



Ana Luísa Fernandes Morais

**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE BEBIDAS E “CHÁS”
PREPARADOS A PARTIR DE DIFERENTES FORMULAÇÕES**

**Dissertação do 2º Ciclo de Estudos conducente ao Grau de Mestre em Controlo de
Qualidade**

Orientação

Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira

Professora Doutora Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira

PORTO
Setembro, 2011

É autorizada a reprodução integral desta dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado que a tal se compromete.

AGRADECIMENTOS

No percurso de estudo e trabalho que agora termina participaram, direta ou indiretamente, pessoas às quais estou profundamente grata. Pelos contributos de todos quantos tornaram possível a conclusão deste mestrado, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Maria Beatriz Oliveira pela sua dedicada orientação e atenção, pelo constante apoio, exemplo e conselho, pela disponibilidade e compreensão, pelos ensinamentos transmitidos ao longo da minha formação académica, pela cuidadosa revisão científica, e cuja profunda experiência e saber muito valorizaram esta tese.

À Professora Doutora Isabel C.F.R. Ferreira pelo seu acolhimento e simpatia, pela constante disponibilidade pedagógica, pela dedicada orientação e atenção, pela valiosa revisão crítica desta tese, pelo inestimável empenho no sucesso deste trabalho.

Aos Doutores João Barreira e Lillian Barros pelo bom acolhimento, amizade e ajuda constante, pela disponibilidade para partilhar os seus conhecimentos metodológicos.

Aos elementos do Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança pelo precioso acolhimento e pela cooperação ao longo dos meses de trabalho, a Ângela, a Eliana, a Carla, o Zé, a Soraia e a Vânia.

Aos elementos do Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, em especial a Doutora Rita Alves, a Anabela Costa, a Ivone Almeida e a Anabela Borges, pela amizade, ajuda e simpatia constantes, por terem sempre uma palavra de alento e sobretudo de acalmia para mim.

Aos meus amigos, que sem estarem diretamente ligados à ciência me apoiaram e deram alento e motivação nos problemas e ansiedades, ao longo destes dois anos. Em especial ao Miguel pela preciosa ajuda na execução das figuras desta dissertação.

Aos meus colegas de mestrado, pelos momentos de entusiasmo e pânico partilhados em conjunto, a Maria, a Juliana, a Paula, o Telmo, a Xana, o Manuel e a Isabel.

O maior agradecimento é dirigido à minha família. Aos meus Pais, Maria Augusta e Manuel António, e ao meu irmão Miguel, pelo amor e apoio que sempre me deram. Pelo

incentivo constante para continuar a progredir na carreira académica, e investir num futuro melhor.

A todos os demais aqui fica o meu agradecimento.

RESUMO

Existe uma grande variedade de chás que alegam benefícios para a saúde devido às suas propriedades antioxidantes, particularmente o chá verde, preto e vermelho.

No presente trabalho, estudou-se a atividade antioxidante e o teor em antioxidantes dos chás mencionados, utilizando diferentes formulações (saquetas, folhas, raízes, granulados, pós, líquidos) e diferentes formas de preparação (infusão, solubilização ou uso direto).

A atividade antioxidante foi avaliada através da capacidade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), poder redutor, inibição da descoloração do β -caroteno e inibição da peroxidação lipídica por inibição da formação de substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os compostos antioxidantes determinados foram os fenóis totais e o ácido ascórbico.

Para avaliar e comparar a atividade antioxidante dos diferentes chás, determinaram-se valores de DF_{50} (fator de diluição responsável por 50% da atividade antioxidante). A análise discriminante linear (LDA) foi utilizada para categorizar as diferentes formulações de chás, de acordo com a sua capacidade antioxidante e o seu teor em compostos antioxidantes.

Os dados confirmaram e validaram as propriedades indicados nos rótulos, relativamente ao potencial antioxidante. Das bebidas à base de plantas estudadas, o chá verde foi a que apresentou maior teor em compostos bioativos. Apresenta, no entanto, diferentes propriedades de acordo com a formulação utilizada.

Tendo em conta os baixos valores de DF_{50} obtidos, alguns métodos de preparação sugeridos devem ser redefinidos para evitar eventuais efeitos pró-oxidantes. Assim, este trabalho pode ser útil na definição da melhor formulação de chás, tendo em vista os benefícios para a saúde destas bebidas tão largamente consumidas.

Palavras chave: Chás; Atividade antioxidante; Bebidas à base de chás; Análise Discriminante Linear

ABSTRACT

There is a large variety of teas that claims health benefits due to their antioxidant properties, particularly green, black and red teas. In the present work, the antioxidant activity and antioxidants contents of the mentioned teas were studied using different formulations (bags, leaves, roots, granulates, powders, liquids) and different preparation methods (infusion, solubilisation or directly used).

Antioxidant activity was evaluated by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) radical scavenging capacity, reducing power, inhibition of β -carotene bleaching and inhibition of lipid peroxidation through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. The determined antioxidant compounds were phenolics and ascorbic acid. The DF_{50} (dilution factor responsible for 50% of antioxidant activity) values were calculated in order to evaluate and compare the antioxidant efficiency of the different teas. Linear discriminant analysis (LDA) was used to categorize different tea formulations according with their antioxidant capacity, as well as their antioxidant compounds contents.

Data confirmed and validated the antioxidant benefits indicated in labels. Green tea was the most active herbal beverage, but with different behaviours according to the formulation used. Nevertheless, in view of the DF_{50} values, some suggested preparation methods should be redefined to prevent eventual pro-oxidant effects.

Hence, this work might be useful in the definition of the best tea formulation, considering the health benefits of these highly consumed beverages.

Keywords: Teas; Antioxidant activity; Herbal beverage; Linear Discriminant Analysis

PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES

Ana L. Morais, João C.M. Barreira, M. Beatriz P.P. Oliveira, Isabel C.F.R. Ferreira. Comparative study of antioxidant properties of different tea formulations with medicinal indications. *Plant Foods for Human Nutrition*. Submitted in 13/07/2011.

Ana L. Morais, João C.M. Barreira, M. Beatriz P.P. Oliveira, Isabel C.F.R. Ferreira. Comparative study of antioxidant properties of different green tea formulations. IJUP'2011. 4th Meeting of Young Researchers of U. Porto, 17 e 18 de Fevereiro de 2011, Porto, Portugal; 441p. *Poster*.

João C.M. Barreira, **Ana L. Morais**, M. Beatriz P.P. Oliveira, Isabel C.F.R. Ferreira. Herbal beverages formulations and bioactive properties: a comparative study. 1st iberic Meeting on Natural Bioactives Entrapment for the Food Industry. Challenges and Perspectives, from Nanotechnology to bioavailability, 12 e 13 de Maio de 2011, Lisboa, Portugal, 16p. *Poster*.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| AGRADECIMENTOS | iii |
| RESUMO | v |
| ABSTRACT | vi |
| PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES | vii |
| ÍNDICE | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | x |
| ÍNDICE DE TABELAS | xii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xiii |
| 1 - INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Considerações iniciais | 2 |
| 1.2. Espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS) | 4 |
| 1.3. Stresse oxidativo | 7 |
| 1.4. Defesas antioxidantes | 9 |
| 1.5. Antioxidantes naturais | 11 |
| 1.6. Antioxidantes sintéticos | 18 |
| 2 - CHÁ | 20 |
| 2.1. Considerações iniciais | 21 |
| 2.2. Consumo e produção mundial de chá | 23 |
| 2.3. Composição química do chá | 26 |
| 2.4. Benefícios dos flavonóides do chá | 32 |
| 3 - MATERIAL E MÉTODOS | 40 |
| 3.1. Padrões e reagentes | 41 |
| 3.2. Amostras e sua preparação | 41 |
| 3.3. Avaliação <i>in vitro</i> das propriedades antioxidantes | 44 |
| 3.3.1. Métodos de avaliação da atividade antioxidante | 44 |
| 3.3.2. Atividade captadora de radicais do DPPH | 46 |
| 3.3.3. Poder redutor | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.4. Inibição da descoloração do β -caroteno | 50 |
| 3.3.5. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) | 52 |
| 3.4. Determinação de antioxidantes | 54 |
| 3.4.1. Fenóis..... | 54 |
| 3.4.2. Ácido ascórbico | 55 |
| 3.5. Análise estatística..... | 55 |
| 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO | 56 |
| 4.1. Atividade antioxidante e compostos antioxidantes..... | 57 |
| 5 - CONCLUSÃO | 73 |
| 6 - BIBLIOGRAFIA | 75 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Redução univalente do oxigénio a água. Adaptado de Ramarathnam <i>et al.</i> , 1995..... | 4 |
| Figura 2. Produção e neutralização de radicais livres. Adaptado de Finley <i>et al.</i> , 2011.... | 7 |
| Figura 3. Balanço relativo ao stresse oxidativo. Adaptado de Halliwell <i>et al.</i> , 2011..... | 8 |
| Figura 4. Causas e consequências do stresse oxidativo. Adaptado de Ferreira <i>et al.</i> , 2009..... | 9 |
| Figura 5. Sistema de defesas antioxidantes: antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Adaptado de Huang <i>et al.</i> , 2005. | 9 |
| Figura 6. Visão geral das principais reações que envolvem ROS/RNS, e as principais defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas na célula. Adaptado de Ferreira <i>et al.</i> , 2009..... | 10 |
| Figura 7. Defesas <i>in vivo</i> contra o stresse oxidativo. Adaptado de Niki, 2010..... | 14 |
| Figura 8. Principais classes de fitoquímicos naturais. Adaptado de Ferreira <i>et al.</i> , 2007. | 16 |
| Figura 9. Benefícios na saúde que advêm de uma dieta rica em polifenóis. Adaptado de Pandey <i>et al.</i> , 2009)..... | 17 |
| Figura 10. Captação de radicais livres por compostos fenólicos. Adaptado de Seabra <i>et al.</i> , 2006. | 17 |
| Figura 11. Principais países produtores de chá (2007). Adaptado de Países produtores, 2007..... | 24 |
| Figura 12. Distribuição mundial do consumo de chá. Adaptado de Consumo de chá, 2009..... | 24 |
| Figura 13. Representação das possíveis funções dos componentes do chá na prevenção do cancro e da inflamação. Adaptado de Gonzalez de Mejia <i>et al.</i> , 2009..... | 35 |
| Figura 14. Fatores para avaliar a capacidade antioxidante <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . Adaptado de Niki, 2010..... | 45 |
| Figura 15. Redução do DPPH'. Adaptado de Kaur <i>et al.</i> , 2006..... | 47 |
| Figura 16. Estrutura química do β -caroteno. Adaptado de Ferreira <i>et al.</i> , 2009..... | 51 |
| Figura 17. Reação de TBA e MDA resultante da peroxidação lipídica. Adaptado de Kaur <i>et al.</i> , 2006. | 53 |
| Figura 18. Poder redutor das amostras D-Gt/E (chá verde/extrato), I-GtH/B (chá verde, ananás, hibisco/Saquetas), D-Ga/L (maçãs verdes, limão, <i>Ginkgo biloba</i> /Líquido), S-Gt/G1 (chá verde, vitamina C/Granulado (75°C)). | 61 |

Figura 19. Inibição da descoloração do β -caroteno das amostras S-Gt/G1 (Chá verde, vitamina C/Granulado (75°C)), D-GtH/L (Chá verde, ananás, hibisco/Líquido), D-Prb/L (Romã e bagas vermelhas/Líquido), D-Gt/L (Chá verde e limão/Líquido)..... 62

Figura 20. Inibição da formação de TBARS das amostras I-Gt/B (Chá verde/Saquetas), S-Gt/P1 (Chá verde, vitamina C/Pó (75°C)); S-Gt/P2 (Chá verde, vitamina C/Pó (T amb.)), S-Gt/G1 (Chá verde, vitamina C/Granulado (75°C))...... 63

Figura 21. Comparação entre os teores em fenóis e ácido ascórbico com os valores do ensaio do DPPH e do poder redutor, nas bebidas de uso direto. 67

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Espécies reativas de oxigênio e de azoto (ROS e RNS). Adaptado de Caballero <i>et al.</i> , 2005)..... | 5 |
| Tabela 2. Origem, localização e mecanismos de ação dos principais antioxidantes orgânicos Adaptado de Ferreira <i>et al.</i> , 2007a..... | 12 |
| Tabela 3. Antioxidantes de síntese aprovados pela União Europeia. Adaptado de ASAE, 2006..... | 18 |
| Tabela 4. Componentes do chá. Adaptado de Dufresne <i>et al.</i> , 2001; Wang <i>et al.</i> , 2000; Voung <i>et al.</i> , 2011..... | 28 |
| Tabela 5. Composição total de flavonóides no chá verde e chá preto. Adaptado de Higdon <i>et al.</i> , 2003..... | 30 |
| Tabela 6. Patologias com benefícios quando associadas ao consumo de chá e respectivas referências bibliográficas..... | 32 |
| Tabela 7. Potenciais mecanismos benéficos do consumo de chá contra a DCV. Adaptado de Deka <i>et al.</i> , 2011..... | 36 |
| Tabela 8. Identificação e preparação das amostras (soluções stock)..... | 42 |
| Tabela 9. Informação suplementar dos "chás" analisados..... | 43 |
| Tabela 10. Atividade antioxidante (valores de DF ₅₀) das amostras. Os resultados são expressos em média SD (n=9). Em cada coluna, as diferentes letras representam diferenças significativas ($P<0,05$)..... | 58 |
| Tabela 11. Teores de fenóis, flavonóides, flavonóis, ésteres tartáricos, e ácido ascórbico. Valores expressos como média±desvio padrão (n=9). Em cada coluna, diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($P<0,05$)..... | 65 |
| Tabela 12. Teores de fenóis e ácido ascórbico nas amostras analisadas, para as infusões e solubilizações (200 ml (chávena)), e nas amostras de uso direto de acordo com o referido no rótulo (30 ml, 250 e 330 ml)..... | 69 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAPH** [di-hidrocloro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)]
ABTS [ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)]
AGMI (ácidos gordos monoinsaturados)
AGPI (ácidos gordos polinsaturados)
BHA (mistura dos isómeros 2-*terc*-butil-4-metoxifenol e 3- *terc*-butil-4-metoxifenol)
BHT (di-*terc*-butilmetilfenol)
CAT (catalase)
C (catequina)
CG (galhato de catequina)
CUPRAC (poder antioxidante por redução do ião cúprico)
Cox – 2 (enzimas ciclooxigenase 2)
DCV (doenças cardiovasculares)
DDR (dose diária recomendada)
DF (fator diluição)
DPPH[•] (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)
EDTA (ácido etilenodiaminotetracético)
eNOS (sintase endotelial do óxido nítrico)
EC (epicatequina)
ECG (galhato de epicatequina)
EGC (epigalocatequina)
EGCG (galhato de epigalocatequina)
e.g. (*exempli gratia*)
ET (transferência de eletrões)
FRAP (poder antioxidante por redução do ião férrico)
GC (galocatequina)
GCG (galhato de galocatequina)
GC-MS (cromatografia gasosa com espectrometria de massa acoplada)
GPx (glutaciona peroxidase)
Gred (glutaciona redutase)
HAT (transferência de átomos de hidrogénio)
HO[•] (radical hidroxilo)
HO₂[•] (radical hidroperóxido)
HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência)

- LDA** (análise discriminante linear)
LDL (lipoproteínas de baixa densidade)
MCV (médias da variância canónica)
MDA (malondialdeído)
MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina)
 $^1\text{O}_2$ (oxigénio singlete)
 $\text{O}^{\cdot -}_2$ (anião superóxido)
OMS (Organização mundial de saúde)
ORAC (capacidade de absorção do radical de oxigénio)
PGE₂ (prostaglandina E2)
RSA (atividade captadora de radicais)
RNS (espécies reativas de azoto)
ROO $^{\cdot}$ (radical peroxilo)
ROS (espécies reativas de oxigénio)
SNC (sistema nervoso central)
SOD (superóxido dismutase)
TAC (capacidade antioxidante total)
TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico)
TBA (ácido tiobarbitúrico)
TEAC (capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox)
TRAP (parâmetro antioxidante de radicais livres)

1 - INTRODUÇÃO

- 1.1. Considerações iniciais
- 1.2. Espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS)
- 1.3. Stresse oxidativo
- 1.4. Defesas antioxidantes
- 1.5. Antioxidantes naturais
- 1.6. Antioxidantes sintéticos

1.1. Considerações iniciais

A alimentação humana tem recebido, nas últimas décadas, um olhar atento por parte da comunidade científica. Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma relação direta entre os hábitos alimentares e o risco de doença, provando que a alimentação tem um impacto direto na saúde (Espín *et al.*, 2007). A ingestão inadequada de certos nutrientes tem sido associada ao aumento do risco de doenças crônicas (e.g. doenças cardiovasculares (DCV), diabetes e cancro) (Hatzis *et al.*, 2006; Ogce *et al.*, 2008; Mantzoros, 2009).

Desde Hipócrates (370-460 a.C.) que é referida a associação entre dietas ricas em vegetais e frutas, e benefícios na saúde. Sabe-se, há muito tempo, que uma dieta que inclui frutas e verduras contém vitaminas, minerais e outros compostos bioativos (Soni, 2010). Estes efeitos benéficos têm sido largamente atribuídos aos polifenóis, sendo a ingestão de alimentos ricos em polifenóis associada à diminuição de: dislipidemia e aterosclerose; disfunção endotelial e hipertensão; ativação plaquetária e trombócitos; processo inflamatório associado à indução e perpetuação de DCV.

A dieta humana evoluiu ao longo dos anos, e revela que a ingestão atual de antioxidantes é muito menor do que em tempos ancestrais. O sistema de defesa antioxidante endógeno é insuficiente, sem os antioxidantes obtidos através da dieta (Caballero *et al.*, 2005; Ratman *et al.*, 2006). Uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes aos efeitos dos polifenóis na saúde, permitirá reconhecer os benefícios do consumo de frutas e vegetais (Fraga *et al.*, 2010). Existem vários estudos epidemiológicos que evidenciam o potencial dos fitoquímicos na profilaxia e no tratamento de alguns distúrbios de saúde. Além disso, estes compostos podem ter influência na incidência de várias doenças, uma vez que a saúde de um indivíduo e da população em geral resulta de interações entre fatores genéticos e uma série de fatores ambientais (e.g. nutrição) (Simopoulos *et al.*, 2001).

A dieta mediterrânica tem sido amplamente reconhecida como modelo de alimentação saudável, contribuindo para um estado de saúde e bem-estar favorável a uma melhor qualidade de vida (Sofi *et al.*, 2008). Este regime alimentar caracteriza-se por um elevado consumo de verduras, legumes, fruta, frutos secos e cereais, azeite como principal fonte de gordura (alta ingestão de ácidos gordos monoinsaturados, AGMI), um consumo moderado a alto de peixe (dependendo da proximidade do mar), um consumo moderado de produtos lácteos (principalmente queijo ou iogurte), um baixo consumo de carnes vermelhas e aves, e um consumo regular, mas moderado, de álcool, principalmente de vinho tinto (Trichopoulou *et al.*, 2003; Fung *et al.*, 2009), sem descuidar

uma atividade física regular. Contudo, estes fatores têm sofrido grandes alterações ao longo do tempo, pois a dieta alimentar tem vindo a afastar-se cada vez mais da dieta tradicional mediterrânica o que, conjugado com uma vida sedentária, tem vindo a contribuir para o aumento da incidência de inúmeras doenças (Simopoulos *et al.*, 2001). Em Portugal, calcula-se que apenas um terço da população mantém ainda estes hábitos alimentares saudáveis (Dieta mediterrânica, 2011).

Além dos efeitos benéficos para a saúde, este tipo de dieta pode ainda ser facilmente adotado por todas as populações e culturas. De uma forma mais abrangente, a dieta mediterrânica, tem vantagens económicas, ambientais, nutricionais e alimentares.

O conhecido paradoxo francês e espanhol da dieta mediterrânica são os melhores exemplos para citar evidências que comprovam a eficiência dos antioxidantes na prevenção de doenças (Ratman *et al.*, 2006). O paradoxo francês sugere uma visão interessante sobre os benefícios do vinho tinto. A incidência de mortalidade em França, devida a doença coronária é baixa, e pensa-se que está relacionada com o elevado consumo de vinho. O risco de DCV dos franceses é inferior em pelo menos 50%, quando comparado com regiões em que bebem maioritariamente vinhos brancos. Há também outra explicação para o paradoxo francês, que defende a hipótese de que a dieta francesa apresentava um baixo teor de gordura no passado (Providência, 2006; Opie *et al.*, 2007). Os polifenóis do vinho tinto são benéficos na redução da lesão dos vasos sanguíneos, diminuindo a pressão arterial; têm efeito protetor contra as doenças coronárias e aterosclerose e contribuem para a inibição de alguns cancros (Šeruga *et al.*, 2011). O paradoxo espanhol da dieta mediterrânica aponta também para um regime alimentar rico em antioxidantes, o que resulta na proteção contra DCV.

Muitos dos benefícios derivados da ingestão de tais dietas pode ser o resultado de sinergias entre as vitaminas antioxidantes mais conhecidas e outros antioxidantes naturais (Ratman *et al.*, 2006).

A capacidade de alguns alimentos de origem vegetal para reduzir o risco de doenças crónicas tem sido associada, pelo menos em parte, à sua composição em metabolitos secundários (fitoquímicos), que mostraram exercer uma vasta gama de atividades biológicas. Há uma infinidade de outros compostos bioativos obtidos através da dieta alimentar. Estes metabolitos são menos bioativos que os fármacos, mas desde que ingeridos regularmente e em quantidades significativas, como parte integrante da dieta, podem ter um efeito a longo prazo perceptível nas funções fisiológicas (Espín *et al.*, 2007).

Os vários carotenóides, flavonóides e fenóis encontrados em verduras, leguminosas, frutos, ervas e bebidas, como chás e vinhos, também podem ser importantes para a saúde humana (Caballero *et al.*, 2005).

1.2. Espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS)

Um radical livre pode ser definido como uma molécula ou fragmento de molécula que contém um ou mais eletrões desemparelhados em orbitais moleculares ou atômicas, e é capaz de existir de modo independente. A ocorrência de um eletrão desemparelhado resulta numa grande reatividade e num tempo de semivida curto, isto porque estas espécies têm afinidade para doar ou obter um eletrão, de modo a tornarem-se estáveis (Benzie *et al.*, 2011).

As espécies reativas de oxigénio (ROS) incluem radicais livres, e podem ser geradas durante a redução do oxigénio a água (**figura 1**).

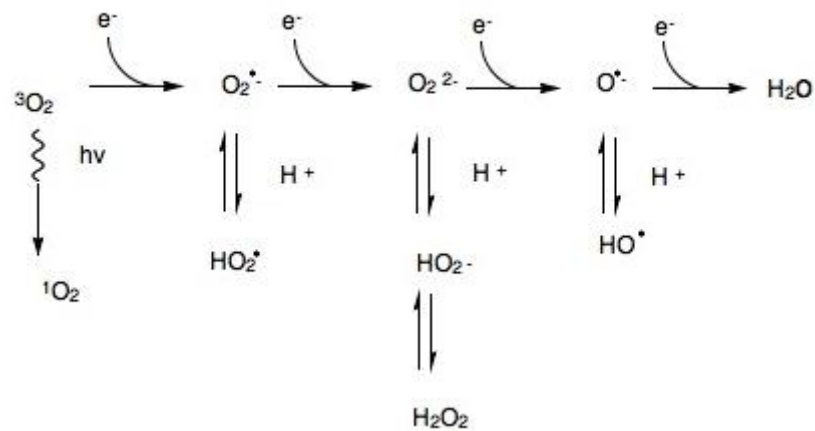


Figura 1. Redução univalente do oxigénio a água. Adaptado de Ramarathnam *et al.*, 1995.

A adição de um eletrão ao oxigénio cria o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), enquanto uma nova redução conduz à formação do peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Após a adição de mais um eletrão forma-se o radical hidroxilo (HO^{\bullet}). Assim, a redução do oxigénio molecular por adição de quatro eletrões dá origem a moléculas de água. Na mitocôndria, a superóxido dismutase (SOD) converte $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , que pode atravessar a membrana e participar na sinalização citosólica (Benzie *et al.*, 2011).

As ROS incluem radicais livres tais como o $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} e radical peróxido (ROO^{\cdot}), e espécies não radicalares, nomeadamente oxigénio singleto ($^1O^2$), ozono (O^3), H_2O_2 e ácido hipocloroso (HOCl) (**tabela 1**).

Tabela 1. Espécies reativas de oxigénio e de azoto (ROS e RNS). Adaptado de Caballero *et al.*, 2005).

| Nome da espécie | Fórmula | Radical (R) /Não Radicalares (NR) |
|-----------------|------------------------|-----------------------------------|
| $O_2^{\cdot-}$ | Superóxido | R |
| OH^{\cdot} | Hidroxilo | R |
| ROO^{\cdot} | Peroxilo | R |
| RO^{\cdot} | Alcoxilo | R |
| HOO^{\cdot} | Hidroperóxido | R |
| H_2O_2 | Peróxido de hidrogénio | NR |
| HOCl | Ácido hipocloroso | NR |
| O_3 | Ozono | NR |
| $ONOO^{\cdot}$ | Peroxinitrito | NR |
| NO^{\cdot} | Óxido nítrico | R |
| $NO^{\cdot-}$ | Anião nitroxilo | NR |

Já a designação das espécies reativas de azoto (RNS) refere-se a todos os estados oxidativos e adutos reativos dos produtos azotados da óxido nítrico sintase (NOS), desde o óxido nítrico (NO^{\cdot}) até aos que surgem em situações fisiológicas, como o anião nitroxilo ($NO^{\cdot-}$) e o catião nitrosónio (NO^+), óxidos superiores do azoto (N_2O_3 ou N_2O_4) e anião peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (**tabela 1**). As propriedades distintas dos radicais resultam das diferenças de reatividade, tempo de vida, permeabilidade e solubilidade nos lípidos.

ROS e RNS estão continuamente a ser produzidos, como subprodutos de várias vias metabólicas que estão localizadas em diferentes compartimentos celulares, tais como cloroplastos, mitocôndrias e peroxisomas (Gill *et al.*, 2010).

A produção de espécies reativas (em pequenas quantidades) nos organismos vivos decorre do normal metabolismo celular, normalmente sob a forma de ROS ou RNS. Uma vez produzidos, muitos dos radicais livres são neutralizados pelas defesas celulares antioxidantes (enzimas e moléculas não enzimáticas).

As espécies reativas exibem um papel duplo, apresentando simultaneamente ação benéfica e tóxica.

Quando se encontram em concentrações baixas ou moderadas, podem ser benéficas para a célula, estando envolvidas em vários processos fisiológicos de sinalização e de regulação (Fridovich, 1990; Ferreira *et al.*, 2007). Alguns benefícios das espécies reativas são:

- ✓ NO[•] - potente vasodilatador e vital para a manutenção da pressão arterial normal, diminui a agregação plaquetária, diminuindo a probabilidade de coagulação do sangue dentro do sistema sanguíneo;
- ✓ H₂O₂ – papel central na sinalização celular e ativação de genes (Caballero *et al.*, 2005).

A produção excessiva de espécies reativas ou a diminuição dos níveis de antioxidantes conduzem ao stresse oxidativo, ou seja à alteração do equilíbrio oxidante/antioxidante em favor do primeiro, o qual tem sido implicado na etiologia de várias doenças e no envelhecimento (Almeida, 2009).

