup>1\*</sup>, Marta Weber do Canto<sup>1</sup>, Luísa H. R. Hecktheuer<sup>1</sup>, Nívia Maria Streit<sup>1</sup>, Ariane Schmidt Furtado<sup>1</sup>, Viviane Durigon<sup>1</sup>**

Submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas

---

\* Correspondência: L. P. Canterle. Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos. Bioquímico-Farmacêutica – Aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFSM. Camobi, Km 9, Cep 97105-900 – Prédio 42, SM, RS, BR. – e-mail: [lianapc@smail.ufsm.br](mailto:lianapc@smail.ufsm.br)

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Maria

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ERVA-MATE EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Liana Pedrolo Canterle<sup>1\*</sup>, Marta Weber do Canto<sup>1</sup>, Luísa H. R. Hecktheuer<sup>1</sup>, Nívia Maria Streit<sup>1</sup>, Ariane Schmidt Furtado<sup>1</sup>, Viviane Durigon<sup>1</sup>

### RESUMO

Antioxidantes são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos óxido-redutivos desencadeados pelos radicais livres, impedindo ou diminuindo, desta forma, os danos gerados por eles, sendo largamente empregados em alimentos, medicamentos e cosméticos, e mais recentemente, estão sendo usados também em terapias antioxidantes em doenças nas quais os radicais livres estão implicados. Este trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade antioxidante do produto erva-mate tipo chimarrão através de testes biológicos. O estudo biológico foi realizado em células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com as amostras de erva-mate em presença dos agentes estressores apomorfina e paraquat durante o metabolismo aeróbico, onde ocorre a multiplicação celular. Os resultados obtidos indicam que a capacidade antioxidante das amostras varia significativamente em função do tipo e concentração do agente estressor utilizado, das concentrações das amostras, do tipo de erval (nativo ou reflorestado) e do estado produtor (RS e SC). Entre os estados, o RS apresentou maior efeito antioxidante, onde ervais reflorestados foram mais eficientes como protetores celular, o contrário ocorreu no estado de SC. Concluiu-se com este trabalho que a erva-mate, ingerida na forma de chimarrão, possui realmente um ótimo efeito antioxidante em sistemas vivos, o que é proporcional à sua concentração.

**UNITERMOS:** *Ilex paraguariensis*, atividade antioxidante, ensaio biológico, leveduras, estressor.

### ABSTRACT

Antioxidants are composites that work as blockers of the oxide-reducers processes unchained by the free radicals, impeding the damages generated by them, being widely used in food, medicines and cosmetics, and recently, they are also being used in antioxidant therapies in diseases where free radicals are implicated. This work has as objective to evaluate the antioxidant capacity of the product yerba-mate “chimarrão” type through biological and chemical assays. The biological study was accomplished in cells eucariotics of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast treated with the mate samples in presence of apomorphine and paraquat dichloride stress agents during the aerobic metabolism, where it happens the cellular multiplication. The obtained results indicate that the antioxidant capacity of the samples varies significantly in function of the type and the concentration of stressor agent used, the concentrations of the samples, the mate type (native or cultivated) and the producing state (RS and SC). Between the states, RS state presented higher antioxidant effect, where reforested mate was more efficient as cellular protectors, the opposite happened in SC state. It was concluded with this work that yerba-mate, injected in the “chimarrão” form, really has a great antioxidant effect in alive systems, that is proportional to its concentration.

**KEYWORDS:** *Ilex paraguariensis*, antioxidant activity, biological assay, yeasts, stressor.

## 1. INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate, é uma espécie nativa da América do Sul e tem sua área de ocorrência natural restrita a 3 países: Brasil, Paraguai e Argentina. No Brasil, está dispersa principalmente nos Estados do Paraná (PR), Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS), Mato Grosso do Sul

---

\* Correspondência: L. P. Canterle. Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos. Bioquímico-Farmacêutica – Aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFSM. Camobi, Km 9, Cep 97105-900 – Prédio 42, SM, RS, BR. – e-mail: lianapc@smail.ufsm.br

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Maria

(MS), São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG). O RS, na década de 70, foi o maior produtor brasileiro, respondendo por 50% da produção, mas atualmente sua participação fica em torno de 25% (WINGE *et al.*, 1995).

No sul do país a grande parte da matéria-prima provém de ervais nativos. No Estado de SC, existem aproximadamente 19.000 propriedades rurais envolvidas com a atividade da erva-mate. Concentram-se principalmente nas regiões oeste e norte do estado. A erva-mate ocorre em cerca de 80% no estado nativo e, 20% em áreas plantadas (MAZUCHOWSKI *et al.*, 1996). É uma cultura caracterizada como de pequena propriedade, com emprego de mão de obra familiar, sem o uso da tecnologia preconizada pela empresa. No estado do RS, aproximadamente 70 % da área total coberta pela cultura no Estado, referem-se a ervais nativos remanescentes e os 30% restantes a áreas de plantios.

As partes aéreas desta planta são usadas para preparar um chá como bebida, o mate. O mate é consumido como duas infusões diferentes: uma é preparada pela adição simples de água fervida ao material seco da planta; e a outra é preparada por adições repetidas de água fervente. Ambas as preparações permitem a extração quase completa dos componentes solúveis em água. Na América do Sul, aproximadamente 30% da população bebe mais que 1 litro/dia desta bebida. A *Ilex paraguariensis* também é usada na medicina popular para o tratamento de artrites, digestão lenta, doença no fígado, dor de cabeça, reumatismo, e obesidade, entre outros (FILIP *et al.*, 2000).

De acordo com o Projeto Plataforma Tecnológica da Erva-Mate do Paraná (2000) (PADCT ERVA-MATE), a erva-mate, quando comparada com outros tipos de plantas e/ou produtos industrializados, é um produto centenário que se encontra em fase embrionária de descobertas, principalmente, em termos dos seus usos industriais, a nível internacional. Para CAMPOS (1996), o desenvolvimento tecnológico da erva-mate e derivados requer investimentos em pesquisa, para a modernização e otimização dos processos de produção, para a busca de uma maior qualidade e diversificação de produtos, para que desta forma, possa ocorrer a busca de novos mercados, nacionais e internacionais.

Segundo publicação de ZERO HORA, de setembro/2004, o chimarrão é designado como “Amargo e saudável”, e ainda diz que estudos constataram que a erva-mate exerce efeito protetor sobre as células da seguinte maneira: “o organismo humano está exposto ao que os cientistas chamam de estresse oxidativo, um processo que danifica as células e pode levá-las à morte prematura. Esse processo é provocado pelos radicais livres, que são produzidos pelas próprias células quando protegem o corpo de infecções e substâncias tóxicas. Pesquisadores associam o estresse oxidativo, em parte, ao envelhecimento e ao surgimento de doenças crônicas como diabetes, aterosclerose e Alzheimer. O estudo demonstrou que a erva-mate é um potente inibidor desse processo oxidativo. Os efeitos foram testados em células humanas dos vasos sanguíneos e, para confirmar, com células de rato, epiteliais e glóbulos brancos”. A pesquisa enfoca também alguns cuidados que devem ser observados ao tomar o chimarrão, como evitar tomar chimarrão com água muito quente.

Para KROON & WILLIAMSON (1999) e MELO & GUERRA (2002), nos últimos 20 anos houve um incremento de pesquisas na busca de determinados tipos de alimentos que possuíssem substâncias biologicamente ativas que trouxessem benefícios à saúde ou efeitos fisiológicos desejáveis (PARK *et al.*, 1997), e com isso um estilo de vida mais saudável. Neste contexto, inserem-se os antioxidantes, porque os mesmos podem retardar o dano oxidativo de tecidos aumentando suas defesas naturais (TSUDA *et al.*, 1998).

FILIP *et al* (2000) analisou a atividade antioxidante de plantas preparadas como mate. Observou que a *I. paraguariensis* apresentava uma maior atividade antioxidante que as outras *Ilex spp* consumidas na América do Sul, e que a mesma era preservada no mate, o que permitiu especular que o consumo regular desta bebida poderia contribuir para melhorar significativamente as defesas antioxidantes humanas. GUGLIUCCI & STAHL (1995) e GUGLIUCCI (1996) observaram que extratos de *I. paraguariensis* causaram uma diminuição na oxidação da lipoproteína humana de baixa-densidade (LDL), em ambos sistemas *in vitro* e *in vivo*. Para KONO *et al.* (1997), NARDINI *et al.* (1997) e KERRY & RICE-EVANS (1999), algumas das propriedades terapêuticas destas plantas são atribuídas ao alto conteúdo de derivados cafeoil, ácido caféico e seus derivados, pois os mesmos exibem propriedade antioxidante em sistemas biológicos e químicos. Todavia, necessita-se de um conhecimento mais aprofundado a respeito da propriedade antioxidante e/ou poder seqüestrante de radicais livres dos extratos de *Ilex paraguariensis* (SCHINELLA *et al*, 2000).

SCHINELLA *et al* (2000) investigaram as propriedades antioxidantes de um extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e, usando sistemas geradores de radical-livre, verificou que o extrato inibiu a peroxidação lipídica enzimática e não enzimática em microsomas hepáticos de ratos, dependente de concentração, com valores de IC<sub>50</sub> de 18 µg/mL e 28 µg/mL, respectivamente. O extrato, ainda, inibiu a peroxidação de membranas de células vermelhas sanguíneas (eritrócitos) induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com um IC<sub>50</sub> de 100 µg/mL e exibiu propriedades seqüestrante de radicais para ânion superóxido (IC<sub>50</sub> = 15 µg/mL) e radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil. Deste modo, concluiu que a ingestão de extratos de *Ilex paraguariensis* poderia ser um meio efetivo e econômico de suprir quantidades significativas de antioxidantes, aumentando as defesas do organismo humano contra o ataque de radicais livres.

Este trabalho visa fundamentalmente verificar a atividade antioxidante em sistemas biológicos do produto 'Erva-Mate Tipo Chimarrão' e a possível existência de diferenças regionais entre os principais estados produtores e consumidores desta bebida (RS e SC).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A oxidação lipídica, uma das principais causas de deterioração em alimentos, acarreta alterações profundas em sua qualidade, com implicações fisiopatológicas para os seres humanos. O interesse no emprego de antioxidantes de fontes naturais que aumentam a vida de prateleira dos alimentos está consideravelmente aumentado pela preferência dos consumidores por ingredientes naturais, e preocupações com os efeitos tóxicos dos antioxidantes sintéticos (SCHWARZ *et al*, 2001). A determinação da atividade antioxidante de produtos naturais teve início com CHIPAULT *et al.* (1952) em especiarias, ingredientes utilizados em alimentos desde os primórdios da história, não somente para melhorar ou ressaltar as características organolépticas dos alimentos, mas também, para preservá-los.

Antioxidantes, de acordo com a 'Food and Drug Administration' (FDA), são substâncias usadas para preservar alimentos através do retardo da deterioração, rancidez e descoloração decorrentes da autooxidação (ADEGOKE *et al*, 1998). No entanto, como a ação dos antioxidantes não se restringe apenas a inibição da peroxidação dos lipídios, mas também a

oxidação de outras moléculas, como proteínas, e DNA, dentre outras, pode-se definir antioxidantes, de modo mais amplo, como substâncias que em pequenas concentrações, em presença de substratos oxidáveis, retardam ou previnem significativamente a oxidação dos mesmos (HALLIWELL, 1996). Todavia, do ponto de vista químico, os antioxidantes são compostos aromáticos que contêm pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos [como o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT) largamente utilizados pela indústria de alimentos] ou naturais [substâncias bioativas, como compostos organosulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos] (KITTS, 1994). De acordo com RAJALAKSHMI & NARASIMHAN (1995), os antioxidantes não podem reverter o processo oxidativo e nem prevenir a rancidez hidrolítica.

O emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto a sua inocuidade-toxicidade. Atualmente, as pesquisas tem-se direcionado no sentido de encontrar compostos naturais que exibam esta propriedade funcional, os quais, poderão substituir os sintéticos ou realizar associações com estes, com o intuito de diminuir a sua quantidade nos alimentos. Dentre os compostos fenólicos bioativos (chamados fitoquímicos) naturalmente presentes nos vegetais, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos e o tocoferol que podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete e/ou exibir, simultaneamente, mais de uma dessas funções. Estes compostos apresentam atividade antioxidante diferenciada em função do substrato lipídico em que atuam e das características químicas inerentes a cada um deles (MELO & GUERRA, 2002). Esta ação pode ser desenvolvida como aceptores de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia provocada por estes radicais livres, além da atuação nos processos oxidativos catalizados por metais, tanto *in vitro*, como *in vivo* (CINTRA & MANCINI FILHO, 1996; WILLIAMSON *et al*, 1998 e SOARES, 2002).

No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres, moléculas ou fragmentos de moléculas que possuem elétrons livres, dito não pareados, em sua órbita externa. Os elétrons livres dessas moléculas as tornam quimicamente instáveis e, portanto, bastante reativas (CHEESEMAN & SLATER, 1996). Os radicais livres gerados *in vivo* reagem com o DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras (JACOB & BURRI, 1996), possivelmente por desestabilização das membranas (MORA *et al*, 1990), dano no DNA (TAKABE *et al*, 2001), e oxidação da lipoproteína de baixa-densidade (LDL). De acordo com RAMARATHNAM *et al* (1995), a autooxidação dos ácidos graxos insaturados que compõem a membrana celular, é apontada como o processo oxidativo de maior ocorrência no organismo humano (MELO & GUERRA, 2002). Assim como, espécies reativas de nitrogênio também parecem contribuir para patologias cardiovasculares. O peroxinitrito, um potente oxidante gerado pela reação do óxido nítrico com o íon superóxido no endotélio vascular, induz a oxidação do LDL (LEEUEWENBURGH *et al*, 1997) e a disfunção pró-inflamatória do miocárdio mediada por citoquinina (FERDINANDY *et al*, 2000; WANG *et al*, 2002). A nitrotirosina, um produto da nitração de proteína por espécies reativas de nitrogênio está presente em lesões ateroscleróticas humanas (BECKMANN *et al*, 1994). Devido a isso, a significância dos antioxidantes na dieta e o seu suposto

papel na intervenção e profilaxia de doenças cardiovasculares tem sido de interesse considerável em recentes anos (HEIM *et al*, 2002).

De acordo com HALLIWELL & GUTTERIDGE (1989), os radicais livres apresentam um papel importante no desenvolvimento de danos de tecido e eventos patológicos em organismos vivos. Em vida aeróbia, os lipídios que contêm ácidos graxos polinsaturados podem ser oxidados através de reações mediadas por radical livre. Quando o oxigênio é provido em excesso ou sua redução é insuficiente, espécies reativas de oxigênio (ERO) como ânions superóxido, radicais hidroxil e peróxido de hidrogênio, são gerados. Organismos aeróbios são protegidos da toxicidade do oxigênio por um sistema de defesa antioxidante natural que envolve mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (HALLIWELL, 1996). Se este sistema endógeno estiver inadequado para a finalidade de seqüestrar as espécies reativas de oxigênio, danos oxidativos a macromoléculas importantes poderão ocorrer (SCHINELLA *et al*, 2000).

Em paralelo, é aceito que a maior ingestão de frutas e legumes pode ajudar a prevenir a ocorrência de várias patologias (HERTOG *et al*, 1995). A possibilidade que os antioxidantes presentes na dieta humana possam ser responsáveis por tais efeitos benéficos, tem incentivado uma quantidade significativa de pesquisas, buscando verificar o conteúdo de antioxidantes, o efeito em vários alimentos e bebidas (VINSON *et al*, 1995), assim como, os mecanismos responsáveis por tais efeitos (LOTITO & FRAGA, 1999).

Para RICE-EVANS *et al*. (1997), atualmente, existe um interesse crescente em fitoquímicos como componentes bioativos de alimentos. O papel de frutas, vegetais e vinho tinto na prevenção de doenças tem sido atribuído em parte a propriedade antioxidante de seus constituintes polifenólicos. E muito destes, constituintes da dieta ou derivados de plantas, são antioxidantes mais efetivos *in vitro* que as vitaminas E e C, e desta forma, podendo contribuir significativamente para o efeito protetor *in vivo*.

De acordo com HARRIS & HAGGERTY (1993), o termo "fitoquímicos" engloba muitos compostos químicos encontrados em plantas com diversas atividades, e o termo "nutracêutico" (ULBRICHT, 1993) ou "quimioprotetores", descrevem praticamente o mesmo ou similar fenômeno, ou seja, uma substância que pode ser considerada um alimento ou parte de um alimento, que proporciona efeitos benéficos à saúde, prevenindo o surgimento de algumas doenças crônicas (como câncer e desordens cardiovasculares). O termo nutracêutico, inclui ainda o "tratamento ou cura de doenças" (FULEKI, 1993). Todavia, o termo quimioprotetores é o mais freqüentemente usado na literatura científica do presente (STAVRIC, 1994) e uma estratégia clínica para bloquear ou reverter a carcinogênese, antes do desenvolvimento do câncer invasivo (LIPPMAN *et al*, 1994; STAVRIC, 1994).

### **Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio**

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um elétron não pareado na última camada eletrônica, o que lhes confere alta reatividade e instabilidade. Quando em excesso, podem provocar lesões oxidativas em moléculas de proteínas, carboidratos, lipídios e também no material genético celular. Com o objetivo de impedir/diminuir a ocorrência

destes danos são empregados compostos antioxidantes que agem seqüestrando os radicais livres formados, quelando íons metálicos, ou ainda, inativando peróxidos capazes de gerar radicais livres.

O termo radical livre existe desde os primórdios da química de Lavoisier, onde foi usado para designar ‘um grupo de elementos que mantinha sua identidade através de uma série de reações’, como por exemplo o radical metila (FELIPPE JR & PERCÁRIO, 1991). Atualmente, os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos que possuem um elétron desemparelhado na última camada ocupando um único orbital atômico ou molecular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

A presença de um elétron desemparelhado confere a estas espécies duas propriedades características: o paramagnetismo, uma vez que produzem facilmente um campo magnético; e a alta reatividade, relacionada com o tempo de meia vida da reação que é de microsegundos. O elétron desemparelhado é convencionalmente representado por um ponto sobrescrito ( $R^*$ ) a direita da estrutura (SLATER, 1984).

Os radicais livres resultam de processos de fissão homolítica ou de reações de transferência de elétrons. Em geral, são formados por absorção de radiação (ultravioleta ou visível); por reações redox (reações de transferência de elétrons não-enzimáticas e reações catalisadas por metais); ou processos de catálise enzimática (SLATER, 1984).

Várias substâncias podem ser definidas como radicais livres, porém o maior interesse é pelas espécies reativas do oxigênio (EROs) (FELIPPE JR. & PERCÁRIO, 1991; HALLIWELL & CHIRICO, 1993; ADEGOKE *et al.*, 1998).

As espécies reativas do oxigênio e outros radicais livres podem ser produzidos por fontes endógenas e exógenas. As fontes exógenas de geração de ERO incluem radiação, fumo, estresse, alguns medicamentos e outras substâncias como xenobióticos, compostos azo aromáticos e biperidil (HALLIWELL, 1987).

No organismo, as ERO são produzidas na fagocitose e como consequência do metabolismo celular normal. Cerca de 95% do oxigênio consumido pelas células segue a cadeia de transporte de elétrons para formar energia e água (BECKMAN & AMES, 1998). O oxigênio é reduzido a água por quatro elétrons. No entanto, em 5% das vezes ocorrem erros no processo de redução do  $O_2$ , formando as EROs.

### **Agentes estressores celulares**

Como já descrito, vários agentes químicos e físicos podem gerar ERO, como por exemplo, o fumo, radiação, stresse, etc. No entanto, com o objetivo de estudar os efeitos oxidantes e antioxidantes em células eucarióticas e procarióticas, alguns compostos capazes de gerar ERO vem sendo utilizados (HENRIQUES *et al.*, 2001). Entre eles estão a apomorfina, o  $H_2O_2$  e o paraquat.

O alcalóide isoquinolínico apomorfina (5,6,6a,7- tetra-hidro-6 metil 4-H dibenzoquinolina-10.11-diol) é capaz de lesar as células devido à formação de espécies reativas de oxigênio bastante estáveis, como as quinonas e semiquinonas e radical superóxido (BLUM *et al.*, 2000). Já os tratamentos com peróxido de hidrogênio provocam lesão celular devido a produção do radical livre hidroxila, que é extremamente reativo.

Os danos causados pelo herbicida paraquat (1,1 dimetil 4,4' bipiridine) 'in vivo' e em células isoladas dependem da reação do paraquat com o  $O_2$ . A redução do paraquat pela presença de NADPH gera o cátion radical paraquat ( $PQ^{*\cdot}$ ) que estimula a peroxidação lipídica. O radical formado pode se complexar com o ferro, reduzindo-o, ou reagir com o  $O_2$  para formar  $O_2^{\cdot-}$ . O balanço entre as reações do paraquat que geram ferro reduzido ou radical peróxido depende da concentração de  $O_2$  no sistema. A alta taxa de  $O_2$  favorece a formação de superóxido (HALLIWELL, 1987).

A habilidade do paraquat de causar peroxidação lipídica e dano ao DNA são potencializados por adição de sais de ferro. Isso sugere que o radical  $OH^*$  também esteja envolvido na toxicidade do paraquat (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

### **Danos causados pelas Espécies Reativas do Oxigênio**

Embora as ERO desempenhem um papel fundamental no organismo, como por exemplo, na fagocitose, o interesse maior está no estudo dos seus efeitos nocivos. Quando há um desequilíbrio entre as ERO e os compostos antioxidantes do organismo, pode ocorrer o ataque das ERO aos mais diversos componentes biológicos gerando várias alterações teciduais que estão implicadas em inúmeros processos patológicos, como por exemplo: câncer, processos isquêmicos, demência senil, diabetes, enfermidades pulmonares e pancreáticas, cirrose, esclerose múltipla, artrite reumatóide, aterosclerose, doenças cardiovasculares e enfermidades do sistema nervoso central (VICEDO & CORREAS, 1997).

O mecanismo pelo qual as ERO lesam as células é bastante complexo. Pela sua alta reatividade e a própria capacidade de aceitar elétrons estes compostos modificam a estrutura e/ou função das moléculas alvo. Os alvos endógenos destes oxidantes são principalmente quatro classes de macromoléculas biológicas: lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos e proteínas (BECKMAN & AMES, 1998).

Os ácidos graxos poliinsaturados são mais sensíveis a oxidação devido ao maior número de duplas ligações. O dano causado pelas ERO aos lipídios poliinsaturados é o mais estudado e conhecido e é chamado peroxidação lipídica (HALLIWELL & CHIRICO, 1993).

Na presença de ERO, os lipídios insaturados reagem com o oxigênio para produzir radicais alquila e peroxila que se propagam por uma cadeia de radicais livres e formam hidroperóxidos como produtos primários. Esse processo é comumente descrito em termos de iniciação, propagação e terminação (ADEGOKE *et al.*, 1998).

A etapa de iniciação pode ocorrer pela presença de metal catalisador, altas temperaturas, exposição à luz e oxigênio ou pela ação de hidroperóxidos. A peroxidação lipídica resulta em uma mistura complexa de hidroperóxidos e produtos secundários de oxidação, incluindo peróxidos cíclicos. Estes produtos podem interagir com proteínas, membranas e enzimas, resultando em efeitos indesejáveis para a célula (SLATER, 1984). O malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica, mostrou-se metagênico para linhagens de *Salmonella thyphimurium* no teste Salmonella/microsoma (teste de Ames) (MARON & AMES, 1983).

A peroxidação lipídica pode ocorrer em alimentos gordurosos (STEVENSON *et al.*, 1984), e em sistemas biológicos (ADEGOKE *et al.*, 1998). A oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados em alimentos tem recebido muita



atenção, já que resulta em redução do tempo de vida de prateleira, na perda da qualidade e na alteração dos valores nutricionais dos alimentos (ZAMBIZI, 1999).

Em sistemas biológicos a peroxidação lipídica ocorre principalmente em membranas, onde o conteúdo de ácidos graxos insaturados é relativamente alto (ADEGOKE *et al.*, 1998)

### **Antioxidantes**

Os antioxidantes possuem larga aplicação em alimentos, cosméticos e medicamentos. Os primeiros compostos antioxidantes utilizados foram produtos sintéticos, como por exemplo, o butil hidroxitolueno e o propil galato. Atualmente, com a busca cada vez maior por produtos naturais e com a crescente utilização de compostos antioxidantes em terapias preventivas nas doenças nas quais os radicais livres estão implicados, os produtos naturais como vitaminas e flavonóides têm merecido atenção especial.

De um modo geral, os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos.

O organismo dispõe de um sistema celular de defesa contra as ERO que são produzidas na cadeia respiratória. São as chamadas defesas antioxidantes primárias, que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). A enzima superóxido dismutase é responsável por catalisar a reação de radicais superóxido com formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser eliminado por ação de outras enzimas como a catalase e a glutatona peroxidase (Eaton, 1991). Existem duas formas da SOD: um dímero que contém cobre e zinco (CuZn SOD) que se encontra no citosol e na matriz, e um tetrâmero que contém manganês (Mn SOD) que se encontra predominantemente na matriz (HALLIWELL, 1996).

A glutatona peroxidase tem ação não específica sobre peróxido de hidrogênio e pode eliminar também peróxidos orgânicos através de uma reação que necessita de glutatona (GSH) como fonte de equivalentes redutores (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

A catalase é a enzima responsável por inativar o  $H_2O_2$ . Nesta reação uma das duas moléculas de hidrogênio é oxidada a hidrogênio molecular, e a segunda é reduzida a água.

Especificamente, na levedura *S. cerevisiae* encontram-se duas enzimas superóxido dismutases : a SodCuZn (codificada por SOD 1), que se localiza no citoplasma e é um homodímero com um  $Cu^{2+}$  e um  $Zn^{2+}$  (STEINMAN, 1980); e a SodMn, que é codificada no núcleo pelo gene SOD2. Duas catalases, uma citosólica e uma peroxissomal codificadas pelos genes CTT1 e CTA1, respectivamente, também foram identificadas (SPEVAK *et al.*, 1986). No decorrer do projeto de sequenciamento do genoma da levedura *S. cerevisiae*, foram identificados três genes que codificam para prováveis GPx (CHURCHER *et al.*, 1997), corroborando dados anteriores que encontraram atividade de glutatona peroxidase neste organismo. Também estão presentes na levedura *S. cerevisiae* os genes necessários para sintetizar glutatona (INOUE *et al.*, 1998).

Os antioxidantes não enzimáticos podem ser definidos como quaisquer substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, comparadas as de um agente oxidante, são capazes de prevenir a oxidação do substrato (HALLIWELL

& GUTTERIDGE, 2000). Segundo CRYSTAL (1991), os antioxidantes são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos óxido-redutivos desencadeados pelos radicais livres.

De acordo com seu mecanismo de ação os antioxidantes podem ser classificados como terminadores de radicais livres (reagem com radicais livres interrompendo a propagação da cascata de reações); como varredores de oxigênio (desativam o oxigênio 'singlet' que pode iniciar uma nova cadeia de propagação de radicais livres); ou como quelantes de íons metálicos capazes de catalisar a peroxidação lipídica (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1999).

Atualmente a utilização de antioxidantes, principalmente não enzimáticos, estende-se aos mais diferentes produtos, como alimentos, cosméticos e medicamentos.

Em alimentos, os antioxidantes são utilizados com a finalidade de retardar as reações químicas e transformações ocorridas durante o armazenamento, de modo a permitir o consumo por longos períodos de tempo. O uso intencional de antioxidantes nos alimentos é justificado quando estes melhoram a sanidade do produto, são comprovadamente não tóxicos aos níveis consumidos e não apresentam efeito cumulativo (SHAHIDI, 2000).

Em cosméticos, os antioxidantes aumentam a duração do produto, auxiliam na proteção contra os danos causados pela radiação ultra-violeta e combatem os danos causados pelos radicais livres evitando ou diminuindo a destruição tissular (ZULLI *et al.*, 2000).

Os antioxidantes sintéticos são mais baratos, de boa qualidade e apresentam grande atividade antioxidante. No entanto, em doses elevadas podem interferir com a saúde do consumidor (SORTWELL, 1995). Atualmente, o seu uso vem sendo bastante discutido e há várias pesquisas para verificar as suas vantagens e desvantagens em relação a saúde do consumidor (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992). O BHT e o PG são exemplos de antioxidantes sintéticos.

Por outro lado, o uso de antioxidantes naturais para melhorar a estabilidade oxidativa dos produtos tem recebido atenção especial, já que, cada vez mais, tem-se evitado o uso de produtos que contenham aditivos sintéticos (FRANKEL, 1993).

A avaliação da capacidade antioxidante de um composto pode ser realizada através de diferentes metodologias. Os ensaios químicos são, normalmente, mais rápidos e simples de serem executados, no entanto, não são representativos das condições celulares do homem. Por outro lado, ensaios em células eucarióticas de levedura tem se mostrado muito adequados na triagem rotineira de vários produtos, sendo testes rápidos, sensíveis, econômicos, reprodutíveis e apresentando resultados confiáveis na identificação da atividade biológica.

O fato de a levedura *Saccharomices cerevisiae* ser um dos microorganismos mais estudados do ponto de vista genético e metabólico, fez com que ela se tornasse em dos microorganismos mais utilizados em testes biológicos (HENRIQUES *et al.*, 2001). Desta forma, testes em células eucarióticas da levedura *Saccharomices cerevisiae*, assumem um importante papel na verificação da capacidade antioxidante de compostos naturais, como a erva-mate.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção do Produto Erva-Mate Tipo Chimarrão

Foram coletadas amostras do produto erva-mate, representativas de duas regiões produtoras de erva-mate (RS e SC), discriminando fatores como: região produtora, tipos de ervais (nativos ou reflorestados) e época de colheita.

As amostras provenientes dos estados do Rio Grande do Sul foram ambas colhidas no município de Ilópolis, e as amostras de Santa Catarina foram colhidas no município de Xaxim. Todas as amostras foram colhidas nos meses de junho, julho e agosto, sempre obedecendo um intervalo de 30 dias entre as colheitas, foram secas um dia após a colheita, processadas e armazenadas da mesma forma, para que estes fatores não tivessem influência nas análises.

As amostras foram recebidas na forma de pó, em embalagens prontas para consumo. Realizou-se a amostragem, a qual partiu de 10 pacotes de erva-mate, cada um contendo 1 Kg de produto, e então as análises foram executadas a partir desta unidade analítica.

A análise da atividade antioxidante “*in vivo*” da erva-mate foi realizada nos três lotes, que foram representativos do período de inverno do sul do Brasil, logo após o recebimento das amostras, com o objetivo de comparar as diferenças entre os estados produtores e os meses de análise.

A aplicação da erva-mate foi feita através de uma solução cuja concentração é representativa da mesma proporção entre erva mate e água (5g de erva-mate para 100ml de água – 5:100) utilizada na bebida chimarrão (SCHINELLA et al, 2000), obtida a partir de uma extração aquosa à 70°C por 10 minutos (RAMALLO et al, 1998).

#### 3.2. Métodos

##### Avaliação da capacidade antioxidante em sistemas biológicos

A avaliação da capacidade antioxidante em sistemas biológicos dos compostos presentes no produto erva mate tipo Chimarrão foi realizada utilizando-se células eucarióticas da levedura *Sacharomyces cerevisiae* como modelo de estudo.

##### Agentes estressores

Como agentes estressores foram utilizados o alcalóide isoquinolínico apomorfina e o paraquat (E. Merck), dissolvidos em água destilada estéril. As soluções de apomorfina e paraquat foram preparadas nas concentrações de 2 mM e 0,10 M, respectivamente.

##### Meios de cultura e soluções

Para revigorar as células da levedura que estavam conservadas em geladeira foi utilizado meio líquido completo YEPD contendo 2% de glicose (E. Merck), 1% de extrato de levedura (E. Merck) e 2% de peptona (E. Merck). Para obtenção das condições aeróbicas de metabolismo utilizou-se o meio líquido sintético completo com 3% de glicerol (SC glicerol). O meio SC era composto de 1,7% do meio de cultura Yeast Nitrogen Base (Sigma Chem. Co.), 0,3783% do mix de aminoácidos (adenina 10,6%, lisina 7,9%, histidina 5,3%, metionina 5,3%, leucina 15,9%, isoleucina 39,6%, triptofano

10,2% e uracil 2%), 4% de solução aquosa de sulfato de amônio a 25% (E. Merck) e 3% de glicerol, em 100 mL de água destilada. O plaqueamento foi feito em meio YEPD sólido adicionado de 2% de ágar (E. Merck). Para a diluição e lavagem das células foi empregada solução de NaCl a 0,9%. Os compostos nitrogenados são de extrema importância devido ao seu papel relevante na nutrição das leveduras, por isso o meio foi enriquecido com vários aminoácidos. (BELL et al., 1979).

#### **Condições de crescimento celular**

As células de levedura utilizadas foram provenientes de fase exponencial de crescimento, obtidas a partir da retirada de 0,1mL do meio líquido completo YEPD, no qual adicionou-se as células liofilizadas, as quais foram incubadas por 24 horas a 28°C.

Após, as células foram centrifugadas e lavadas com solução de NaCl 0,9% e foram reinoculadas no meio líquido SC glicerol (metabolismo aeróbico). Nesse meio as células permaneceram 4 horas. O número de células desta solução foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e uma quantidade de  $2 \times 10^6$  células foram utilizadas para os tratamentos.

#### **Determinação da capacidade antioxidante do produto erva mate tipo chimarrão**

Para determinar a capacidade antioxidante do produto erva mate,  $2 \times 10^6$  células/mL foram tratadas com as soluções de erva mate 5:100, nas quantidades de 0,2 mL e 0,4 mL, adicionadas dos agentes estressores em concentrações crescentes e incubadas a 28°C por 21 horas com agitação. Paralelamente, foram realizados tubos controle para os agentes antioxidantes e estressores, e um tubo sem tratamento foi usado para controle de crescimento celular. Após, as células foram convenientemente diluídas, semeadas em placas de Petri e incubadas por 48 horas a 28°C. A viabilidade celular foi determinada pela contagem das colônias (Unidades Formadoras de Colônias – UFC) nas placas de Petri, considerando-se o tubo controle como 100% de sobrevivência, e então comparou-se o percentual de crescimento obtido em cada tratamento com o tubo controle (100%) .

Os dados foram tratados estatisticamente através da Análise de Variância (ANOVA), usando um nível de significância de  $p < 0,05$ , através do programa *Microsoft Excel*, onde verificou-se a existência ou não de diferença entre os tubos controles para os tubos teste. Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

Nos testes realizados para testar a atividade antioxidante *in vivo*, o tratamento controle, no qual foi adicionado apenas leveduras, teve suas Unidades Formadoras de Colônias (UFC) contadas e então este número foi considerado como 100% de sobrevivência, pois não teve influência dos agentes estressores e da erva-mate. Os resultados de todos os tratamentos foram então comparados com o percentual de crescimento do controle de leveduras (100%) e mostrados nas tabelas 1, 2 e 3. Todos os tratamentos, para as quatro amostras de erva-mate, de ambos estados produtores, diferiram significativamente dos controles de estressores e leveduras.

Nos testes realizados com o agente estressor apomorfina, observou-se que as amostras gaúchas reflorestadas tiveram uma maior ação sobre o agente estressor e permitiram um maior crescimento de células que as amostras nativas do mesmo estado, porém, ambas tiveram um crescimento significativamente maior que o controle de leveduras (considerado 100%), demonstrando que realmente existe um efeito protetor por parte da erva-mate às células em estudo. A mesma relação foi observada para as amostras catarinenses, porém as amostras procedentes de ervais nativos tiveram um maior efeito sobre o crescimento celular que as amostras reflorestadas (Tabelas 1, 2 e 3). Esta última relação se torna mais coerente, quando relacionamos as condições que ocorrem em ambos os métodos de cultivo, ou seja, em ervais nativos, que crescem geralmente entremeados à outras espécies vegetais e muitas vezes à sombra dos mesmos, encontram condições mais adversas de crescimentos e, provavelmente, sintetizam mais substâncias de defesa do tecido vegetal, e são estas substâncias, na maioria das vezes, as mais responsáveis pela atividade antioxidante de um sistema. No caso de ervais reflorestados, plantados planejadamente ao sol para garantir melhor fotossíntese e melhor crescimento da planta, as condições não se tornam tão adversas e o ambiente não é tão hostil quanto aquele entremeadado às matas.

Algumas outras relações foram observadas, ou seja, a atividade antioxidante do tratamento com 0,4 mL de chimarrão foi maior que os tratamentos com 0,2 mL, os quais consistiam nos tubos controle para as amostras de erva mate, demonstrando que existe uma relação direta entre a atividade antioxidante e sua concentração no meio, ou seja nos tratamentos com maior concentração de erva-mate proporcionaram um maior grau de sobrevivência.

Todos os tubos com apomorfina 1,0 mM/1,5 mm e 0,2 mL de chimarrão e com apomorfina 1,0 mM e 0,4 mL de chimarrão tiveram maior crescimento que os controles de apomorfina 1,0 mM e 1,5 mM, mostrando que a presença da erva-mate propiciou o crescimento das leveduras, até mesmo em quantidade maiores que o tubo controle de leveduras.

Todos os tubos com apomorfina 1,0 mM e 0,2 mL chimarrão tiveram maior crescimento que os tubos com apomorfina 1,5 mM e 0,2 mL chimarrão. Todos os tubos com apomorfina 1,0 mM e 0,4 mL chimarrão tiveram maior crescimento que os tubos com apomorfina 1,0 mM e 0,2 mL chimarrão. Estas relações foram obedecidas nos três meses de análise. As mesmas relações foram obtidas com o paraquat, mas o crescimento foi consideravelmente menor, mesmo assim foi significativamente diferente dos tubos controle de estressores e leveduras.

As amostras que apresentaram maior efeito antioxidante foram as colhidas em agosto, seguidas do mês de julho e junho. O ocorrido, talvez, não pode ser explicado pela teoria de que as condições climáticas mais drásticas do inverno ocorrem em junho, e deveria ser neste período a maior síntese de defesas antioxidantes por parte dos tecidos vegetais, mas podemos atribuir estes resultados ao maior aporte de energia luminosa, que dentro do metabolismo vegetal é transformada em química, podendo gerar espécies reativas, que estimulariam a síntese de agentes de defesa.