Existem duas vias principais de produção de ROS no organismo: uma deliberada e útil, e outra acidental, mas inevitável. A produção acidental de ROS ocorre durante a passagem de elétrões, ao longo da cadeia transportadora de elétrões na mitocôndria. Efetivamente, as mitocôndrias são uma das principais fontes de ROS, mas são também um dos primeiros alvos de ataque destes radicais. Uma vez que a cadeia respiratória é composta por proteínas transmembranares, que existem na membrana mitocondrial interna, a formação de ROS ocorre perto da membrana. Assim, as ROS têm fácil acesso aos lípidos da membrana, especialmente sensíveis ao ataque de radicais livres, num processo designado por peroxidação lipídica (Ferreira *et al.*, 2007).

A produção de ROS também pode ser uma consequência de estímulos endógenos ou exógenos, incluindo radiação ultravioleta (UV), quimioterapia, toxinas ambientais e exercício extremo (Benzie *et al.*, 2011). Algumas das principais fontes de ROS são as reações de destoxificação de fármacos e outros xenobióticos, que envolvem o sistema enzimático citocromo P₄₅₀.

Os antioxidantes catalisam a redução das espécies reativas mediada por enzimas tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e a glutathiona peroxidase (GPx) ou através de cofatores ou redutores, tais como a glutathiona (GSH).

Enzimas como a xantina oxidase, NADPH oxidase ou a NOS estão também envolvidas na formação endógena de ROS e RNS (**figura 2**) (Kohen *et al.*, 2002; Finley *et al.*, 2011).

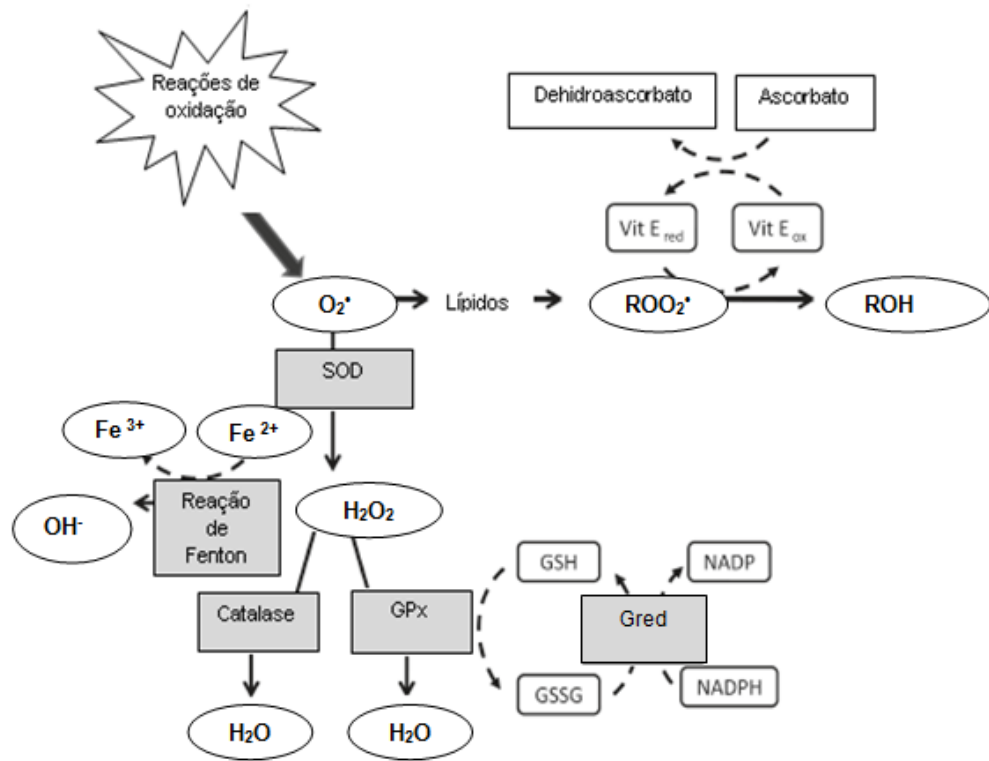


Figura 2. Produção e neutralização de radicais livres. Adaptado de Finley *et al.*, 2011.

A oxidação dos lípidos das membranas celulares é um processo muito frequente no corpo humano. Como referido anteriormente, esta reação é iniciada rapidamente, pelo excesso de ROS, em particular os radicais hidroxilo, através de um mecanismo radicalar em cadeia, formando-se compostos tóxicos como os peróxidos lipídicos e aldeídos, caso do malonaldeído (MDA) e do 4-hidroxinonenal. Tanto as espécies envolvidas, bem como as formadas, são referidas como causa de doença, incluindo o cancro, e o próprio processo de envelhecimento.

A peroxidação lipídica, além de causar sérios danos no organismo, é a principal causa da deterioração dos alimentos, afetando a cor, o aroma (formação de moléculas nocivas à saúde, voláteis e não voláteis), a textura e o valor nutricional (Falcão, 2008).

1.3. Stresse oxidativo

Normalmente, há um equilíbrio entre a formação e a remoção de espécies reativas. Como consequência do desequilíbrio neste processo, ocorre o chamado stresse oxidativo e, por consequência, diversos danos oxidativos decorrentes do ataque a

biomoléculas, que podem comprometer o funcionamento celular e conduzir a várias doenças e ao próprio envelhecimento (Dudonné *et al.*, 2009). Nesta situação, o organismo produz mais ROS (e.g. O^{\cdot}_2 , HO^{\cdot} e H_2O_2) do que aqueles que os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos conseguem neutralizar (**figura 3**) (Krishnaiah *et al.*, 2001).

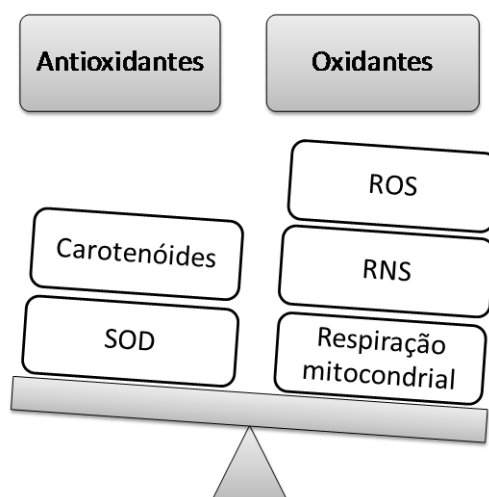


Figura 3. Balanço relativo ao stress oxidativo. Adaptado de Halliwell *et al.*, 2011.

O stress oxidativo pode ter causas naturais, como o que ocorre em situações de exercício físico extremo, ou em processos de inflamação; mas pode também ter causas não naturais como a presença de xenobióticos no organismo, poluentes ambientais e radiação (**figura 4**).

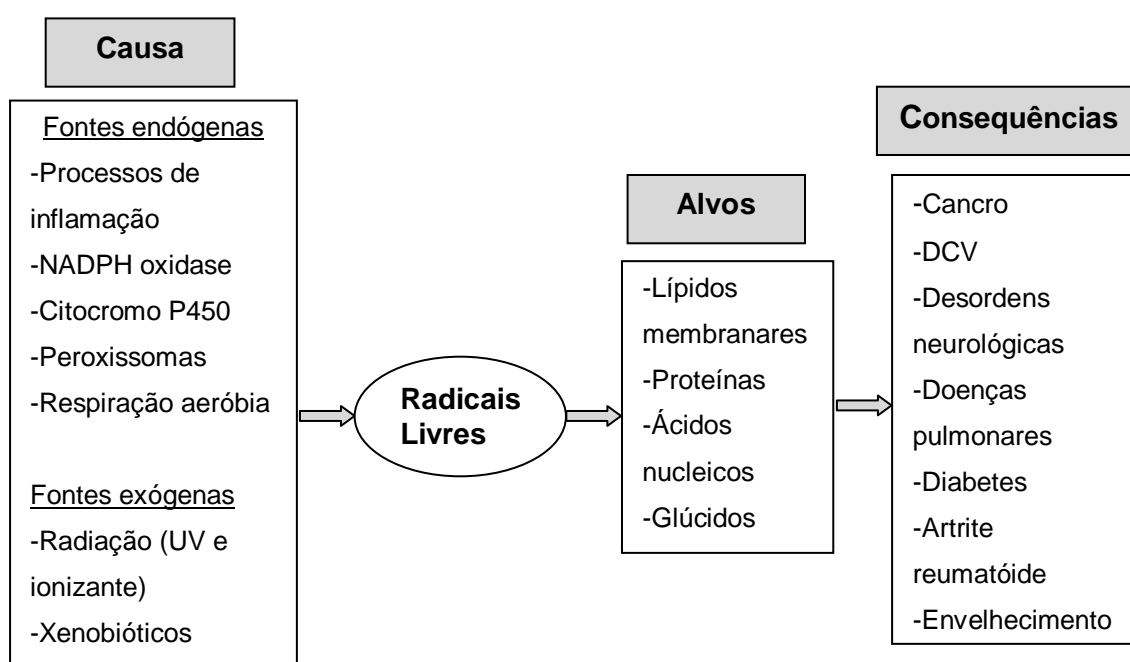


Figura 4. Causas e consequências do stresse oxidativo. Adaptado de Ferreira *et al.*, 2009.

ROS em excesso no organismo podem danificar e oxidar lípidos celulares, proteínas e ADN, levando à sua modificação e inibição do seu funcionamento normal (Fu *et al.*, 1998; Ridnor, *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007). Como já referido anteriormente, inúmeros estudos demonstraram a associação do stresse oxidativo com várias doenças nomeadamente cancro, diabetes, cirrose, DCV, artrite reumatóide, desordens neurológicas, hematológicas, pulmonares, oculares e também com os processos de envelhecimento (Halliwell, 1996; Ferreira *et al.* 2007; Valko *et al.* 2007; Singh *et al.*, 2008).

1.4. Defesas antioxidantes

A natureza equipou os organismos contra os danos provocados pelos radicais livres e outras espécies reactivas, com vários mecanismos de defesa que atuam de diferentes formas (Falcão, 2008).

O sistema de defesas antioxidantes do organismo inclui antioxidantes enzimáticos e moléculas não-enzimáticas (**figura 5**) que desempenham a sua função em locais específicos.

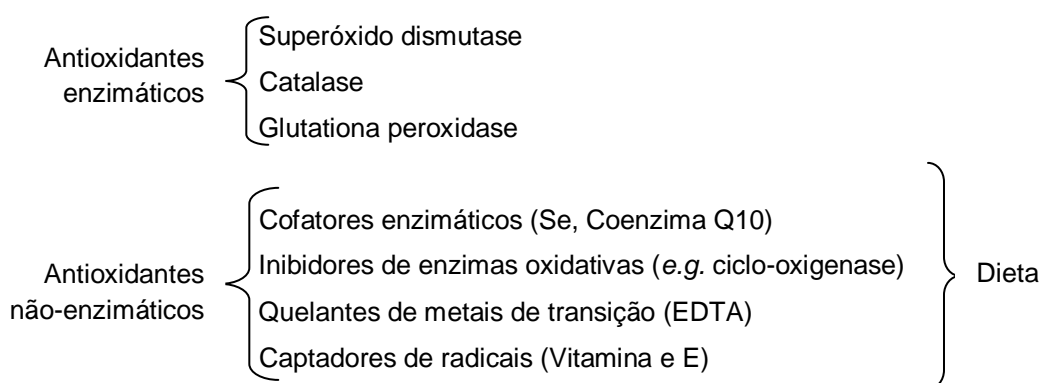


Figura 5. Sistema de defesas antioxidantes: antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Adaptado de Huang *et al.*, 2005.

Os antioxidantes enzimáticos encontram-se tanto no meio intracelular, como no meio extracelular, e constituem a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos de níveis elevados de ROS e RNS. O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, onde se destacam a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona

1.5. Antioxidantes naturais

A importância dos antioxidantes remonta à antiguidade. Os antigos egípcios demonstraram um notável conhecimento técnico, preservando os corpos com extratos de plantas ricos em compostos fenólicos.

Um antioxidante é, por definição, qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações relativamente às dos potenciais substratos oxidáveis, atrasa significativamente, ou inibe, a oxidação desses substratos por ROS (Halliwell, 1990; Ferreira *et al.*, 2007). Os antioxidantes têm uma longa história de uso na alimentação/saúde da população e na indústria alimentar (Finley *et al.*, 2011), sendo usados como conservantes em diversos produtos (*e.g.* gorduras, produtos alimentares, para retardar o desenvolvimento de ranço) (Huang *et al.*, 2005).

Na bioquímica e medicina, os antioxidantes são enzimas ou outras substâncias orgânicas, tais como vitamina E ou β -caroteno, que são capazes de neutralizar os efeitos prejudiciais da oxidação nos tecidos animais (Huang *et al.*, 2005).

Por volta de 1950, foi demonstrado que as reações de oxidação estão envolvidas no processo de envelhecimento e na progressão de várias doenças. Simultaneamente, verificou-se que os antioxidantes podem retardar o processo de envelhecimento, a progressão da doença e prolongar o tempo de vida. Estes factos levaram a um aumento da investigação nas fontes, efeitos e toxicidade dos antioxidantes, assim como um crescente número de publicações (cerca de 150 000 até hoje).

O uso de plantas como alimentos e para fins medicinais é, desde tempos imemoriais, atribuída à eficácia biológica dos metabolitos secundários que possuem, nomeadamente, atividade antioxidante (compostos fenólicos, vitaminas C e E, e carotenóides) (Ndhlala *et al.*, 2010).

Os antioxidantes naturais estão amplamente distribuídos em tecidos vegetais (sementes, cereais, legumes, frutos, folhas, raízes, especiarias e ervas), animais e de microrganismos, protegendo-os do stresse oxidativo e contribuindo para a prevenção e manutenção da saúde humana.

Os frutos, legumes, cereais, chás, café e cacau são fontes ricas em antioxidantes (vitaminas, compostos fenólicos e carotenóides) e têm sido alvo de inúmeros estudos (Shahidi *et al.*, 2010). Os vegetais têm antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, que podem atuar individualmente, sendo mais eficazes quando atuam em conjunto. Esta sinergia permite eliminar radicais livres, quer na fase aquosa quer na lipídica (Kondo *et al.*, 2009).

Efetivamente, as plantas são uma fonte natural que contém compostos bioativos eficazes, incluindo antioxidantes, como polifenóis, vitaminas, carotenóides, ácidos gordos insaturados e açúcares redutores, que podem ser utilizados para diversas aplicações, principalmente como aditivos alimentares e na promoção da saúde como ingredientes na formulação de alimentos funcionais e nutracêuticos (Loziene *et al.*, 2007).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que uma ingestão elevada de frutos e legumes está fortemente associada à redução do risco de desenvolvimento de doenças crónicas, como cancro e DCV (Ferreira *et al.*, 2009). Na verdade, os produtos de origem vegetal contêm uma ampla variedade de fitoquímicos, com capacidade antioxidante, oferecendo proteção contra os efeitos nocivos do stresse oxidativo, redução do risco de DCV, e diminuição da incidência de doenças crónicas degenerativas (Oliveira *et al.*, 2007).

Os antioxidantes naturais dos alimentos (vegetais, frutos, bebidas, especiarias) e suplementos têm recebido muita atenção como nutracêuticos e como possíveis ingredientes de produtos cosméticos, permitindo aos consumidores uma escolha mais saudável (Niki *et al.*, 2010). Alguns antioxidantes naturais (ácido ascórbico, α -tocoferol e flavonóides) não podem ser obtidos *in vivo*, e como tal, têm de ser fornecidos através da dieta. Estas substâncias possuem a capacidade de fornecer eletrões/átomos de hidrogénio às ROS sem se transformarem em moléculas instáveis.

Como referido na secção anterior, os mecanismos de defesa antioxidante nos diferentes tecidos compreendem sistemas enzimáticos e não enzimáticos e podem ser classificados em função do seu mecanismo de ação predominante, da sua localização e da sua proveniência, seja da dieta (antioxidantes exógenos), ou da síntese endógena (antioxidantes endógenos) (Ferreira *et al.*, 2007) (**tabela 2**).

Tabela 2. Origem, localização e mecanismos de ação dos principais antioxidantes orgânicos
Adaptado de Ferreira *et al.*, 2007a.

| Antioxidantes exógenos | Antioxidantes endógenos | |
|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | Extracelulares | Intracelulares |
| Prevenção | Prevenção | Prevenção |
| Zinco | Albumina | Glutationa Peroxidase |
| Selénio | Bilirrubina | Superóxido Dismutase |
| | Ceruloplasmina | Catalase |
| Interceção | Ferritina | Glutationa Redutase |
| Ácido ascórbico | Mioglobina | |
| Alfa-tocoferol | Metalotionina | Interceção |
| Carotenóides | | Glutationa |

Ácido úrico
Coenzima Q

Tabela 2. Continuação.

| Antioxidantes exógenos | Antioxidantes endógenos | |
|------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Prevenção | Extracelulares | Intracelulares |
| | | Reparação Metaloenzimas |

Mediante os mecanismos associados (**figura 7**), os antioxidantes podem ser classificados como:

- ✓ **Antioxidantes preventivos** - constituem a primeira linha de defesa (SOD, CAT, GPx).
- ✓ **Antioxidantes captadores** - funcionam como segunda linha de defesa do organismo (muitos compostos fenólicos atuam com captadores de radicais livres, impedindo o início do processo de peroxidação lipídica e a sua propagação, sendo exemplos o α -tocoferol, o ácido ascórbico e a glutathione).
- ✓ **Antioxidantes reparadores** - várias enzimas se incluem na terceira linha de defesa, reparando lesões, eliminando resíduos ou reconstituindo funções perdidas. Podem atuar por reparação do dano oxidativo, reconstituindo a membrana, degradando proteínas danificadas, metabolizando hidroperóxidos lipídicos e reparando o ADN (e.g. as proteases, as fosfolipases, as transferases).
- ✓ **Antioxidantes de adaptação** - funcionam como quarta linha de defesa, em que cada antioxidante é formado, no tempo certo, e transferido para as posições adequadas nas concentrações necessárias (Barreira, 2010; Niki, 2010).

O papel e os efeitos benéficos dos antioxidantes contra várias desordens e doenças induzidas pelo stresse oxidativo têm sido alvo de grande atenção. Há vários tipos de antioxidantes, com diferentes funções, que atuam na rede de defesa *in vivo* (Niki, 2010).

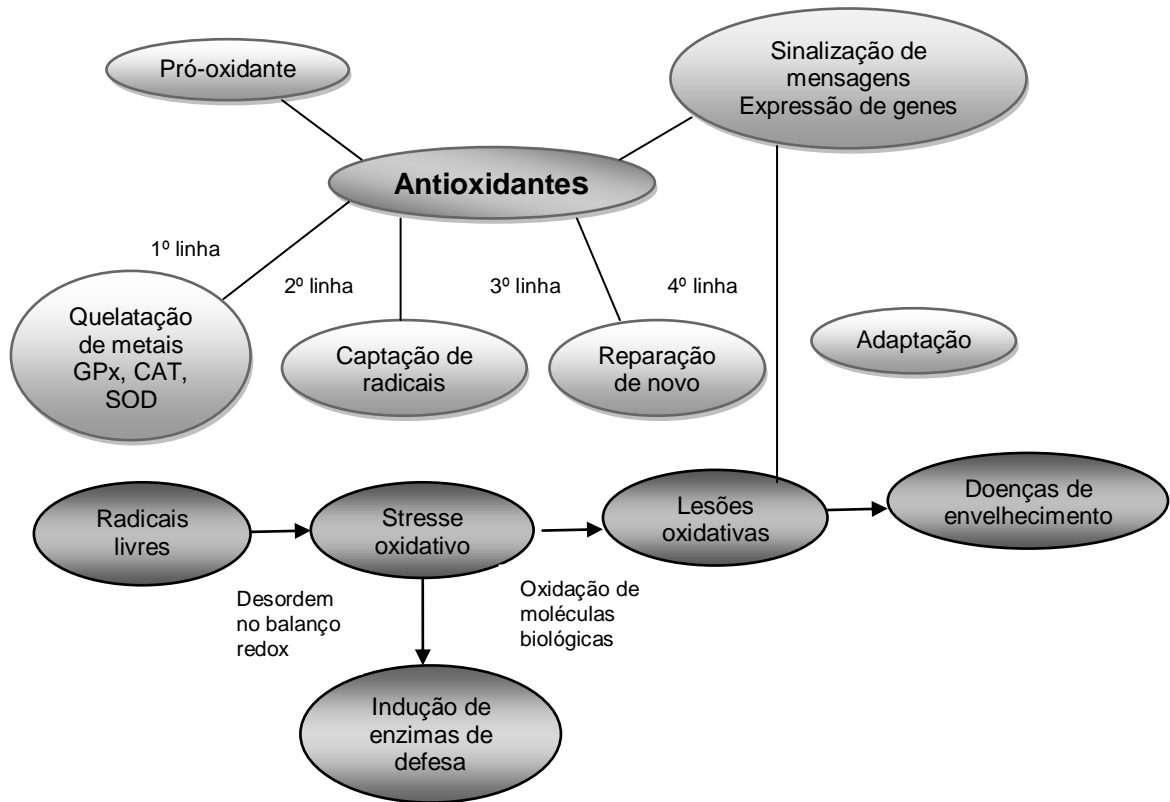


Figura 7. Defesas *in vivo* contra o stresse oxidativo. Adaptado de Niki, 2010.

Os mecanismos de ação dos antioxidantes incluem atuações como:

- ✓ Barreiras físicas, para impedir a produção de ROS e o acesso a locais biológicos importantes (por exemplo filtros UV e membranas celulares);
- ✓ Mecanismos químicos, que "captam" a energia e os elétrons, eliminando os ROS. Os carotenóides e as antocianidinas são exemplos deste tipo de antioxidantes;
- ✓ Sistema catalítico, que neutraliza ou desloca os ROS. São exemplo, as enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx;
- ✓ Inativação/ligação de íons metálicos, para evitar a produção de ROS. Ferritina, ceruloplasmina e catequinas são exemplos deste tipo de antioxidantes;
- ✓ Antioxidantes de quebra de cadeia, que captam e destroem os ROS. São exemplos deste tipo de antioxidantes o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (Vitamina E), ácido úrico, glutatona e flavonóides (Karadag *et al.*, 2009).

Além de todas as defesas antioxidantes endógenas mencionadas, os suplementos antioxidantes ou os alimentos que os contêm podem ser usados para ajudar o organismo a reduzir os danos oxidativos, impedindo a deterioração oxidativa. Na verdade, a implicação do stresse oxidativo na etiologia e progressão de várias doenças crónicas

sugere que os antioxidantes podem ter benefícios para a saúde como agentes profiláticos (Ferreira *et al.*, 2009).

Os antioxidantes provenientes da dieta são bastante variados e incluem, como grupos maioritários, os polifenóis e os carotenóides. Estes têm funções diferentes e são produzidos pelas plantas para proteger as células contra danos oxidativos. Quando ingeridos, protegem também o organismo contra o stresse oxidativo (Benzie *et al.*, 2011). Muitos desses compostos (ácido ascórbico, tocoferóis, carotenóides, polifenóis) são capazes de neutralizar ROS. Exemplos de produtos comercializados com base nos possíveis benefícios dos antioxidantes incluem alimentos integrais e bebidas (e.g. açaí, *gogi berry*, chá verde, hibisco, *Ginkgo biloba*) bem como substâncias isoladas, vendidas, principalmente como suplementos alimentares (e.g. ácido ascórbico, licopeno, selénio) ou adicionados aos alimentos (e.g. vitamina E) (Finley *et al.*, 2011).

Os fitoquímicos (**figura 8**) que estão presentes na dieta (fruta, vegetais, leguminosas, especiarias e ervas aromáticas e medicinais) assumem um papel importante como agentes protetores do organismo contra danos oxidativos, (Ramarathnam *et al.*, 1995; Skerget *et al.*, 2005). Possuem propriedades anticancerígenas e representam uma abordagem terapêutica promissora na prevenção e no tratamento de inúmeros cancros. Há de facto uma elevada quantidade de ensaios clínicos que relatam os potenciais benefícios dos fitoquímicos na prevenção da doença (Tachibana, 2011).

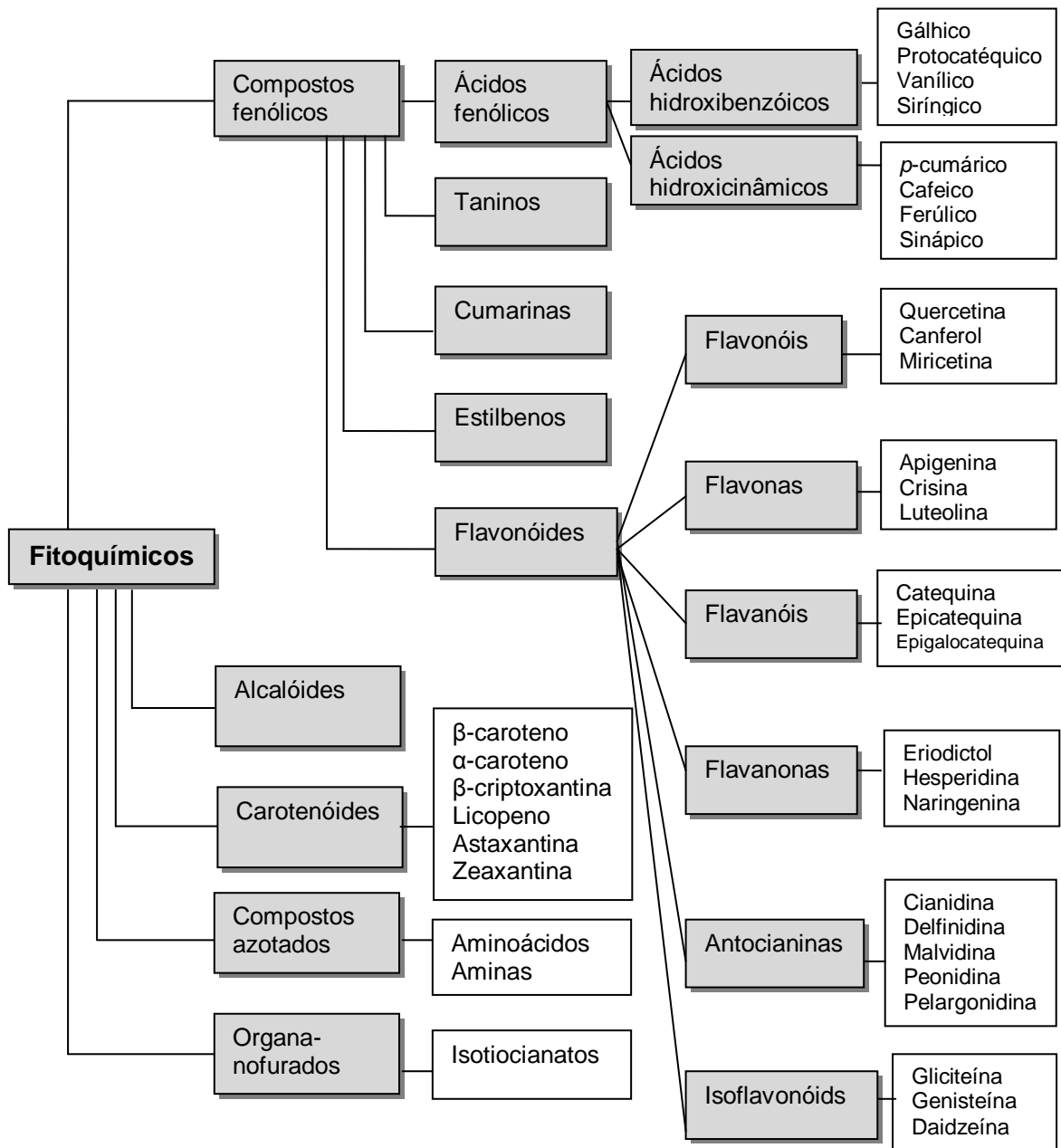


Figura 8. Principais classes de fitoquímicos naturais. Adaptado de Ferreira *et al.*, 2007.