Os ervais do RS apresentaram um efeito protetor celular maior que os ervais de SC, sugerindo que as condições climáticas mais drásticas do inverno gaúcho influenciam diretamente na síntese destes compostos de defesa do tecido vegetal. Entre os tipos de cultivo, no RS, a atividade antioxidante dos ervais reflorestados foram maiores que dos ervais nativos, e para SC, ocorreu o inverso. Embora todos os tratamentos evidenciem um efeito protetor sobre as células (diferença significativa dos controles), as células tiveram maior dificuldade de crescimento frente aos estressor paraquat.

**TABELA 1.** Valores de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com erva-mate nativa e reflorestada dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, colhidas no mês de junho, em presença dos agentes estressores apomorfina e paraquat durante metabolismo aeróbico.

**Sobrevivência (%) ± DP**

Concentração dos Agentes Estressores + Amostras	RS-N*	RS-R*	SC-N*	SC-R*
--	-------	-------	-------	-------

**APOMORFINA (mM)**

1,0 mM + 0,0 mL	25,91 ± 0,71			
1,5 mM + 0,0 mL	18,29 ± 0,00			
0,0 mM + 0,2 mL	256,44 ± 6,25	440,45 ± 2,65	243,78 ± 3,78	194,12 ± 2,87
0,0 mM + 0,4 mL	402,12 ± 4,51	787,28 ± 3,10	386,45 ± 3,33	372,78 ± 3,01
1,0 mM + 0,2 mL	204,85 ± 3,87	214,75 ± 4,52	196,67 ± 4,29	136,91 ± 5,87
1,5 mM + 0,2 mL	162,78 ± 7,85	173,17 ± 4,61	132,47 ± 5,87	125,64 ± 6,87
1,0 mM + 0,4 mL	295,59 ± 2,99	427,31 ± 5,84	269,37 ± 4,32	248,58 ± 7,89

**PARAQUAT (M)**

0,05 M + 0,0 mL	37,00 ± 0,23			
0,10 M + 0,0 mL	14,00 ± 3,64			
0,05 M + 0,2 mL	236,12 ± 6,89	265,28 ± 4,56	157,82 ± 5,87	143,48 ± 5,67
0,10 M + 0,2 mL	168,73 ± 5,98	173,89 ± 5,68	165,91 ± 6,46	131,16 ± 7,13
0,05 M + 0,4 mL	264,45 ± 4,75	279,74 ± 4,99	170,34 ± 7,99	154,31 ± 6,71

\* = Valores da coluna significativamente diferente dos controles de estressores e de levedura (considerado 100% de sobrevivência).

RS-N = erva mate nativa proveniente do estado do Rio Grande do Sul

RS-R = erva mate reflorestada proveniente do estado do Rio Grande do Sul

SC-N = erva mate nativa proveniente do estado de Santa Catarina

SC-R = erva mate reflorestada proveniente do estado de Santa Catarina

**TABELA 2.** Valores de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com erva-mate nativa e reflorestada dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, colhidas no mês de julho, em presença dos agentes estressores apomorfina e paraquat durante metabolismo aeróbico.

<b>Sobrevivência (%) ± DP</b>				
Concentração dos Agentes Estressores + Amostras	RS-N*	RS-R*	SC-N*	SC-R*
<b>APOMORFINA (mM)</b>				
1,0 mM + 0,0 mL	33,00 ± 0,00			
1,5 mM + 0,0 mL	22,00 ± 1,41			
0,0 mM + 0,2 mL	284,23 ± 6,87	489,61 ± 7,59	270,87 ± 6,33	216,67 ± 5,24
0,0 mM + 0,4 mL	447,78 ± 5,89	874,94 ± 7,12	429,54 ± 8,14	413,42 ± 6,87
1,0 mM + 0,2 mL	227,19 ± 6,33	238,67 ± 8,96	218,61 ± 6,15	151,18 ± 4,18
1,5 mM + 0,2 mL	181,75 ± 4,78	192,37 ± 6,57	147,15 ± 4,37	139,67 ± 6,34
1,0 mM + 0,4 mL	328,47 ± 7,12	474,68 ± 5,99	299,43 ± 5,87	276,13 ± 5,19
<b>PARAQUAT (M)</b>				
0,05 M + 0,0 mL	50,00 ± 0,98			
0,10 M + 0,0 mL	20,00 ± 1,47			
0,05 M + 0,2 mL	262,17 ± 8,13	295,78 ± 7,14	175,75 ± 4,58	159,48 ± 6,57
0,10 M + 0,2 mL	187,29 ± 7,54	193,96 ± 8,63	184,15 ± 7,14	146,27 ± 8,13
0,05 M + 0,4 mL	293,67 ± 5,87	310,85 ± 6,41	189,17 ± 6,97	171,37 ± 7,46

\* = Valores da coluna significativamente diferente dos controles de estressores e de levedura (considerado 100% de sobrevivência).

RS-N = erva mate nativa proveniente do estado do Rio Grande do Sul

RS-R = erva mate reflorestada proveniente do estado do Rio Grande do Sul

SC-N = erva mate nativa proveniente do estado de Santa Catarina

SC-R = erva mate reflorestada proveniente do estado de Santa Catarina

**TABELA 3.** Valores de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com erva-mate nativa e reflorestada dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, colhidas no mês de agosto, em presença dos agentes estressores apomorfina e paraquat durante metabolismo aeróbico.

<b>Sobrevivência (%) ± DP</b>				
Concentração dos Agentes Estressores + Amostras	RS-N*	RS-R*	SC-N*	SC-R*
<b>APOMORFINA (mM)</b>				
1,0 mM + 0,0 mL	48,00 ± 3,69			
1,5 mM + 0,0 mL	26,00 ± 5,66			
0,0 mM + 0,2 mL	326,28 ± 6,99	562,84 ± 5,44	310,97 ± 7,13	249,64 ± 6,47
0,0 mM + 0,4 mL	514,56 ± 7,89	989,67 ± 5,23	494,31 ± 6,92	475,13 ± 8,78
1,0 mM + 0,2 mL	261,78 ± 5,24	273,25 ± 7,15	251,39 ± 7,82	174,78 ± 9,48
1,5 mM + 0,2 mL	208,46 ± 6,31	220,37 ± 6,65	169,16 ± 6,41	160,36 ± 6,33
1,0 mM + 0,4 mL	377,37 ± 6,98	545,16 ± 5,47	344,46 ± 7,29	317,97 ± 4,55
<b>PARAQUAT (M)</b>				
0,05 M + 0,0 mL	65,00 ± 1,82			
0,10 M + 0,0 mL	25,00 ± 2,32			
0,05 M + 0,2 mL	301,25 ± 3,45	339,78 ± 4,89	201,97 ± 8,99	183,93 ± 8,45
0,10 M + 0,2 mL	215,89 ± 5,87	222,69 ± 7,93	212,16 ± 8,13	168,18 ± 6,16
0,05 M + 0,4 mL	337,36 ± 7,12	356,37 ± 6,17	217,63 ± 6,17	197,56 ± 4,72

\* = Valores da coluna significativamente diferente dos controles de estressores e de levedura (considerado 100% de sobrevivência).

RS-N = erva mate nativa proveniente do estado do Rio Grande do Sul

RS-R = erva mate reflorestada proveniente do estado do Rio Grande do Sul

SC-N = erva mate nativa proveniente do estado de Santa Catarina

SC-R = erva mate reflorestada proveniente do estado de Santa Catarina



O maior grau de sobrevivência encontrado nos tratamentos que receberam erva-mate pode ser explicado pelo fato de que, além da atividade antioxidante exercida pela amostra no meio de reação protegendo do agente estressor, a erva-mate também contém vários nutrientes que podem ser utilizados pelas leveduras pra proporcionar o aumento do número de colônias. Estudos indicam como principais constituintes da erva-mate os seguintes compostos: água, celulose, gomas, dextrina, mucilagem, glicose, pentose, lipídios, resina aromática, legumina, albumina, cafeína, teofilina, cafearina, cafamarina, ácido matetânico, ácido fólico, ácido caféico, ácido virídico, clorofila, colessterina, óleo essencial, aminoácidos, proteínas, vitaminas, saponinas, enzimas, polifenóis, alcalóides e taninos. Nas cinzas encontram-se grandes quantidades de potássio, lítio, ácidos fólicos, sulfúrico, carbônico, clorídrico e cítrico, além de magnésio, manganês, ferro, alumínio e traços de arsênico (Perez, 1993).

Em trabalho desenvolvido por ALIKARDIS (1987), extratos de *Ilex paraguariensis* foram administrados durante 60 dias em ratas e realizaram-se estudos hematológicos, hepatograma e de urina. Se observou um aumento moderado da contagem plaquetária nas ratas que consumiram extratos de *Ilex paraguariensis* em relação aos valores obtidos nas ratas controle (administração de somente água destilada), confirmando seu efeito positivo em sistemas vivos, como encontrado no presente trabalho.

Na análise dos resultados obtidos por ALIKARDIS (1987) para caracterizar as ações fisiofarmacológicas das infusões de *Ilex paraguariensis*, não se observou nenhum resultado que sugira possibilidade de hemólise, pois, não houve aumento de produção dos reticulócitos circulantes ou da transaminase láctico desidrogenase ou da bilirrubina indireta, nem foi detectado a presença de fragilidade globular ou de hemossiderina (na urina), que são parâmetros que se alteram claramente no caso de hemólise. Em conclusão, a ingestão contínua de infusões de *Ilex paraguariensis* não produziu mudanças patológicas nestes animais, que os se diferenciaram do grupo controle; e os efeitos estimulantes centrais e diuréticos da infusão de *Ilex paraguariensis* se devem seguramente ao seu conteúdo de cafeína e metilxantinas. A ausência de efeitos tóxicos também foi observada na análise com leveduras, pois o aumento da concentração de erva-mate no meio não impediu o aumento do grau de sobrevivência.

Comparando os resultados encontrados com a literatura científica atual, verificou-se que FILIP *et al.* (2000) testou a habilidade de extratos de *Ilex paraguariensis* em inibir a oxidação lipídica em membranas sintéticas (lipossomos), e conclui que ocorreu uma proteção relevante das membranas, principalmente em um estágio inicial da reação, onde o extrato analisado foi hábil em inibir a oxidação dos lipossomos. Este é um dado que pode confirmar o efeito protetor encontrado para as amostras analisadas.

Existe uma forte correlação entre a atividade antioxidante e o total de compostos fenólicos encontrados na erva-mate. Os derivados cafeoil presentes no extrato são os compostos responsáveis, em grande parte, a atividade antioxidante observada. A presença de rutina, quercetina e camferol, ambos livres ou como glicosídeos, em várias espécies *Ilex*, incluindo *I. paraguariensis*, podem também ser responsáveis em parte pela atividade antioxidante observada da erva-mate (FILIP *et al.* 2000).

Pode-se observar que o Desvio Padrão (DP) encontrado no testes *in vivo* foi, em todos os casos, superior ao que é normalmente encontrado na literatura científica, porém, como se trata de um ensaio biológico, este DP seria aceitável, visto que um sistema vivo está envolvido na análise.

Frente a estes resultados, o RS estaria em desvantagem em relação aos ervais de SC, já que possuímos apenas 30% de ervais reflorestados, e são estes os de maior atividade antioxidante. Já em SC ocorre o contrário e o mais vantajoso para a saúde da população que as consome: a maioria é de ervais nativos, cujo efeito protetor celular é maior.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que a capacidade antioxidante das amostras varia em função do tipo e concentração do agente estressor utilizado, das concentrações das amostras, do tipo de erval (nativo ou reflorestado) e do estado produtor (RS e SC). Entre os estados, o RS apresentou maior efeito antioxidante, onde ervais reflorestados foram mais eficientes como protetores celular, o contrário ocorreu no estado de SC. Concluiu-se com este trabalho que a erva-mate, ingerida na forma de chimarrão, possui realmente um ótimo efeito antioxidante em sistemas vivos, e este é proporcional à sua concentração.

A relevância dos resultados obtidos nesta pesquisa fica destacada quando se avalia o quanto a atividade econômica em que ela se insere poderá ficar incrementada, pelo fato de que a produção de produtos de maior qualidade e com atributos voltados para a saúde humana (valor nutricional, qualidade do produto), poderá influenciar no seu consumo. Contribuindo para impulsionar o desenvolvimento econômico e tecnológico da região sul, pois atende as demandas do setor industrial e tecnológico frente ao mercado consumidor de erva-mate, nas regiões de consumo tradicional e na busca de novas áreas mercadológicas, assim como, ainda propicia o desenvolvimento de produtos alternativos, voltados para a saúde humana.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEGOKE, G.O.; VIJAY KUMAR, M.; GOPALA KRISHNA, A.G.; VARADARAJ, M.C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B.R. Antioxidants and lipid oxidation in food - a critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*, v. 35, n.4, p. 283-298, 1998.
- ALIKARDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 20:121-144, 1987.
- BABIOR, B.M. Superoxide : A two-edged sword. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30(2):141-155, 1997.
- BECKMANN, J.S.; YE, Y.Z.; ANDERSON, P.G.; CHEN, J.; ACCAVITTI, M.A.; TARPEY, M.M. White, Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, v. 375, p. 81-88, 1994.
- BECKMAN, K. B. & AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78(2): 547-581, 1998.

- BELL, A. A., OUGH, C. S., KLEWER, W. M. Effects on must and wine composition, rates of fermentation and wine quality of nitrogen fertilization of *Vitis vinifera* var. Thompson Seedless grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, Califórnia, v. 30, n. 2, p. 124-129, 1979.
- BLUM, D.; TORCH, S.; NISSOU, M.F.; BANABIB, A.L.; VERMA, J.M. Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. *Neurosci. Lett.*, 283: 193-196, 2000.
- BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina* (B. Aires), 58:350-356, 1998.
- CAMPOS, A. M. *Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de Ilex paraguariensis St. Hil. Aquifoliaceae (erva - mate)*. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 1996, 149p. [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul].
- CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. Uma introdução à bioquímica dos radicais livres. In: CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F., eds. *Radicais livres em medicina*. Interlivros, Rio de Janeiro, 1996. p.1-13.
- CHIPAULT, J.R.; MIZUN, G.K.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of natural spices. *Food Research*, v. 17, p. 46-55, 1952.
- CHURCHER, C.; BOWMAN, S.; BADCOCK, K.; BANKIER, A.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; BARREL, B. *et al.* The nucleotide sequence of *saccharomyces cerevisiae* cromosome IX. **Nature**, 387:84-87, 1997.
- CINTRA, R.M.G.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant activity of spices in different systems. In: *Biennical Meeting International Society For Free Radical Research*, Barcelona. Abstract Book, ISFRR, v. 8.,p. 90, 1996.
- CRYSTAL, R.G. Oxidants and antioxidants: pathophysiologic determinants and therapeutic agents. *Am. J. Med.*; 91(1): 1-13, 1991.
- EATON, J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: Mysteries of the bestiary. *J. Lab. Clin.Med.*, 7: 3-4, 1991.
- FELIPPE JR., J & PERCÁRIO, S. Radicais livres em medicina intensiva. *Rev. Bras. Terap. Intens.*, 3(3):66-72, 1991.
- FERDINANDY, P.; DANIAL, H.; AMBRUS, I.; ROTHERY, R.A.; SCHULZ, R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res*, v. 87, p. 241-247, 2000.
- FILIP, R.; LÓTITO, S.B.; FERRARO, G.; FRAGA, C.G.; Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.
- FRANKEL, E.N. In search of better methods lo evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Food Science and Technology*, v. 4, p. 220-225, 1993.
- FULEKI, T. Vineland vistas. *The Grower*, v. 43, p. 7, 1993.

- GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of Human LDL in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 224, p. 338-344, 1996.
- GUGLIUCCI, A.; STAHL, A.J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Mol Biol Int*, v. 35, p. 47-56, 1995.
- HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, v. 16, p. 33-50, 1996.
- HALLIWELL, B. Oxygens radicals and metal ions: potential antioxidant intervention strategies. *Ann. Interme. Med.*; 107:526-45, 1987.
- HALLIWELL, B., CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57: 715-725, 1993.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, 1989.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 3 ed. Clarendon, Oxford, 2000.
- HARRIS, R.K.; HAGGERTY, W.J.; Assays for potentially anticarcinogenic phytochemicals in flaxseed. *Cereal Foods World*, v.38, p. 147-51, 1993.
- HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J.; Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, p. 572-584, 2002.
- HENRIQUES J.A.P.; DAFRÉ, A.L.; PICADA, J.N.; MARIS, A.F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. (Ed) *Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria*. Vol. 1. Guaíba, Agropecuária, 227-252, 2001.
- HERTOG, M.G.L.; KROUMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S.; PEKKARINEN, M.; SIMIC, B.; TOSHIMA, H.; FESKENS, E.J.M.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med.*, v. 155, p. 381-386, 1995.
- INOUE, Y.; SUGIYAMA, K.; IZAWA, S.; KIMURA, A. Molecular identification of glutathione synthetase (GSH2) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1395:315-320, 1998.
- JACOB, R.A.; BURRI, B. Oxidative damage and defense. *American Journal of Clinical Nutrition.*, v. 63, p. 985-990, 1996.
- KERRY, N.; RICE-EVANS, C. Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships. *J Neurochem*, v. 73, p. 247-253, 1999.
- KITTS, D.D.; Bioactive substance in food: identification and potential use. Canada. *Journal of the Physiology and Pharmacology*, v. 72, p. 423-434, 1994.

- KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; TAGAWUA, S.; ADACHI, K.; UEDA, A.; SAWA, Y.; SHIBATA, H. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochim Biophys Acta*, v. 1335, p. 335-342, 1997.
- KROON, P A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plant and food: current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 79, n. 3, p. 355-361, 1999.
- LEEUWENBURGH, C.; HARDY, M.M.; HAZEN, S.L.; WAGNER, P.; OH-ISHI, S.; STEINBRECHER, U.P.; HEINECKE. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem*, v. 272, p. 1433-1436, 1997.
- LIPPMAN, S.M.; BENNER, S.E.; HONG, W.K. Retinoid chemoprevention studies in upper aerodigestive tract and lung carcinogenesis. *Cancer Res*, v. 54 (Supl.), p. 2025-2028, 1994.
- LOTITO, S.B.; FRAGA, C.G. Catechins as antioxidant: mechanisms preventing human plasma oxidation and activity in red wines. *Biofactors*, v. 10, 125-130, 1999.
- MARON, D.M. & AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113 173-215, 1983.
- MAZUCHOWSKI, J. Z.; DA CROCE, D.; WINGE, H. *Diagnóstico e Perspectivas da Erva-Mate no Brasil*. Chapecó, 1996.
- MELO, E.A.; GUERRA; N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol. SBCTA*, Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, jan-jun., 2002.
- MORA, A.; PAYA, M.; RIOS, J.L.; ALCARAZ, M.J. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation, *Biochem Pharmacol.*, v. 40, p. 793-797, 1990.
- NARDINI, M.; NATELLA, F.; GENTILI, V.; DI FELICE, M.; SCACCINI C. Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: an *in vivo* study. *Arch Biochem Biophys*, v. 342, p. 157-160, 1997.
- PARK, Y.K.; KOO, M.H.; CARVALHO, P. O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. *Boletim da SBCTA*, v. 31, n. 2, p. 200-206, 1997.
- PEREZ, C. A. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity, *J Ethnopharmacol*. 39(2): 119-28, 1993.
- PROJETO PLATAFORMA TECNOLÓGICA DA ERVA-MATE DO PARANÁ. MCT/CNPq/PADCT/Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate, Curitiba, Paraná. In: *Produtos Alternativos e Desenvolvimento da Tecnologia Industrial na Cadeia Produtiva da Erva-Mate*, série PADCT nº 1 e *Patentes Industriais e as Prioridades para os Investimentos Tecnológicos na Cadeia Produtiva da Erva-Mate*, série PADCT nº 2, agosto 2000.
- RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI, DL.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. *Food antioxidants - technological, toxicological and health perspectives*. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 65-157, 1995.