Os polifenóis são a classe de antioxidantes mais generalizada na natureza, sendo a sua distribuição ubíqua (Pereira *et al.*, 2009). São constituintes de porções comestíveis e não comestíveis das plantas (Wijeratne *et al.*, 2006). Além de propriedades antioxidantes, a sua presença contribui para a parte sensorial dos alimentos, como a cor, o sabor e o aroma (Amarowicz *et al.*, 2010).

Os polifenóis são agentes redutores e, juntamente com outros agentes redutores alimentares (ácido ascórbico, vitamina E e carotenóides), protegem o organismo contra o stresse oxidativo. Os compostos fenólicos podem formar compostos de coordenação

com o ferro, pelo que são muito estudados para o tratamento e prevenção de condições associadas a ROS originados por ferro e stresse oxidativo. O ferro é uma das principais causas de ROS *in vivo*, explicada pela redução do Fe(III) e regeneração do ferro para a reação com o H₂O₂ numa reação de Fenton, que conduz a lesões no ADN e morte celular (Barreira, 2010).

Há evidência de que os compostos fenólicos atuam como antioxidantes, prevenindo doenças associadas ao stresse oxidativo como a oxidação das LDL, agregação plaquetária, danos nas células sanguíneas, DCV, cancro, inflamação (Scalbert *et al.*, 2000; Gharras, 2009) e doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer (Niki, 2010) (**figura 9**).

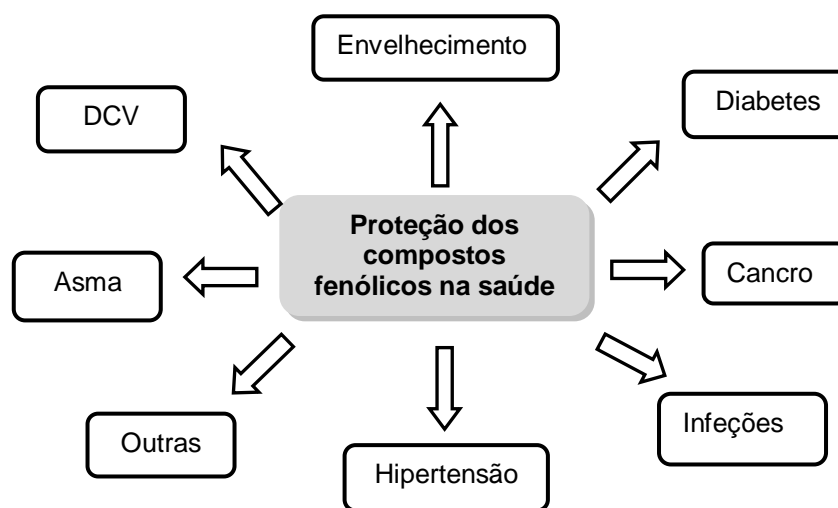


Figura 9. Benefícios na saúde que advêm de uma dieta rica em polifenóis. Adaptado de Pandey *et al.*, 2009).

O potencial de captação de radicais livres está diretamente ligado ao potencial de oxidação dos polifenóis. Estes compostos apresentam elevada facilidade em doar o hidrogénio do grupo hidroxilo fenólico, dando origem a um radical fenoxilo (**figura 10**), cuja estabilidade depende da deslocalização do eletrão desemparelhado.

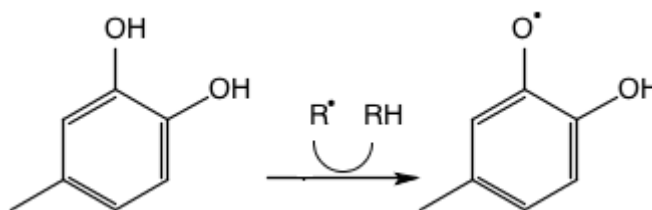


Figura 10. Captação de radicais livres por compostos fenólicos. Adaptado de Seabra *et al.*, 2006.

Deste modo, os compostos fenólicos podem exercer a sua ação antioxidante sequestrando ROS e RNS (e.g. superóxido, hidroxilo, peróxido, óxido nítrico, peroxinitrito e ácido hipocloroso), gerados *in vivo* ou nos alimentos. Adicionalmente, a capacidade para quelatar iões metálicos envolvidos na produção de radicais livres, particularmente ferro e cobre, justifica a ação dos polifenóis como antioxidantes preventivos. No entanto, compostos com menor potencial de oxidação do que o Fe(III) e o Cu(II) podem reduzir esses metais, funcionando como pró-oxidantes (Rice-Evans *et al.*, 1996; Heim *et al.*, 2002; Seabra *et al.*, 2006).

1.6. Antioxidantes sintéticos

Devido aos seus benefícios, os alimentos e produtos farmacêuticos contêm, normalmente, antioxidantes sintéticos. Foram introduzidos na indústria alimentar na década de 40, para retardar a oxidação (Shahidi, 2000), aumentando a durabilidade do produto. Dos aprovados pela EU, os mais usados na preservação de alimentos são o BHA (mistura de isómeros 2-*tert*-butil-4-metoxifenol ou 3-*tert*-butil-4-metoxifenol), o BHT (di-*tert*-butilmetilfenol) e o TBHQ (2-*tert*-butil-hidroquinona) (Ndhlala *et al.*, 2010). O galhato de propilo (PG) é também autorizado (**tabela 3**) (Moure *et al.*, 2001).

Tabela 3. Antioxidantes de síntese aprovados pela União Europeia. Adaptado de ASAE, 2006.

Antioxidantes de síntese

E 300 – Ácido ascórbico (antioxidante em soluções aquosas e emulsões lipídicas, evita o escurecimento de frutos e sumos, preserva a cor da carne e utiliza-se como melhorante de farinha; ocorre naturalmente em muitos frutos e vegetais frescos).

E 310 - Galhato de propilo (3,4,5-tri-hidroxibenzoato de propilo); antioxidante utilizado em óleos e gorduras e produtos desidratados.

E 311 – Galhato de octilo.

E 312 - Galhato de dodecilo (3,4,5,-tri-hidroxibenzoato de dodecilo).

E 315 - Ácido eritórbico, ou ácido isoascórbico; é uma forma isomérica do ácido ascórbico (E 300); é utilizado como antioxidante.

E 316 — Eritorbato de sódio; sal de sódio do E 315, utilizado com idêntica finalidade.

Tabela 3. Continuação.**Antioxidantes de síntese**

E 320 — Butil-hidroxianisol (BHA); antioxidante de natureza fenólica, utilizado em óleos e gorduras e produtos desidratados, emprega-se frequentemente em conjugação com os galatos (E 310, E 311 ou E 312) ou com compostos sinérgicos, nomeadamente os ácidos.

E 321 — Butil-hidroxitolueno (BHT); utilizado em óleos e gorduras e produtos desidratados.

TBHQ – 2-*terc*-butil-hidroquinona

O BHA e BHT têm sido amplamente utilizados como antioxidantes na indústria de alimentos e parecem ser responsáveis por danos no fígado e indução de carcinogénese. Há estudos que demonstram que o uso excessivo destes antioxidantes sintéticos em alimentos pode causar perda de nutrientes, toxicidade e riscos para a saúde (Guan *et al.*, 2006; Saad *et al.*, 2007). Nos últimos anos, a restrição no uso de antioxidantes sintéticos, tais como BHA e BHT, devido aos efeitos tóxicos já referidos, suscitou um maior interesse pelos antioxidantes naturais. As mudanças no comportamento alimentar com o consumo cada vez maior de alimentos de base vegetal, que contêm quantidades significativas de fitoquímicos bioativos, podem trazer benefícios para a saúde, nomeadamente a redução do risco de doenças crónicas (Ferreira *et al.*, 2009).

Desta forma, têm sido preferidos antioxidantes naturais, assim como o ácido ascórbico e os compostos fenólicos (hidrossolúveis), que são excretados pela urina, depois de terem complexado radicais livres. Por outro lado, antioxidantes insolúveis na água, como por exemplo a vitamina E, desempenham um papel importante na coadjuvação dos seus análogos lipossolúveis na remoção dos radicais livres do organismo (Barreira, 2010).

Pelos motivos referidos, pelos custos elevados de produção e menor eficiência, comparativamente com os antioxidantes naturais, o interesse pela utilização destes últimos tem sido crescente (Moure *et al.*, 2001; Krishnaiah *et al.*, 2010).

Existe, efetivamente, um grande interesse em encontrar antioxidantes naturais para utilização em alimentos, de forma a retardar a oxidação lipídica, ou em aplicações farmacêuticas para reduzir o risco de doenças crónicas relacionadas com a produção de radicais livres (Prior, 2003).

2 - CHÁ

- 2.1. Considerações iniciais
- 2.2. Consumo e produção mundial de chá
- 2.3. Composição química do chá
- 2.4. Benefícios dos flavonóides do chá

2.1. Considerações iniciais

Desde sempre que as plantas desempenharam um papel muito importante para a humanidade (Novais, 2004). Descobertas arqueológicas revelaram que as infusões de folhas de várias plantas silvestres, incluindo a planta do chá, podem ter sido consumidas há mais de cinco mil anos. Dizem algumas lendas Chinesas e Indianas que o uso de chá já ocorria em 2737 anos aC, quando o Imperador chinês Shen Nung experimentou uma bebida com um aroma agradável e gosto refrescante, após a queda acidental de folhas secas em água a ferver. Em Portugal, as primeiras referências à planta do chá, referem-se à povoação de Angra do Heroísmo (Ilha Terceira) e são do princípio de século XIX (Chá nos Açores, 2011). Esta antiga prática, que começou por ser associada a fins medicinais, foi introduzida, progressivamente, em todo o mundo. Assim, há muitos séculos que se utilizam plantas sob a forma de chás ou tisanas com o objetivo de tratar diferentes doenças (reduzir a inflamação, melhorar o fluxo sanguíneo, tratar doenças infecciosas, purificar o corpo e manter o equilíbrio mental) (Sumpio *et al.*, 2006).

Atualmente, o uso de plantas como forma de tratamento ainda é muito importante para o ser humano. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população humana ainda trata os seus problemas de saúde com remédios tradicionais (Novais, 2004). Em todo o mundo, são frequentemente usadas muitas plantas para preparar bebidas ingeridas após as refeições ou aplicadas na terapia popular. Em Portugal, bem como em Espanha, algumas das plantas medicinais mais populares têm sido tradicionalmente recolhidas para preparar infusões e decocções, conhecidas localmente como chás (Pardo de Santayana *et al.*, 2005).

O chá é uma bebida feita a partir das folhas da espécie *Camellia sinensis* da família *Theaceae* (Yang e Lambert, 2011). É uma bebida muito popular que, se encontra no segundo lugar do consumo mundial, a seguir à água (Sumpio *et al.*, 2006; Vuong *et al.*, 2011), sobretudo devido ao seu sabor agradável e aos seus efeitos na saúde (Benzie *et al.*, 2011). Chá refere-se tradicionalmente a bebidas produzidas por infusão em água quente de folhas secas da planta *Camellia sinensis* (branco, verde, oolong e preto); provêm da mesma fonte botânica e diferem, principalmente, no tipo e extensão do processamento que sofrem (Ferruzzi, 2010).

As formas mais comuns de preparação tiram partido da ação do calor, que facilita a passagem de alguns dos compostos bioativos das plantas para a água.

Para além da infusão (sobre as folhas da planta deita-se água muito quente, deixando repousar durante alguns minutos) os chás podem ser preparados por decocção ou cozimento (na água em ebulição deitam-se as partes das plantas cortadas, mantendo em ebulição). A infusão é indicada quando o chá é preparado a partir de partes tenras da

planta (folhas, botões florais e flores), enquanto a decocção é mais usada para raízes, caules e frutos secos. Tanto as infusões como as decocções são administradas por via oral e tópica (epidérmica e inalável) (Carvalho, 2010).

Após a colheita, as folhas frescas da planta *Camellia sinensis* são submetidas a uma série de etapas de tratamento que resultam em três tipos principais de chá (Chow *et al.*, 2011; Deka *et al.*, 2011):

- ✓ **Chá verde** (não fermentado) - depois da colheita, as folhas de chá verde (folhas jovens) sofrem um processo de cozedura pelo vapor, que inativa a enzima polifenol oxidase, estabiliza as catequinas monoméricas, prevenindo a oxidação dos constituintes do chá, antes da secagem (McKay *et al.*, 2002; Gonzalez de Mejia *et al.*, 2009; Hara, 2011; Yang *et al.*, 2011).
- ✓ **Chá preto** (fermentado) - o chá preto é feito através de oxidação das catequinas, catalisada pela polifenol oxidase, nas folhas frescas, denominada fermentação. Este processo de fermentação resulta na oxidação de polifenóis simples, algumas catequinas são oxidadas ou condensadas em moléculas maiores (dímeros ou polímeros), tais como teaflavinas (3-6%) e tearubiginas (12-18%). Estes polímeros são responsáveis pelas suas características típicas, como a cor escura e o forte sabor adstringente (Almajano *et al.*, 2008).
- ✓ **Oolong** (semi-fermentado) - é produzido por oxidação parcial da folha, da qual resultam características intermédias entre o chá verde e o chá preto (Wang *et al.*, 2000; McKay *et al.*, 2002; Henning *et al.*, 2004; Cabrera *et al.*, 2006; Milasiene *et al.*, 2007).

Apesar de o chá ser uma fonte pobre em nutrientes essenciais, fornece quantidades apreciáveis de fitoquímicos, muitos deles relacionados com a redução de inúmeras doenças e distúrbios relacionados com o stresse oxidativo (Cabrera *et al.*, 2006; Mckay *et al.*, 2007).

As tisanas rooibos (*Aspalathus linearis*) e borututu (*Cochlospermum angolensis*) são também muito consumidas. O borututu é uma árvore de África, e as suas raízes são tradicionalmente usadas para chá, pois apresentam vários benefícios para a saúde (*e.g.* doenças hepáticas, doenças gastrointestinais, diurético, desintoxicante e purificador) (Borututu, 2011). O rooibos é um chá de ervas obtidas a partir de *Aspalathus linearis*, uma planta indígena da África do sul e tem sido usado na medicina tradicional, sobretudo devido às suas propriedades antioxidantes. Alguns estudos revelaram benefícios do seu consumo no tratamento da pressão alta, insónia, depressão, diabetes mellitus 2, aterosclerose e doenças de pele (Rooibos, 2011).

O uso de preparações antioxidantes naturais de plantas tem tido um elevado crescimento na indústria alimentar e nutracêutica, criando oportunidades para o desenvolvimento de novos produtos (Joubert *et al.*, 2004), que são vendidos em estabelecimentos especializados, na forma de extratos, pós e bebidas prontas a consumir, que são populares pela sua fragrância, propriedades antioxidantes e aplicações terapêuticas (Chan *et al.*, 2010).

Enquanto a capacidade antioxidante do chá verde e preto está bem documentada, os estudos com o chá roibos ainda são escassos. No entanto, alguns estudos *in vitro* mostraram que este produto tem ação antioxidante comparável à do chá verde e preto (Breiter *et al.*, 2011).

Muitos fitoquímicos têm propriedades antioxidantes fortes (Caballero *et al.*, 2005). Pensa-se que a sua atividade, em especial se consumidos inseridos numa dieta equilibrada, pode proteger contra os danos oxidativos nos seres humanos (Cabrera *et al.*, 2006). Porém, apesar da comprovada capacidade antioxidante dos polifenóis do chá, muitos estudos clínicos e em modelos animais têm demonstrado que estes compostos, especialmente os polímeros, ésteres e glucósidos, embora abundantes, nem sempre são absorvidos por via oral. O efeito funcional do composto não depende apenas da quantidade ingerida, mas também da sua biodisponibilidade (Macedo *et al.*, 2011).

2.2. Consumo e produção mundial de chá

O consumo de chá não é uniforme em todo o mundo. Grandes segmentos da população mundial praticamente não consomem chá (Chow *et al.*, 2011).

A produção mundial de chá em 2007 atingiu um recorde de 3,95 milhões de toneladas, e atualmente, há uma tendência de crescimento anual de 1,9% para o chá preto e 3,8% para o chá verde. Pensa-se que em 2017 a produção poderá atingir 3,14 milhões de toneladas de chá preto e 1,57 milhões de toneladas de chá verde (Vuong *et al.*, 2011).

Entre os maiores produtores de chá está a China, Índia, Quênia, Sri Lanka e Turquia (**figura 11**).

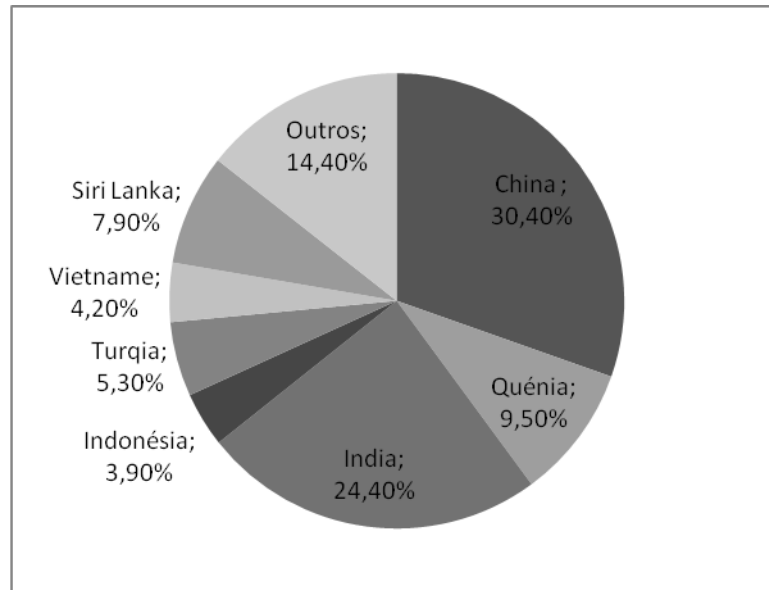


Figura 11. Principais países produtores de chá (2007). Adaptado de Países produtores, 2007.

No Japão, China, Índia e Inglaterra existe um elevado consumo de chá, bebida que detém uma posição preferencial na sociedade (Sumpio *et al.*, 2006). Hoje em dia, (figura 12) o chá preto é consumido principalmente na Europa, América do Norte e Norte de África (exceto Marrocos), enquanto o chá verde é bebido em toda a Ásia. O chá oolong é popular na China e Taiwan. Também as infusões de ervas em mistura com frutos são populares em algumas partes da América Latina e na Europa Ocidental (Benzie *et al.*, 2011).

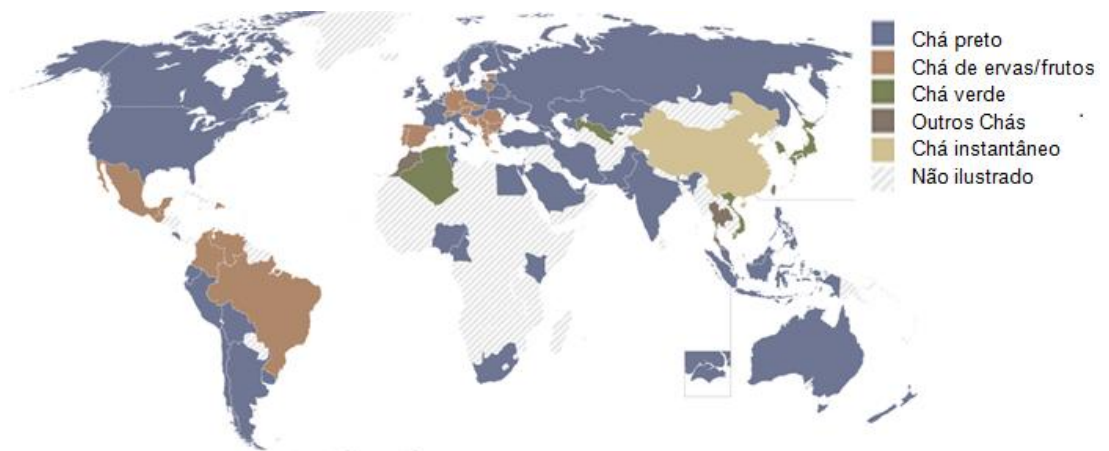


Figura 12. Distribuição mundial do consumo de chá. Adaptado de Consumo de chá, 2009.

Tendo por base dados da associação de Chá dos Estados Unidos, estima-se que o valor industrial do chá aumentou 2,73% entre 1990 e 2002, aumento para o qual muito contribuiu a evolução do mercado das bebidas prontas a consumir (925% de aumento) (Caballero *et al.*, 2005).

Existe uma grande variedade de chás que alegam benefícios para a saúde, devido às suas propriedades antioxidantes, com destaque para o chá verde, preto e oolong. Existem ainda os aromatizados e as tisanas, com inúmeros sabores e provenientes de todo o mundo, desde a Ásia à América do Sul, passando pelo Médio Oriente, África e terminando nos Açores.

Além dos inúmeros tipos de chás existentes, estes encontram-se disponíveis no mercado em diferentes formulações (sacos, folhas, raízes, granulados, pós, líquidos) que podem ser preparadas por infusão ou solubilização, ou estarem já prontos a consumir.

As infusões podem ser preparadas com folhas soltas ou acondicionadas em invólucros apropriados, tipicamente conhecidos como “sacos de chá”. Nestes, as folhas de chá são embaladas geralmente numa folha de papel. O uso de sacos de chá é fácil e conveniente, o que os torna bastante populares. Contudo, os apreciadores sugerem que este método retira algum sabor ao chá. Para contrariar algumas destas desvantagens foi criado o “saco de chá de pirâmide”, introduzidos pela Lipton em 1996. Este saco tem um *design* único, permitindo, na sua forma tridimensional, mais espaço para as folhas de chá se expandirem durante a maceração. No entanto, alguns tipos de sacos de chá em pirâmide têm sido criticados, como prejudiciais ao meio ambiente, já que o material sintético de que são constituídos não é destruído nos aterros sanitários. O facto de as folhas estarem contidas num saco, o tamanho e o material desse saco podem também contribuir para a alteração da composição da infusão do chá (Astill *et al.*, 2001).

No caso do chá a granel, as folhas são embaladas num recipiente, onde as porções devem ser medidas, individualmente, pelo consumidor para uso num copo, caneca ou bule. Assim, o consumidor pode preparar chás com sabores de intensidade variável, sendo, no entanto, um processo de preparação menos prático.

Também os chamados “chás instantâneos” têm vindo a tornar-se populares, em especial devido à conveniência de não precisarem de água fervente. Estes produtos vêm, muitas vezes com sabores adicionados, como baunilha, mel ou frutas, e também podem conter leite em pó. Os apreciadores de chá tendem a criticar estes produtos por adulterarem o sabor do chá, em favor da facilidade de preparação.

Os chás prontos a beber surgiram para surpreender o mercado, criando novas categorias de bebidas que resultam da fusão de universos aparentemente distintos – o universo da água e o universo dos chás. Estes tendem a apresentar um consumo

elevado pois estão ao alcance de todos os consumidores, desde um supermercado passando pelo café, o que facilita o seu consumo. O chá pronto a beber é agora uma alternativa conveniente a refrigerantes mais açucarados.

Também estão disponíveis extratos de chá verde encapsulado e líquido para aqueles que não gostam de beber chá, mas que procuram os seus benefícios.

Em qualquer uma destas formulações, o sabor e a quantidade das folhas parecem ser influenciados pelo clima, solo, altitude, época e modo de colheita, misturas e armazenamento sendo, no entanto, o processamento o fator que define o tipo de produto final. Além dessas influências, a variedade, o ambiente de crescimento, as condições de processamento e mesmo o tamanho da folha influenciam a composição desta, bem como a composição das infusões finais obtidas. O método de preparação da infusão, no momento em que vai ser consumida, nomeadamente a quantidade de folhas e água usada, o tempo de infusão e a agitação são também determinantes na quantidade de componentes do chá que estão, efetivamente, disponíveis para ingestão. O valor desta bebida ultrapassa o seu efeito retemperador e o seu papel social positivo, parecendo ser dotada de ação fisiológica benéfica (Astill *et al.*, 2001).

2.3. Composição química do chá

A composição do chá verde tem sido largamente estudada, sendo atualmente bem conhecida (Dufresne *et al.*, 2001). A sua composição química é complexa, podendo encontrar-se polifenóis, alcalóides, aminoácidos, glúcidos, proteínas, compostos voláteis, minerais e oligoelementos, entre outros constituintes.

Na composição de um rebento de chá, cerca de metade da matéria seca é insolúvel em água e dela fazem parte a fibra bruta, celulose, proteínas, gorduras, ácidos gordos, etc. Na matéria seca, solúvel em água, encontram-se polifenóis, aminoácidos, cafeína, açúcares e amido, sendo os polifenóis o maior grupo de componentes biologicamente ativos do chá (Henning *et al.*, 2004). No entanto, existem outros compostos no chá verde com interesse para a saúde humana, como o flúor, a cafeína, minerais e oligoelementos como crómio e manganês (Karak *et al.*, 2010).

Estudos recentes demonstraram a presença de oligoelementos no chá, pois as plantas são normalmente cultivadas em solos muito ácidos, onde alguns destes são potencialmente mais biodisponíveis para absorção radicular (Karak *et al.*, 2010). Contudo, a presença do elemento no chá pode ter efeitos tanto benéficos como adversos. Por um lado, o consumo regular de chá pode contribuir para a DDR (dose diária

recomendada) de alguns desses elementos, por outro o excesso de oligoelementos pode ser nefasto para a população (Reto *et al.*, 2007; Karak *et al.*, 2010).

Entre os polifenóis presentes no chá, os flavonóides são o grupo mais abundante. Estes dividem-se em seis subclasses estruturalmente relacionadas: flavonas, flavonóis, flavanonas, antocianinas, isoflavonas e flavanóis. Estes derivados fenólicos são sintetizados em quantidades substanciais (0,5% para 1,5%) e numa grande variedade de compostos (mais de 4000 identificados), estando amplamente distribuídos no reino das plantas (McKay *et al.*, 2002). Sendo o grupo mais biologicamente ativo do chá, são componentes que têm propriedades antioxidantes, antimutagénicas e anticarcinogénicas (Yao *et al.*, 2004), podendo transferir essas propriedades para a bebida.

As catequinas pertencem à subclasse dos flavanóis e são estruturalmente definidas como flavan-3-óis. As catequinas e os seus dímeros (teaflavinas) e polímeros (tearubiginas) foram identificados como os principais componentes no chá (Sang *et al.*, 2011). As epicatequinas são as catequinas principais no chá, especialmente o galhato de epigalocatequina (EGCG) (mais de 10% em base seca) (Dufresne *et al.*, 2001), seguido da epigalocatequina (EGC), galhato de epicatequina (ECG) e epicatequina (EC). Em contraste, as catequinas, incluindo o galhato de galocatequina (GCG), galocatequina (GC), galhato de catequina (CG) e catequina (C), estão presentes apenas em pequenas quantidades no chá. No seu conjunto, as catequinas representam cerca de 30% do seu peso seco (Wang *et al.*, 2000; Vuong *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2011).

O EGCG tem uma estrutura com oito grupos hidroxilo, pelo que é altamente hidrofílico. Exerce a sua bioatividade, principalmente, em ambientes aquosos ou compartimentos de água nos tecidos do organismo. No ser humano, pode ter biodisponibilidade limitada devido às suas características físicas e químicas, que impõem a sua taxa de absorção, através do trato gastrointestinal, metabolismo e eliminação. O EGCG é um poderoso antioxidante, também conhecido por inibir a oxidação em vários sistemas alimentares, incluindo carne de porco, peixe e óleos de peixe marinhos altamente insaturados (Zhong *et al.*, 2011).

Em geral, as catequinas são coradas, hidrossolúveis, e são responsáveis pelo sabor amargo e adstringente da infusão de chá verde. São bem conhecidas pelas suas propriedades antioxidantes, superiores às descritas para as vitaminas C e E e β -caroteno. O teor em catequinas no chá varia com o local de cultivo, a variedade, a nutrição da planta, a época do ano e as condições de processamento.

O teor de polifenóis totais é semelhante em diferentes tipos de chá, mas os componentes individuais variam devido, em parte, ao grau de oxidação dos polifenóis que ocorre durante o processamento das folhas. Durante a fermentação das folhas frescas do

chá, algumas catequinas sofrem oxidação, o que leva à formação de dímeros e polímeros (Sang *et al.*, 2011), que se intitulam teaflavinas e tearubiginas, respetivamente, mas mantêm muitas das propriedades biológicas das catequinas (Hara, 2011). As teaflavinas (teaflavina, galhato de 3- teaflavina, galhato de 3'-teaflavina e digalhato de 3,3'-teaflavina) (Gonzalez de Mejia *et al.*, 2009), representam entre 1 e 6% do peso seco dos sólidos do chá preto. As tearubiginas (polímeros) são as mais abundantes e representam cerca de 10 a 20% do peso seco (Caballero *et al.*, 2005).

Estas substâncias são responsáveis por conferir ao chá preto a sua cor e sabor únicos. As teaflavinas são responsáveis pelo seu pigmento amarelado, enquanto as tearubiginas são também responsáveis pela cor avermelhada/acastanhada.

O chá preto, ao contrário do chá verde, é um produto altamente processado. No chá preto as catequinas polimerizadas, como teaflavinas e tearubiginas predominam (McKay *et al.*, 2002). Os mecanismos antioxidantes dos polifenóis do chá, especialmente tearubiginas, continuam a carecer de uma elucidação completa (Ho *et al.*, 2009).

Os componentes principais do chá estão listados na **tabela 4**.

Tabela 4. Componentes do chá. Adaptado de Dufresne *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000; Voung *et al.*, 2011.

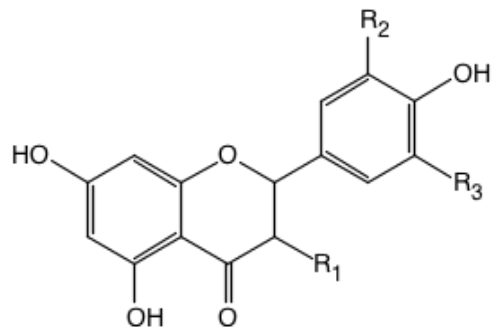
| Componentes | Estrutura | Estrutura química |
|------------------|-----------------------|---|
| Flavonóis | | |
| Miricetina | $R_1=R_2=R_3=OH$ |  <p>Flavonóis</p> |
| Quercetina | $R_1=R_2=OH; R_3=H$ | |
| Canferol | $R_1= OH; R_2=R_3= H$ | |

Tabela 4. Continuação.

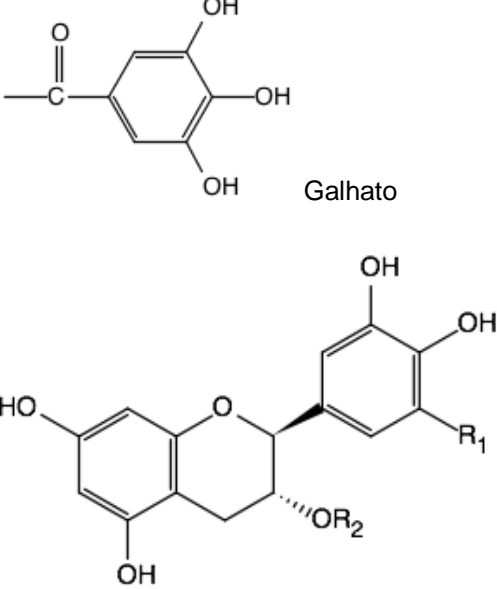
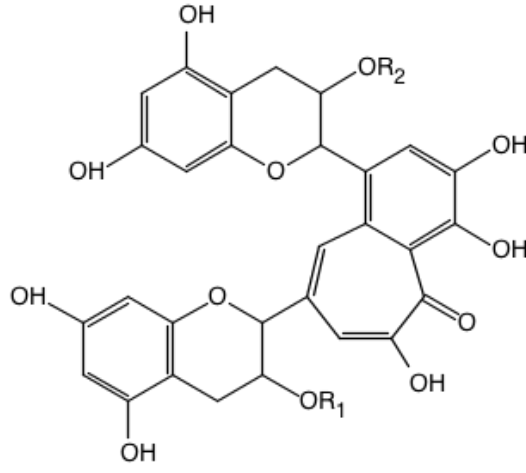
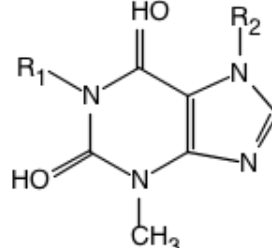
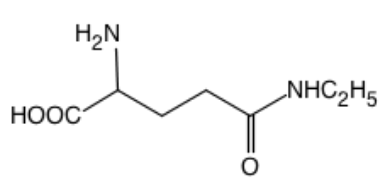
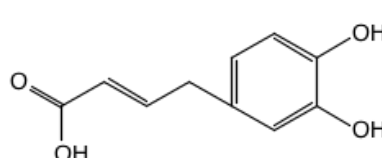
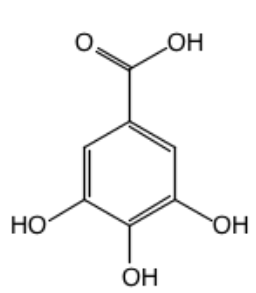
| Componentes | Estrutura | Estrutura química |
|--|---|---|
| <p>Catequinas C GC CG GCG</p> <p>EC EGC ECG EGCG</p> | <p>$R_1=R_2=H$ $R_1=OH; R_2=H$ $R_1=H; R_2=Galhato$ $R_1=OH; R_2=Galhato$</p> <p>$R_1=R_2=H$ $R_1=OH; R_2=H$ $R_1=H; R_2=Galhato$ $R_1=OH; R_2=Galhato$</p> |  <p>Galhato</p> <p>Catequina</p> |
| <p>Teaflavinas</p> <p>Teaflavinas 3-galhato</p> <p>Teaflavina-3'-galhato</p> <p>Teaflavina 3.3 - digalhato</p> <p>Tearubiginas</p> | <p>$R_1= R_2=H$</p> <p>$R_1=OH; R_2=OH$</p> <p>$R_1=Galhato; R_2= OH$</p> <p>$R_1=OH; R_2=Galhato$</p> <p>$R_1= R_2=Galhato$</p> |  <p>Teaflavina</p> |
| <p>Metilxantinas</p> <p>Cafeina</p> <p>Teoromina</p> | <p>$R_1=R_2=CH_3$</p> <p>$R_1=H; R_2=CH_3$</p> |  <p>Metilxantinas</p> |

Tabela 4. Continuação.

| Componentes | Estrutura | Estrutura química |
|-------------------------|-----------|---|
| Aminoácidos | | |
| Teanina | |  <p style="text-align: right;">Teanina</p> |
| Ácidos orgânicos | | |
| Ácido cafeico | |  <p style="text-align: right;">Ácido cafeico</p> |
| Ácido quinico | | |
| Ácido gálgico | | |
| Voláteis | | |
| | |  <p style="text-align: right;">Ácido gálgico</p> |

Como se pode observar, 60 a 80% dos flavonóides totais no chá verde são monómeros de catequina (**tabela 5**). Já no chá preto as tearubiginas podem incluir mais de 70% do total de flavonóides, enquanto as teaflavinas compreendem cerca de 10% (**tabela 5**) (Higdon *et al.*, 2003; Deka *et al.*, 2011).

Tabela 5. Composição total de flavonóides no chá verde e chá preto. Adaptado de Higdon *et al.*, 2003.

| | Chá verde | Chá preto |
|----------------------------|-----------|-----------|
| Flavonóis | 7-9% | 7-9% |
| Catequinas oxidadas | 20-30% | |
| Tearubiginas | | 63-74% |
| Teaflavinas | | 5-12% |
| Catequinas | 60-80% | 6-24% |

Também podem ser encontrados no chá verde flavonóis como a quercetina, canferol, miricetina, rutina e derivados glucosídicos (Dufresne *et al.*, 2001; McKay *et al.*, 2002; Higdon *et al.*, 2003; Reto *et al.*, 2007).

O chá contém ainda ácidos fenólicos, principalmente os ácidos cafeico, quínico e gálgico. A cafeína pertence ao grupo das metilxantinas (Dufresne *et al.*, 2001), que por sua vez são classificados como sendo alcalóides da purina. A cafeína é o alcalóide da purina que se encontra presente no chá em maior quantidade (Ashihara *et al.*, 2008). As folhas de chá contêm 2-5% de cafeína, nomeadamente nos materiais hidrossolúveis de chá verde e preto (Yang *et al.*, 2011). Entre os efeitos da cafeína no organismo humano é de salientar a sua ação estimulante do SNC. A folha de chá contém teores que rondam um terço da cafeína contida no café, a fonte mais eminente de cafeína (Dufresne *et al.*, 2001). O teor em cafeína varia nas diferentes partes do rebento da planta. É maior no gomo terminal e 1ª folha, decresce sucessivamente nas folhas menos jovens e é mínima no caule. O seu teor não se altera significativamente durante o processo de fabrico do chá preto (McKay *et al.*, 2002).

A teanina é um aminoácido comumente encontrado no chá (*Camellia sinensis*), principalmente no chá verde (Dufresne *et al.*, 2001), e tem sido associada com um melhor sabor e um efeito anti-hipertensor (Sang *et al.*, 2011).

Para além destes compostos, existe também o ácido gálgico que é o composto polifenólico mais absorvido (Han *et al.*, 2007).

A concentração de flavonóides em qualquer bebida de chá depende do tipo de chá (mistura, descafeinado, instantâneo) e do tipo de preparação (*e.g.* quantidade utilizada, tempo de infusão, temperatura) (McKay *et al.*, 2002). Os polifenóis do chá, principalmente as catequinas e as teaflavinas, podem exercer as suas propriedades antioxidantes por captação de radicais livres, quelatação de metais e iões de transição, e modulação de enzimas antioxidantes/oxidantes ou genes. A EGCG e a ECG têm a maior capacidade de captação de radicais.

A biodisponibilidade dos polifenóis do chá é, geralmente, considerada pobre, uma vez que a absorção de catequinas (excluindo metabolitos do cólon) é inferior a 25% da dose oral, com a maioria dos estudos a indicar eficiências de absorção entre 0,1 e 10% (Ferruzzi, 2010). É, pois, questionável se as quantidades consumidas de chá serão suficientes para obter os níveis de catequinas necessários para beneficiar a saúde. Além disso, o consumo de chá, que contém cafeína, pode causar alguns efeitos indesejáveis.

Portanto, a utilização de extratos de chá em alimentos tem sido considerada uma forma alternativa de proporcionar os benefícios das catequinas do chá. Além disso, a

utilização de catequinas em alimentos pode prolongar a sua vida-útil e melhorar a qualidade.

Portanto, o conhecimento completo das propriedades das catequinas, da produção de extratos de chá e da sua incorporação em alimentos continua a ser um importante desafio (Vuong *et al.*, 2011).

2.4. Benefícios dos flavonóides do chá

Registos que remontam ao século X a.C. indicam o uso do chá pelo Homem, em grande parte devido ao seu valor medicinal (Deka *et al.*, 2011). Embora o chá tenha sido, historicamente, pensado para promover a saúde e bem-estar, a investigação sobre os possíveis benefícios na saúde é mais recente (Reto *et al.*, 2007).

Como já foi referido, muitos dos benefícios para a saúde têm sido atribuídos aos compostos fenólicos. Estudos realizados *in vitro* e em modelos animais fornecem evidências de que os polifenóis do chá possuem bioatividade para retardar o aparecimento de fatores de risco associados ao desenvolvimento de doenças (Benzie *et al.*, 2011).

Muitos dos resultados destes estudos têm sido apregoados nos *media* ou em revistas de grande tiragem (Yang e Lambert, 2011), o que tem contribuído para a popularidade mundial de chá no que se refere a ausência de toxicidade, e como agente dietético natural e depurativo (Henning *et al.*, 2004).

De acordo com os compostos bioativos do chá e a sua potencial capacidade de promover benefícios na saúde, encontram-se descritos inúmeros benefícios, que estão citados em inúmeras referências bibliográficas e que, de forma muito resumida, se apresentam na **tabela 6**.

Tabela 6. Patologias com benefícios quando associadas ao consumo de chá e respetivas referências bibliográficas.

| Patologias | Referências |
|------------------------|--|
| Atividade antioxidante | Higdon <i>et al.</i> , 2003; Yao <i>et al.</i> , 2004; Khan <i>et al.</i> , 2007; Song <i>et al.</i> , 2005; Ho <i>et al.</i> , 2009; Shin <i>et al.</i> , 2007; Lambert <i>et al.</i> , 2010; Macedo <i>et al.</i> , 2011; Zhong <i>et al.</i> , 2011 |

Tabela 6. Continuação.

| Patologias | Referências |
|--|---|
| Anticarcinogénica | Trevisanato <i>et al.</i> , 2000; Higdon <i>et al.</i> , 2003; Yao <i>et al.</i> , 2004; Khan <i>et al.</i> , 2007; Song <i>et al.</i> , 2005; Cabrera <i>et al.</i> , 2006; Khan <i>et al.</i> , 2007; Mckay <i>et al.</i> , 2007; Gonzalez de Mejia <i>et al.</i> , 2009; Chow <i>et al.</i> , 2011; Yang <i>et al.</i> , 2011; Yuan <i>et al.</i> , 2011 |
| Ação anti-diabética | Khan <i>et al.</i> , 2007; Vuong <i>et al.</i> , 2011 |
| Ação antibacteriana | Song <i>et al.</i> , 2005; Almajano <i>et al.</i> , 2008; Chacko <i>et al.</i> , 2010 |
| Propriedades hipocolesterolémicas | Reto <i>et al.</i> , 2007; Deka <i>et al.</i> , 2011 |
| Propriedades anti-hipertensoras | Mckay <i>et al.</i> , 2007; Deka <i>et al.</i> , 2011; Sang <i>et al.</i> , 2011 |
| Proteção na saúde oral | Wang <i>et al.</i> , 2000; Dufresne <i>et al.</i> , 2001; Higdon <i>et al.</i> , 2003; Mckay <i>et al.</i> , 2007 |
| Proteção nas DCV | Trevisanato <i>et al.</i> , 2000; Higdon <i>et al.</i> , 2003; Cabrera <i>et al.</i> , 2006; Khan <i>et al.</i> , 2007; Mckay <i>et al.</i> , 2007; Vuong <i>et al.</i> , 2011; Ras <i>et al.</i> , 2011 |
| Proteção nas doenças neurodegenerativas | Higdon <i>et al.</i> , 2003; Dufresne <i>et al.</i> , 2001; Cabrera <i>et al.</i> , 2006; Khan <i>et al.</i> , 2007; Mckay <i>et al.</i> , 2007; Chacko <i>et al.</i> , 2010 |
| Antiviral | Song <i>et al.</i> , 2005; Khan <i>et al.</i> , 2007 |
| Prevenção de patologias osteoarticulares | Higdon <i>et al.</i> , 2003; Cabrera <i>et al.</i> , 2006; Mckay <i>et al.</i> , 2007; Chacko <i>et al.</i> , 2010; Shen <i>et al.</i> , 2011 |
| Atividade anti-inflamatória | Dufresne <i>et al.</i> , 2001; Chacko <i>et al.</i> , 2010 |
| Melhoria da função gastrointestinal | Dufresne <i>et al.</i> , 2001 |
| Diminuição da agregação plaquetária | Cabrera <i>et al.</i> , 2006; Mckay <i>et al.</i> , 2007 |
| Combate à obesidade | Henning <i>et al.</i> , 2004; Hodgson <i>et al.</i> , 2010; Deka <i>et al.</i> , 2011; Vuong <i>et al.</i> , 2011 |
| Proteção solar contra radiação UV | Li <i>et al.</i> , 2009 |

Atividade antioxidante: O notável potencial antioxidante do chá, está contido dependente de muitos fatores, sobretudo os que estão relacionados com a preparação da bebida. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos (e.g. catequinas) é devida principalmente às suas propriedades redox (Macedo *et al.*, 2011), podendo bloquear radicais livres e quelar íons metálicos (Lambert *et al.*, 2010). Devido a todos estes facto a popularidade/consumo desta bebida tem aumentado em todo o mundo (Reto *et al.*, 2007).

No entanto, o consumo de chá (catequinas) em quantidades excessivas pode causar alguns problemas de saúde, tendo mesmo sido demonstrado que alguns extratos de chá verde (Shin *et al.*, 2007) e frações enriquecidas com flavonóides de roibos (Joubert *et al.*, 2005) podem ter atividade pró-oxidante. Na verdade, deve existir a consciência de que os antioxidantes potentes também podem exibir atividade pró-oxidante, pois um composto antioxidante sob determinadas circunstâncias, pode alterar o seu comportamento de forma a potenciar os danos oxidativos em vez de inibi-los. A presença de metais de transição, como por exemplo Fe^{3+} e Cu^{2+} , em determinadas concentrações, podem ocasionar essa alteração de comportamento. Nestas situações, o efeito protetor dos antioxidantes deixa de se verificar, ou pode, inclusive, causar danos oxidativos de componentes celulares (Joubert *et al.*, 2005).

Atividade anticarcinogénica: A possível prevenção de cancro através do consumo de chá tem recebido muita atenção nas últimas três décadas. Modelos experimentais têm sugerido que os flavonóides (catequinas e teaflavinas) encontrados no chá podem reduzir o risco de vários tipos de cancro. Têm sido feitos grandes avanços para compreender as reações moleculares que previnem o cancro (Gonzalez de Mejia *et al.*, 2009). No entanto, os dados epidemiológicos não confirmam nem refutam um papel preventivo da ingestão de chá nas neoplasias, em contraste com os fortes indícios relativamente a estudos experimentais (Gonzalez de Mejia *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2011).

A atividade do chá (chá verde, principalmente) e dos seus componentes contra a carcinogénese, durante as fases de iniciação, promoção e progressão, e em diferentes órgãos, tem sido demonstrada em diferentes laboratórios com modelos animais (Yang *et al.*, 2011). No entanto, os mecanismos envolvidos na prevenção do cancro podem envolver efeitos antioxidantes e pró-oxidantes (Lambert *et al.*, 2010).

A seguir apresenta-se um diagrama simplificado das possíveis funções associadas aos componentes do chá na prevenção do cancro e inflamação (**figura 13**). Os flavanóis do chá têm atividade anti-inflamatória, inibindo a ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e reduzindo a formação da prostaglandina E2 (PGE₂), e a expressão da sintetase

indutível do óxido nítrico (iNOS). Podem, assim, atuar como agentes de bloqueio e supressão de múltiplas fases da carcinogênese (Gonzalez de Mejia *et al.*, 2009).

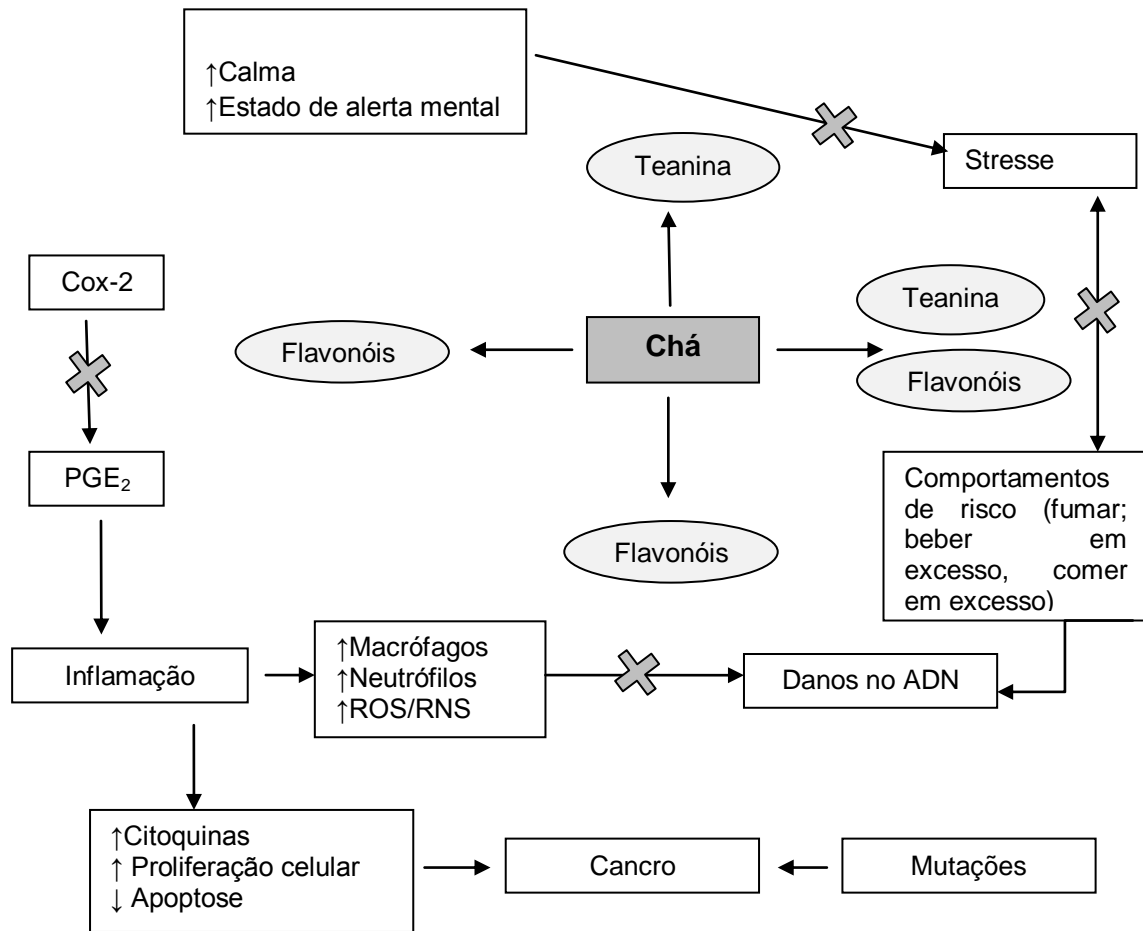


Figura 13. Representação das possíveis funções dos componentes do chá na prevenção do cancro e da inflamação. Adaptado de Gonzalez de Mejia *et al.*, 2009

Em geral, o consumo de chá preto não tem sido associado com menor risco de cancro, o que pode dever-se às concentrações relativamente inferiores de catequinas neste, comparativamente às do chá verde (Yuan *et al.*, 2011).

Pelo contrário, o elevado consumo de chá verde foi, consistentemente, associado com um risco reduzido de cancro do trato gastrointestinal. A atividade antitumoral de extratos de chá verde e polifenóis do chá foram demonstradas em diferentes modelos animais, incluindo modelos para cancros de pele, pulmão, cavidade oral, esófago, estômago, intestino delgado, cólon-retal, bexiga, fígado, pâncreas, próstata e mama (Yang *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2011).

Muitos estudos efetuados em linhas celulares demonstraram a bioatividade do EGCG, incluindo aumento da apoptose, inibição da proliferação celular e inibição da

angiogénese. No entanto, os mecanismos moleculares da inibição *in vivo* da carcinogénese continuam a ser investigados (Yang *et al.*, 2011). Está ainda sob estudo a atividade preventiva do consumo de chá verde ou extracto de chá verde em doentes com vírus do papiloma humano (Chow *et al.*, 2011).

Proteção nas DCV: Alguns indivíduos (população asiática) associam a ingestão de chá ou álcool ao tabagismo (Yuang *et al.*, 2011). Em diferentes estudos foi evidenciada a associação entre o tabagismo e os eventos cardiovasculares (e.g. enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral, doença vascular periférica, agravamento da angina de peito, até mesmo, morte súbita).

Embora os países asiáticos apresentem um elevado consumo de tabaco, semelhante ao dos países ocidentais, os primeiros apresentam uma baixa incidência de cancro e DCV. Pensa-se que este facto se deve ao consumo diário e elevado de chá verde (cerca de 1,2L) por dia (Sumpio *et al.*, 2006), o que constitui o designado paradoxo asiático.

Dada a aparente associação entre o consumo de chá e a redução de DCV, vale a pena considerar os potenciais mecanismos associados. Um grande número de estudos epidemiológicos e de intervenção têm examinado esta questão. Embora, ainda não esteja claro onde ocorrem os efeitos favoráveis, nomeadamente a pressão arterial, lípidos, diabetes mellitus tipo 2, ou obesidade (**tabela 7**). Se presentes, os efeitos benéficos do consumo de chá sobre fatores de risco são pouco evidentes (Deka *et al.*, 2011).

Tabela 7. Potenciais mecanismos benéficos do consumo de chá contra a DCV. Adaptado de Deka *et al.*, 2011.

Potenciais mecanismos do chá contra a DCV

Redução da pressão arterial

Melhoria na dislipidemia

Sensibilidade à insulina

Perda de peso

Efeitos antioxidantes – captação de ROS e prevenção da oxidação de lípidos, proteínas e ADN

Efeitos anti-inflamatórios

Melhoria da função endotelial

Inibição plaquetária

Inibição da proliferação de células musculares lisas e de migração

Apesar de já referido, há estudos observacionais que sugerem um benefício do chá, enquanto outros não conseguiram mostrar tal associação. Estudos sobre os mecanismos em modelos experimentais e seres humanos têm identificado uma série de mecanismos plausíveis de benefício (incluindo efeitos anti-inflamatório e antiplaquetários, bem como efeitos favoráveis sobre o endotélio vascular) (Deka *et al.*, 2011).

Os flavonóides do chá parecem exercer vários efeitos benéficos, nomeadamente: proteção cardiovascular; envolvimento na inibição da agregação plaquetária; efeito vasodilatador atribuído à libertação da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) (Hodgson *et al.*, 2010); favorecimento do metabolismo lipídico por inibição da oxidação das LDL; estimulação da angiogénese; (Lastra *et al.*, 2007; Ramprasath *et al.*, 2010), redução da aterosclorose (Mckay *et al.*, 2002), pelo menos parcialmente responsável por benefícios sobre o risco de DCV (Hodgson *et al.*, 2010).

Além disso, existem indicações de que o consumo regular de chá verde pode ter benefícios na redução da gordura corporal e, por conseguinte, na prevenção da obesidade (Hodgson *et al.*, 2010). Porém, a literatura disponível não fornece uma informação clara sobre o tipo e/ou quantidade de chá que deve ser consumida como parte de uma dieta saudável (Deka *et al.*, 2011).