- RAMALLO, LAURA A. ;SMORCEWSKI, MARTA ;VALDEZ, EUZÉBIA C. ;PAREDES, ANA M., SCHMALKO, MIGUEL E. Contenido nutricional del extracto acuoso de la yerba mate em tres formas diferentes de consumo. *La Alimentacion Latinoamericana*, nº 225, 1998.
- RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science and Technology*, v. 6, n. 3, p. 75-82, 1995.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER N.J.; PAGANGA G. Antioxidant Properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, April, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.
- SÁNCHEZ-MORENO, S.; LAURRAURI, J.A.;CALIXITO-SAURA, F. Free radical scavenger capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grapes juices and related polyphenolic constituents. *Food. Res. Internat.*, 32(6): 407-412, 1999.
- SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 269, p. 357-360, 2000.
- SCHWARZ, K.; BERTELSEN, G.; NISSEN, L.R.; GARDNER, P.T.; HEINONEN, M.I.; HUYNH-BA, ANU H. T.; LAMBELET, P.; MCPHAIL, D.; SKIBSTED, L.H.; TIJBURG, L. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur Food Res Technol*; v. 212, p. 319–328, 2001.
- SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahtung*, 44(3): 158-163, 2000.
- SHAHIDI, F. & WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. *Crit. Ver. Food Sci. Nutr.*, 32(1): 67-103, 1992.
- SLATER, T.F. Free-radical mechanism in tissue injury. *Biochem. J.*, 222: 1-15, 1984.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr.*, , Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, jan./abr., 2002.
- SORTWELL, D. El uso de antioxidantes BHA y BHT. *Tecnol. Aliment.*, 30(5): 9-11, 1995.
- SPEVAK, W.; HARTIG, A.; MEINDL, P.; RUIS, H. Heme control region of the catalase T gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, 203: 73-78, 1986.
- STAVRIC, B. Role of chemoprevents in human diet. *Clinical Biochemistry*, v. 27, n. 5, p. 319-332, 1994.
- STEINMAN, H.M. The amino acid sequence of copper-zinc superoxide dismutase from bakers yeast. *J. Biol. Chem.*, 255: 6758-6765, 1980.
- STEVENSON, S.G.; VAISEY-GENSER, M.; ESKIN, N.A.M.. Quality control in the use of deep frying oils. *JAACS*, 61(6): 1102-1108, 1984.
- TAKABE, W.; NIKI, E.; UCHIDA, K.; YAMADA, S.; SATOH, K.; NOGUCHI, N. Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid per oxidation product, acrolein, *Carcinogenesis*, v. 22, p. 935–941, 2001.

- TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. *Lipids*, v. 33, p. 583–588, 1998.
- ULBRICHT, T.; Health and food industry - What lies ahead - Nutraceuticals. *Food Policy*, v. 18, p. 379-381, 1993.
- VICEDO, T.B. & CORREAS, F.J.H. Antioxidants: una terapéutica de futuro? *Nutr. Hosp.*, 12(3):108-120, 1997.
- VINSON, J.; DABBAGH, Y.; SERRY, M.M.; JANG, J. Plant polyphenols, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J Agric Food Chem.*, v. 43, p. 2800-2802, 1995.
- WANG, W.; SAWICKI, G.; SCHULZ, R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovasc Res.*, v.53, p. 165–174, 2002.
- WILLIAMSON, G.; FAULKNER, K.; PLUMB, G.W. Glucosinolates and phenolics as antioxidants from plant foods. *European Journal of Cancer Prevention*, Oxford, v. 7, n. 1, p. 17-21, 1998.
- WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L.C. Erva-Mate: Biologia e Cultura no Cone Sul. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, p. 356, 1995.
- ZAMBIZI, C. Oxidation reactions of vegetable oils and fats. *Bol. SBCTA*, 33(1):1-7, 1999.
- ZERO HORA, Porto Alegre, 04 de setembro de 2004. Leoleli Camargo. Edição nº 14257 - Capa - Vida / Vida.
- ZULLI, F.; LIECHTI, C.H.; SUTER, F. Controlled delivery of lipophilic agents to cell cultures for in vitro toxicity and biocompatibility assays. *Internat. J. Cosmetic. Sci.*, 22(4): 265-270, 2000.

## 3.2 ARTIGO 2

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ERVA-MATE EM SISTEMAS QUÍMICOS<sup>1</sup>**

**Aval. Ativ. Antiox. da Erva-Mate em Sist. Quím.**

**Liana Pedrolo CANTERLE<sup>2\*</sup>, Marta Weber do CANTO<sup>2</sup>, Luisa H. R.  
HECKTHEUER<sup>2</sup>, Nívia M. STREIT<sup>2</sup>, Ana Cristina P. do PRADO<sup>2</sup>, Viviane DURIGON<sup>2</sup>**

Submetido à Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos

*\* Recebido para publicação em / / . Aceito para publicação em / / .*

*<sup>2</sup> Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, CCR – Prédio 42, Universidade Federal de Santa Maria. Campus Universitário – Camobi. Santa Maria – RS. CEP 97105-900 – Brasil. e-mail: [lianapc@smail.ufsm.br](mailto:lianapc@smail.ufsm.br)*

*\* A quem a correspondência deve ser enviada.*



# AValiação DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ERVA-MATE EM SISTEMAS QUÍMICOS<sup>1</sup>

## Aval. Ativ. Antiox. da Erva-Mate em Sist. Quím.

Liana Pedrolo CANTERLE<sup>2</sup>, Marta Weber do CANTO<sup>2</sup>, Luisa H. R. HECKTHEUER<sup>2</sup>, Nívia M. STREIT<sup>2</sup>, Ana Cristina P. do PRADO<sup>2</sup>, Viviane DURIGON<sup>2</sup>

### RESUMO

Antioxidantes são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos óxido-redutivos desencadeados pelos radicais livres, impedindo ou diminuindo, desta forma, os danos gerados por eles. Os antioxidantes são largamente empregados em alimentos, medicamentos e cosméticos, e mais recentemente, estão sendo usados também em terapias antioxidantes em doenças nas quais os radicais livres estão implicados. Este trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade antioxidante do produto erva-mate tipo chimarrão através de testes químicos. A avaliação se baseou na determinação da Atividade Antioxidante Total (Hidrofílica e Lipofílica), do Poder Redutor e do Efeito Sequestrante de Radicais DPPH. Os resultados obtidos indicam que a capacidade antioxidante da maioria das amostras variaram significativamente em função do estado produtor e do tipo de erval nos três meses de análise, que são representativos do período de inverno do sul do país. Concluiu-se com este trabalho que a erva-mate, ingerida na forma de chimarrão, possui realmente um ótimo efeito antioxidante em sistemas químicos, e que esta propriedade pode ser explorada visando a diversificação das formas de consumo, o que facilitaria a expansão da cultura pelo país.

**Palavras-chave:** *Ilex paraguariensis*; atividade antioxidante; poder redutor.

### SUMMARY

ANTIOXIDANT ACTIVITY EVALUATION OF YERBA-MATE IN CHEMICAL SYSTEMS. Antioxidants are composts that work as blockers of the reductive-oxide processes unchained by free radicals, impeding or decreasing, this way, the damages generated by them. The antioxidants are widely used in foods, medicines and cosmetics, and more recently, they are also being used in antioxidant therapies in diseases in which the free radicals are implicated. This work has as objective evaluates the antioxidant capacity of the product yerba-mate “chimarrão” type through chemical tests. The evaluation was based on the determination of the Total Antioxidant Activity (Hydrophilic and Lipophilic), of the Reducing Power and of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical sequestering effect. The obtained results indicate that the antioxidant capacity of majority of the samples varied significantly in function of the producer state and the herbal type in the three months of analysis, that are representative of the winter season of the south of the country. It was concluded with this work that the yerba-mate, ingested in the “chimarrão” form, it really has a great antioxidant effect in chemical systems, and that this property can be explored seeking the diversification in the consumption ways, that would facilitate the expansion of the culture in the country.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*; antioxidant activity; reducer power.

\* Recebido para publicação em / / . Aceito para publicação em / / .

<sup>2</sup> Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, CCR – Prédio 42, Universidade Federal de Santa Maria. Campus Universitário – Camobi. Santa Maria – RS. CEP 97105-900 – Brasil. e-mail: lianapc@smail.ufsm.br

\* A quem a correspondência deve ser enviada.

## 1 – INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate, é uma espécie nativa da América do Sul e tem sua área de ocorrência natural restrita a 3 países: Brasil, Paraguai e Argentina.

De acordo com o Projeto Plataforma Tecnológica da Erva-Mate do Paraná (PADCT Erva-Mate) [24], a erva-mate, quando comparada com outros tipos de plantas e/ou produtos industrializados, é um produto centenário que se encontra em fase embrionária de descobertas, principalmente, em termos dos seus usos industriais, a nível internacional. Para CAMPOS [4], o desenvolvimento tecnológico da erva-mate e derivados requer investimentos em pesquisa, para a modernização e otimização dos processos de produção, para a busca de uma maior qualidade e diversificação de produtos, para que desta forma, possa ocorrer a busca de novos mercados, nacionais e internacionais.

A erva-mate apresenta variações em sua qualidade e no conjunto de suas características, principalmente físico-químicas, devido a influências de alguns fatores como os tipos de ervais (nativos ou reflorestados), os sistemas de cultivo, a região produtora. O produto 'Erva-Mate Tipo Chimarrão', nos estados onde é conhecido, encontra-se associado aos usos, expectativas e costumes dos consumidores, onde, características organolépticas, como a cor do produto, o aroma, o gosto desejável, o sabor residual, se constituem nos principais fatores de qualidade apreciados pelo consumidor [27], assim como, a preocupação com sua influência na alimentação e na saúde humana. Na América do Sul, aproximadamente 30% da população bebe mais que 1 litro/dia desta bebida [8], quantidade esta bastante significativa para justificar o aumento do interesse de pesquisadores por esta planta.

Em publicação de ZERO HORA, de setembro de 2004, [33] o chimarrão é designado como “Amargo e saudável”, e explica alguns mecanismos envolvidos no efeito protetor da erva-mate sobre as células, evidenciando a preocupação cada vez maior da população por substâncias naturais com efeito positivo sobre a saúde.

Para KROON & WILLIAMSON [15] e MELO & GUERRA [19], nos últimos 20 anos houve um incremento de pesquisas na busca de determinados tipos de alimentos que possuíssem substâncias biologicamente ativas que trouxessem benefícios á saúde ou efeitos fisiológicos desejáveis [23], e com isso um estilo de vida mais saudável. Neste contexto, inserem-se os antioxidantes, porque os mesmos podem retardar o dano oxidativo de tecidos aumentando suas defesas naturais [32].

A erva mate consumida como “Chimarrão” é muito apreciada pelo sabor peculiar e propriedades estimulantes devido ao alto conteúdo de cafeína e teobromina [7]. *Ilex*

*paraguariensis* está incluída na British Herbal Pharmacopeia [5] e no Martindale [16]. Esta espécie é conhecida por ter sabor característico amargo, funções hepatoprotetoras, coleréticas, hipocolesterêmicas, antioxidantes, antirreumáticas, diuréticas, e propriedades gliconeolíticas e lipolíticas. Atualmente, é empregado em preparações de ervas comerciais, como tônico, anticelulite e antienvhecimento. Algumas destas atividades farmacológicas são atribuídas ao alto conteúdo de derivados cafeoil e flavonóides [1, 12].

O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antioxidante do produto 'Erva-Mate Tipo Chimarrão' e verificar também a possível existência de diferenças regionais entre os tipos de ervais e os principais estados produtores e consumidores desta bebida, o Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC).

## **2 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 – Obtenção do produto Erva-Mate Tipo Chimarrão**

Foram coletadas amostras do produto erva-mate, representativas de duas regiões produtoras de erva-mate (RS e SC), discriminando fatores como: região produtora, tipos de ervais (nativos ou reflorestados) e época de colheita.

As amostras provenientes dos estados do Rio Grande do Sul foram ambas colhidas no município de Ilópolis, e as amostras de Santa Catarina foram colhidas no município de Xaxim. Todas as amostras foram colhidas nos meses de junho, julho e agosto, sempre obedecendo um intervalo de 30 dias entre as colheitas, foram secas um dia após a colheita, processadas e armazenadas da mesma forma, para que estes fatores não tivessem influência nas análises.

As amostras foram recebidas na forma de pó, em embalagens prontas para consumo. Realizou-se a amostragem, a qual partiu de 10 pacotes de erva-mate, cada um contendo 1 Kg de produto, e então as análises foram executadas à partir desta unidade analítica.

A análise da atividade antioxidante *in vitro* da erva-mate foi realizada nos três lotes, que foram representativos do período de inverno do sul do Brasil, logo após o recebimento das amostras.

A avaliação da atividade antioxidante da erva-mate foi feita através de uma solução cuja concentração é representativa da mesma proporção entre erva-mate e água (5:100) utilizada na bebida chimarrão, obtida à partir de uma extração aquosa à 70°C por 10 minutos [26]. As análises foram realizadas utilizando um Espectrofotômetro, na região do Ultra-Violeta-Visível (UV-VIS), modelo Spectrum 22ED.

Para melhor entendimento, as amostras analisadas foram codificadas da seguinte maneira: erva mate nativa proveniente do RS (RS-N), erva mate reflorestada proveniente do RS (RS-R), erva mate nativa proveniente de SC (SC-N) e erva mate reflorestada proveniente de SC (SC-R).

## 2.2 – Determinação da Atividade Antioxidante Total

O objetivo desta análise foi verificar a capacidade de diferentes componentes (presentes na erva-mate) em seqüestrar o radical cátion 2,2 azino-di-3-etilbenzotiazolina sulfonato (ABTS), comparado com um padrão antioxidante (Trolox - 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) em uma curva dose-resposta.

A determinação da Atividade Antioxidante Total foi realizada segundo ARNAO *et al.* [2], com algumas adaptações. A reação para determinação da atividade antioxidante hidrofílica consistiu na adição de 2 mM de ABTS, 15  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), 0,25  $\mu$ M de Horseradish Peroxidase (HRP) em 5 mM de tampão fosfato (pH 7,5). Esta solução foi monitorada a 730 nm até absorvância estável e então 20  $\mu$ L de fase aquosa (erva-mate em água 5:100) foi adicionada. A diminuição da absorvância foi então monitorada até estabilização.

Da mesma forma, utilizou-se 1 mM de ABTS, 15 mM de peróxido de hidrogênio, 6  $\mu$ M de HRP em etanol para a verificação da atividade antioxidante lipofílica. Após absorvância estável a 730 nm desta solução, 20  $\mu$ L de fase orgânica (erva-mate em etanol 5:100) foi adicionada ao meio e o decréscimo da absorvância foi monitorado até estabilização.

Para cada lote analisado, foi construída uma Curva dose-resposta do Padrão Antioxidante Trolox. Encontram-se abaixo as Equações de Reta e  $R^2$  (Coeficiente de Correlação) correspondentes aos meses de junho e julho, que pelo fator de semelhança foram consideradas iguais, e agosto, respectivamente. Para a construção das Retas foi utilizado somente etanol como solvente, visto que não se verificaram diferenças entre retas construídas com etanol e solução tampão.

$$AAT = 4,3308x - 3,0105 / R^2 = 0,9990$$

$$AAT = 3,1976 - 5,7029 x / R^2 = 0,9809$$

Onde AAT – Atividade Antioxidante Total

### 2.3 – Determinação do Efeito Sequestrante de Radicais DPPH

O mecanismo de ação desta reação baseia-se na capacidade do antioxidante em doar hidrogênio para o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) provocando a varredura deste radical livre do meio de reação, modificando a cor da solução, verificando-se então a capacidade dos antioxidantes presentes na amostra em anular radicais livres gerados por oxidação [3].

Este procedimento experimental foi adaptado de ARNOUS *et al.* [3] e CHEN *et al.* [6]. Em uma solução metanólica de radical DPPH 60 µM (9,75mL), foram adicionadas as amostras (0,125 mL de um extrato 5:100 em água). As soluções foram homogeneizadas e então deixadas no escuro por 30 min. A absorbância das soluções resultantes foram medidas em cubetas de 1 cm usando Espectrofotômetro a 515 nm contra um branco, que não continha DPPH.

O resultado foi expresso através da plotação dos resultados em Curva dose-resposta de soluções conhecidas de Trolox, a um comprimento de onda de 515nm e expressos como mM equivalentes de Trolox. Abaixo se representam as equações referentes aos meses de junho e julho, as quais, novamente, pela semelhança foram consideradas iguais, e do mês de agosto, respectivamente. As concentrações utilizadas de padrão Trolox para construção da Curva dose resposta variaram de 4,0 – 13,6 mM.

$$\text{AAR} = 148,96552x - 16,60138 / R^2 = 0,9631$$

$$\text{AAR} = 147,6923x - 18,4985 / R^2 = 0,9549$$

Onde AAR – Atividade Anti-Radical

### 2.4 – Determinação do Poder Redutor

O íon ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) produzido na reação redox forma um produto colorido quando reage com DPPH, que tem um comprimento de onda máximo de 525 nm. [25]. Analiticamente, 0,5 mL de amostra apropriadamente diluída (5:100 em água) foi misturada com 0,5 mL de cloreto férrico 3 mM em ácido cítrico 5mM. A solução foi misturada e incubada a 50°C em banho-maria por 20 minutos. Seguindo, 9 mL de uma solução de DPPH (60 µM) em 1.2% de Ácido Tricloroacético foi adicionada, a mistura foi homogeneizada e depois de 5 minutos a absorbância foi lida a 525nm. Foi utilizada água destilada como branco. Uma curva de calibração foi estabelecida através de plotação a 525nm contra concentrações conhecidas de quercetina (3,00 – 15,00 mM). O poder redutor foi expresso como equivalentes de quercetina através da equação obtida das curvas padrão, representadas abaixo para os meses de junho e julho, e agosto, respectivamente.

$$PR = 14,4969 - 34,8123x / R^2 = 0,9863$$

$$PR = 5,5635 - 4,3315x / R^2 = 0,9168$$

Onde PR = Poder Redutor.