É ainda importante realçar que não se pode esperar que a ingestão de chá verde corrija, por si só, o resultado de outros hábitos alimentares ou de sedentarismo, menos favoráveis no que diz respeito à obesidade e à distribuição da gordura corporal. Há que incluir este novo hábito num padrão de alimentação e estilo de vida saudáveis, para que dele se possa tirar mais partido.

Doenças neurodegenerativas: Alguns estudos indicam que o chá pode melhorar funções neurológicas e psicológicas (Dufresne *et al.*, 2001). Efetivamente, tem sido sugerido que os flavonóides da dieta, potentes bioativos presentes no chá, podem exercer efeitos benéficos no SNC.

As catequinas do chá verde foram reconhecidas como compostos multifuncionais para a neuroprotecção, com efeitos benéficos sobre a função vascular e o desempenho mental. Também a teanina melhora a atividade cognitiva em seres humanos e tem efeitos neuroprotetores. De qualquer forma, são ainda necessários mais estudos clínicos em humanos, envolvendo o consumo de produtos de chá (Gonzalez de Mejia *et al.*, 2009) para poder afirmar seguramente esta ação.

Foi também aferida uma relação inversa entre o consumo de chá verde e o processo de envelhecimento cerebral, diminuindo os danos neurológicos e a perda de

memória associada; os autores deste estudo aconselham um consumo regular desta bebida incluída numa dieta normal e equilibrada (Envelhecimento cerebral, 2010).

Sendo assim, dietas ricas em antioxidantes fenólicos são eficazes na prevenção da oxidação induzida por redução do stresse nas funções neuronais; atuam ainda na redução ou atraso do funcionamento do SNC associado ao envelhecimento. Alguns antioxidantes são referidos como protetores de efeitos tóxicos nos neurónios, aumentando, desta forma, o seu interesse noutras patologias associadas com danos oxidativos, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (Dufresne *et al.*, 2001).

Ação antibacterianas: As catequinas, as proantocianidinas e os taninos hidrolisáveis já demonstraram atividade antimicrobiana (Almajano *et al.*, 2008). Os polifenóis do chá verde podem prevenir as cáries dentárias, através da inibição da atividade biológica das estirpes *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (Wang *et al.*, 2000).

Têm sido usados extratos de chá na terapia da cólera, em áreas de epidemia, e na prevenção de infeções do vírus *Influenza*. As teaflavinas extraídas do chá preto têm um efeito inibidor sobre o vírus da SIDA, mas não tão evidente como as catequinas de chá verde. Também foi demonstrado que um componente de extratos de chá é capaz de reverter a resistência à meticilina de *Staphylococcus aureus* (MRSA - methicillin-resistant *S. aureus*) (Wang *et al.*, 2000).

Prevenção das patologias osteoarticulares: Os polifenóis do chá verde mostraram ainda um efeito promotor na formação óssea, para além de prevenirem a perda de densidade óssea induzida pelo envelhecimento, a insuficiência das hormonas sexuais e a inflamação crónica em sistemas modelo.

Foram realizados estudos de intervenção a curto prazo, com suplementação de chá verde, em mulheres pós-menopausa que apresentavam uma baixa densidade óssea, e os resultados são promissores. Porém, são necessários estudos adicionais de observação no ser humano para demonstrar claramente os efeitos benéficos do consumo de chá na saúde óssea (Shen *et al.*, 2011).

O consumo de chá foi inversamente relacionado com o risco de fraturas da anca, durante um período de 6 anos. Contudo, os mecanismos envolvidos no efeito benéfico do consumo de chá na densidade óssea não são claros. Embora o chá seja uma fonte relativamente boa de flúor, um elemento conhecido por aumentar a densidade óssea em doses farmacológicas, há pouca evidência de que a quantidade de flúor fornecida pelo chá afete, significativamente, a densidade óssea (Higdon *et al.*, 2003).

Contudo, estudos revelaram que os benefícios atribuídos às catequinas do chá só ocorrem com consumos elevados (cinco ou mais chávenas diárias de chá verde). Desta forma, torna-se questionável o consumo de tanto chá para obter os referidos benefícios. Além disso, o consumo de chá, que contém cafeína, pode causar irritação do trato gastrointestinal e insónia (Vuong *et al* 2011).

Apesar dos pressupostos benefícios para a saúde obtidos pelo consumo de chá, não estão autorizadas alegações de saúde oficiais. Todavia pode ser reconhecido como uma parte importante do regime alimentar.

Como discutido anteriormente, ainda existem incongruências sobre o consumo de chá e os efeitos na saúde. Apesar de estudos epidemiológicos e em modelos animais terem demonstrado a eficácia dos constituintes do chá na prevenção de doenças crónicas, outros estudos não conseguiram demonstrar tais benefícios (Sang *et al.*, 2011).

Uma compreensão mais clara da química, estabilidade, biodisponibilidade e biotransformação dos polifenóis do chá irá fornecer uma base bioquímica para a compreensão de muitos dos resultados já existentes e planeamento de novos estudos. (Sang *et al.*, 2011); sobretudo é necessário um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no ser humano (Gonzalez de Mejia *et al.*, 2009).

É evidente que o chá é uma fonte de uma vasta gama de fitoquímicos que são digeridos, absorvidos e metabolizados pelo organismo, e que os constituintes do chá exercem efeitos ao nível celular. É, pois, considerado por muitos como um alimento funcional (Dufresne *et al.*, 2001).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Padrões e reagentes

3.2. Amostras e sua preparação

3.3. Avaliação *in vitro* das propriedades antioxidantes

3.3.1. Atividade captadora de radicais de DPPH

3.3.2. Poder redutor

3.3.3. Inibição da descoloração do β -caroteno

3.3.4. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

3.4. Determinação de antioxidantes

3.5. Análise estatística

Materiais e métodos

3.1. Padrões e reagentes

Os padrões trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcroman-2-carboxílico), ácido L-ascórbico, ácido cafeico, ácido clorogénico, malvidina 3-glucósido e quercetina desidratada foram adquiridos na Sigma (St. Louis, MO, EUA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Todos os outros produtos químicos e solventes eram de grau analítico. A água foi tratada com um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, USA).

3.2. Amostras e sua preparação

As amostras utilizadas no presente trabalho foram adquiridas em estabelecimentos do mercado local e incluíram várias bebidas, designadas por “chás”, com alegações de saúde no rótulo (efeito antioxidante, emagrecimento, anti-carcinogénico, anti-envelhecimento e estimulação do sistema nervoso).

De forma a poder comparar as diferenças induzidas pelo método de preparação, as amostras foram seleccionadas de acordo com a disponibilidade em diferentes formulações comerciais: saquetas (B), folhas (Lv), raízes (R), granulados (G), pós (P), extratos líquidos (E) e soluções (L). As amostras foram ainda escolhidas de forma a avaliar diferenças na sua composição incluindo uma única planta (*Camellia sinensis*, *Aspalathus linearis* ou *Cochlospermum angolensis*) ou combinações de diferentes frutos, plantas ou extratos de algas.

As bebidas foram preparadas de acordo com as recomendações do fabricante: infusão (I), solubilização (L) ou uso direto (D), como descrito na **tabela 8**.

As soluções obtidas foram consideradas soluções stock e, a partir delas, efectuaram-se várias diluições: 1:10 (fator de diluição - DF=10), 1:25 (DF=25), 1:50 (DF=50), 1:100 (DF=100), 1:200 (DF=200) e 1:1000 (DF=1000), para executar os ensaios de atividade antioxidante.

Na **tabela 9** disponibiliza-se informação suplementar das amostras estudadas, nomeadamente as alegações de saúde e a data de validade.

Tabela 8. Identificação e preparação das amostras (soluções stock).

| Designação/formulação | Modo de preparação ^a | Tempo | Temperatura ^a | Código |
|--|---|--------|--------------------------|----------|
| Chá verde (<i>Camellia sinensis</i>)/Saquetas | 1 saqueta (2,0 g) em 200 ml | 5 min, | 75 °C | I-Gt/B |
| Chá verde, ananás, hibisco/Saquetas | 1 saqueta (2,3 g) em 200 ml | 5 min, | 75 °C | I-GtH/B |
| Chá verde, limão, algas/Saquetas | 1 saqueta (1,5 g) em 200 ml | 3 min, | 100 °C | I-GtL/B |
| Chá verde/Folhas | 1,62 g de folhas em 200 ml | 3 min, | 75 °C | I-Gt/Lv |
| Chá vermelho rooibos (<i>Aspalathus linearis</i>)/Saquetas | 1 saqueta (1,5 g) em 200 ml | 4 min, | 100 °C | I-Rt/B |
| Chá borututu (<i>Cochlospermum angolensis</i>)/Raízes | 0,27 g de raízes em 200 ml | 5 min, | 75 °C | I-Bt/R |
| Infusão | | | | |
| Chá verde, vitamina C/Granulado | 4-5 colheres de chá (16,55 g) em 200 ml | 75 °C | | S- Gt/G1 |
| Solubilização | | | | |
| Chá verde, vitamina C, frutos vermelhos/Pó | 5,0 g de pó em 200 ml | 75 °C | | S-Gt/P1 |
| Chá verde / Extrato líquido | Direto (3 colheres de chá- 30 ml) | Direto | Temperatura ambiente | S-Gt/P2 |
| Chá verde, ananás, hibisco/Líquido | Direto (Garrafa de 250 ml) | Direto | | D-Gt/E |
| Chá verde, limão/ Líquido | Direto (Garrafa de 330 ml) | Direto | | D-GtH/L |
| Maçãs verdes, limão, <i>Ginkgo biloba</i> /Líquido | Direto (Garrafa de 250 ml) | Direto | | D-GtL/L |
| Romã, bagas vermelhas/ Líquido | Direto (Garrafa de 330 ml) | Direto | | D-Ga/L |
| Chá vermelho rooibos / Líquido | Direto (Garrafa de 330 ml) | Direto | | D-PRb/L |
| Chá preto Earl Grey, limão/ Líquido | Direto (Garrafa de 330 ml) | Direto | | D-Rt/L |
| Chá de cidreira, tília, camomila e limão /Líquido | Direto (Garrafa de 330 ml) | Direto | | D-Bt/L |
| | Direto (Garrafa de 330 ml) | Direto | | D-LbLC/L |

^aDe acordo com as indicações dos fabricantes.

Tabela 9. Informação suplementar dos "chás" analisados.

| Designação/formulação | Alegações | Data de validade |
|--|---|-------------------------|
| Chá verde (<i>Camellia sinensis</i>)/Saquetas | Antioxidante natural; anticarcinógeno; adelgaçante, anti- envelhecimento | 30-06-2011 |
| Chá verde, ananás, hibisco/ Saquetas | Manutenção do peso corporal | 03-2012 |
| Chá verde, erva limão, algas/ Saquetas | Antioxidante e adelgaçante | 05-2013 |
| Chá verde/Folhas | _____ | 10-10-2011 |
| Chá vermelho rooibos (<i>Aspalathus linearis</i>)/Saquetas | Antioxidante | 05-2013 |
| Chá Borututu (<i>Cochlospermum angolensis</i>)/Raízes | Desintoxicante; purificante | 13-04-2013 |
| Chá verde, vitamina C/Granulado | | 05-2012 |
| Chá verde, vitamina C, frutos vermelhos/Pó | Antioxidante natural | 09-2013 |
| Chá verde / Extrato líquido | Diurético; Emagrecimento e estimulante do SNC | 07-2013 |
| Chá verde, ananás, hibisco/Líquido | Antioxidantes; manutenção do peso corporal | 07-2013 |
| Chá verde, limão/ Líquido | Purificante, antioxidantes naturais | 04-2011 |
| Maçãs verdes, limão, <i>Ginkgo biloba</i> /Líquido | _____ | 27-05-2011 |
| Romã, bagas vermelhas/ Líquido | Antioxidantes | 27-05-2011 |
| Chá vermelho rooibos / Líquido | _____ | 28-04-2011 |
| Chá preto Earl Grey, limão / Líquido | _____ | 28-04-2011 |
| Chá de cidreira, tília, camomila e limão /Líquido | Benefício dos chás e ervas medicinais | 28-04-2011 |

3.3. Avaliação *in vitro* das propriedades antioxidantes

3.3.1. Métodos de avaliação da atividade antioxidante

As evidências que implicam o stresse oxidativo no desenvolvimento de diversas doenças e desequilíbrios fisiológicos induziram um maior interesse na compreensão do papel dos antioxidantes na sua prevenção e tratamento.

Desta forma, é de grande interesse para o público em geral e especialistas na área alimentar, conhecer a capacidade antioxidante dos componentes alimentares disponíveis para consumo. Devido à complexidade da composição dos alimentos, a separação de cada composto antioxidante e o seu estudo individualmente é caro e ineficiente, uma vez que não inclui as possíveis interações sinérgicas ou antagónicas entre os diferentes compostos antioxidantes presentes (Huang *et al*, 2005; Niki, 2010).

A avaliação da capacidade antioxidante nos alimentos pode ser vista por duas abordagens. Primeiro, a origem da capacidade antioxidante, por si só, ou seja, o potencial antioxidante, que é determinado pela composição antioxidante e propriedades antioxidantes dos componentes. Em segundo lugar, os efeitos biológico que dependem, entre outras coisas, da biodisponibilidade dos antioxidantes presentes (Roginsky *et al.*, 2005).

Adicionalmente, os antioxidantes individuais dos alimentos não refletem necessariamente a capacidade antioxidante total, já que poderão existir possíveis interações sinérgicas entre os compostos antioxidantes presentes (Magalhães *et al.*, 2008).

Têm sido discutidos vários métodos em termos de simplicidade, instrumentação necessária, mecanismos, verificação do ponto final, a forma de quantificação biológica e relevância (Niki, 2010). Assim diferentes compostos antioxidantes podem atuar *in vivo* através de diferentes mecanismos, pelo que nenhum método pode avaliar integralmente a capacidade antioxidante total (TAC) de uma amostra (Pellegrini *et al.*, 2003).

Era de elevado interesse para os investigadores definir um método adequado para a quantificação rápida da eficácia antioxidante e a sua ação na prevenção de doenças. No entanto, tais métodos ainda não foram desenvolvidos. A TAC, por meio de um ensaio com reação química *in vivo* parece mais realista mas não é fácil de conseguir. Há, no entanto, numerosos métodos publicados que medem a TAC *in vitro* (Huang *et al.*, 2005).

A capacidade antioxidante *in vivo* e *in vitro* é determinada por vários fatores que devem ser tidos em consideração na sua avaliação (**figura 14**).



Figura 14. Fatores para avaliar a capacidade antioxidante *in vivo* e *in vitro*. Adaptado de Niki, 2010.

Os métodos mais comuns usados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* podem dividir-se em dois mecanismos:

- ✓ Transferência de átomos de hidrogénio (HAT): método para avaliar a capacidade de um antioxidante eliminar os radicais livres pela cedência de hidrogénio, que representa o mecanismo da reação clássica de oxidação lipídica (Prior *et al.*, 2005). A maioria dos ensaios HAT é aplicada através de mecanismos competitivos, em que antioxidantes e substrato competem pelos radicais peroxilo através da decomposição dos azo-compostos (Zulueta *et al.*, 2005). Estas reações são independentes dos solventes e do pH e, geralmente, são bastante rápidas (Phipps *et al.*, 2007).
- ✓ Transferência de eletrões (ET): métodos baseados na capacidade de detetar um potencial antioxidante por transferência de um eletrão, para a redução de uma espécie, incluindo metais, carbonilos e radicais livres. A reatividade dos métodos ET é baseada, principalmente, na desprotonação e potencial de ionização do

grupo funcional reativo. São reações dependentes do pH, refletindo o aumento da capacidade de cedência com a capacidade de desprotonação e, geralmente são lentas (Prior *et al.*, 2005; Phipps *et al.*, 2007).

Porém, o mecanismo reacional que suporta os mecanismos HAT e ET tem muitas semelhanças entre si, além disso acontecem quase sempre em conjunto em todas as amostras e torna-se difícil a sua diferenciação.

Os ensaios de ET incluem métodos como o TEAC (capacidade antioxidante em equivalentes de trolox), o FRAP (poder antioxidante por redução do íon férrico), a redução de cobre (CUPRAC) e o DPPH (captação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo).

Por sua vez os ensaios HAT incluem o ensaio de descoloração do β -caroteno, o parâmetro antioxidante de radicais totais (TRAP), a capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o método de Folin-Ciocalteu ou ensaio dos fenóis totais (Phipps *et al.*, 2007; Tabar *et al.*, 2009).

Os ensaios mais comuns *in vitro* para avaliar a capacidade antioxidante são: FRAP, ORAC e DPPH. O ideal seria a combinação de, pelo menos, dois ensaios, para poder ter informação sobre a TAC (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008).

A maioria dos estudos baseia-se, principalmente, em ensaios *in vitro*, e não reflete necessariamente, a fisiologia do ser humano (mecanismos *in vivo*). A controvérsia sobre a eficácia dos antioxidantes tem intensificado a investigação em estudos *in vivo*, sobre a sua biodisponibilidade, para fazer a ponte com observações *in vitro* (Niki, 2010).

3.3.2. Atividade captadora de radicais do DPPH

3.3.2.1. Fundamento teórico

O ensaio da capacidade de captação de radicais livres é determinado através do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), e é um dos mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante em plantas (Ndhlala *et al.*, 2010).

O DPPH é um radical de azoto estável, disponível comercialmente, com uma cor púrpura intensa, que reage com compostos que podem doar um átomo de hidrogênio. Este método baseia-se na captação do DPPH[•] através da adição de um antioxidante que descolora a solução de DPPH (**figura 15**) (Krishnaiah *et al.*, 2010). Forma-se a correspondente hidrazina que apresenta uma cor amarela pálida, com diminuição da absorvância a 515 nm (Ferreira *et al.*, 2007).

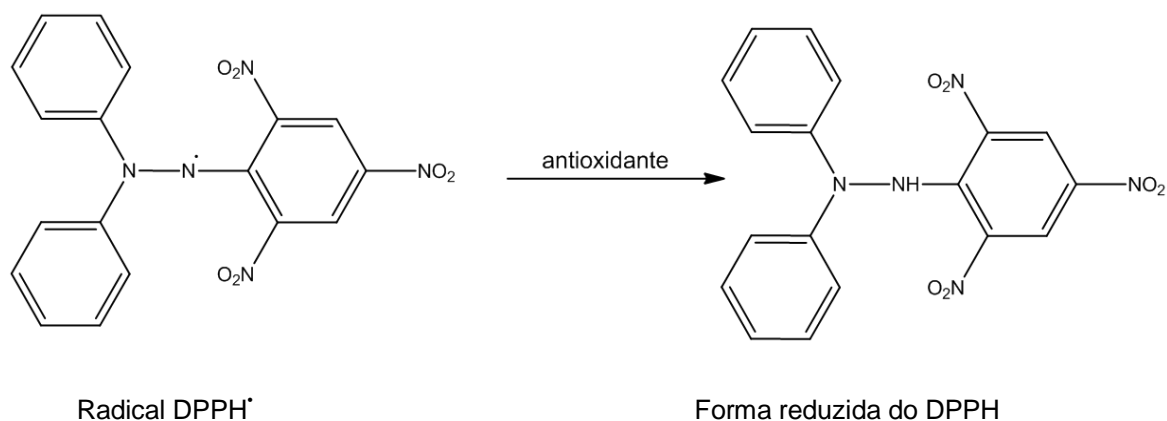


Figura 15. Redução do DPPH[•]. Adaptado de Kaur *et al.*, 2006.

Este ensaio é tecnicamente simples, necessitando apenas de recorrer a um leitor de microplacas ou um espectrofotômetro para realizar as leituras, o que provavelmente explica a sua utilização generalizada (Prior *et al.*, 2005). É rápido e dá resultados reprodutíveis, para além do DPPH ser um radical livre razoavelmente estável (Ndhlala *et al.*, 2010).

Embora este método seja, frequentemente, utilizado para a determinação da capacidade antioxidante de géneros alimentícios, a alteração da absorvância do DPPH[•], pode ser devida à ação da luz, do oxigénio e do tipo de solvente (Magalhães *et al.*, 2008). Também a inexistência de qualquer similaridade do DPPH[•] com os radicais peróxido (ROO[•]) altamente reativos e transitórios, envolvidos na peroxidação lipídica, é outra limitação apontada a este método. Os antioxidantes que reagem rapidamente com os ROO[•] podem reagir lentamente ou nem reagir com o DPPH[•] (Kaur *et al.*, 2006; Karadag *et al.*, 2009). Além disso, as medições espectrofotométricas podem ser afetadas por compostos que absorvem no comprimento de onda da determinação (caso dos carotenóides), assim como pela falta de transparência da amostra (Prior *et al.*, 2005).

3.3.2.2. Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH

Esta metodologia foi realizada utilizando um Leitor de Microplacas ELX800 (Bio-Tek equipamento, Inc.). A mistura da reação em cada um dos 96 poços continha: solução da amostra com diferentes diluições (300 µl) e solução metanólica (270 µl) de radicais DPPH (6×10^{-5} mol/l). As misturas foram deixadas em repouso durante 60 min no escuro. A redução do radical DPPH foi determinada pela medição da absorvância a 515 nm. A atividade captadora de radicais (RSA) foi calculada como percentagem da descoloração

da solução de DPPH, usando a equação: $\% \text{ RSA} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}})/A_{\text{DPPH}}] \times 100$, onde A_{S} é a absorvância da solução da amostra numa determinada concentração e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH. O fator de diluição que fornece 50% de atividade captadora de radicais (DF_{50}) foi calculado por interpolação a partir do gráfico de percentagem de RSA em função da concentração da amostra. Utilizou-se trolox como padrão.

3.3.3. Poder redutor

3.3.3.1. Fundamento teórico

Um antioxidante forte captador de radicais livres age muitas vezes como um potente redutor. O poder antioxidante avaliado pela redução do íon férrico (FRAP) e/ou por redução do íon cúprico (CUPRAC) mede a capacidade dos antioxidantes para reduzirem o Fe(III) e Cu(II) aos estados de menor valência (Fe(II) e Cu(I)), sendo estes últimos mais reativos na decomposição de H_2O_2 e hidroperóxidos (Niki, 2010).

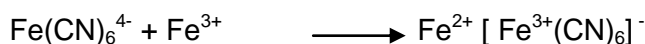
O ensaio do poder redutor mede a capacidade dos antioxidantes para reduzir o complexo Fe(III)/ferricianeto $[\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$, à forma ferrosa, Fe(II), em meio ácido (pH 3,6) (Magalhães *et al.*, 2008) para manter a solubilidade do ferro (Karadag *et al.*, 2005). A reação a pH baixo diminui o potencial de ionização que impulsiona a transferência de elétrões e aumenta o potencial redox, causando uma mudança no mecanismo de reação (Pior *et al.*, 2005). Esta deteção pode ser feita em soluções hidrofílicas ou lipofílicas (Carlsen *et al.*, 2010). Os antioxidantes presentes causam a redução do Fe(III)/complexo ferricianeto à forma ferrosa (Fe(II)). Assim, em função do poder redutor das amostras, a coloração amarela da solução sofre alteração entre os tons de verde ou azul (Amarowicz *et al.*, 2004; Guimarães *et al.*, 2010), que pode ser medido espectralmente a 700 nm. Para determinar o poder redutor (ciclo redox) das substâncias testadas, estas são postas em contacto com um determinado metal responsável pela produção de radicais livres e, em alguns casos, pela regeneração dos antioxidantes:

A química dos ensaios baseados no ferro pode ser resumida pela seguinte equação:



Onde L é o ligando cromogéneo seletivo para o ião ferroso, que produz o complexo corado Fe(II)-L (azul da prússia) em resultado da reação redox associada (Barreira, 2010). A espécie oxidante é Fe³⁺-L ou Fe(CN)₆³⁻ (quando se utiliza ferricianeto como reagente) (Berker *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2010).

A reação quando se utilizada o ferricianeto é:



Este ensaio é simples, rápido, económico, robusto e não requer equipamento especializado. Pode ser automatizado, semi-automático ou manual (Phipps *et al.*, 2007; Karadag *et al.*, 2009) e oferece um índice da capacidade antioxidante (Magalhães *et al.*, 2008) pouco seletivo.

No que diz respeito às suas limitações, qualquer composto (mesmo sem propriedades antioxidantes), com potencial redox mais baixo do que o do par Fe(III)/Fe(II), pode, teoricamente, reduzir o Fe(III) a Fe(II), contribuindo para o valor de FRAP e induzindo, falsamente, para resultados elevados (Magalhães *et al.*, 2008). Outro ponto a ter em consideração é a produção simultânea de Fe(II), que é um conhecido pró-oxidante e pode resultar na produção adicional de radicais, como HO• a partir de H₂O₂. Este radical livre é um dos mais nocivos *in vivo*.

Finalmente, compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda podem interferir na determinação, causando sobrestimação do valor de deste ensaio (Magalhães *et al.*, 2008).

3.3.3.2. Ensaio do poder redutor

Esta metodologia foi realizada utilizando o Leitor de Microplacas descrito anteriormente. As soluções das amostras em diferentes diluições (500 µl) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/l, pH 6,6, 500 µl) e adicionou-se ferricianeto de potássio (1% w/v, 500 µl). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min e adicionou-se ácido tricloroacético (10% w/v, 500 µl). As misturas (800 µl) foram colocadas em microplacas de 48 poços, juntamente com água desionizada (800 µl) e cloreto férrico (0,1% w/v, 160 µl), sendo a absorvância medida a 690 nm. O fator de diluição que fornece 0,5 de absorvância (EC₅₀) foi calculado por interpolação a partir do gráfico de absorvâncias em função da concentração da amostra. Utilizou-se trolox como padrão.

3.3.4. Inibição da descoloração do β -caroteno

3.3.4.1. Fundamento teórico

A peroxidação lipídica foi, inicialmente, estudada na deterioração dos alimentos em 1930 (Niki, 2009). É considerada como o processo mais prejudicial em todos os organismos vivos (Gill *et al.*, 2010).

Alguns lípidos como os AGPI (ácidos gordos polinsaturados) ou os seus ésteres e o colesterol são vulneráveis ao ataque de radicais livres. A peroxidação lipídica induz alterações nas membranas biológicas, nomeadamente, alteração da integridade, permeabilidade e fluidez; perda funcional das biomembranas; modifica as LDL, as formas pró-inflamatórias e fornece produtos potencialmente tóxicos (Niki, 2009; Niki, 2010). Assim, a peroxidação lipídica *in vivo* tem sido implicada nos mecanismos subjacentes a numerosas doenças (DCV, cancro, desordens neurológicas) e no envelhecimento (Niki, 2009). Os antioxidantes podem retardar este processo em alimentos e amostras biológicas (Barreira, 2010). A capacidade dos antioxidantes para a inibição da peroxidação lipídica pode ser avaliada através da medição do grau de supressão da referida peroxidação lipídica (Niki, 2010).

Para determinar a eliminação de ROO^* lipídicos por parte dos antioxidantes, são utilizados diferentes ensaios. Os modelos lipídicos de membrana incluem lipossomas de lecitina, emulsão de ácido linoleico, fígado de rato, rins, cérebro, etc. A peroxidação lipídica pode ser induzida por diferentes agentes, tais como H_2O_2 , hidroperóxido de *tert*-butilo ou ácido ascórbico com sulfato ferroso, AAPH (di-hidroclorato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)) ou hipoclorito de sódio (Kaur *et al.*, 2006).

Os carotenóides podem sofrer descoloração por auto-oxidação, induzida pela luz ou calor, ou oxidação induzida por radicais ROO^* (AAPH ou lípidos oxidantes) (Prior *et al.*, 2005; Karadag *et al.*, 2009).

O β -caroteno (**figura 16**) é uma substância lipossolúvel, precursora da vitamina A (Debieer *et al.*, 2005), de cor laranja, sendo frequentemente adicionado a alimentos para fornecer uma coloração uniforme (Mukhopadhyay, 2000). A sua atividade antioxidante é exercida *in vivo* através de dois mecanismos: desativação de oxigénio singleto e sequestro de radicais peroxilo e alcoxilo formados durante a peroxidação lipídica (Seabra *et al.*, 2006).

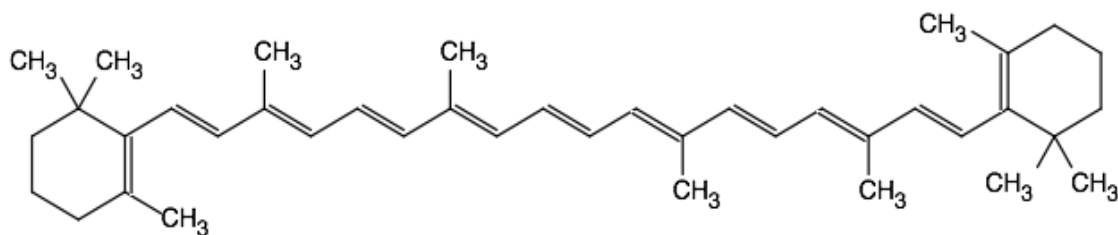
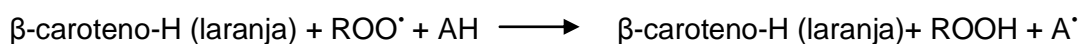
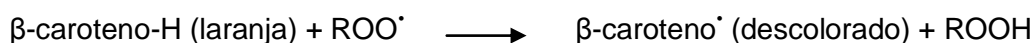


Figura 16. Estrutura química do β -caroteno. Adaptado de Ferreira *et al.*, 2009.

O ensaio de descoloração do β -caroteno é muito utilizado, e baseia-se em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno e avalia a atividade de inibição de radicais livres, gerados durante a peroxidação do ácido linoleico; a absorvância é medida a 470 nm (Kaur *et al.*, 2006). O mecanismo de reação envolve a descoloração dos carotenóides através da oxidação induzida pelo calor. Essa descoloração pode ser inibida ou diminuída pela ação dos antioxidantes contidos na amostra (Prior *et al.*, 2005; Roginsky *et al.*, 2005; Karadag *et al.*, 2009; Ndhlala *et al.*, 2010):



Uma enorme vantagem deste método é o facto de ser simples e não necessitar de instrumentação especializada (Karadag *et al.*, 2009). Para ensaios de rotina pode ser adaptada a determinação em microplacas (Roginsky *et al.*, 2005). Outra vantagem é a sua aplicabilidade em ambientes lipofílicos e hidrofílicos. Além disso, o ensaio de descoloração do β -caroteno pode detetar tanto a ação antioxidante como pró-oxidante de compostos (Ndhlala *et al.*, 2010).

As limitações, frequentemente, apontadas a este método são o facto de o β -caroteno poder sofrer descoloração a 470 nm por vias múltiplas, o que pode dificultar a interpretação dos resultados (Ndhlala *et al.*, 2010).

3.3.4.2. Ensaio da inibição da descoloração do β -caroteno

Preparou-se uma solução por dissolução de β -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 ml). Transferiram-se 2 ml desta solução para um balão de fundo redondo. Após remoção do clorofórmio a 40 °C, sob vácuo, juntou-se ácido linoleico (40 mg), emulsificante Tween 80 (400 mg), água destilada (100 ml) e agitou-se vigorosamente. Transferiu-se uma

alíquota (4,8 ml) desta emulsão para tubos de ensaio contendo as soluções das amostras em diferentes diluições (0,2 ml). Os tubos foram agitados e incubados a 50 °C em banho-maria. Imediatamente após a adição da emulsão a cada tubo, mediu-se a absorvância a 470 nm no tempo zero (espectrofotômetro Analytikjena Specord 200). A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação: $(\text{teor de } \beta\text{-caroteno após 2 h de ensaio/teor inicial de } \beta\text{-caroteno}) \times 100$. O fator de diluição que origina 50% de atividade antioxidante (DF_{50}) foi calculado por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β -caroteno em função da concentração da amostra. Utilizou-se trolox como padrão.

3.3.5. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

3.3.5.1. Fundamento teórico

O ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído (MDA) têm sido utilizados como biomarcadores da peroxidação lipídica, há mais de 30 anos (Niki, 2009). A peroxidação lipídica pode ser determinada pela medição dos produtos de oxidação que reagem com o TBA.

Os danos na membrana são, por vezes, utilizados como único parâmetro para determinar o nível de destruição de lípidos. A peroxidação lipídica, uma consequência do stresse oxidativo, está associada à perda progressiva do potencial da membrana aumentando, assim, a sua permeabilidade e, conduzindo, por fim, à morte celular. A formação de TBARS em homogeneizados de cérebro é uma consequência da peroxidação lipídica. De facto, o cérebro é altamente sensível ao danos oxidativos, uma vez que: consome uma quantidade significativa de oxigénio, é relativamente deficiente em defesas antioxidantes, é rico em substratos oxidáveis como AGPI e catecolaminas (Chong *et al.*, 2005) e é rico em iões de metais de transição como o ferro, geralmente envolvidos em reações catalisadas por metais que levam à formação de espécies reactivas de oxigénio.

Tem sido reconhecido que, durante a peroxidação lipídica, os produtos são formados a partir de moléculas polinsaturadas, pequenos hidrocarbonetos, fragmentos de cetonas, MDA, e outros compostos relacionados (peróxidos lipídicos e outros aldeídos de baixa massa molecular). Alguns destes compostos reagem com o TBA para formar compostos de cor rosa, genericamente designados como substâncias reativas do ácido

tiobarbitúrico (TBARS) **figura 17**, que são avaliadas por espectrofotometria a 532 nm (Kaur *et al.*, 2006; Gill *et al.*, 2010).

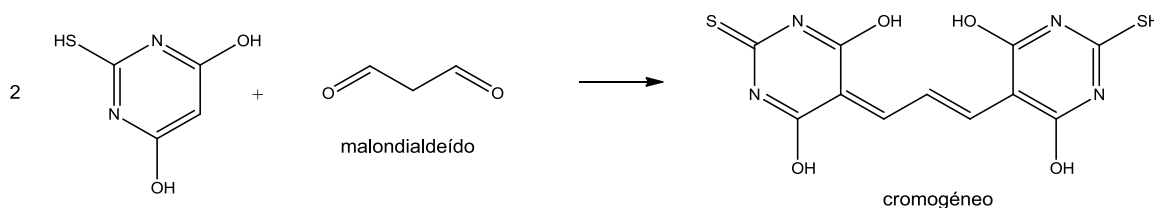


Figura 17. Reação de TBA e MDA resultante da peroxidação lipídica. Adaptado de Kaur *et al.*, 2006.

No ensaio TBARS, a detecção é feita por espectrofotometria e o material requerido não é altamente específico. Mas recentemente os adutos MDA-TBA podem ser medidos por HPLC com UV/VIS ou detecção de fluorescência, ou por GC-MS após derivatização (Niki, 2009).

Este ensaio TBARS, é muitas vezes criticado por ser inespecífico, pois mede a formação não só de MDA, mas também de outros oxocompostos (Ndhlala *et al.*, 2010), é também um método altamente sensível que depende em muito da centrifugação para a obtenção de resultados fidedignos (Barreira *et al.*, 2008).

3.3.5.2. Ensaio das substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Utilizou-se tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*), dissecado e homogeneizado em gelo com tampão Tris-HCL (20 mM, pH 7,4) numa proporção 1:2 (w/v) e após centrifugação a 3000g durante 10 min. Incubou-se uma alíquota (100 µl) do sobrenadante com as diferentes diluições das amostras (200 µl), FeSO₄ (10 µM; 100 µl) e ácido ascórbico (0,1 mM; 100 µl) a 37 °C durante 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% w/v; 500 µl), seguindo-se a adição do ácido tiobarbitúrico (TBA; 2%, w/v; 380 µl). A mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min. Após centrifugação a 3000g durante 10 min, para remoção de proteínas, a intensidade da cor do composto MDA -TBA do sobrenadante foi medida a 532 nm. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula: [(A - B)/A] × 100%, onde A e B eram as absorvâncias do controlo e da solução com a amostra, respetivamente. O fator de diluição que fornece 50% de inibição da peroxidação lipídica (EC₅₀) foi calculado por interpolação a partir do gráfico da percentagem de inibição da

formação de TBARS em função da concentração da amostra. Utilizou-se trolox como padrão.

3.4. Determinação de antioxidantes

3.4.1. Fenóis

Misturou-se a solução stock (250 µl) com HCl 0,1% em etanol 95% (250 µl) e HCl 2% (4550 µl). Após 15 min, a absorvância foi medida a 280, 320, 360 e 520 nm. A absorvância (A) a 280 nm foi utilizada para determinar o teor total de fenóis, $A_{320\text{ nm}}$ para estimar os ésteres tartáricos, $A_{360\text{ nm}}$ para estimar os flavonóis e $A_{520\text{ nm}}$ para estimar as antocianinas (Mazza *et al.*, 1999). Utilizou-se ácido clorogénico para construir a reta padrão (0,2-3,2 mM), para a determinação de fenóis totais, sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido clorogénico (CIAE) por ml da solução stock. Utilizou-se a quercetina (0,2-3,2 mM) para a determinação de flavonóis totais e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de quercetina (QE) por ml de solução stock. Utilizou-se malvidina 3-glucósido (0,1-2,3 mM) para a determinação de antocianinas totais. Utilizou-se ácido cafeico (0,2-3,6 mM) para a determinação de ésteres tartáricos e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido cafeico (CAE) por ml de solução stock.

Os flavonóides totais foram determinados espectrofotometricamente, utilizando um método baseado na formação do complexo flavonóide-alumínio (Barros *et al.*, 2009). Misturou-se uma alíquota (500 µl) da solução stock com água destilada (200 µl) e com uma solução de NaNO₂ (5%, 150 µl). Após 6 min de repouso, adicionou-se uma solução de AlCl₃ (10%, 150 µl) e deixou-se repousar durante mais 6 min. Posteriormente, adicionou-se uma solução de NaOH (4%, 200 µl) e água destilada até perfazer o volume final de 5 ml. Por fim, a mistura foi devidamente homogeneizada e deixada repousar por 15 min. A intensidade da cor rosa foi medida a 510 nm (Jia *et al.*, 1999). Utilizou-se (+)-catequina ($1,5 \times 10^{-2}$ -1,0 mM) para avaliar os teores de flavonóides, sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de (+)-catequina (CE) por ml solução stock .

3.4.2. Ácido ascórbico

Após liofilização da solução stock (Ly-8-FM-ULE, Snijders, Holland) procedeu-se a uma extração da amostra (150 mg) com ácido metafosfórico (1%, 10 ml) durante 45 min, à temperatura ambiente e, posteriormente, filtrou-se por papel de filtro Whatman n.º 4. Misturou-se o filtrado (1 ml) com 2,6-dicloro-indofenol (9 ml) e mediu-se a absorvância a 515 nm após 30min (Espectrofotómetro Analytikijena 2000-2004) (Guimarães *et al.*, 2010).

A concentração de ácido ascórbico foi calculada com base na reta de ácido L-ascórbico ($6,0 \times 10^{-3} - 0,1$ mg/ml), e os resultados expressos em mg de ácido ascórbico por ml de solução stock.

3.5. Análise estatística

Para cada formulação analisaram-se três amostras e fizeram-se todos os ensaios em triplicado. Os resultados foram expressos em valores médios \pm desvio padrão (SD). As diferenças estatísticas, representadas por letras, foram obtidas por análise da variância a um fator (ANOVA) com base no teste de Tukey com $\alpha=0,05$, em conjunto com a estatística de Welch.

Utilizou-se a função análise discriminante linear (LDA) para categorizar diferentes formulações de “chás”, de acordo com a sua atividade antioxidante e teor em compostos bioativos. A LDA foi realizada seguindo o método *stepwise*, com o objetivo de determinar as variáveis com maior capacidade discriminativa, de acordo com os valores de F para adição (3,84) e F para remoção (2,71). O valor de F para uma determinada variável indica a sua significância estatística na discriminação entre grupos. A análise discriminante define uma combinação ótima de variáveis para que a primeira função forneça a maior discriminação entre os grupos, a segunda função forneça a maior discriminação a seguir à primeira função, e assim sucessivamente (Maroco, 2003; López *et al.*, 2008). O teste Wilks λ foi aplicado para verificar as funções discriminantes canónicas significativas.

O método de classificação *leave-one-out* foi aplicado para validar os resultados obtidos. Todos os testes estatísticos foram efetuados com um nível de significância de 5%. As análises foram efetuadas usando o programa SPSS (v 18.0).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade antioxidante e compostos antioxidantes

4.1. Atividade antioxidante e compostos antioxidantes

O chá (*Camellia sinensis*) é, depois da água, a bebida mais consumida em todo o mundo. Este pode ser classificado em chá verde, chá preto e chá vermelho (Henning *et al.*, 2004; Cabrera *et al.*, 2006; Milasiene *et al.*, 2007). Além destes também são consumidas as tisanas de rooibos e borututu.

Existe uma grande variedade de bebidas de “chá” com menções a benefícios para a saúde, devido às suas propriedades antioxidantes, em especial os chás verde, preto e vermelho. Estão disponíveis no mercado em várias formulações (saquetas, folhas, raízes, granulados, pós e líquidos), exigindo métodos de preparação distintos: infusão, solubilização ou uso direto. Assim, efetuou-se um estudo comparativo da atividade antioxidante de várias bebidas, de forma a perceber qual a formulação mais eficiente e, ainda, compreender se as quantidades recomendadas pelos fornecedores são adequadas para o objetivo que se propõem.

As amostras foram divididas em três grandes grupos, de acordo o método de preparação: infusões (I), solubilizações (S) e uso direto (D), de acordo com as recomendações do fabricante. Nas I e S, estudaram-se diferentes formulações: saquetas (B), folhas (Lv), raízes (R), granulados (G), pós (P) e extratos líquidos (E). Todas as amostras foram selecionadas por terem a indicação de benefícios para a saúde, incluindo efeitos antioxidantes, de emagrecimento, anticarcinogénicos, anti-envelhecimento e de estimulação do sistema nervoso (**tabela 9**).

A capacidade antioxidante tem sido avaliada, em vários estudos, por diferentes métodos e em diferentes condições. Não há um método universal através do qual a capacidade antioxidante possa ser avaliada com precisão e de forma quantitativa (Zulueta *et al.*, 2009; Niki, 2010).

Desta forma para avaliar as propriedades antioxidantes das amostras recorreu-se a quatro ensaios *in vitro* baseados no mecanismo HAT e ET onde se inclui: o ensaio da atividade captadora de radicais DPPH, o poder redutor e a inibição da peroxidação lipídica pelo sistema β -caroteno-linoleato e o ensaio TBARS com homogeneizados cerebrais.

A **tabela 10** mostra os resultados obtidos para o fator de diluição da solução *stock* de cada amostra, que corresponde a 50% de atividade antioxidante (DF_{50}), expresso com as casas decimais permitidas pelo desvio padrão. Optou-se por expressar os resultados em valores de DF_{50} em vez de EC_{50} (concentrações efetivas), mais habitualmente utilizadas, por se considerar uma medida mais realista da atividade antioxidante na perspectiva do consumidor. Tendo em conta as informações disponíveis nos rótulos (relativamente à formulação, método de preparação e quantidade utilizada), a

concentração final de cada amostra é diferente e, por isso, é útil entender se as recomendações correspondem ao efeito antioxidante mais apropriado, ou se algumas diluições seriam mais adequadas.

Na generalidade, as bebidas solubilizadas (S) provaram ter uma atividade antioxidante mais elevada; no entanto, os valores máximos de DF_{50} foram obtidos nas amostras prontas a beber/uso direto (D).

Tabela 10. Atividade antioxidante (valores de DF_{50}) das amostras. Os resultados são expressos em média SD (n=9). Em cada coluna, as diferentes letras representam diferenças significativas ($P<0,05$).

| Amostras | Atividade captadora de radicais de DPPH | Poder redutor | Inibição da descoloração do β -Caroteno | Inibição de TBARS |
|----------|---|----------------|---|-------------------|
| I-Gt/B | 3,01±0,16 h | 31,2±0,2 g | 1,9±0,3 h | 203±12 a |
| I-GtH/B | 56±4 b | 118,0±0,4 b | 11,7±0,5 ef | 143±17 b |
| I-GtL/B | 3±1 h | 22,9±0,4 i | 2,8±0,4 gh | 83±6 ef |
| I-Gt/Lv | 19,2±0,4 fg | 25,5±0,2 h | 2,7± 0,2 gh | 76±1 f |
| I-Rt/B | 2,0±0,3 h | 12±2 k | 2,0± 0,4 h | 16±2 hi |
| I-Bt/R | 1,6±0,2* | 1,016± 0,004 p | 1,3± 0,2 h | 1,5±0,1 i |
| S-Gt/G1 | 36±5 d | 47,3±0,3 d | 45±8 b | 133±25 bcd |
| S-Gt/G2 | 24±1 e | 39,9±0,1 e | 3,7± 0,4 gh | 123±10 cd |
| S-Gt/P1 | 27±1 e | 40,9±0,2 e | 20±2 d | 137±16 bc |
| S-Gt/P2 | 20±5 f | 35±1 f | 8±1 fg | 144±12 b |
| D-Gt/E | 149±5 a | 197,1±0,5 a | 12±1 ef | 118±3 d |
| D-GtH/L | 52±2 c | 6,64±0,02 m | 36±5 c | 73±15 f |
| D-GtL/L | 15±1 g | 21,7±0,2 j | 59±4 a | 100±17 e |
| D-Ga/L | 1,89±0,03 h | 57±1 c | 2,6±0,2 gh | 53±2 g |
| D-PRb/L | 1,89±0,03 h | 8,70±0,04 ll | 35±2 c | 30±1 h |
| D-Rt/L | 3,38±0,67 h | 5,1±0,1 n | 13±1 e | 17±2 hi |
| D-Bt/L | 36,8±0,4 d | 11,3±0,1 k | 13,8±0,4 e | 21±4 h |
| D-LbLC/L | 1,25±0,05 h | 2,34±0,01 o | 33±8 c | 30±4 h |

* DF_{25}

Atividade captadora de radicais DPPH: Os valores de DF_{50} das infusões variaram entre um mínimo de 1,6 (neste caso, trata-se de um valor de DF_{25}) para uma infusão de raízes e 56 para uma infusão feita a partir do conteúdo de uma saqueta com uma mistura de ingredientes. A única infusão avaliada a partir de folhas apresentou também um valor elevado (19,2).

Parece de salientar que no grupo dos produtos fornecidos em saqueta os resultados são bastante diversos (I-Gt/B; I-GtH/B; I-GtL/B; I-Rt/B) com valores entre 2 e

56, apresentando a amostra I-GtH/B o valor mais elevado de todas e, portanto a maior atividade captadora de radicais.

No caso das amostras preparadas por solubilização os valores obtidos variaram entre 20 e 36. É interessante notar que as amostras preparadas a quente (75°C) apresentaram sempre valores superiores às preparações com água a temperatura ambiente (36 *versus* 24 para S-Gt/G e 27 *versus* 20 para S-Gt/P). Assim, para uma maior atividade captadora de radicais DPPH, recomenda-se a preparação das amostras a quente.

No caso das bebidas prontas a consumir obtiveram-se, igualmente, valores bastante díspares. A amostra D-LbLC/L apresentou o valor de DF₅₀ mais baixo (1,25), e a amostra D-Gt/E apresentou o valor mais elevado (149). As amostras que continham chá verde e chá preto na sua composição também conduziram a valores elevados.

De referir que a presença de *Ginkgo biloba* numa das amostras (D-Ga/L) não lhe conferiu uma atividade captadora de radicais livres mais elevada. A presença de chá vermelho (D-Rt/L) também não elevou significativamente esta propriedade, diminuindo o valor de DF₅₀ para 3,38.

A formulação influenciou, efetivamente, os resultados da atividade antioxidante. Já outros autores descreveram diferenças na atividade captadora de radicais livres em extratos de folhas, licores de chás e amostras combinadas com aditivos (Muthuiah *et al.*, 2009).

Na **figura 18**, estão representadas as amostras I-GtH/B, D-Gt/E, D-GtH/L e D-Bt/L, onde se observou maior atividade antioxidante, avaliada pela atividade captadora de radicais de DPPH, em função do fator de diluição. Neste ensaio, os radicais de DPPH que absorvem a 515 nm, são em parte neutralizados pelos compostos antioxidantes presentes na amostra, e como resultado obtém-se uma diminuição na absorvância do sistema reacional ao referido comprimento de onda.

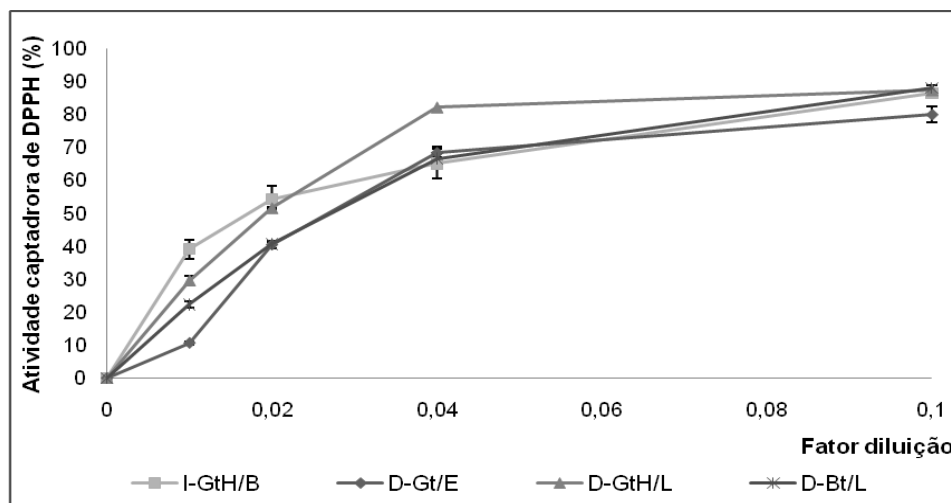


Figura 18. Atividade captadora de radicais DPPH das amostras I-GtH/B (chá verde, ananás, hibisco/Saquetas), D-Gt/E (chá verde/extrato), D-GtH/L (chá verde, ananás e hibisco/Líquido), D-Bt/L (chá preto Earl Grey, limão/Líquido).

NOTA: 0,02 corresponde a um DF 50 e 0,1 corresponde a um DF 10.

A partir da análise da **Figura 18**, podemos concluir que os efeitos de captação sobre os radicais DPPH nas amostras representadas aumentou nas amostras menos diluídas.

Poder redutor. Quanto ao poder redutor das amostras avaliadas, os valores de DF_{50} obtidos para as infusões são muito diferentes e variaram entre 1 e 118. O valor mínimo é referente à amostra I-Bt/R e o mais elevado à I-GtH/B (saqueta com uma mistura de componentes incluindo chá verde, ananás e hibisco), à semelhança do que se verificou no ensaio do DPPH.

No caso das amostras obtidas por solubilização, as conclusões a retirar são semelhantes às verificadas com o ensaio do DPPH. As amostras preparadas a quente apresentaram valores mais elevados; os valores obtidos variaram entre 35 e 47,3 e foram superiores aos valores do DPPH.

Os valores obtidos para as bebidas fornecidas já preparadas variaram entre 2,34 e 197, verificando-se um comportamento diverso ao verificado no ensaio do DPPH. A amostra D-Gt/E, à semelhança do parâmetro anterior discutido (DPPH) apresentou valores mais elevados (197). Das restantes amostras, algumas apresentaram valores muito superiores como é o caso da D-Ga/L (com *Ginkgo biloba* com valores 30 vezes superior), outras com valores muito inferiores (caso da D-GtH/L com um valor cerca de 8 vezes inferior).

Na **figura 19**, estão representadas as amostras D-Gt/E, I-GtH/B, D-Ga/L, S-Gt/G1, onde se obtiveram os melhores resultados para a atividade antioxidante determinada pelo poder redutor. Neste ensaio, mede-se a conversão do complexo Fe^{3+} /ferricianeto à sua forma ferrosa. Pode observar-se que o poder redutor também aumentou com a diminuição do fator de diluição (DF).

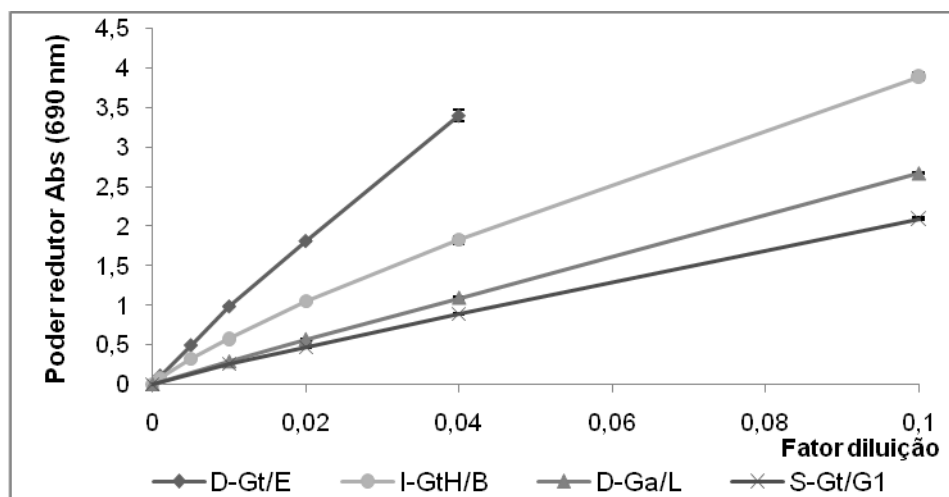


Figura 18. Poder redutor das amostras D-Gt/E (chá verde/extrato), I-GtH/B (chá verde, ananás, hibisco/Saquetas), D-Ga/L (maças verdes, limão, *Ginkgo biloba*/Líquido), S-Gt/G1 (chá verde, vitamina C/Granulado (75°C)).

NOTA: 0,02 corresponde a um DF 50 e 0,1 corresponde a um DF 10.

Inibição da descoloração do β -caroteno: Relativamente à inibição da descoloração do β -caroteno, os valores de DF_{50} determinados nas infusões variaram entre 1,3 na amostra de borututu e 11,7 na amostra constituída por chá verde, ananás e hibisco. Contrariamente ao verificado nos parâmetros já discutidos, as variações nestas amostras são inferiores, estando todos os valores próximos de 2, à exceção de uma das amostras.

Os valores determinados nas amostras obtidas por solubilização são muito diferentes quando esta ocorre a quente ou não (doze vezes superiores numa das amostras e cerca de três vezes na outra, com a solubilização a 75°C).

Quanto às bebidas comercializadas prontas a consumir, a amostra com chá verde e limão (D-GtL/L) é a que apresenta o valor superior (59) seguindo-se três amostras com valores de DF_{50} na ordem dos 33-36 (D-GtH/L, D-PRb/L, D-LbLC/L). As amostras com chá verde (extrato líquido), chá preto e limão, e chá vermelho apresentam valores semelhantes e na ordem de 12-13. A amostra com *Ginkgo biloba* (D-Ga/L) é a que apresenta a menor capacidade de descoloração do β -caroteno neste grupo de amostras.