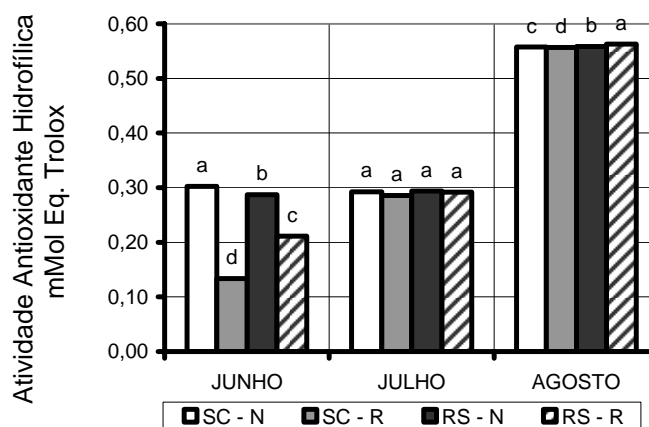
## 2.5 – Análise Estatística dos Resultados

A comparação dos resultados obtidos entre os tipos de ervais e os estados produtores foi feita através de análise de variância (ANOVA), e pós-Teste de Tukey para avaliar a diferença entre as médias, usando um nível de significância de  $p < 0,05$ , através do programa *Microsoft Excel*. Todos os testes foram realizados em triplicata.

## 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Atividade Antioxidante Total foi avaliada separadamente (hidrofilica e lipofilica) para facilitar a discussão dos resultados. Quanto a atividade antioxidante hidrofilica, em junho, todas as amostras diferiram significativamente (Gráfico 1), sendo que a maior atividade antioxidante foi da amostra SC-N e a menor SC-R, ficando as amostras do estado do RS em posição intermediária. Em julho, não houve diferença significativa entre os tipos de ervais. Em agosto, as diferenças voltaram a aparecer, sendo todos os ervais diferentes entre si, além disso, a maior atividade foi das amostras do RS e as menores de SC, talvez pelo fato de que no RS o clima no inverno costuma ter temperaturas mais extremas, e isto poderia ter aumentado a síntese de compostos fenólicos responsáveis pelas defesas vegetais, os quais possuem atividade antioxidante.

Com relação aos meses de análise, todas as amostras apresentaram maior atividade antioxidante hidrofilica em agosto, intermediária em julho e menor em junho, com exceção da amostra SC-N, que teve a menor atividade em julho (Gráfico 1).



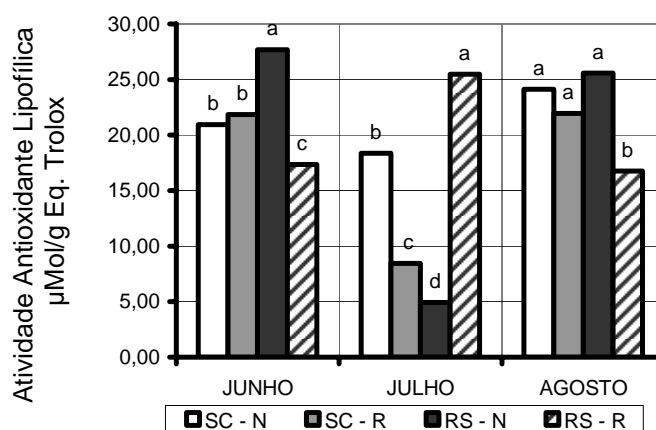
**GRÁFICO 1:** Diferenças de Atividade Antioxidante Hidrofilica entre os tipos de ervais  
<sup>a, b, c</sup> Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Segundo OMARI *et al.* [22], para atividade antioxidante hidrofílica de *Quercus ilex*, atribui-se 88,0 – 99,9 % da atividade antioxidante total à fração hidrofílica (equivalente a 1 mmol de Trolox), e apenas 12-0,1% (até o correspondente a 30  $\mu$ mol de Trolox) do total para os constituintes lipofílicos. O mesmo foi observado entre as amostras em estudo, onde o extrato aquoso foi mais eficaz em anular o processo de oxidação no meio de análise, comprovando que a erva-mate tem suas melhores propriedades aproveitadas quando ingerida pelos seus consumidores na forma de chimarrão.

Mesmo em condições distintas de temperatura (diferentes meses do ano, embora sendo todos representativos do inverno sulino) todas as amostras mostraram uma maior contribuição hidrofílica que lipofílica à atividade antioxidante total (Gráficos 1 e 2).

Em estudo comparativo entre *Ilex paraguariensis* e outras espécies comumente utilizadas como adulterantes, FILIP *et al.* [8] observou que a primeira apresentou uma diferença significativa de atividade antioxidante sobre as demais, provando que as possíveis misturas encontradas no mercado não só alteram as propriedades sensoriais do chimarrão e produtos derivados, como também influenciam sua ação sobre o metabolismo e saúde humana. Daí a importância de uma comprovação científica sobre os benefícios da bebida de *Ilex paraguariensis* para a saúde das populações e a certificação de um produto não adulterado.

Podemos observar que, em junho, a atividade antioxidante lipofílica (Gráfico 2) foi maior para a amostra RS-N, seguida das amostras de SC (reflorestada e nativa não diferiram entre si) e com menor atividade a amostra RS-R.



**GRÁFICO 2:** Diferenças de Atividade Antioxidante Lipofílica entre os tipos de ervas  
<sup>a, b, c</sup> Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )

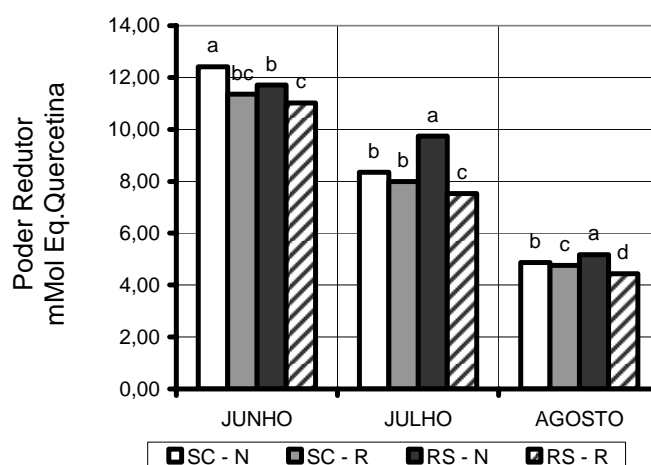
Em julho, todas as amostras diferiram significativamente, onde a maior e menor atividade, foi respectivamente, RS-R e RS-N, sendo que SC ficou com valores intermediários, mas também significativos. Em agosto, as amostras mais eficazes foram RS-N e SC-N, porém, a única que diferiu significativamente das demais foi a RS-R. Em junho foi detectada maior atividade antioxidante lipofílica entre todas as análises para a amostra RS-N e em julho a menor atividade encontrada para a mesma amostra, mostrando grande variação.

A tendência observada foi da atividade antioxidante lipofílica ser maior em agosto (Gráfico 2), o que não seria explicado pela teoria de que os fenóis, importantes substâncias com atividades antioxidantes, que são, provavelmente, mais produzidos pelos tecidos vegetais nas condições adversas e de estresse do inverno, com objetivo de defesa contra agentes agressores e invasores da natureza, e que, provavelmente, esta maior capacidade protetora deve-se a existência de outras substâncias possivelmente com atividade antioxidante. Entre as amostras, observou-se uma grande variação entre elas com respeito ao maior efeito protetor, sendo que todas elas, em pelo menos um período de análise (tanto para atividade hidrofílica quanto lipofílica) tiveram a maior capacidade de evitar reações de oxidação. De acordo com OMARI *et al.* [22], o verão, quando comparado às outras estações, é a estação que possui maior efeito protetor sobre espécies reativas de oxigênio para várias espécies vegetais. Extratos de folhas *Quercus ilex* após processamento mostraram maior atividade antioxidante total durante o verão, quando a temperatura e pressão de vapor foram maior. Sob estas condições, a água viabilizou o fechamento dos estômatos, levando a diminuição da fotossíntese, que é característica das espécies vegetais. A absorção de luz pode então exceder o requerido para a assimilação da fotossíntese, que, ao longo de condições como o verão, com altas temperaturas, alta taxa respiratória e metabólica e maior irradiação, pode aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio e a participação de mecanismos fotoprotetores [22]. Como as análises foram feitas durante o inverno, os resultados encontrados não podem ser comparados com o que acontece com o metabolismo vegetal durante o verão do Mediterrâneo, onde ocorreu a pesquisa de OMARI *et al.* [22], porém entre os três meses analisados, o mês de agosto geralmente apresenta maior número de horas de insolação por dia (os dias ficam mais longos se comparados os dias de junho), portanto, talvez este mesmo mecanismo talvez poderia explicar o que ocorreu com as amostras em análise.

Para a análise do poder redutor das amostras referentes aos meses de junho e agosto, verificou-se diferenças significativas entre todas elas (Gráfico 3). No mês de julho, as amostras de SC não diferiram entre si, mas diferiram das demais amostras.



O maior poder redutor foi observado para todas as amostras, nas análises referentes ao mês de junho, valores intermediários em julho e o menor poder redutor para o mês de agosto (Gráfico 3). Provavelmente, a diferença encontrada entre as análises de atividade antioxidante total e poder redutor deve-se a síntese de diferentes compostos em diferentes períodos do ano, os quais influenciam, em maior ou menor proporção, a capacidade de defesa de células vegetais e a compensação de síntese de um ou outro composto ajudariam a manter em níveis constantes dessa capacidade de defesa (variação sazonal).



**GRÁFICO 3:** Diferenças de Poder Redutor entre os tipos de ervais  
<sup>a, b, c</sup> Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Ao contrário da vasta literatura que existe sobre atividade antioxidante total e poder seqüestrante de radicais, dados específicos sobre poder redutor são um tanto limitados. Entretanto, a habilidade antioxidante de muitos compostos está diretamente relacionada a sua capacidade redutora, assim, a medida do Poder Redutor pode ser uma importante ferramenta de suporte na definição do mecanismo de ação de um dado antioxidante em determinado meio.

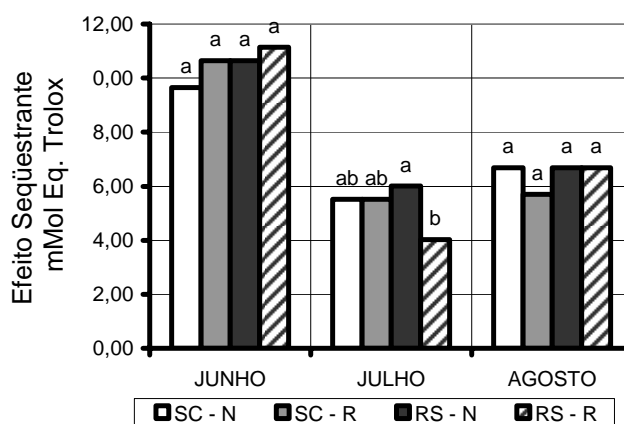
PSARRA *et al.* [25] pesquisou o poder redutor de vinhos brancos e sua relação com a composição de polifenóis. As análises mostraram que o poder redutor das amostras de vinhos variaram largamente, o que é uma indicação que o poder redutor é dependente de ambos conteúdo de polifenóis totais e da relativa quantidade de polifenóis individuais. O Poder Redutor pode ser atribuído na mesma extensão tanto à concentração de polifenóis totais quanto a concentração de flavanóis para as amostras de vinhos testados. Provavelmente possa se esperar a mesma condição para extratos de erva-mate, onde, para se comprovar, poderia-se quantificar estes mesmos compostos nas amostras em questão.

Os valores encontrados para amostras de vinhos brancos variaram entre 0,31 e 2,05 mM Equivalentes de Quercetina [25], já para os extratos de erva-mate, os valores foram superiores, entre 4,4373 e 12,4082 mM Equivalentes de Quercetina. Esta diferença pode ser aceita levando-se em consideração que vinhos brancos possuem uma atividade antioxidante menor que vinhos tintos, que por sua vez, possui metade da atividade antioxidante de extratos de erva-mate, preparadas na menor concentração utilizada para comparar a ação protetora de *Ilex paraguariensis* com outros sistemas alimentares [8].

Segundo MAU *et al.* [17], o Poder Redutor de extratos de cogumelos medicinais foi crescente em relação a sua concentração, isto pode também ser esperado para os extratos de erva-mate, uma vez que os resultados encontrados foram semelhantes. Tal resultado nos conduz ao fato de que as características antioxidantes da erva-mate podem ser exploradas como uma propriedade medicinal.

O maior poder seqüestrante de radicais DPPH foi encontrado nas amostras colhidas no mês de junho. Este efeito se reduziu em julho e voltou a aumentar em agosto, mas sem diferença significativa entre os dois últimos meses (Gráfico 4). Isto pode ser devido a variações climáticas, já que até nos estados do sul do Brasil, onde há melhor definição entre as estações do ano, picos climáticos diferentes da temperatura média para a época do ano vêm ocorrendo freqüentemente.

Todas as amostras referentes aos meses de junho e agosto apresentaram efeito seqüestrante semelhante (sem diferença significativa entre si). Já para o mês de julho, a amostra RS-N e RS-R, tiveram, respectivamente, maior e menor capacidade de evitar a oxidação em sistemas químicos e SC ficou com valores intermediários, sem diferenças entre si.



**GRÁFICO 4:** Diferenças de Efeito Seqüestrante de Radicais DPPH entre os tipos de ervais  
a, b, c Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )

ARNOUS *et al.* [3] encontrou valores de Atividade Anti-radical para vinhos tintos envelhecidos entre 0,88 – 1,53 mM Equivalentes de Trolox e verificou uma pobre correlação entre o total de antocianinas com atividade anti-radical e poder redutor, o pode ser devido ao fato que os valores de antocianinas também representam polímeros e outros tipos de pigmentos, que podem não possuir características antioxidantes similares com antocianinas monoméricas. O conteúdo de polifenóis é o fator que mais contribui para as propriedades antioxidantes do vinho tinto e tudo indica que sejam também do mate.

Os valores de Atividade Anti-Radical, encontrados para os extratos de erva-mate (4,0221 – 11,1393 mM Equivalentes de Trolox) foram superiores aos encontrados para amostras de vinhos tintos envelhecidos. Considerando que durante o envelhecimento de vinhos, os compostos fenólicos podem participar de reações de polimerização e precipitação, e que são estes os principais responsáveis pela atividade antioxidante de vinhos tintos, uma maior ação protetora por parte dos extratos de erva-mate seria esperada. Além das reações de polimerização e precipitação, os polifenóis também são utilizados para evitar a própria oxidação do vinho, sendo, portanto, consumidos durante a estocagem e envelhecimento [3].

O radical DPPH é um radical estável com uma baixa taxa de deterioração e reatividade frente a outros compostos. Conseqüentemente, somente um bom doador de hidrogênio consegue reagir com um radical estável em uma reação estequiométrica. Em adição, antioxidantes que são efetivos quelantes de íons de metais de transição podem contribuir diferentemente para a resposta antioxidante nos ensaios de Poder Redutor comparado a ensaios usando radicais estáveis [29].

A análise baseada no poder seqüestrante de radicais estáveis é um método confiável para prever a inibição dos produtos primários formados à partir da oxidação por extratos naturais em sistemas alimentares homogêneos [29].

GUGLIUCCI [10] mostrou que extratos de *Ilex paraguariensis* foram hábeis em inibir a oxidação induzida de lipoproteínas de baixa densidade em plasma humano. Tal efeito foi atribuído aos polifenóis e flavonóis presentes no extrato. Entretanto, a quantidade destes antioxidantes que pode ser absorvida não é clara, evidências indicam que quantidade substancial destes compostos é absorvida e são encontrados em altos níveis em plasma humano, sendo responsáveis por inibir a oxidação de lipoproteínas.

A diferença na atividade de extratos em relação à Equivalentes de Trolox indicam diferenças no modo de ação antioxidante entre os ensaios utilizados (Atividade Antioxidante Total, Poder Redutor e Efeito Seqüestrante de Radicais DPPH). Os ensaios são baseados em diferentes princípios e representam diferentes aspectos de potencial antioxidante, então uma

divergência entre todos eles pode ser normalmente esperada, como já demonstrado em estudos similares em soro humano [10].

#### **4 – CONCLUSÃO**

Vários tipos de análise foram realizados (diferentes mecanismos de ação), com o objetivo de englobar a maior parte de mecanismos que o tecido vegetal da erva-mate possui como defesa antioxidante, como a sua atividade em meio aquoso e em meio orgânico, sua capacidade em participar de reações de óxi-redução, e em anular radicais livres presentes no meio reacional. Com o resultado destas três técnicas, tornou-se possível predizer a real atividade antioxidante da erva-mate como um todo.

Quanto à relação entre os estados produtores e os tipos de ervais, não foi possível estabelecer uma relação constante, visto que as variações foram grandes, e de certa forma, semelhantes de acordo com os meses de análise para todas elas.

A suplementação das defesas antioxidantes naturais do corpo humano, que às vezes não é suficiente, para anular todos os mecanismos de oxidação e envelhecimento gerados pela toxicidade que o oxigênio gera no organismo, pode ser feita através de uma dieta balanceada com frutas, vegetais e outros produtos naturais derivados, como o Chimarrão, podendo-se então incluí-lo em uma dieta racional. Os resultados desta pesquisa sugerem que a ingestão de erva-mate na forma de Chimarrão pode ser um meio muito eficaz e econômico para fornecer uma importante quantidade de compostos que aumentam o sistema de defesa antioxidante de um organismo.

Além disso, a 'Erva-Mate Tipo Chimarrão', como um produto agroindustrial responde por 96% da produção de erva-mate brasileira [18], tal como ainda hoje se pratica, deixando muita margem para ser melhorada. Com os resultados deste trabalho, onde se verificou que a erva-mate, da forma que é consumida (extrato aquoso) possui uma ótima atividade antioxidante, torna-se possível a exploração do consumo desta bebida, sob diferentes formas, por todo o país.

A relevância dos resultados deste trabalho fica destacada quando se avalia o quanto a atividade econômica em que ela se insere poderá ficar incrementada, pelo fato de que a produção de produtos de maior qualidade e com atributos voltados para a saúde humana, poderá influenciar no seu consumo.

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADZET T, CAMARASA J, LAGUNA JC. **J Nat Prod** 1987;50:612.
- [2] ARNAO, M.B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.73, p. 239-244, 2001.
- [3] ARNOUS, A.; MAKRIS, D.P.; KEFALAS, P. Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 5736-5742, 2001.
- [4] CAMPOS, A. M. Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (erva - mate). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, p. 149, 1996.
- [5] BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA 4th Edition, British Herbal Medicine Association, 1996, p. 130.
- [6] CHEN, J.H.; HO, C.T. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. **J. Agric. Food Chem.** v. 45, p. 2374-2378, 1997.
- [7] FILIP R, LOPEZ P, COUSSIO J, FERRARO G. **Phytotherapy Res** 1998;12:129.
- [8] FILIP, R.; LÓTITO, S.B.; FERRARO, G.; FRAGA, C.G.; Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.
- [9] GUGLIUCCI, A.; STAHL, A.J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochem Mol Biol Int**, v. 35, p. 47-56, 1995.
- [10] GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of Human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, p. 338-344, 1996.
- [11] KERRY, N.; RICE-EVANS, C. Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships. **J Neurochem**, v. 73, p. 247-253, 1999.
- [12] KISO Y, TOHKIN M, HIKINO H. **J Nat Prod** 1983;46:841.
- [13] KOLEVA, I.I.; BEEK, T.A.V.; LINNSEN, J.P.H.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L.N. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. **Phytochemical Analysis**, 13. 8-17, 2002.
- [14] KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; TAGAWUA, S.; ADACHI, K.; UEDA, A.; SAWA, Y.; SHIBATA, H. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of

reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. **Biochim Biophys Acta**, v. 1335, p. 335-342, 1997.