Na **figura 20**, apresenta-se o gráfico da inibição da descoloração do β -caroteno onde estão representadas as amostras com maior atividade antioxidante em função do DF, D-Gt/L, S-Gt/G1, I-GtH/L, D-Prb/L.

Neste ensaio, é medida a oxidação do β -caroteno. O radical livre do ácido linoleico ataca a molécula do β -caroteno altamente insaturada. Na presença de antioxidantes estes podem impedir a descoloração do β -caroteno, através da neutralização dos radicais livres linoleato e outros radicais livres formados no sistema. Assim observa-se uma diminuição da absorvância em amostras desprovidas de antioxidantes. Na presença de um antioxidante há manutenção da cor, aumentando, assim, a absorção por um período maior de tempo. Mais uma vez, o aumento da percentagem de inibição da descoloração do β -caroteno é proporcional à diminuição do fator de diluição (DF) (**figura 20**).

De acordo com o observado, é provável que os componentes antioxidantes presentes na bebida de uso direto com chá verde e limão, reduzam em maior extensão a descoloração do β -caroteno, neutralizando os radicais livres linoleato e outros radicais livres formados.

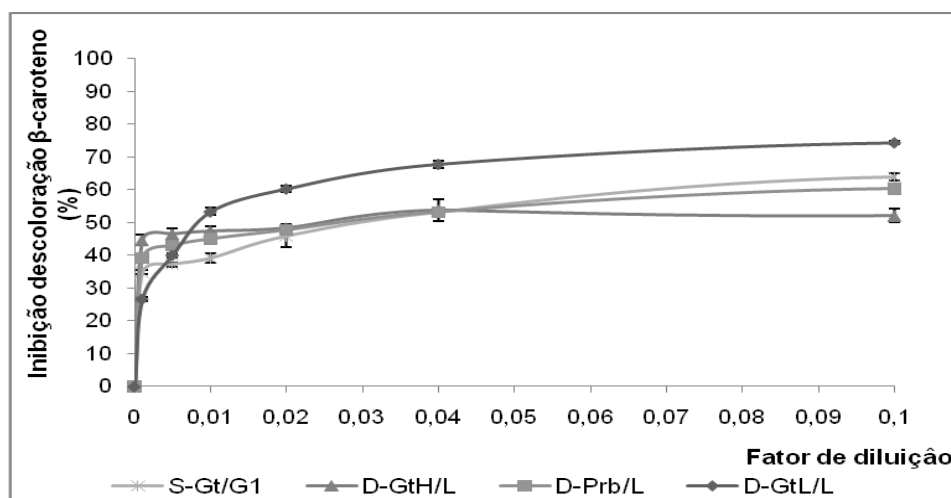


Figura 19. Inibição da descoloração do β -caroteno das amostras S-Gt/G1 (chá verde, vitamina C/Granulado (75°C)), D-GtH/L (chá verde, ananás, hibisco/Líquido), D-Prb/L (romã e bagas vermelhas/Líquido), D-Gt/L (chá verde e limão/Líquido).

NOTA: 0,02 corresponde a um DF 50 e 0,1 corresponde a um DF 10.

Inibição do TBARS: No caso das infusões, o valor deste parâmetro decresce desde a amostra I-Gt/B (203 mg/ml) até a I-Rt/B (116 mg/ml) e por fim a I-Bt/R (1,5 mg/ml).

Já para as solubilizações, o valor deste parâmetro não foi afetado pela temperatura, durante a preparação, contrariamente ao que foi descrito para os parâmetros anteriores.

Nas amostras de consumo direto obtiveram-se também valores díspares (de 17 a 118 mg/ml). O extrato líquido de chá verde apresentou o valor mais elevado e o chá verde um valor intermédio (53 mg/ml). A amostra D-LbLC/L apresentou um valor semelhante à amostra D-Prb/L (30 mg/ml).

A formulação influenciou, efetivamente, os resultados da atividade antioxidante. Já outros autores descreveram diferenças na atividade captadora de radicais livres em extratos de folhas, licores de chás e amostras combinadas com aditivos (Muthuiah *et al.*, 2009).

Na **figura 21**, estão representados as amostras com melhor ação na inibição da peroxidação lipídica, I-Gt/B, S-Gt/G1, S-Gt/P1, S-Gt/P2.

A inibição da peroxidação lipídica foi avaliada pelo ensaio do TBARS, este método é um método altamente sensível, e os resultados estão totalmente dependentes de uma centrifugação eficiente para remover a proteína precipitada. Caso contrário, isto levará a absorvências erradas que, por sua vez, conduzem a resultados errados. Este ensaio mede o MDA formado a partir da oxidação de ácidos gordos insaturados. O MDA reage com o TBA para formar um pigmento rosa.

Como pode ser entendido a partir **figura 21**, a capacidade de inibição da peroxidação lipídica é proporcional ao fator de diluição utilizado. Este método mesmo a partir de fatores diluição baixíssimos, permitiu alcançar percentagens de inibição muito elevadas.

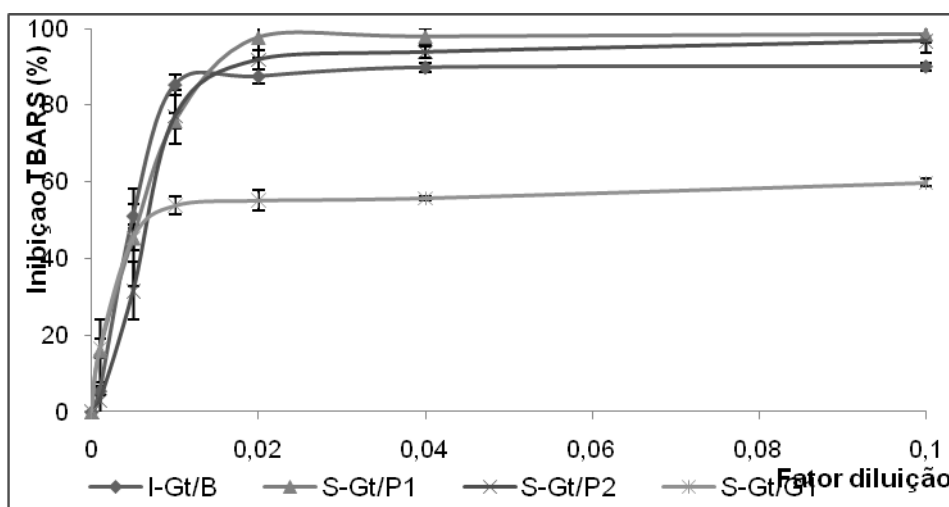


Figura 20. Inibição da formação de TBARS das amostras I-Gt/B (chá verde/Saquetas), S-Gt/P1 (chá verde, vitamina C/Pó (75°C)); S-Gt/P2 (chá verde, vitamina C/Pó (T amb.)), S-Gt/G1 (Chá verde, vitamina C/Granulado (75°C)).

NOTA: 0,02 corresponde a um FD 50 e 0,1 corresponde a um FD.

Foram também determinados alguns compostos antioxidantes em todas as amostras, nomeadamente fenóis, flavonóides, flavonóis, ésteres tartáricos e ácido ascórbico (**tabela 11**). As amostras analisadas mostraram diferenças significativas relativamente ao teor em antioxidantes.

Relativamente às amostras obtidas por infusão, a amostra constituída por chá verde, ananás e hibisco (I-GtH/B) é a mais rica em fenóis (1,96 mg CIAE/ml) e a amostra com borututu é a mais pobre (0,024 mg CIAE/ml).

Estes resultados estão em consonância com os discutidos para o DPPH e poder redutor (**tabela 9**). Como pode ser observado na **figura 22**, obteve-se um comportamento semelhante para o teor em ácido ascórbico.

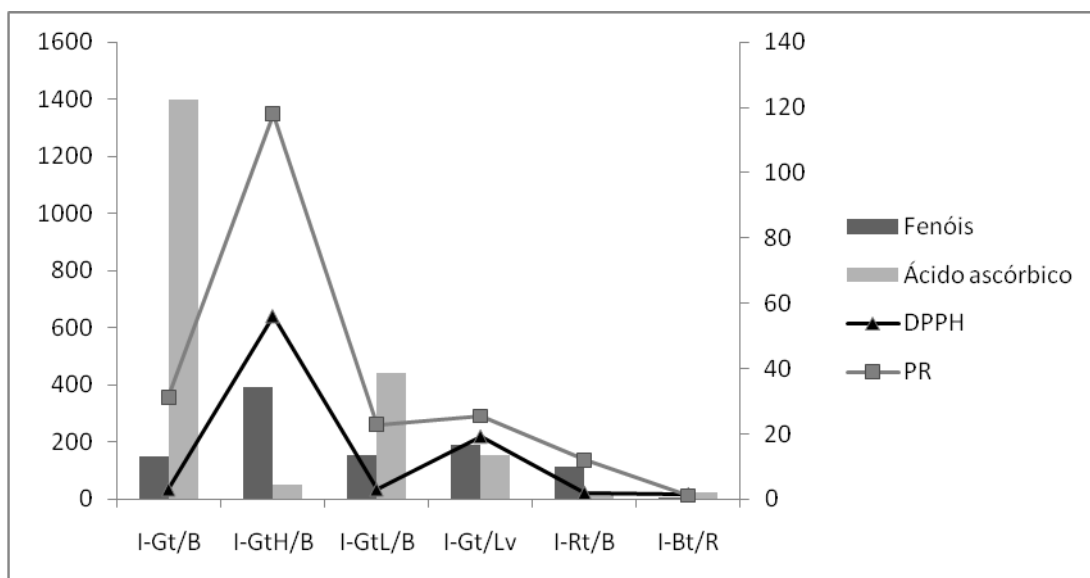


Figura 22. Comparação entre o teor em fenóis e ácido ascórbico, e os valores de DF50 obtidos nos ensaios do DPPH e do poder redutor (PR) para as infusões.

Tabela 11. Teores de fenóis, flavonóides, flavonóis, ésteres tartáricos, e ácido ascórbico. Valores expressos como média±desvio padrão (n=9). Em cada coluna, diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($P<0,05$).

| Amostras | Fenóis (mg CIAE/ml) | Flavonóides (mg CE/ml) | Flavonóis (mg QE/ml) | Ésteres tartáricos (mg CAE/ml) | Ácido ascórbico (mg/ml) |
|----------|------------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| I-Gt/B | 0,74±0,05 e | 0,127±0,003 d | 0,020±0,001 g | 0,038±0,002 cde | 7,0±0,2 a |
| I-GtH/B | 1,96±0,02 a | 0,25±0,01 b | 0,077±0,001 b | 0,086±0,003 a | 0,249±0,001 gh |
| I-GtL/B | 0,77±0,01 e | 0,109±0,004 e | 0,047±0,001 d | 0,042±0,002 cd | 2,20±0,03 c |
| I-Gt/Lv | 0,96±0,02 d | 0,06±0,02 f | 0,020±0,002 g | 0,011±0,001 i | 0,77±0,04 d |
| I-Rt/B | 0,56±0,02 g | 0,164±0,005 c | 0,110±0,004 a | 0,077±0,004 b | 0,08±0,01 ij |
| I-Bt/R | 0,024±0,002 j | 0,015±0,001 h | 0,005±0,001 k | 0,005±0,002 j | 0,12±0,02 ij |
| S-Gt/G1 | 0,6±0,2 g | 0,060±0,001 f | 0,022±0,001 g | 0,03±0,01 defg | 0,396±0,002 ef |
| S-Gt/G2 | 0,73±0,02 e | 0,058±0,005 f | 0,041±0,004 e | 0,036±0,004 cdef | 0,32±0,01 fg |
| S-Gt/P1 | 0,63±0,01 fg | 0,55±0,01 a | 0,030±0,002 f | 0,031±0,003 efg | 0,434±0,005 e |
| S-Gt/P2 | 0,40±0,01 h | 0,155±0,005 c | 0,019±0,001 gh | 0,019±0,002 hi | 0,480±0,003 e |
| D-Gt/E | 0,64±0,02 fg | 0,14±0,01 d | 0,053±0,002 c | 0,043±0,003 c | 0,047±0,001 j |
| D-GtH/L | 1,52±0,05 b | 0,155±0,005 c | 0,014±0,001 i | 0,033±0,001 efg | 2,88±0,02 b |
| D-GtL/L | 1,02±0,01 d | 0,028±0,001 gh | 0,015±0,001 hi | 0,028±0,001 fg | 0,13±0,01 ij |
| D-Ga/L | 0,41±0,02 h | 0,127±0,003 d | 0,018±0,001 gh | 0,015±0,003 i | 2,87±0,1 b |
| D-PRb/L | 1,44±0,02 b | 0,032±0,002 g | 0,022±0,001 g | 0,025±0,002 gh | 0,43±0,01 e |
| D-Rt/L | 0,20±0,01 i | 0,032±0,001 g | 0,019±0,001 gh | 0,027±0,002 fgh | 0,14±0,01 ij |
| D-Bt/L | 1,11±0,02 c | 0,06±0,02 f | 0,03±0,01 f | 0,035±0,002 cdef | 0,31±0,04 fg |
| D-LbLC/L | 0,71±0,02 ef | 0,05±0,01 f | 0,009±0,001 j | 0,016±0,003 i | 0,160±0,002 hi |

A **figura 24** representa as 4 amostras mais relevantes para o teor de fenóis, flavonóides, flavonóis, ésteres tartáricos e ácido ascórbico, respetivamente.

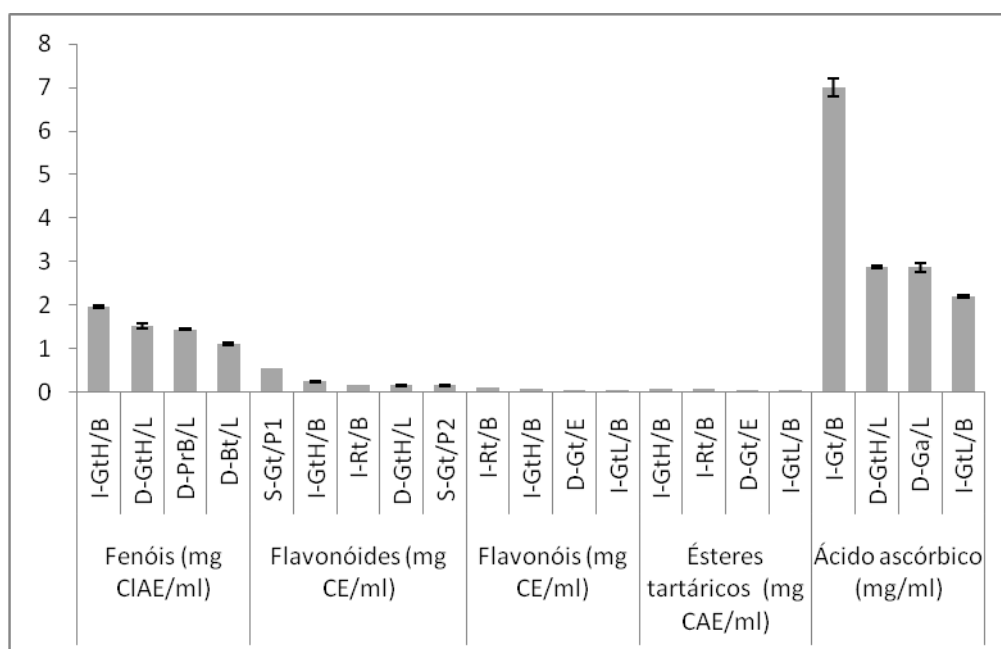


Figura 24. Teor de fenóis, flavonoides, flavonóis, ésteres tartáricos e ácido ascórbico nas quatro amostras com maior concentração de cada antioxidante.

A amostra de borututu é de todas as amostras a que apresentou um teor mais baixo de todos os compostos antioxidantes avaliados e que mostrou uma atividade antioxidante inferior. Trata-se da única amostra preparada com raízes (da planta *Cochlospermum angolensis*).

Estes valores seriam de certa forma expectáveis, pois esta infusão é usada tradicionalmente para normalizar a função hepática e gastrointestinal, através de um efeito diurético, destoxicante e purificador (Borututu, 2011). Há evidências da sua ação ao nível referido, mas possivelmente por um mecanismo não antioxidante.

Comparando as infusões das amostras de chá verde (saquetas e folhas) verificam-se algumas diferenças que evidenciam a adição de alguns componentes ou um processo de obtenção diferente. Nas saquetas, o teor de fenóis é inferior (0,74 *versus* 0,96 mg CIAE/ml); nos flavonóides ocorre o contrário (0,127 *versus* 0,06 mg CE/ml), assim como nos ésteres tartáricos (0,038 *versus* 0,011 mg CAE/ml). Os teores de vitamina C diferem cerca de 10 vezes (7,0 para 0,71 mg/ml) sendo superior nas saquetas. Este exemplo é perfeitamente elucidativo da importância da leitura dos rótulos dos produtos, podendo ter vários significados a nível de compostos antioxidantes.

A amostra com chá verde, ananás e hibisco (saqueta) parece ser das mais ricas nos compostos antioxidantes avaliados, expeto no teor de vitamina C. Na amostra correspondente nas bebidas de uso direto encontrou-se um valor elevado de vitamina C, o que se pode justificar pela adição desta. A vitamina C foi o principal antioxidante encontrado em todos as amostras estudadas (**tabela 11**). Na verdade, esta vitamina é vulgarmente adicionada a formulações de chá para estabilizar as catequinas (os compostos fenólicos maioritários) no intestino, onde o pH é neutro ou alcalino, antes da absorção (Chen *et al.*, 1998), além de aumentar a capacidade antioxidante nos chás de frutas (Belšćaka *et al.*, 2011).

Para as bebidas de uso direto, o teor em fenóis variou entre 0,64 e 1,52 mg CIAE/ml, sendo que o valor mais baixo corresponde ao extracto de chá verde líquido e o valor superior pertence à bebida constituída por romã e bagas vermelhas. Contudo, o teor de fenóis nas bebidas de uso direto foi globalmente elevado.

Nas bebidas de uso direto foi obtido um dos valores mais altos (2,88 mg CIAE/ml) na amostra que apresenta na sua constituição chá verde, ananás e hibisco; este valor é o esperado, uma vez que tanto o ananás como o hibisco, são fontes de ácido ascórbico (Ali *et al.*, 2005; Ananás, 2011). Também se obteve um valor elevado na amostra com maçãs verdes, limão e *Ginkgo biloba* (2,87 mg CIAE/ml); uma vez que o limão faz parte da constituição desta bebida, este valor está de acordo com o esperado.

Na **figura 21** verifica-se que não existe correlação entre os fenóis e ácido ascórbico com os ensaios do DPPH e do poder redutor. Esta situação permite concluir que outro tipo de moléculas são responsáveis pelos comportamentos detetados pelos referidos parâmetros.

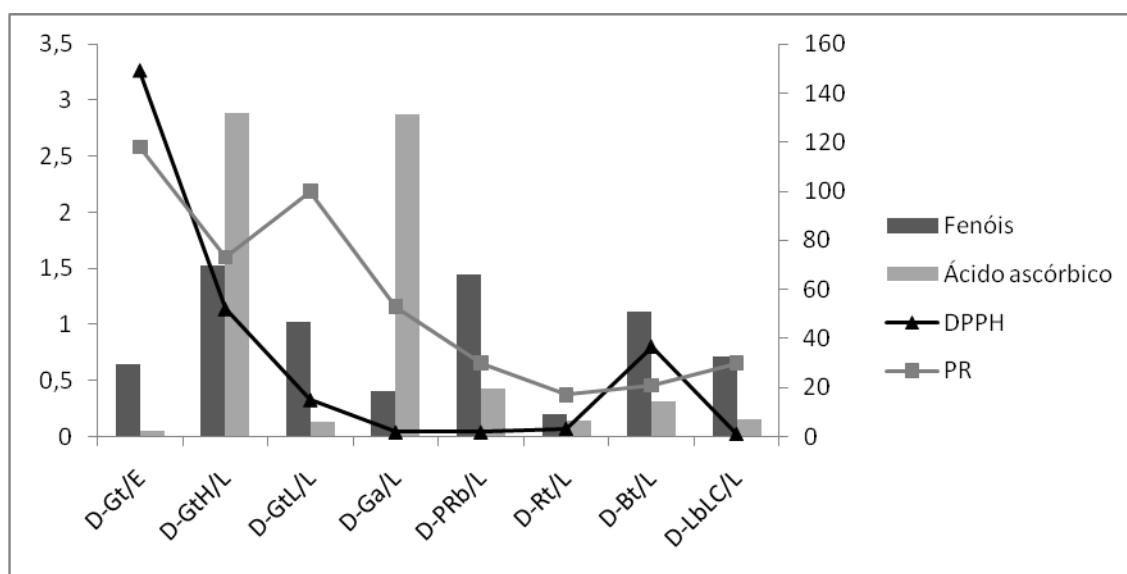


Figura 21. Comparação entre os teores em fenóis e ácido ascórbico com os valores do ensaio do DPPH e do poder redutor, nas bebidas de uso direto.

A presença de limão na composição das amostras parece permitir inferir que se tratam de amostras ricas em Vitamina C. É o caso da infusão I-GtL/B e da bebida pronta a beber D-Ga/L. No entanto, isto não se verifica para a amostra de chá verde com limão (0,13 mg/ml). Como as amostras anteriores contêm outros compostos bioativos podemos inferir que os valores mais elevados apresentados por estas amostras podem não se dever ao limão.

Outra situação interessante é o caso do chá vermelho rooibos. A infusão obtida de saquetas é mais rica em fenóis, flavonóides, flavonóis e ésteres tartáricos e a amostra da bebida de uso direto tem teores superiores (dobro) de vitamina C. Uma situação semelhante ocorre com as amostras compostas por chá verde, ananás e hibisco. Parece possível concluir que as bebidas prontas a consumir sofrem adição de vitamina C.

No caso das amostras obtidas por solubilização (pós) ambas referem vitamina C na sua composição. Contudo, os valores determinados deste parâmetro foram na ordem de 0,4 e 0,5 mg/ml.

E de salientar que o teor determinado na amostra de frutos vermelhos é semelhante ao obtido na amostra da bebida pronta a beber com frutos vermelhos na sua composição (0,43 mg/ml).

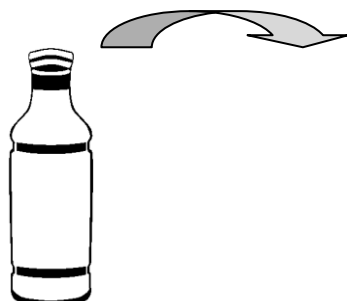
É ainda de referir que o tipo de preparação do pó (solubilização a 75°C e Temp. ambiente) praticamente não afetou os valores de vitamina C. Relativamente aos outros parâmetros avaliados, a temperatura de solubilização afetou aleatoriamente os resultados, com valores superiores e inferiores nas duas amostras deste grupo. No caso da amostra com frutos vermelhos, a solubilização a quente enriqueceu a bebida nos diferentes componentes avaliados.

As amostras analisadas mostraram diferenças significativas relativamente ao teor em antioxidantes. As infusões demonstraram maiores concentrações de fenóis (I-GtH/B), flavonóis (I-Rt/B), ésteres tartáricos (I-GtH/B) e ácido ascórbico (I-Gt/B). Porém, não foi possível encontrar correlações significativas entre os antioxidantes individuais determinados e os valores de DF_{50} obtidos nos diferentes ensaios de avaliação da atividade antioxidante. Portanto, outros compostos antioxidantes além dos quantificados (por exemplo, açúcares redutores) estão a contribuir para o potencial antioxidante das amostras.

Tabela 12. Teores de fenóis e ácido ascórbico nas amostras analisadas, para as infusões e solubilizações (200 ml (chávena)), e nas amostras de uso direto de acordo com o referido no rótulo (30 ml, 250 e 330 ml).



| Infusões | | |
|----------------|---------------------|-------------------------|
| | Fenóis (mg CIAE) | Ácido ascórbico (mg) |
| I-Gt/B | 148 | 1400 |
| I-GtH/B | 392 | 50 |
| I-GtL/B | 154 | 440 |
| I-Gt/Lv | 192 | 154 |
| I-Rt/B | 112 | 16 |
| I-Bt/R | 5 | 24 |
| Solubilizações | | |
| S- Gt/G1 | 120 | 79 |
| S-Gt/G2 | 146 | 64 |
| S-Gt/P1 | 126 | 86,8 |
| S-Gt/P2 | 80 | 96 |



| Direto | | |
|----------|---------------------|-------------------------|
| | Fenóis (mg CIAE) | Ácido ascórbico (mg) |
| D-Gt/E | 19 | 1 |
| D-GtH/L | 380 | 720 |
| D-GtL/L | 337 | 43 |
| D-Ga/L | 103 | 718 |
| D-PRb/L | 475 | 142 |
| D-Rt/L | 60 | 46 |
| D-Bt/L | 333 | 102 |
| D-LbLC/L | 213 | 523 |

Após a discussão dos teores da capacidade antioxidante e dos teores de compostos antioxidantes, expressos em mg/ml, a **tabela 12** apresenta os teores de fenóis e de ácido ascórbico ingeridos quando do consumo de uma embalagem de tisana pronta a beber (250 ou 330 ml) ou de uma chávena de chá (200ml).

As amostras para consumo imediato são as melhores fontes de fenóis com valores que variaram entre 60mg para o chá vermelho e 475mg para a mistura romã e bagas vermelhas. No entanto, se a mistura chá verde, ananás e hibisco se apresentasse

numa embalagem de volume semelhante (330ml em vez de 250ml) seria a mais rica em fenóis. A mistura com chá de cidreira, tília, camomila e limão fornece teores mais baixos de fenóis (213mg). Uma chávena de borututu fornece apenas 5 mg de fenóis.

O chá vermelho é a bebida mais pobre em ácido ascórbico (16mg). A amostra mais rica em vitamina C é o chá verde (saquetas) com 1400mg/chávena (200ml). Com 1/3 deste valor (440mg) segue-se a mistura chá verde, limão e algas, também em saquetas. Relativamente aos teores de vitamina C apresentados pelas bebidas prontas a consumir, há grandes variações, como aliás se referiu anteriormente. As amostras mais ricas em vitamina C são as misturas chá verde, ananás e hibisco; e maçãs verdes, limão e *Ginkgo biloba*. Como já referido, este valor era expectável, uma vez que tanto o ananás como o hibisco são fontes de ácido ascórbico (Ali *et al.*, 2005; Ananás, 2011) bem como o limão. Como também já foi mencionado anteriormente, o ácido ascórbico é, frequentemente, utilizado para estabilizar as catequinas do chá, pelo que estes valores podem resultar da fortificação das bebidas com esta vitamina.

4.2. Análise discriminante linear

Todos os resultados obtidos foram avaliados através da análise discriminante linear (LDA) de modo a interpretar as diferenças entre as formulações (saquetas B, folhas Lv, raízes R, granulados G, pós P, extratos líquidos E e soluções L). Todas as variáveis independentes foram selecionadas através do procedimento *stepwise* com um nível de tolerância $1-R^2 > 0,52$. As diferentes amostras foram agrupadas individualmente após aplicação do algoritmo às variáveis selecionadas de acordo com os ensaios de atividade antioxidante e concentração de compostos bioativos. A LDA confirmou que há diferenças significativas na atividade antioxidante e na quantidade de antioxidantes entre as amostras, traduzidas pelo modelo obtido com duas funções discriminantes significativas ($P < 0,001$ no teste de Wilks ' λ ') representado na **figura 23**.