- [15] KROON, P A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plant and food: current and future perspectives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 355-361, 1999.
- [16] MARTINDALE. The extra pharmacopoeia. 30th Edition London: The Pharmaceutical Press, 1993, p.1327.
- [17] MAU, J.L.; LIN, H.C.; CHEN, C.C. Antioxidant Properties of Several Medicinal Mushrooms. **J. Agric. Food Chem.** v. 50, p. 6072-6077, 2002.
- [18] MAZUCHOWSKI, J. Z.; DA CROCE, D.; WINGE, H. **Diagnóstico e Perspectivas da Erva-Mate no Brasil**. Chapecó, p. 28, 1996.
- [19] MELO, E.A.; GUERRA; N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, jan-jun., 2002.
- [20] NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, Boca Raton, v. 29, n. 4, p. 273-300, 1990.
- [21] NARDINI, M.; NATELLA, F.; GENTILI, V.; DI FELICE, M.; SCACCINI C. Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: an *in vivo* study. **Arch Biochem Biophys**, v. 342, p. 157-160, 1997.
- [22] OMARI, B.E.; FLECK, I.; ARANDA, X.; ABADÍA, A.; CANO, A.; ARNAO, M.B. Total Antioxidant activity in *Quercus ilex* sprouts after fire. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p. 41-47, 2003.
- [23] PARK, Y.K.; KOO, M.H.; CARVALHO, P. O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Boletim da SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 200-206, 1997.
- [24] PROJETO PLATAFORMA TECNOLÓGICA DA ERVA-MATE DO PARANÁ. MCT/CNPq/PADCT/Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate, Curitiba, Paraná. In: Produtos Alternativos e Desenvolvimento da Tecnologia Industrial na Cadeia Produtiva da Erva-Mate, série PADCT n° 1 e Patentes Industriais e as Prioridades para os Investimentos Tecnológicos na Cadeia Produtiva da Erva-Mate, série PADCT n° 2, agosto 2000.
- [25] PSARRA, E.; MAKRIS, D.P.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P. Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek White wines: correlation with polyphenolic composition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 1014-1020, 2002.
- [26] RAMALLO, L.A.; SMORCEWSKI, M.; VALDEZ, E.C.; PAREDES, A.M.; SCHMALKO, M.R. Contenido nutricional del extracto acuoso de la yerba mate en tres formas diferentes de consume. **La Alimentación Latinoamericana**, n° 225, p. 48-52, 1998.

- [27] SAAP. SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ. Erva-mate: prospeção tecnológica da cadeia produtiva. SEAB, Curitiba, p. 121, 1997.
- [28] SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 357-360, 2000.
- [29] SCHWARZ, K.; BERTELSEN, G.; NISSEN, L.R.; GARDNER, P.T.; HEINONEN, M.I.; HUYNH-BA, ANU H. T.; LAMBELET, P.; MCPHAIL, D.; SKIBSTED, L.H.; TIJBURG, L. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. **Eur Food Res Technol**; v. 212, p. 319–328, 2001.
- [30] SIMIC, M.G.; JAVANOVIC, S.V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: HO, C.T.; OSAWA, T.; HUANG, T.M.; ROSEN, R.T. (Ed.). Food phytochemicals for cancer prevention. Washington, ACS Symposium Series, n. 546. **American Chemical Society**, p. 20-33, 1994.
- [31] SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, jan./abr., 2002.
- [32] TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. **Lipids**, v. 33, p. 583–588, 1998.
- [33] ZERO HORA, Porto Alegre, 04 de setembro de 2004. Leoleli Camargo. Edição nº 14257 - Capa - Vida / Vida.

#### 4 – DISCUSSÃO

Os compostos nitrogenados são de extrema importância devido ao seu papel relevante na nutrição das leveduras, por isso o meio de crescimento foi enriquecido com vários aminoácidos (Bell et al., 1979).

Nos testes realizados para testar a atividade antioxidante *in vivo*, o tratamento controle, no qual foi adicionado apenas leveduras, teve suas Unidades Formadoras de Colônias (UFC) contadas e então este número foi considerado como 100% de sobrevivência, pois não teve influência dos agentes estressores e da erva-mate. Os resultados de todos os tratamentos foram então comparados com o percentual de crescimento do controle de leveduras (100%) e mostrados nas tabelas 1, 2 e 3. Todos os tratamentos, para as quatro amostras de erva-mate, de ambos estados produtores, diferiram significativamente dos controles de estressores e leveduras.

Em todos os testes, os antioxidantes foram adicionados às células de levedura antes do agente estressor, uma vez que sua adição posterior não protege as células dos efeitos tóxicos gerados pelos agentes estressores.

Nos testes realizados com o agente estressor apomorfina, observou-se que as amostras gaúchas reflorestadas tiveram uma maior ação sobre o agente estressor e permitiram um maior crescimento de células que as amostras nativas do mesmo estado, porém, ambas tiveram um crescimento significativamente maior que o controle de leveduras (considerado 100%), demonstrando que realmente existe um efeito protetor por parte da erva-mate às células em estudo. A mesma relação foi observada para as amostras catarinenses, porém as amostras procedentes de ervais nativos tiveram um maior efeito sobre o crescimento celular que as amostras reflorestadas (Tabelas 1, 2 e 3). Esta última relação se torna mais coerente, quando relacionamos as condições que ocorrem em ambos os métodos de cultivo, ou seja, em ervais nativos, que crescem geralmente entremeados à outras espécies vegetais e muitas vezes à sombra dos mesmos, encontram condições mais adversas de crescimento e, provavelmente, sintetizam mais substâncias de defesa do tecido vegetal, e são estas substâncias, na maioria das vezes, as mais responsáveis pela atividade antioxidante de um sistema. No caso de ervais reflorestados, plantados planejadamente ao sol para garantir melhor fotossíntese e melhor crescimento da planta, as condições não se tornam tão adversas e o ambiente não é tão hostil quanto aquele entremeadado as matas, porém, há um aporte de energia solar de grande intensidade, o que pode gerar muitas espécies de radicais, que por sua vez podem estimular a geração de substâncias antioxidantes.



Algumas outras relações foram observadas, ou seja, a atividade antioxidante do tratamento com 0,4 mL de chimarrão foi maior que os tratamentos com 0,2 mL, os quais consistiam nos tubos controle para as amostras de erva mate, demonstrando que existe uma relação direta entre a atividade antioxidante e sua concentração no meio, ou seja nos tratamentos com maior concentração de erva-mate proporcionaram um maior grau de sobrevivência.

Todos os tubos com apomorfina 1,0 mm/1,5 mm e 0,2 mL de chimarrão e com apomorfina 1,0 mm e 0,4 mL de chimarrão tiveram maior crescimento que os controles de apomorfina 1,0 mm e 1,5 mm, mostrando que a presença da erva-mate propiciou o crescimento das leveduras, até mesmo em quantidade maiores que o tubo controle de leveduras.

Todos os tubos com apomorfina 1,0 mm e 0,2 mL chimarrão tiveram maior crescimento que os tubos com apomorfina 1,5 mm e 0,2 mL chimarrão. Todos os tubos com apomorfina 1,0 mm e 0,4 mL chimarrão tiveram maior crescimento que o os tubos com apomorfina 1,0 mm e 0,2 mL chimarrão. Estas relações foram obedecidas nos três meses de análise.

As mesmas relações foram obtidas com o paraquat, mas o crescimento foi consideravelmente menor, mesmo assim foi significativamente diferente dos tubos controle de estressores e leveduras.

As amostras que apresentaram maior efeito antioxidante foram as colhidas em agosto, seguidas do mês de julho e junho. Tal fato não pode ser explicado pela teoria de que as condições climáticas mais drásticas do inverno ocorrem em junho, e deveria ser neste período a maior síntese de defesas antioxidantes por parte dos tecidos vegetais, mas podemos atribuir estes resultados ao maior aporte de energia luminosa, que dentro do metabolismo vegetal é transformada em química, podendo gerar espécies reativas, que estimulariam a síntese de agentes de defesa (Omari et al., 2003).

Os ervais do RS apresentaram um efeito protetor celular maior que os ervais de SC, sugerindo que as condições climáticas mais drásticas do inverno gaúcho influenciam diretamente na síntese destes compostos de defesa do tecido vegetal. Entre os tipos de cultivo, no RS, a atividade antioxidante dos ervais reflorestados foram maiores que dos ervais nativos, e para SC, ocorreu o inverso. Embora todos os tratamentos evidenciem um efeito protetor sobre as células (diferença significativa dos controles), as células tiveram maior dificuldade de crescimento frente aos estressor paraquat, o que demonstra uma maior fragilidade do metabolismo das leveduras contra o mecanismo de ação deste agente estressor.

Os resultados apresentados mostraram então que, de um modo geral, as amostras testadas possuem maior capacidade de proteger células da levedura dos danos causados pela apomorfina, ou seja, da geração de radicais quinonas, semiquinonas e radical superóxido (Lai & Yu, 1997; Mena et al., 1997; Blum et al., 2000). O maior efeito agressor do paraquat, pode ser explicado, pelo menos em parte, por, além de gerar o radical paraquat, também gerar radicais  $O_2^{\cdot-}$  e possivelmente  $OH^{\cdot}$  (Halliwell, 1987; Bulkley, 1993; Halliwell & Gutteridge, 2000), o que requeria um maior poder de inativação dos radicais livres pelos compostos ensaiados.

O maior grau de sobrevivência encontrado nos tratamentos que receberam erva-mate pode ser explicado pelo fato de que, além da atividade antioxidante exercida pela amostra no meio de reação protegendo do agente estressor, a erva-mate também contém vários nutrientes que podem ser utilizados pelas leveduras pra proporcionar o aumento do número de colônias. Estudos indicam como principais constituintes da erva-mate os seguintes compostos: água, celulose, gomas, dextrina, mucilagem, glicose, pentose, lipídios, resina aromática, legumina, albumina, cafeína, teofilina, cafearina, cafamarina, ácido matetânico, ácido fólico, ácido caféico, ácido virídico, clorofila, colesteroína, óleo essencial, aminoácidos, proteínas, vitaminas, saponinas, enzimas, polifenóis, alcalóides e taninos. Nas cinzas encontram-se grandes quantidades de potássio, lítio, ácidos fólicos, sulfúrico, carbônico, clorídrico e cítrico, além de magnésio, manganês, ferro, alumínio e traços de arsênico (Perez, 1993).

A levedura *S. cerevisiae*, uma anaeróbica facultativa, utiliza preferencialmente a glicose para obtenção de energia através da fermentação. Esse mecanismo é mediado por um complexo mecanismo de repressão e ativação de genes e proteínas conhecido por “repressão catabólica” ou “repressão por glicose”. A glicose quando presente no meio reprime uma série de genes que codificam as proteínas necessárias para a utilização de outras fontes de carbono e para o metabolismo oxidativo, incluindo a biossíntese de mitocôndrias e o transporte de elétrons pela cadeia mitocondrial (Maris et al., 1999). Quando a concentração de glicose cai para menos de 0,5% no meio, ocorre a depressão das enzimas que participam da biossíntese das mitocôndrias e de outros agentes necessários para o crescimento respiratório (Gancedo, 1998). Desta forma, no meio sintético completo (SC) contendo 3% de glicerol, ocorre depressão catabólica e a levedura cresce utilizando as via de metabolismo aeróbico.

O sistema enzimático de defesa antioxidante usado pelas leveduras é complexo e não totalmente esclarecido. Sabe-se, no entanto, que as células podem aumentar suas defesas antioxidantes durante o metabolismo aeróbico com o objetivo de diminuir os danos adicionais

gerados pelo funcionamento da cadeia de transporte de elétrons (Jamieson, 1998). Estas defesas incluem principalmente o aumento das enzimas SOD 1 e SOD 2 (Maris et al., 1999).

Frente a estes resultados, o RS estaria em desvantagem em relação aos ervais de SC, já que possuímos apenas 30% de ervais reflorestados, e são estes os de maior atividade antioxidante. Já em SC ocorre o contrário e o mais vantajoso para a saúde da população que as consome: a maioria é de ervais nativos, cujo efeito protetor celular é maior.

Não se observou, para nenhuma das amostras em todos os meses de análise, algum resultado que caracterizasse toxicidade por parte da erva-mate, nas concentrações que foram utilizadas. O crescimento celular em todos os tubos com maior concentração de erva-mate foi sempre maior que o de menor concentração.

Em trabalho desenvolvido por Alikardis (1987), extratos de *Ilex paraguariensis* foram administrados durante 60 dias em ratas e realizaram-se estudos hematológicos, hepatograma e de urina. Se observou um aumento moderado da contagem plaquetária nas ratas que consumiram extratos de *Ilex paraguariensis* em relação aos valores obtidos nas ratas controle (administração de somente água destilada), confirmando seu efeito positivo em sistemas vivos, como encontrado no presente trabalho.

Na análise dos resultados obtidos por Alikardis (1987) para caracterizar as ações fisiofarmacológicas das infusões de *Ilex paraguariensis*, não se observou nenhum resultado que sugira possibilidade de hemólise, pois, não houve aumento de produção dos reticulócitos circulantes ou da transaminase láctico desidrogenase ou da bilirrubina indireta, nem foi detectado a presença de fragilidade globular ou de hemossiderina (na urina), que são parâmetros que se alteram claramente no caso de hemólise. Em conclusão, a ingestão contínua de infusões de *Ilex paraguariensis* não produziu mudanças patológicas nestes animais, que os diferenciam do grupo controle; e os efeitos estimulantes centrais e diuréticos da infusão de *Ilex paraguariensis* de devem seguramente ao seu conteúdo de cafeína e metilxantinas. A ausência de efeitos tóxicos também foi observada na análise com leveduras.

Comparando os resultados encontrados com a literatura científica atual, verificou-se que Filip et al. (2000) testou a habilidade de extratos de *Ilex paraguariensis* em inibir a oxidação lipídica em membranas sintéticas (lipossomos), e concluiu que ocorreu uma proteção relevante das membranas, principalmente em um estágio inicial da reação, onde o extrato analisado foi hábil em inibir a oxidação dos lipossomos. Este é um dado que pode confirmar o efeito protetor encontrado para as amostras analisadas.

Existe uma forte correlação entre a atividade antioxidante e o total de compostos fenólicos encontrados na erva-mate. Os derivados cafeoil presentes no extrato são os

compostos responsáveis, em grande parte, a atividade antioxidante observada. A presença de rutina, quercetina e camferol, ambos livres ou como glicosídeos, em várias espécies *Ilex*, incluindo *I. paraguariensis*, podem também ser responsáveis em parte pela atividade antioxidante observada da erva-mate (Filip et al. 2000).

Observou-se uma relação constante entre todos os resultados, onde o crescimento de leveduras foi sempre proporcional à concentração do agente estressor e das amostras de erva-mate, para os dois estressores utilizados nos três meses de análise, demonstrando a confiabilidade da técnica e comprovando o efeito protetor da erva-mate.

Pode-se observar que o Desvio Padrão (DP) encontrado no testes *in vivo* foi, em todos os casos, superior ao que é normalmente encontrado na literatura científica, porém, como se trata de um ensaio biológico, este DP seria aceitável, visto que um sistema vivo está envolvido na análise.

De acordo com os resultados da atividade antioxidante *in vivo*, demonstrou-se quanto o produto erva-mate preparado na forma de chimarrão pode ser benéfico ao metabolismo humano, já que possui efeito protetor em sistemas vivos.

A Atividade Antioxidante Total foi avaliada separadamente (hidrofílica e lipofílica) para facilitar a discussão dos resultados. Quanto a atividade antioxidante hidrofílica, em junho, todas as amostras diferiram significativamente (Gráfico 1 – Artigo 2), sendo que a maior atividade antioxidante foi da amostra SC-N e a menor SC-R, ficando as amostras do estado do RS em posição intermediária. Em julho, não houve diferença significativa entre os tipos de ervais. Em agosto, as diferenças voltaram a aparecer, sendo todas as ervais diferentes entre si, além disso, a maior atividade foi das amostras do RS e as menores de SC, talvez pelo fato de que no RS o clima no inverno costuma ter temperaturas mais extremas, e isto poderia ter aumentado a síntese de compostos fenólicos responsáveis pelas defesas vegetais, os quais possuem atividade antioxidante.

A reação que ocorre na determinação da Atividade Antioxidante Total baseia-se na capacidade de diferentes componentes em sequestrar o radical cátion  $ABTS^{\circ+}$  comparado com um padrão antioxidante (Trolox) em uma curva dose-resposta. A presença de antioxidantes na solução causa supressão na cor de maneira proporcional a sua concentração. O método de descoloração  $ABTS/H_2O_2/HRP$  permite a avaliação da atividade antioxidante de amostras alimentares complexas. Este método, com poucas modificações, é capaz de determinar ambas atividades antioxidantes lipofílicas e hidrofílicas, assim, é possível estimar

a atividade antioxidante de ambos tipos de antioxidantes em uma mesma amostra. Este método é fácil, preciso, e rápido (Arnao et al., 2001).

Com relação aos meses de análise, todas as amostras apresentaram maior atividade antioxidante hidrofílica em agosto, intermediária em julho e menor em junho, com exceção da amostra SC-N, que teve a menor atividade em julho (Gráfico 1- Artigo 2).

Segundo Omari et al. (2003), para atividade antioxidante hidrofílica de *Quercus ilex*, atribui-se 88,0 – 99,9 % da atividade antioxidante total à fração hidrofílica (equivalente a 1 mMol de Trolox), e apenas 12-0,1% (até o correspondente a 30 µmol de Trolox) do total para os constituintes lipofílicos. O mesmo foi observado entre as amostras em estudo, onde o extrato aquoso foi mais eficaz em anular o processo de oxidação no meio de análise, comprovando que a erva-mate tem suas melhores propriedades aproveitadas quando ingerida pelos seus consumidores na forma de chimarrão.

Mesmo em condições distintas de temperatura (diferentes meses do ano, embora sendo todos representativos do inverno sulino) todas as amostras mostraram uma maior contribuição hidrofílica que lipofílica à atividade antioxidante total (Gráficos 1 e 2 – Artigo 2).

Em estudo comparativo entre *Ilex paraguariensis* e outras espécies comumente utilizadas como adulterantes, Filip et al. (2000) observou que a primeira apresentou uma diferença significativa de atividade antioxidante sobre as demais, provando que as possíveis misturas encontradas no mercado não só alteram as propriedades sensoriais do chimarrão e produtos derivados, como também influenciam sua ação sobre o metabolismo e saúde humana. Daí a importância de uma comprovação científica sobre os benefícios da bebida de *Ilex paraguariensis* para a saúde das populações e a certificação de um produto não adulterado.

Além atividade antioxidante das folhas de *Ilex paraguariensis*, que pode ser atribuída em parte aos seus constituintes fenólicos, derivados cafeoil e flavonóides, outras propriedades terapêuticas também lhes são atribuídas, como ação colerética, hipocolesterêmica, hepatoprotetora, propriedades gliconolíticas, lipolíticas e propriedades amargas do mate. Atualmente, preparações comerciais com erva-mate também são utilizadas como tônico, anticelulite e antienvhecimento. Um risco que os consumidores de chimarrão correm é a adulteração da erva-mate, mais comumente por sete congêneres: *Ilex brevicuspis*; *Ilex theezans*; *Ilex microdonta*; *Ilex dumosa var. dumosa*; *Ilex taubertiana*; *Ilex pseudobuxus*; *Ilex integerrima* e *Ilex Argentina*. *Ilex paraguariensis* demonstrou um conteúdo superior de flavonóides e derivados cafeoil que as outras espécies testadas (Filip et al., 2000).

Podemos observar que, em junho, a atividade antioxidante lipofílica (Gráfico 2 – Artigo 2) foi maior para a amostra RS-N, seguida das amostras de SC (reflorestada e nativa não diferiram entre si) e com menor atividade a amostra RS-R.

Em julho, todas as amostras diferiram significativamente, onde a maior e menor atividade, foi respectivamente, RS-R e RS-N, sendo que SC ficou com valores intermediários, mas também significativos. Em agosto, as amostras mais eficazes foram RS-N e SC-N, porém, a única que diferiu significativamente das demais foi a RS-R. Em junho foi detectada maior atividade antioxidante lipofílica entre todas as análises para a amostra RS-N e em julho a menor atividade encontrada para a mesma amostra, mostrando grande variação.

A tendência observada foi da atividade antioxidante lipofílica ser maior em agosto (Gráfico 2 – Artigo 2), o que não seria explicado pela teoria de que os fenóis, importantes substâncias com atividades antioxidantes, que provavelmente são mais produzidos pelos tecidos vegetais nas condições adversas e de estresse do inverno, com objetivo de defesa contra agentes agressores e invasores da natureza, e que, provavelmente, esta maior capacidade protetora deve-se a existência de outras substâncias possivelmente com atividade antioxidante. Entre as amostras, observou-se uma grande variação entre elas com respeito ao maior efeito protetor, sendo que todas elas, em pelo menos um período de análise (tanto para atividade hidrofílica quanto lipofílica) tiveram a maior capacidade de evitar reações de oxidação.

De acordo com Omari et al. (2003), o verão, quando comparado às outras estações, é a estação que possui maior efeito protetor sobre espécies reativas de oxigênio para várias espécies vegetais. Extratos de folhas *Quercus ilex* após processamento mostraram maior atividade antioxidante total durante o verão, quando a temperatura e pressão de vapor foram maior. Sob estas condições, a água viabilizou o fechamento dos estômatos, levando a diminuição da fotossíntese, que é característica das espécies vegetais. A absorção de luz pode então exceder o requerido para a assimilação da fotossíntese, que, ao longo de condições como o verão, com altas temperaturas, alta taxa respiratória e metabólica e maior irradiação, pode aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio e a participação de mecanismos fotoprotetores. Como as análises foram feitas durante o inverno, os resultados encontrados não podem ser comparados com o que acontece com o metabolismo vegetal durante o verão do Mediterrâneo, onde ocorreu a pesquisa de OMARI *et al.* [22], porém entre os três meses analisados, o mês de agosto geralmente apresenta maior número de horas de insolação por dia (os dias ficam mais longos se comparados os dias de junho), portanto, talvez este mesmo mecanismo talvez poderia explicar o que ocorreu com as amostras em análise.

Para a análise do poder redutor das amostras referentes aos meses de junho e agosto, verificou-se diferenças significativas entre todas elas (Gráfico 3 – Artigo 2). No mês de julho, as amostras de SC não diferiram entre si, mas diferiram das demais amostras.

O maior poder redutor foi observado para todas as amostras, nas análises referentes ao mês de junho, valores intermediários em julho e o menor poder redutor para o mês de agosto (Gráfico 3 – Artigo 2). Provavelmente, a diferença encontrada entre as análises de atividade antioxidante total e poder redutor deve-se a síntese de diferentes compostos em diferentes períodos do ano, os quais influenciam, em maior ou menor proporção, a capacidade de defesa de células vegetais e a compensação de síntese de um ou outro composto ajudariam a manter em níveis constantes desta capacidade de defesa.

Ao contrário da vasta literatura que existe sobre atividade antioxidante total e poder seqüestrante de radicais, dados específicos sobre poder redutor são um tanto limitados. Entretanto, a habilidade antioxidante de muitos compostos está diretamente relacionada a sua capacidade redutora, assim, a medida do Poder Redutor pode ser uma importante ferramenta de suporte na definição do mecanismo de ação de um dado antioxidante em determinado meio.

Psarra et al. (2002) pesquisou o poder redutor de vinhos brancos e sua relação com a composição de polifenóis. As análises mostraram, que o poder redutor das amostras de vinhos variaram largamente, o que é uma indicação que o poder redutor é dependente de ambos conteúdo de polifenóis totais e da relativa quantidade de polifenóis individuais. A pesquisa mostra ainda que análogos do ácido clorogênico, como o ácido cafeico, possuem uma grande habilidade em reduzir o íon férrico presente na reação e possivelmente encontrado na erva-mate. O Poder Redutor pode ser atribuído na mesma extensão tanto à concentração de polifenóis totais quanto a concentração de flavanóis para as amostras de vinhos testados. Provavelmente possa se esperar a mesma condição para extratos de erva-mate, onde, para se comprovar, poderia-se quantificar estes mesmos compostos nas amostras em questão.

Os valores encontrados para amostras de vinhos brancos variaram entre 0,31 e 2,05 mM Equivalentes de Quercetina (Psarra et al., 2002), já para os extratos de erva-mate, os valores foram superiores, entre 4,4373 e 12,4082 mM Equivalentes de Quercetina. Esta diferença pode ser aceita levando-se em consideração que vinhos brancos possuem uma atividade antioxidante menor que vinhos tintos, que por sua vez, possui metade da atividade antioxidante de extratos de erva-mate, preparadas na menor concentração utilizada para

comparar a ação protetora de *Ilex paraguariensis* com outros sistemas alimentares (Filip et al., 2000).

Segundo Mau et al. (2002) o Poder Redutor de extratos de cogumelos medicinais foi crescente em relação a sua concentração, isto pode também ser esperado para os extratos de erva-mate, uma vez que os resultados encontrados foram semelhantes. Tal resultado nos conduz ao fato de que as características antioxidantes da erva-mate podem ser exploradas como uma propriedade medicinal.

O radical DPPH é um radical estável com uma baixa taxa de deterioração e reatividade frente a outros compostos. Conseqüentemente, somente um bom doador de hidrogênio consegue reagir com um radical estável em uma reação estequiométrica. Em adição, antioxidantes que são efetivos quelantes de íons de metais de transição podem contribuir diferentemente para a resposta antioxidante nos ensaios de Poder Redutor comparado a ensaios usando radicais estáveis (Schwarz et al., 2001).

A análise baseada no poder seqüestrante de radicais estáveis é um método confiável para prever a inibição dos produtos primários formados à partir da oxidação por extratos naturais em sistemas alimentares homogêneos (Schwarz et al., 2001).

O maior poder seqüestrante de radicais DPPH foi encontrado nas amostras colhidas no mês de junho. Este efeito se reduziu em julho e voltou a aumentar em agosto, mas sem diferença significativa entre os dois últimos meses (Gráfico 4 – Artigo 2). Isto pode ser devido a variações climáticas, já que até nos estados do sul do Brasil, onde há melhor definição entre as estações do ano, picos climáticos diferentes da temperatura média para a época do ano vêm ocorrendo freqüentemente.

Todas as amostras referentes aos meses de junho e agosto apresentaram efeito seqüestrante semelhante (sem diferença significativa entre si). Já para o mês de julho, a amostra RS-N e RS-R, tiveram, respectivamente, maior e menor capacidade de evitar a oxidação em sistemas químicos e SC ficou com valores intermediários, sem diferenças entre si.

Arnous et al. (2001) encontrou valores de Atividade Anti-radical para vinhos tintos envelhecidos entre 0,88 – 1,53 mM Equivalentes de Trolox e verificou uma pobre correlação entre o total de antocianinas com atividade anti-radical e poder redutor, o pode ser devido ao fato que os valores de antocianinas também representam polímeros e outros tipos de pigmentos, que podem não possuir características antioxidantes similares com antocianinas monoméricas. O conteúdo de polifenóis é o maior fator que afeta as propriedades antioxidantes do vinho tinto, e tudo indica que sejam também do mate.



Os valores de Atividade Anti-Radical, encontrados para os extratos de erva-mate (4,0221 – 11,1393 mM Equivalentes de Trolox) foram superiores aos encontrados para amostras de vinhos tintos envelhecidos. Considerando que durante o envelhecimento os compostos fenólicos podem participar de reações de polimerização e precipitação, e que são estes os principais responsáveis pela atividade antioxidante de vinhos tintos, uma maior ação protetora por parte dos extratos de erva-mate seria esperada. Além das reações de polimerização e precipitação, os polifenóis também são utilizados para evitar a própria oxidação do vinho, sendo, portanto, consumidos durante a estocagem e envelhecimento (Arnous et al., 2001).

Gugliucci (1996) mostrou que em extratos de *Ilex paraguariensis* foram hábeis em inibir a oxidação induzida de lipoproteínas de baixa densidade em plasma humano. Tal efeito foi atribuído aos polifenóis presentes no extrato. Entretanto, a quantidade destes antioxidantes que pode ser absorvida não é clara, evidências indicam que quantidade substancial destes compostos é absorvida e são encontrados em altos níveis em plasma humano, sendo responsáveis por inibir a oxidação de lipoproteínas.

A diferença na atividade de extratos em relação à Equivalentes de Trolox indicam diferenças no modo de ação antioxidante entre os ensaios utilizados (Atividade Antioxidante Total, Poder Redutor e Efeito Seqüestrante de Radicais DPPH). Os ensaios são baseados em diferentes princípios e representam diferentes aspectos de potencial antioxidante, então uma divergência entre todos eles pode ser normalmente esperada, como já demonstrado em estudos similares em soro humano (Gugliucci, 1996).

Os resultados obtidos por Filip et al. (2000) demonstram que *Ilex paraguariensis* tem um conteúdo superior de flavonóides (quercetina, rutina e camferol) e derivados cafeoil (ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquinico, ácido 3,5-dicafeoilquinico e ácido 4,5-dicafeoilquinico) – principais responsáveis pela atividade antioxidante da erva-mate – que outras espécies testadas. Ácido cafeico, ácido clorogênico e os três ácidos dicafeoilquinicos estão presentes em todas as espécies, no entanto, diferenças quantitativas substanciais são notadas entre *Ilex paraguariensis* e outras espécies. Estes resultados, além de contribuir para o conhecimento da composição de espécies *Ilex* sul americanas, estão em acordo com o uso terapêutico da *Ilex paraguariensis*. O conteúdo superior de derivados cafeoil e flavonóides detectado em *Ilex paraguariensis* sustenta o uso do mate como colerético, antioxidante e agente hipocolesterêmico. Muitos flavonóides, como a quercetina, luteolina e catequinas, são melhores antioxidantes que a vitamina C, vitamina E e  $\beta$ -caroteno em uma mesma concentração molar (Gao et al., 1999).

A cafeína, teofilina e teobromina são três alcalóides, estreitamente relacionados, encontrados na erva-mate e fazem parte do grupo de compostos mais interessantes sob o ponto de vista terapêutico (Perez, 1993).

Investigações fitoquímicas de *Ilex paraguariensis* encontram muitas classes de constituintes químicos como alcalóides (cafeína), aminoácidos, polifenóis (ácidos clorogênicos) e flavonóides (quercetina, rutina e camferol). Os polifenóis e flavonóides tem se mostrado protetores contra várias doenças (Schinella, et al., 2000).

Quanto à relação entre ervais nativos e reflorestados, o que poderia ser esperado era que as amostras provenientes de ervais nativos, os quais nascem entremeados às matas, com menor exposição ao sol e competindo com várias outras espécies vegetais por espaço para crescimento, provavelmente tivessem uma maior produção de compostos de defesa, e conseqüentemente, maior atividade antioxidante, mas esta relação nem sempre foi observada, encontrando-se uma grande variação.

## 5 – CONCLUSÃO

Através da análise antioxidante *in vivo*, verificou-se que as amostras de erva mate apresentaram efeito protetor sobre as células de *Saccharomyces cerevisiae*, permitindo seu crescimento na presença de diferentes agentes estressores (apomorfina e paraquat) em diferentes concentrações, anulando seu efeito agressor.

Os resultados obtidos mostraram que os agentes estressores utilizados exercem um importante efeito citotóxico dose-dependente sobre as células da levedura, o qual é significativamente diminuído pela adição das amostras de erva-mate.

Com a análise química, constatou-se que a erva mate, consumida na forma de chimarrão, possui ótima capacidade de anular radicais livres presentes em um meio complexo, que pode ser comparada com outros produtos vegetais de já comprovada ação antioxidante, como vinhos tintos e óleos virgens.

Quanto aos estados produtores e os tipos de ervais, não foi possível estabelecer uma relação constante, visto que as variações foram grandes, e de certa forma, semelhantes de acordo com os meses de análise para todas as amostras.

A suplementação das defesas antioxidantes naturais do corpo humano pode ser feita através de uma dieta balanceada com frutas, vegetais e de bebidas a base de erva-mate, o que pode ser extremamente benéfico à saúde visto sua comprovada atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e outros efeitos fisiológicos, já relatados pela literatura científica que suportam a crença popular em algumas das atividades relacionadas para o consumo dessa planta. Pode-se, então, incluir o Chimarrão em uma dieta racional.

Os resultados desta pesquisa sugerem que a ingestão de erva-mate na forma de Chimarrão pode ser um meio muito eficaz e econômico para fornecer uma importante quantidade de compostos que aumentam o sistema de defesa antioxidante de um organismo, além de permitir a busca de novas áreas mercadológicas, propiciando o desenvolvimento de produtos alternativos e de maior qualidade, com atributos voltados para a saúde humana.

## **6 – SUGESTÕES**

Repetir este estudo em outros anos, a fim de verificar a diferença entre os meses de colheita e também se os resultados do ano em questão (2004) se reproduzem, visto que as variações climáticas são consideráveis.

Realizar as análises nas outras estações do ano (primavera, verão e outono), para verificar qual a relação obedecida de acordo com uma faixa mais ampla de oscilações ambientais.

## 7 – REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, G.O. et al. Antioxidants and lipid oxidation in food - a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n.4, p. 283-298, 1998.
- ALIKARDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal of Ethnopharmacology**, 20:121-144, 1987.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA - MATE. Atividade importante no Sul do País. Santa Cruz do Sul, RS: **Grupo de Comunicações Gazeta**; p. 53-55. 1999.
- ARNAO, M.B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.73, p. 239-244, 2001.
- ARNOUS, A.; MAKKRIS, D.P.; KEFALAS, P. Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 5736-5742, 2001.
- ARUOMA, O. I. **JAOCs**, v. 75, p. 99–212, 1998.
- BABIOR, B.M. Superoxide : A two-edged sword. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 30(2):141-155, 1997.
- BAISCH, A.L.M.; JOHNSTON, F.L.; STEIN, P. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. **J. ethnopharmacol.**, v.60, p. 133-39, 1998.
- BARROS, S.G.S. et al. Mate (chimarrão) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. **Arq. Gastroenterot.**, v.37, n.1, p.25-30, 2000.

- BASTOS, D.H.M.; TORRES, E.A.F.S.; Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 26, p. 77-89, 2003.
- BECKMAN, K. B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiol. Rev.** 78(2): 547-581, 1998.
- BECKMANN, J.S. et al. White, Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, v. 375, p. 81-88, 1994.
- BELL, A. A., OUGH, C. S., KLIEWER, W. M. Effects on must and wine composition, rates of fermentation and wine quality of nitrogen fertilization of *Vitis vinifera* var. Thompson Seedless grapevines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Califórnia, v. 30, n. 2, p. 124-129, 1979.
- BLUM, D. et al. Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. **Neurosci. Lett.**, 283: 193-196, 2000.
- BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina** (B. Aires), 58:350-356, 1998.
- BULKLEY, G.B. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. **Surgery.**, 113(5): 479-483, 1993.
- CARPANEZZI, A. A. Cultura da erva-mate no Brasil: conflitos e lacunas. In: **erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Editora da Universidade/UFRGS, p.43-46, 1995.
- CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.T. Chá mate e café como fontes de hidrocarbonetos polidroxiaromáticos (HPA<sub>s</sub>) na dieta da população de Campinas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.19, n.1., 2002.

- CAMPOS, A. M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de Ilex paraguariensis St. Hil. Aquifoliaceae (erva - mate)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 1996.
- CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. Uma introdução à bioquímica dos radicais livres. In: CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. **Radicais livres em medicina**. Interlivros, Rio de Janeiro: 1996, p.1–13.
- CHEN, J.H.; HO, C.T. Antioxidant Activities of Carffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. **J. Agric. Food Chem.** v. 45, p. 2374-2378, 1997.
- CHIPAULT, J.R. et al. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, v. 17, p. 46-55, 1952.
- CINTRA, R.M.G.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant activity of spices in different systems. In: Biennieal Meeting International Society For Free Radical Research, Barcelona. **Anais Abstract Book, ISFRR**, v. 8.,p. 90, 1996.
- DE STEFANI, E. et al. Black tobacco, mate, and bladder cancer. A case-control study from Uruguay. **Cancer**, v. 67, n.2, p. 536-540, 1991.
- DESER. DEPARTAMENTO DE ESTUDOS SÓCIO-ECONÔMICOS. A cadeia produtiva do mate, In: **Informativo de Conjuntura Agrícola e Comercialização do Alto Uruguai**. Curitiba, PR. Nº3 – set/out, 2001. 12p. Disponível em: <<http://www.deser.org.br>>. Acesso em: 10 jan. 2002.
- EATON, J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: Mysteries of the bestiary. **J. Lab. Clin.Med.**, 7: 3-4, 1991.
- FELIPPE JR., J.; PERCÁIO, S. Radicais livres em medicina intensiva. **Rev. Bras. Terap. Intens.**, 3(3):66-72, 1991.

- FERDINANDY, P. et al. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. **Circ Res**, v. 87, p. 241–247, 2000.
- FERGUSON, L.R.; HARRIS, P.J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v.8, n.1, p.17-25, 1999.
- FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.
- FRANKEL, E.N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Food Science and Technology**, v. 4, p. 220-225, 1993.
- FULEKI, T. Vineland vistas. **The Grower**, v. 43, p. 7, 1993.
- GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 334-361, 1998.
- GAO, Z.; HUANG, K.; YANG, X.; XU, H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1472:643-650, 1999.
- GORZALCZANY, S. et al. Choleric effect and intestinal propulsion of “mate” (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. **J. ethnopharmacol.** v.75, p. 291-294, 2001.
- GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of Human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, p. 338-344, 1996.
- GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. **Life Sciences**, v.72, p.279-292, 2003.



- GUGLIUCCI, A.; STAHL, A.J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochem Mol Biol Int**, v. 35, p. 47-56, 1995.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Clarendon, Oxford, 2000.
- HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996.
- HALLIWELL, B. Oxigens radicals and metal ions: potential antioxidant intervention strategies. **Ann. Interme. Med.**; 107:526-45, 1987.
- HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **Am. J. Clin. Nutr.**, 57: 715-725, 1993.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, 1989.
- HARRIS, R.K.; HAGGERTY, W.J. Assays for potentially anticarcinogenic phytochemicals in flaxseed. **Cereal Foods World**, v.38, p. 147-51, 1993.
- HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J.; Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.
- HENRIQUES, J.A.P. et al. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. (Ed) **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Vol. 1. Guaíba, Agropecuária, 227-252, 2001.
- HERTOG, M.G.L. et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Arch Intern Med.**, v. 155, p. 381-386, 1995.
- INOUE, Y. et al. Molecular identification of glutathione synthetase (GSH2) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. Biophys. Acta.**, 1395:315-320, 1998.