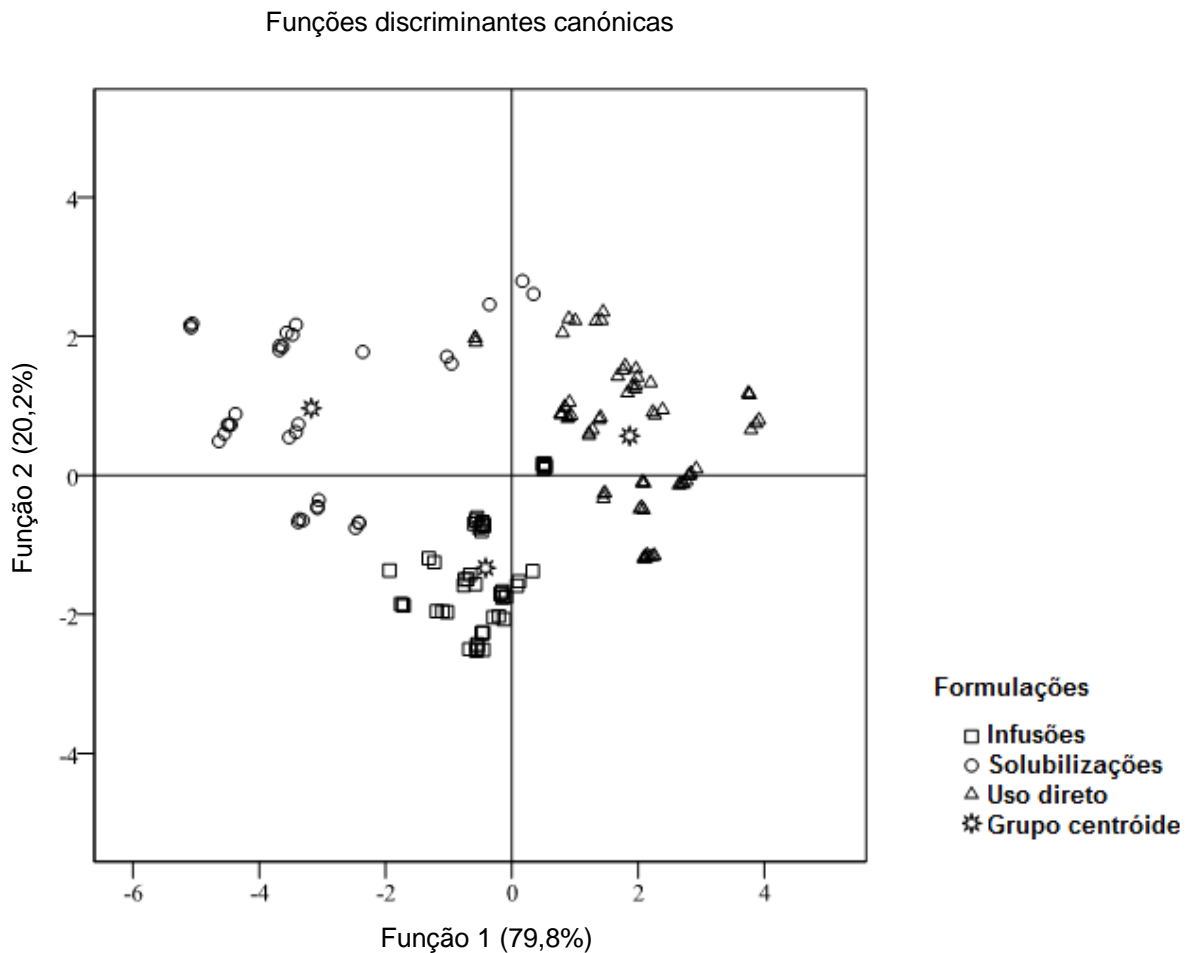


Figura 23. Representação de todos os grupos *Scatter plot* pela análise discriminante linear das diferentes formulações de “chás”, de acordo com a atividade antioxidante e teor em compostos bioativos.

Estas duas funções explicam 100,0% da variação observada. Os resultados foram validados de acordo com o método de classificação *leave-one-out*.

A primeira função melhorou a separação das soluções de uso direto dos restantes métodos de preparação (MCV: infusões -1,331; solubilizações -0,967; uso direto 0,568) estando mais correlacionada com a inibição da descoloração do β -caroteno e com os flavonóis. Já a segunda função separa principalmente as solubilizações das infusões (médias da variância canônica (MCV): infusões -0,415; solubilizações -3,176; uso direto 1,865), e mostrou estar mais correlacionada com a inibição de TBARS e com os flavonóides.

As variáveis analisadas mostraram ter poder discriminante, uma vez que 90,3% dos casos dos grupos originais, bem como dos grupos obtidos por validação cruzada foram corretamente classificados. Relativamente às diferentes formulações/preparações estudadas, o extrato líquido de chá verde provou ter maior atividade antioxidante (em

todos os ensaios testados, exceto inibição de TBARS) do que o mesmo chá após a infusão preparada.

Observou-se a mesma situação para o chá verde suplementado com limão, que foi mais eficaz (em todos os ensaios, com exceção da inibição da peroxidação lipídica pelo sistema β -caroteno-linoleato) quando utilizado prontamente do que quando consumido após a infusão.

No chá verde suplementado com hibisco, a infusão apresentou melhores resultados, com maior atividade antioxidante para todos os ensaios, exceto para a inibição da peroxidação lipídica pelo modelo β -caroteno-linoleato.

Chás/infusões com hibisco são um dos produtos de elevado valor no comércio internacional no ramo da botânica. O hibisco natural é extraído das flores secas de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae), e os cálices vermelhos são a parte da planta com interesse comercial, devido à sua ação benéfica e propriedades antioxidantes, além da sua utilização como corante. São ricos em ácidos orgânicos, minerais, antocianinas e outros compostos fenólicos (Wang *et al.*, 2000b; Ramirez-Rodrigues *et al.*, 2011). Este tem sido usado de forma eficaz na medicina popular contra a febre, hipertensão e desordens hepáticas, como cardioprotetor, propriedades atribuídas aos flavonóides e antocianinas presentes na sua composição (Ali *et al.*, 2005).

Recentemente, ganhou uma posição importante no mercado dos refrigerantes, apesar dos seus efeitos biológicos e farmacológicos ainda não estarem bem definidos (Ramírez-Rodrigues *et al.*, 2011).

Curiosamente, no caso do chá vermelho com roibos foram observadas diferenças significativas apenas para o poder redutor e inibição da peroxidação lipídica pelo sistema β -caroteno-linoleato.

5 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que quer o método de preparação (infusão, solubilização ou uso direto), quer a formulação (saquetas, folhas, raízes, granulados, pós, extratos líquidos ou soluções prontas a beber) utilizados podem influenciar as propriedades antioxidantes dos “chás”.

O chá verde (*Camellia sinensis*) foi a bebida com maior atividade antioxidante, no entanto, apresenta comportamentos diferentes consoante a formulação utilizada: o extrato líquido (D-Gt/E) apresentou a melhor atividade captadora de radicais livres de DPPH e poder redutor; a bebida de uso direto com adição de limão (D-GtL/L) destacou-se na inibição da descoloração do β -caroteno, e a infusão preparada a partir de saquetas (I-Gt/B) mostrou melhores resultados na inibição de TBARS.

Os resultados confirmaram e validaram os benefícios antioxidantes indicados pelos fabricantes. Esses benefícios podem ser importantes na redução do risco de doenças cardiovasculares e algumas formas de cancro, no poder neuroprotector e em vários outros distúrbios relacionados com o stresse oxidativo. Quando incluídos em dietas equilibradas, podem aumentar o estado global antioxidante e auxiliar o organismo contra os danos oxidativos (Cabrera *et al.*, 2006; Mckay, 2007). No entanto, tendo em vista os valores de DF_{50} , alguns métodos de preparação sugeridos deverão ser redefinidos de modo a obter concentrações mais diluídas e prevenir eventuais efeitos pró-oxidantes. Alguns autores já descreveram atividade pró-oxidante em extratos de chá verde (Shin *et al.*, 2007) e em frações de rooibos enriquecidas em flavonóides (Joubert *et al.*, 2005). Assim, numa perspetiva de saúde, deveremos ter sempre em mente que os antioxidantes também podem exercer efeitos pró-oxidantes, conduzindo a danos oxidativos nos componentes celulares (Joubert *et al.*, 2005).

Com este trabalho demonstrou-se a importância da leitura do rótulo, e das informações veiculadas, por este tipo de produtos. Algumas situações detetadas deverão ser confirmadas com mais estudos, podendo assim dar uma ajuda ao consumidor no momento da escolha do produto que deverá adquirir.

6 - BIBLIOGRAFIA



Ali BH, Wabel NA, Blunden G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A review. *Phytotherapy Research*, **2005**, 19, 369–375.

Almajano MP, Carbó J, Jiménez AL, Gordon MH. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, **2008**, 108, 55–63.

Almeida IF. Desenvolvimento de sistemas semi-sólidos contendo fitocompostos captadores de espécies reativas. Tese de doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; **2009**.

Ananás - <http://pt.wikipedia.org/wiki/Anan%C3%A1s>, **2011** (último acesso em 25/08/11).

Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, **2004**, 84, 551-562.

Amarowicz R, Estrella I, Hernandez T, Robredo S, Troszynska A, Kosinska A, *et al.* Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity, and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*). *Food Chemistry*, **2010**, 121, 705–710.

ASAE - <http://www.asae.pt/>, **2006**, (último acesso em 13/05/11).

Ashihara H, Sano H, Crozier A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*, **2008**, 69, 841-856.

Astill C, Birch MR, Dacombe C, Humphrey PG, Martin PT. Factors Affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 5340-5347.

Barreira JCM, Ferreira ICFR, Oliveira MBPP, Pereira JA. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry*, **2008**, 107, 1106–1113.

Barreira JCM. Caracterização biológica, química e nutricional de *Castanea sativa* Miller e *Prunus dulcis* (Miller) D.A.Webb. Tese de doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, **2010**.

- Barros L, Heleno SA, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Systematic evaluation of the antioxidant potential of different parts of *Foeniculum vulgare* Mill from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, **2009**, 47, 2458–2464.
- Belščaka A, Bukovav N, Piljac-Žegarac J. The influence of ascorbic acid and honey addition on the anti-oxidant proprieties of fruit tea infusions: antioxidants in fruit tea. *Journal of Food Biochemistry*, **2011**, 35, 195–212.
- Benzie IFF, Wachtel-galor S. Editors. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nded *Taylor & Francis*, **2011**, 11-37; 239-263.
- Berker KI, Güçlü K, Tor I, Apak R. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, *batho*-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, **2007**, 72, 1157-1165.
- Borututu chá - <http://www.herbies-herbs.com/pages/borututu.html>, (último acesso em 12/08/11).
- Breiter T, Laue C, Kressel G, Gröll S, Engelhardt UH, Hahn A. Bioavailability and antioxidant potential of rooibos flavonoids in humans following the consumption of different rooibos formulations. *Food Chemistry*, **2011**, 128, 338–347.
- Caballero B, Allen L, Prentice A. Editors. Encyclopedia of human nutrition. 2nded, *Elsevier: Academic Press*, **2005**, 257-262.
- Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea- A review. *Journal of the American College of Nutrition*, **2006**, 25, 79-99.
- Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bøhn SK, Dragland S, Sampson L, et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, **2010**, 9, 1-11.
- Carvalho AM., Morales, R. Persistence of Wild Food and Wild Medicinal Plant Knowledge in a North-Eastern Region of Portugal. In M. Pardo de Santayana, A. Pieroni, & R. Pur, Editors. *Ethnobotany in the New Europe: People, Health and Wild Plant Resources*. Oxford, UK: Berghahn Books, **2010**, 14, 147-17.

Chá em Portugal - http://ascameliasdasjaponeiras.com/index.php?link=artigo&codigo=1_ (último acesso em 12/05/11).

Chacko SM, Thambi PT, Kuttan R, Nishigaki I. Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chinese Medicine*, **2010**, 5, 13.

Chan EWC, Lim YY, Chong KL, Tan JBL, Wong SK. Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2010**, 23, 185–189.

Chen Z-Y, Zhu QY, Wong YF, Zhang Z, Chung HY. Stabilizing effect of ascorbic acid on green tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, 46, 2512-2516.

Chong ZZ, Li F, Maiese K. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology*, **2005**, 75, 207-246.

Chow H-HS, Hakim IA. Pharmacokinetic and chemoprevention studies on tea in humans. *Pharmacological Research*, **2011**, 64, 105–112.

Consumo de chá - <http://blog.euromonitor.com/2010/11/cultural-evolution-is-affecting-tea-consumption-habits-datagraphic.html> (último acesso em 17/07/11).

Debier C, Larondelle Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *British Journal of Nutrition*, **2005**, 93, 153–174.

Deka A, Vita JA. Tea and cardiovascular disease. *Pharmacological Research*, **2011**, 64, 136-45.

Dieta mediterrânica - <http://dieta-especial.blogspot.com/2011/02/dieta-mediterranica.html>, **2011** (ultimo acesso em 13/05/11).

Dudonné S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Mérillon J-M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57, 1768–1774.

Dufresne CJ, Farnworth ER. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2001**, 12, 404–421.

- Envelhecimento cerebral - http://www.publico.pt/Sociedade/cha-verde-retarda-envelhecimento-cerebral-conclui-investigacao-da-universidade-do-porto_1439866 (último acesso em 23/05/11).
- Espín JC, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, **2007**, 68, 2986–3008.
- Falcão SIDM. Avaliação da actividade electroquímica em cogumelos silvestres comestíveis. Tese. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2008.
- Ferreira F, Ferreira R, Duarte JA. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, **2007a**, 7, 257 – 275.
- Ferreira ICFR, Abreu RMV. Stress Oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise - Sociedade Portuguesa de BioAnalistas da Saúde*, **2007**, 2, 32-39.
- Ferreira ICFR, Barros L, Abreu RMV. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, **2009**, 16, 1543-1560.
- Ferruzzi MG. The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *Physiology & Behavior*, **2010**, 100, 33–41.
- Finley JW, Kong A-N, Hintze KJ, Jeffery EH, Ji LL, Lei XG. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 6837–6846.
- Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, **2010**, 31, 435–445.
- Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1999**, 893, 13-8.
- Fu S, Davies MJ, Stocker R, Dean RT. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochemical Journal*, **1998**, 333, 519-525.

- Fung T, Rexrode KM, Mantzoros CS, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women. *Circulation*, **2009**, 119, 1093-1100.
- Gharras EH. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, **2009**, 44, 2512–2518.
- Gonzalez de Mejia E, Ramirez-Mares MV, Puangpraphant S. Bioactive components of tea: Cancer, inflammation and behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, **2009**, 23, 721–731.
- Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **2010**, 48, 909-930
- Guan Y, Chu Q, Fu L, Wu T, Ye J. Determination of phenolic antioxidants by micellar electrokinetic's capillary chromatography with electrochemical detection. *Food Chemistry*, **2006**, 94, 157-162.
- Guimarães R, Barreira JCM, Barros L, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Effects of oral dosage forms and storage period in the antioxidant properties of four species used in traditional herbal medicine. *Phytotherapy research*, **2010**, 4, 484-492.
- Halliwel B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications*, **1990**, 9, 1-32.
- Halliwel B. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, **1996**, 16, 33-50.
- Halliwel B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, **2011**, 32, 125-130.
- Han X, Shen T, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, **2007**, 8, 950-988.
- Hara Y. Tea catechins and their applications as supplements and pharmaceuticals. *Pharmacological Research*, **2011**, 64, 100–104.

- Hatzis CM, Bertias GK, Linardakis M, JM Scott, Kafatos AG. Dietary and other lifestyle correlates of serum folate concentrations in a healthy adult population in Crete, Greece: a cross-sectional study. *Nutrition Journal*, **2006**, 5, 1-10.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **2002**, 13, 572-584.
- Henning SM, Niu Y, Lee NH, Thames GD, Minutti RR, Wang H, Go VL, Heber D. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **2004**, 80, 1558-1564.
- Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2003**, 43, 89–143.
- Ho C-T, Lin J-K, Shahidi F. Editors. Tea and tea products: Chemistry and health-promoting properties, nutraceutical science and technology series, Taylor and Francis Inc; **2009**; 131–160.
- Hodgson JM, Croft KD. Tea flavonoids and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, **2010**, 31, 495–502.
- Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 1841-1856.
- Jia Z, Tang M, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, **1999**, 64, 555-559.
- Joubert E, Winterton P, Britz TJ, Ferreira D. Superoxide anion and α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl radical scavenging capacity of rooibos (*Aspalathus linearis*) aqueous extracts, crude phenolic fractions, tannin and flavonoids *Food Research International*, **2004**, 37, 2133-2138.

- Joubert E, Winterton P, Britz TJ, Gelderblom WCA. Antioxidant and pro-oxidant activities of aqueous extracts and crude polyphenolic fractions of rooibos (*Aspalathus linearis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 10260-10267.
- Kanter M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *The Proceedings of the Nutrition Society*, **1998**, 57, 9-13.
- Karadag A, Ozcelik B, Saner S. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, **2009**, 2, 41–60.
- Karak T, Bhagat RM. Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. *Food Research International*, **2010**, 43, 2234–2252.
- Kaur IP, Geetha T. Screening methods for antioxidants- a review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2006**, 6, 305–312.
- Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, **2007**, 81,519–533.
- Kohen R, Nyska A. Invited Review: Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, **2002**, 30, 620-650.
- Kondo M, Zhang L, Ji H, Kou Y, Ou B. Bioavailability and antioxidant effects of a xanthone-rich mangosteen (*Garcinia mangostana*) product in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57, 8788–8792.
- Krishnaiah D, Sarbatlya R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, **2010**, 89, 217-233.
- Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2010**, 501, 65–72.
- Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, **2007**, 35, 1156-1160.

- Li YH, Wu Y, Wei HC, Xu YY, Jia LL, Chen J, *et al.* Protective effects of green tea extracts on photoaging and photomunosuppression. *Skin research and technology*, **2009**, 15, 338-345.
- López A, García P, Garrido A. Multivariate characterization of table olives according to their mineral nutrient composition. *Food Chemistry*, **2008**, 106, 369-378.
- Loziene K, Venskutonis PR, Sipailiene A, Labokas J. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry*, **2007**, 103, 546–559.
- Macedo JÁ, Battestin V, Ribeiro ML, Macedo GA. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. *Food Chemistry*, **2011**, 126, 491–497.
- Magalhães LM, Segundo MA, Lima JLFC. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 613, 1-19.
- Mantzoros CS. Nutrition and metabolism, underlying mechanisms and clinical consequences. *Humana Press, LLC*, **2009**, 263 – 278.
- Maroco J. Análise Estatística, com utilização do SPSS. Edições Sílabo, Lisboa, Portugal, **2003**.
- Mazza G, Fukumoto L, Delaquis P, Girard B, Ewert B. Anthocyanins, phenolics, and color of cabernet franc, merlot, and pinot noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 4009-4017.
- McKay DL, Blumberg JB. The role of tea in human health: an update. *Journal of the American College of Nutrition*, **2002**, 21, 1-13.
- Mckay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity of South African herbal teas: Rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia intermedia*). *Phytotherapy Research*, **2007**, 21, 1-6.
- Milasiene R, Sawicka K, Kornysova O, Ligor M, Maruska A, Buszewski B. Evaluation of antioxidant activity of green and black tea (*Camellia sinensis*) and rooibos (*Aspalathus*

- linearis*) tea extracts by means of HPLC with reaction detector. *Ars Separatoria Acta*, **2007**, 5, 27-33.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez J, Sineiro J, Domínguez H, *et al.* Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, **2001**, 72, 2, 145-171.
- Mukhopadhyay M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. *CRC Press LLC*, **2000**, 225-249.
- Muthuiah MJ, Thomas J, Kumar RR, Mandal AK. Studies on radical scavenging activity of tea leaves and effect of additives on activities of black tea liquor. *International Journal of Food Science and Technology*, **2009**, 44, 2070-2074.
- Ndhkala AR, Moyo M, Staden JV. Review natural antioxidants: Fascinating or mythical Biomolecules. *Molecules*, **2010**, 15, 6905-6930.
- Niki E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology & Medicine*, **2009**, 47, 469-484.
- Niki E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, **2010**, 49, 503–515.
- Novais HM, Santos I, Mendes S, Pinto-Gomes C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrábida Natural Park. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 93, 183-195.
- Oliveira I, Sousa A, Valentão P, Andrade P, Ferreira ICFR, Ferreres F, *et al.* Hazel (*Corylus avellana L.*) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food Chemistry*, **2007**, 1018–1025.
- Ogce F, Ceber E, Ekti R, Oran NT. Comparison of mediterranean, western and japanese diets and some recommendations. *Asian Pacific Organization for Cancer Prevention*, **2008**, 9, 351-356.
- Países produtores de chá em http://en.wikipedia.org/wiki/Tea#cite_note-FAOSTAT-50 (último acesso em 17/07/11).

- Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2009**, 2, 270-278.
- Patel JM. A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids. *Lethbridge Undergraduate Research Journal*, **2008**, 3, 2.
- Pardo de Santayana M, Blanco E, Morales R. Plants known as té in Spain: An ethno-pharmacobotanical review. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 98, 1-19.
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, *et al.* Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *The Journal of Nutrition* , **2003**, 133, 2812–2819.
- Pereira D, Valentão P, Pereira J, Andrade P. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, **2009**, 14, 2202-2211.
- Pérez-Jiménez J, Arranz S, Taberner M, Díaz-Rubio ME, Serrano J, Goñi I, *et al.* Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, **2008**, 41, 274–285.
- Phipps SM, Sharaf MHM, Butterweck V. Assessing Antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements. *Pharmacopeial Forum*, **2007**, 33, 810-814.
- Prior RL. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **2003**, 78, 570S-578S.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 4290-4302.
- Providência R. Protecção cardiovascular por bebidas alcoólicas: Bases científicas do paradoxo francês. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, **2006**, 25, 1043-1058.
- Ras RT, Zock PL, Draijer R. Tea consumption enhances endothelial-dependent vasodilation; a meta-analysis. *PLoS ONE*, **2011**, 6(3): e16974. doi:10.1371/journal.pone.0016974.

- Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science & Technology*, **1995**, 6, 75-82.
- Ramírez-Rodrigues MM, Balaban MO, Marshall MR, Rouseff RL. Hot and cold water infusion aroma profiles of *Hibiscus sabdariffa*: Fresh compared with dried. *Journal of Food Science*, **2011**, 76, C212- C217.
- Ramprasath VR, Jones PJH. Anti-atherogenic effects of resveratrol. *European Journal of Clinical Nutrition*, **2010**, 64, 660-668.
- Ratnam D, Ankola D, Bhardwaj V, Sahana D, Kumar M. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, **2006**, 113,189-207.
- Reto M, Figueira ME, Filipe HM, Almeida CMM. Chemical composition of green tea (*Camellia sinensis*) infusions commercialized in Portugal. *Plant Foods for Human Nutrition*, **2007**, 62, 139–144.
- Rice-Evans AC, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, **1996**, 20, 933-956.
- Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, **2005**, 92, 235–254.
- Rooibos chá - <http://www.theherbspiral.com/supps/herbpages/Rooibos.htm>, (último acesso em 12/08/11).
- Saad B, Sing YY, Nawi MA, Hashim NH, Ali ASM, Saleh MI, et al. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. *Food Chemistry*, **2007**, 105, 389-394.
- Sang S, Lambert JD, Ho C-T, Yang CS. The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacological Research*, **2011**, 64, 87–99.

- Scalbert A, Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, **2000**, 130, 2073S—2085S.
- Seabra RM, Andrade PB, Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Bastos ML Antioxidant compounds extracted from several plant materials. Fingerman M, Nagabhushanam R, editors. In: Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms. Enfield (NH) USA: Science, **2006**, 115-174.
- Šeruga M, Novak I, Jakobek L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, **2011**, 124, 1208–1216.
- Shahidi F. Antioxidants in food and food antioxidants. *The journal FOOD/NAHRUNG*, **2000**, 44, 158–163.
- Shahidi F, Zhong Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **2010**, 112, 930–940.
- Shen C-L,b, Yeh JK, Cao JJ, Chyue M-C, Wang J-S. Green tea and bone health: Evidence from laboratory studies. *Pharmacological Research*, **2011**, 64, 155–161.
- Shin J-K, Kim G-N, Jang H-D. Antioxidant and pro-oxidant effects of green tea extracts in oxygen radical absorbance capacity assay. *Journal of Medicinal Food*, **2007**, 10, 32-40.
- Singh S, Singh RP. In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. *Food Reviews International*, **2008**, 24, 392-415.
- Simopoulos AP. The mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The Scientific Evidence. *The Journal of Nutrition*, **2001**, 131, 3065S–3073S.
- Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M, Knez Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, **2005**, 89, 191-8.
- Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Adherence to mediterranean diet and health status:meta-analysis. *British Medical Journal*, **2008**, 337-1344.

- Song J-M, Lee K-H, Seong B-L. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research*, 2005, 68, 66–74.
- Soni MG, Thurmond ST, Miller ER, Spriggs T, Bendich A, Omaye ST. Safety of vitamins and minerals: Controversies and perspective. *Toxicological Sciences*, **2010**, 118, 348-55.
- Sumpio BE, Cordova AC, Berke-Schlessel DW, Qin F, Chen QH. Green tea, the “asian paradox,” and cardiovascular disease. *Journal of the American College of Surgeons*, **2006**, 5, 813-825.
- Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J-O, Dommès J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, **2009**, 113, 1226–1233.
- Tachibana H. Green tea polyphenol sensing. *Proceedings of the Japan Academy*, **2011**, 87, 66-80.
- Tapsell LC, Hemphill I, Cobiac L, Patch CS, Sullivan DR, Fenech M, *et al.* Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *The Medical Journal of Australia*, **2006**, 184, 4-24.
- Trevisanato SI, Kim Y-I. Tea and health. *Nutrition Reviews*, **2000**, 58, 1-70.
- Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a mediterranean diet and survival in a greek population. *The New England Journal of Medicine*, **2003**, 348, 26.
- Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MTD, Mazura M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2007**, 39, 44–84.
- Visioli F, De La Lastra CA, Andres-Lacueva C, Aviram M, Calhau C, Cassano A. Polyphenols and human health: A prospectus. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2011**, 51, 524–546.

- Vuong QV, Stathopoulos CE, Nguyen MH, Golding JB, Roach PD. Isolation of Green Tea Catechins and Their Utilization in the Food Industry. *Food Reviews International*, **2011**, 27, 227–247.
- Wang C-J, Wang J-M, Lin W-L, Chu C-Y, Chou F-P, Seng T-HT. Effect of hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **2000b**, 38, 411-416.
- Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Science & Technology*, **2000**, 11, 152-160.
- Wijeratne SSK, Abou-Zaid MM, Shahidi F. Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 312–318.
- Yang CS, Lambert JD. Research on tea and health. *Pharmacological Research*, **2011**, 64, 85–86.
- Yang CS, Wang H, Li GX, Yang Z, Guan F, Jin H. Cancer prevention by tea: Evidence from laboratory studies. *Pharmacological Research*, **2011**, 64, 113–121.
- Yao LH, Jiang YM, SHI J, Tomás-Barberán FA, Datta N, Singanusong R. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, **2004**, 59, 113–122.
- Yuan J-M, Sun C, Butler LM. Tea and cancer prevention: Epidemiological studies. *Pharmacological Research*, **2011**, 64, 123–135.
- Zhong Y, Shahidi F. Lipophilized epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives as novel antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 6526–6533.
- Zulueta A, Esteve MJ, Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, **2009**, 144, 310–316.