- JACOB, R.A.; BURRI, B. Oxidative damage and defense. **American Journal of Clinical Nutrition.**, v. 63, p. 985-990, 1996.
- JAMIESON, D.J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 1511-1527, 1998.
- KATIYAR, S.K. et al. (-)-Epigallo-catechin-3-gallate in *Camellia sinensis* leaves from Himalaya of Sikkim: Inhibitory effects against biochemical events and tumor initiation in Sencar mouse skin. **Nutr Cancer**; 18: 73-83, 1992.
- KARAKAYA, S. et al. A. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. **J. Food Sci. Nutr.**, v.52, p. 501-508, 2001.
- KERRY, N.; RICE-EVANS, C. Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships. **J Neurochem**, v. 73, p. 247-253, 1999.
- KITTS, D.D. Bioactive substance in food: identification and potential use. **Journal of the Physiology and Pharmacology**, Canada.v. 72, p. 423-434, 1994.
- KOLEVA, I.I. et al. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. **Phytochemical Analysis**, 13. 8-17, 2002.
- KONO, Y. et al. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. **Biochim Biophys Acta**, v. 1335, p. 335-342, 1997.
- KROON, P A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plant and food: current and future perspectives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 355-361, 1999.
- LABELL, F.; Foods of tomorrow. Part I. Experts ask policy change on health claims. **Food Processing**, April, p. 52-57, 1993.

- LAI, C.T.; YU, P.H. Dopamine and L- $\beta$ -3-4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (L-DOPA)- induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Biochem. Pharmacol.**, 53:317-328, 1997.
- LEEUEWENBURGH, C. et al. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. **J Biol Chem**, v. 272, p. 1433–1436, 1997.
- LIPPMAN, S.M.; BENNER, S.E.; HONG, W.K. Retinoid chemoprevention studies in upper aerodigestive tract and lung carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 54 (Suppl.), p. 2025-2028, 1994.
- LOTITO, S.B.; FRAGA, C.G. Catechins as antioxidant: mechanisms preventing human plasma oxidation and activity in red wines. **Biofactors**, v. 10, 125-130, 1999.
- MACCARI, A.J.; SANTOS, A.P.R. Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. **MCT/CNPq/PADCT**, Curitiba, PR, 2000.
- MANCINI-FILHO, J.; MOREIRA, A. V. B. Efeito dos compostos fenólicos de especiarias sobre lípidos polinsaturados. **Rev. Bras. Cjênc. Farm**, São Paulo, v.39, p. 130-133, 2003.
- MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Res.**, 113 173-215, 1983.
- MARIS, A.F. **Estratégias de produção antioxidante da levedura *Saccharomices cerevisiae***. Tese de doutorado. Centro de biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 1999.
- MAU, J.L.; LIN, H.C.; CHEN, C.C. Antioxidant Properties of Several Medicinal Mushrooms. **J. Agric. Food Chem.** v. 50, p. 6072-6077, 2002.
- MELO, E.A.; GUERRA; N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, jan-jun., 2002.

- MENA, M.A. et al. Glia protect midbrain dopamine neurons in culture from L-DOPA toxicity through multiple mechanisms. **J. Neural Transm.**, 104:317-328, 1997.
- MORA, A. et al. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation, **Biochem Pharmacol.**, v. 40, p. 793–797, 1990.
- MUÑOZ, N. et al. Hot Mate drinking and precancerous lesions of the oesophagus: an endoscopic southern Brazil. **J. Cancer**, v.39, p.708-709, 1987.
- NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, Boca Raton, v. 29, n. 4, p. 273-300, 1990.
- NARDINI, M. et al. Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: an *in vivo* study. **Arch Biochem Biophys**, v. 342, p. 157-160, 1997.
- NISHIDA H, OMORI M, FUKUTOMI Y, et al. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on spontaneous hepatoma in C3H/HeNCrj mice and human hepatoma-derived PLC/PRF/5 cells. **J. Cancer Res.**, 85: 221-5, 1994.
- OMARI, B.E. et al. Total Antioxidant activity in *Quercus ilex* resprouts after fire. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p. 41-47, 2003.
- PARK, Y.K.; KOO, M.H.; CARVALHO, P. O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Boletim da SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 200-206, 1997.
- PELEG, H.; BODINE, K.K.; NOBLE, A.C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, Oxford, v.23, n.3, p.371-378, 1998.
- PEREZ, C. A. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity, **J Ethnopharmacol.** 39(2): 119-28, 1993.

PETERSON, J.; DWYER, J.; Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, Vol. 18. No 12. pp. 1995-2018, 1998.

PINTO, J. et al. Mate, coffee and tea consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in southern Brazil. **Epidemiology**, v.5, n.6, p.583-590, 1994.

PSZCZOLA, D.E. Highlights of "The nutraceutical initiative: A proposal for economic and regulatory reform." **Food Technol.**, April, 77-79, 1992.

PROJETO PLATAFORMA TECNOLÓGICA DA ERVA-MATE DO PARANÁ. MCT/CNPq/PADCT/Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate, Curitiba, Paraná. In: **Produtos Alternativos e Desenvolvimento da Tecnologia Industrial na Cadeia Produtiva da Erva-Mate, série PADCT n° 1 e Patentes Industriais e as Prioridades para os Investimentos Tecnológicos na Cadeia Produtiva da Erva-Mate, série PADCT n° 2**, agosto 2000.

PSARRA, E. et al. Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek White wines: correlation with polyphenolic composition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 1014-1020, 2002.

RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI. DL.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. **Food antioxidants - technological, toxicological and health perspectives**. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 65-157, 1995.

RAMARATHNAM, N. et al. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 3, p. 75-82, 1995.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER N.J.; PAGANGA G. Antioxidant Properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, April, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

SAAP. SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ. **Erva-mate: prospeção tecnológica da cadeia produtiva**. SEAB, Curitiba, p. 121, 1997.

- SÁNCHEZ-MORENO, S.; LAURRAURI, J.A.; CALIXITO-SAURA, F. Free radical scavenger capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grapes juices and related polyphenolic constituents. **Food. Res. Internat.**, 32(6): 407-412, 1999.
- SCHINELLA, G.R. et al. Antioxidant effects of aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 357-360, 2000.
- SCHWARZ, K. et al. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. **Eur Food Res Technol**; v. 212, p. 319–328, 2001.
- SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. **Crit. Ver. Food Sci. Nutr.**, 32(1): 67-103, 1992.
- SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Nahtung**, 44(3): 158-163, 2000.
- SIMIC, M.G.; JAVANOVIC, S.V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: HO, C.T.; OSAWA, T.; HUANG, T.M.; ROSEN, R.T. (Ed.). **Food phytochemicals for cancer prevention**. Washington, ACS Symposium Series, n. 546. American Chemical Society, p. 20-33, 1994.
- SLATER, T.F. Free-radical mechanism in tissue injury. **Biochem. J.**, 222: 1-15, 1984.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, , Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, jan./abr., 2002.
- SORTWELL, D. El uso de antioxidantes BHA y BHT. **Tecnol. Aliment.**, 30(5): 9-11, 1995.
- STAVRIC, B. Role of chemoprevents in human diet. **Clinical Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 319-332, 1994.
- STEINMAN, H.M. The amino acid sequence of copper-zinc superoxide dismutase from bakers yeast. **J. Biol. Chem.**, 255: 6758-6765, 1980.

- STEVENSON, S.G.; VAISEY-GENSER, M.; ESKIN, N.A.M.. Quality control in the use of deep frying oils. **JAACS**, 61(6): 1102-1108, 1984.
- TAKABE, W. et al. Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid per oxidation product, acrolein, **Carcinogenesis**, v. 22, p. 935-941, 2001.
- THOMAS, M.J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, v.16, n.7/8, p.716-718, 2000.
- TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. **Lipids**, v. 33, p. 583-588, 1998.
- ULBRICHT, T.; Health and food industry - What lies ahead - Nutraceuticals. **Food Policy**; v. 18, p. 379-381, 1993.
- VASSALO, A. et al. Esophageal cancer in Uruguay: A case control study. **JNCI**, v.75, p.1005-1009, 1985.
- VICEDO, T.B.; CORREAS, F.J.H. Antioxidants: una terapéutica de futuro? **Nutr. Hosp.**, 12(3):108-120, 1997.
- VINSON, J. et al. Plant polyphenols, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. **J Agric Food Chem.**, v. 43, p. 2800-2802, 1995.
- WANG, W.; SAWICKI, G.; SCHULZ, R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. **Cardiovasc Res.**, v.53, p. 165-174, 2002.
- WEISBURGER, J.H. Mechanisms of action of antioxidant as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. **Food Chem. Toxicol.** v.37, n.9-10, p.943-948, 1999.
- WILLIAMSON, G.; FAULKNER, K.; PLUMB, G.W. Glucosinolates and phenolics as antioxidants from plant foods. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 17-21, 1998.

WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L.C. Erva-Mate: Biologia e Cultura no Cone Sul. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, p. 356, 1995.

ZAMBIZI, C. Oxidation reactions of vegetale oils and fats. **Bol. SBCTA**, 33(1):1-7, 1999.

ZULLI, F.; LIECHTI, C.H.; SUTER, F. Controlled delivery of lipophilic agents to cell cultures for in vitro toxicity and biocompatibility assays. **Internat. J. Cosmetic. Sci.**, 22(4): 265-270, 2000.

YANG, C.S.; WANG, Z.Y. Tea and cancer. **J Nat Cancer Inst.**, 85: 1038-49, 1983.



## 8. ANEXOS

### 8.1 ANEXO A: Tabela 1 - Atividade Antioxidante Hidrofílica das amostras nativas e reflorestadas de erva-mate dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina

Tipos de ervais	Meses								
	JUNHO			JULHO			AGOSTO		
SC - N	0,3023	a	B	0,2926	a	C	0,5576	c	A
SC - R	0,1336	d	C	0,2857	a	B	0,5570	d	A
RS - N	0,2873	b	C	0,2937	a	B	0,5583	b	A
RS - R	0,2109	c	C	0,2919	a	B	0,5627	a	A

Letras Minúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da coluna (Tipos de ervais). Letras Maiúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da linha (Meses).

Resultados expressos em mM Equivalentes de Trolox

RS-N = erva mate nativa proveniente do estado do Rio Grande do Sul

RS-R = erva mate reflorestada proveniente do estado do Rio Grande do Sul

SC-N = erva mate nativa proveniente do estado de Santa Catarina

SC-R = erva mate reflorestada proveniente do estado de Santa Catarina

### 8.2 ANEXO B: Tabela 2 - Atividade Antioxidante Lipofílica das amostras nativas e reflorestadas de erva-mate dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina

Tipos de ervais	Meses								
	JUNHO			JULHO			AGOSTO		
SC - N	20,9638	b	B	18,3507	b	C	24,1346	a	A
SC - R	21,8564	b	A	8,4681	c	B	21,9444	a	A
RS - N	27,6685	a	A	4,9516	d	B	25,5722	a	A
RS - R	17,3626	c	B	25,4838	a	A	16,7486	b	B

Letras Minúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da coluna (Tipos de ervais).

Letras Maiúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da linha (Meses).

Resultados expressos em  $\mu$ M Trolox

RS-N = erva mate nativa proveniente do estado do Rio Grande do Sul

RS-R = erva mate reflorestada proveniente do estado do Rio Grande do Sul

SC-N = erva mate nativa proveniente do estado de Santa Catarina

SC-R = erva mate reflorestada proveniente do estado de Santa Catarina

**8.3 ANEXO C: Tabela 3 – Poder Redutor das amostras nativas e reflorestadas de erva-mate dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**

Tipos de ervais	Meses								
	JUNHO			JULHO			AGOSTO		
<i>SC - N</i>	12,4082	a	A	8,3468	b	B	4,8705	b	C
<i>SC - R</i>	11,3638	bc	A	7,9986	b	B	4,7550	c	C
<i>RS - N</i>	11,7119	b	A	9,7392	a	B	5,1737	a	C
<i>RS - R</i>	11,0157	c	A	7,5345	c	B	4,4373	d	C

*Letras Minúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da coluna (Tipos de ervais).*

*Letras Maiúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da linha (Meses).*

Resultados expressos em mM Quercetina

RS-N = erva mate nativa proveniente do estado do Rio Grande do Sul

RS-R = erva mate reflorestada proveniente do estado do Rio Grande do Sul

SC-N = erva mate nativa proveniente do estado de Santa Catarina

SC-R = erva mate reflorestada proveniente do estado de Santa Catarina

**8.4 ANEXO D: Tabela 4 – Efeito Seqüestrante de Radicais DPPH das amostras nativas e reflorestadas de erva-mate dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**

Tipos de ervais	Meses								
	JUNHO			JULHO			AGOSTO		
<i>SC - N</i>	9,6497	a	A	5,5117	ab	B	6,6831	a	B
<i>SC - R</i>	10,6428	a	A	5,5117	ab	B	5,6985	a	B
<i>RS - N</i>	10,6428	a	A	6,0083	a	C	6,6831	a	B
<i>RS - R</i>	11,1393	a	A	4,0221	b	C	6,6831	a	B

*Letras Minúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da coluna (Tipos de ervais).*

*Letras Maiúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da linha (Meses).*

Resultados expressos em mM Trolox

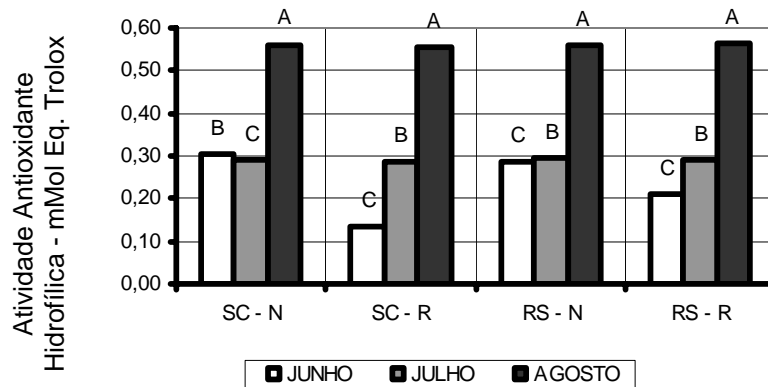
RS-N = erva mate nativa proveniente do estado do Rio Grande do Sul

RS-R = erva mate reflorestada proveniente do estado do Rio Grande do Sul

SC-N = erva mate nativa proveniente do estado de Santa Catarina

SC-R = erva mate reflorestada proveniente do estado de Santa Catarina.

### 8.5 ANEXO E: Gráfico 5 - Diferenças de Atividade Antioxidante Hidrofílica entre os meses de análise.



A, B, C Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

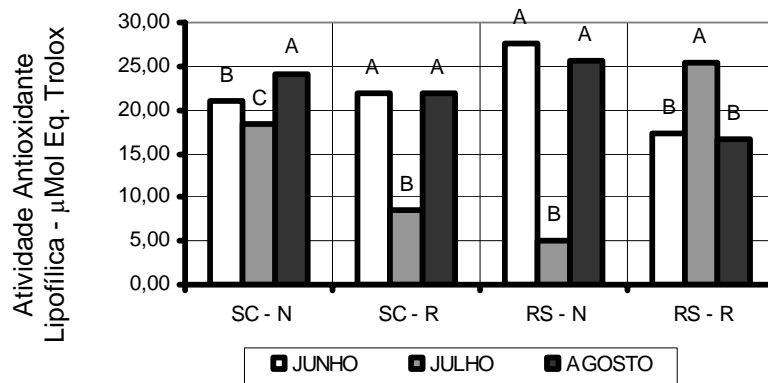
RS-N = erva mate nativa proveniente do estado do Rio Grande do Sul

RS-R = erva mate reflorestada proveniente do estado do Rio Grande do Sul

SC-N = erva mate nativa proveniente do estado de Santa Catarina

SC-R = erva mate reflorestada proveniente do estado de Santa Catarina.

### 8.6 ANEXO F: Gráfico 6 - Diferenças de Atividade Antioxidante Lipofílica entre os meses de análise.



A, B, C Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

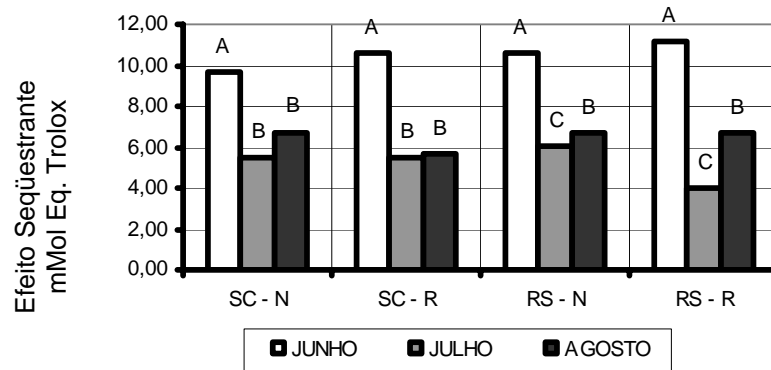
RS-N = erva mate nativa proveniente do estado do Rio Grande do Sul

RS-R = erva mate reflorestada proveniente do estado do Rio Grande do Sul

SC-N = erva mate nativa proveniente do estado de Santa Catarina

SC-R = erva mate reflorestada proveniente do estado de Santa Catarina.

**8.7 ANEXO G: Gráfico 7 - Diferenças de Efeito Seqüestrante de Radicais DPPH entre os meses de análise.**



A, B, C Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

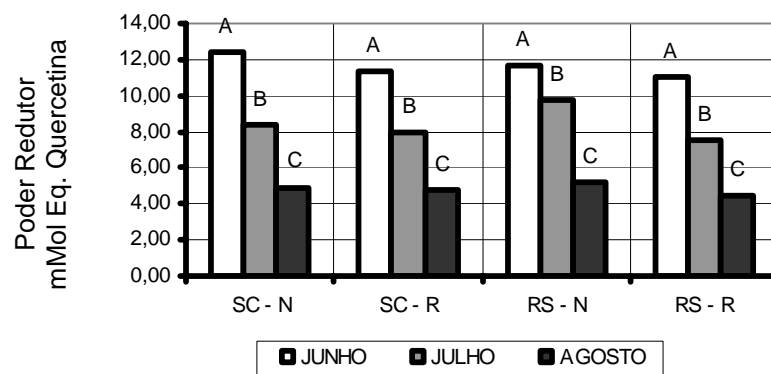
RS-N = erva mate nativa proveniente do estado do Rio Grande do Sul

RS-R = erva mate reflorestada proveniente do estado do Rio Grande do Sul

SC-N = erva mate nativa proveniente do estado de Santa Catarina

SC-R = erva mate reflorestada proveniente do estado de Santa Catarina.

**8.8 ANEXO H: Gráfico 8 - Diferenças de Poder Redutor entre os meses de análise.**



A, B, C Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

RS-N = erva mate nativa proveniente do estado do Rio Grande do Sul

RS-R = erva mate reflorestada proveniente do estado do Rio Grande do Sul

SC-N = erva mate nativa proveniente do estado de Santa Catarina

SC-R = erva mate reflorestada proveniente do estado de Santa Catarina.