

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*

Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

JÂNIO SOUSA SANTOS

EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO NA COMPOSIÇÃO
FENÓLICA E PROPRIEDADES FUNCIONAIS *in vitro* DE EXTRATO AQUOSO DE
ROOIBOS VERMELHO ORGÂNICO *Aspalathus linearis* (fabaceae)

Ponta Grossa

2016

JÂNIO SOUSA SANTOS

EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO NA COMPOSIÇÃO
FENÓLICA E PROPRIEDADES FUNCIONAIS *in vitro* DE EXTRATO AQUOSO DE
ROOIBOS VERMELHO ORGÂNICO *Aspalathus linearis* (fabaceae)

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos do
Programa de Pós-Graduação da
Universidade Estadual de Ponta
Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Granato

Ponta Grossa

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

S237

Santos, Jânio Sousa

Efeito do tempo e temperatura de extração na composição fenólica e propriedades funcionais in vitro de extrato aquoso de rooibos vermelhos orgânicos *Aspalathus linearis* (fabaceae)/ Jânio Sousa Santos. Ponta Grossa, 2016.
91f.

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel Granato.

1.Flavonoides. 2.Funcionalidade in vitro. 3.Inibição hemolítica. 4.Espectrofotometria UV/VIS. 5.Antioxidantes. I.Granato, Daniel. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. T.

CDD: 664

TERMO DE APROVAÇÃO

JÂNIO SOUSA SANTOS

EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E PROPRIEDADES FUNCIONAIS IN VITRO DE EXTRATO AQUOSO DE ROOIBOS VERMELHO ORGÂNICO *Aspalathus linearis* (fabaceae).

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

Orientador:


Prof. Dr. Daniel Granato – UEPG/PR


Prof.^a Dr.^a Eliane Dalva Godoy Danesi – UEPG/PR


Prof. Dr. Eduardo Sidinei Chaves – UTFPR

Ponta Grossa, 29 de julho de 2016.

GRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

Aos parceiros Dr. Heitor Daguer (MAPA-SC), Prof. Dr. Domingos Savio Nunes (UEPG), Prof. Dr. Luis Antonio Esmerino (UEPG), Prof^a. Dr^a. Mariza Boscacci Marques (UEPG), Prof^a. Dr^a. Maria Inés Genovese (USP), Dr^a. Alice Fujita (USP), pelas contribuições prestadas no desenvolvimento do presente estudo.

Ao meu colega Laercio Galvão Maciel pela parceria e todo apoio prestado durante o primeiro semestre do Mestrado, o qual foi crucial para minha permanência no curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos de Mestrado.

A todos meu muitíssimo obrigado!

RESUMO

Rooibos (*Aspalathus linearis*) é um arbusto leguminoso de origem africana, cuja atenção tem sido voltada ao seu produto tecnológico mais importante: Extrato aquoso (chá). O chá de rooibos apresenta uma composição química complexa com quantidades de vários compostos fenólicos, além de níveis elevados de aspalatina, uma dihidrocalcona encontrada apenas em rooibos. De tal modo o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do tempo e temperatura na extração dos compostos fenólicos e propriedades funcionais *in vitro* de extratos aquosos de *Aspalathus linearis* orgânico fermentado. Inicialmente foram preparados por meio de um delineamento de experimento 2² sete extratos aquosos de rooibos vermelho para avaliação dos efeitos lineares e combinados da temperatura e tempo de extração. Por meio de métodos espectrofotométricos primeiramente os extratos foram avaliados quanto ao efeito do tempo e da temperatura de extração no teor de compostos fenólicos totais, flavonoides, flavonóis, taninos condensados hidrolisáveis e *orto*-difenólicos, atividade antioxidante frente aos radicais DPPH[•] e ABTS[•], capacidade redutora do ferro e capacidade redutora total. Posteriormente à identificação e quantificação de 19 compostos fenólicos foram realizadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS). O terceiro passo foi avaliar atividade inibitória das enzimas α -amilase e α -glucosidase *in vitro* e o perfil hemolítico dos extratos aquosos de rooibos vermelho em eritrócitos humanos. A análise de componentes principais (PCA) foi usada para associar a composição química, atividade antioxidante, capacidade redutora, e inibição das enzimas (α -amilase e α -glucosidase). De modo geral o extrato que foi submetido ao processo de extração na maior temperatura do delineamento (85 °C) apresentou os maiores teores de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, flavonóis totais, taninos condensados hidrolisáveis e *orto*-difenólicos e na atividade antioxidante frente aos radicais DPPH[•] e ABTS[•], como na capacidade redutora do ferro e capacidade redutora total, com pouca influência do tempo. A atividade antioxidante e capacidade redutora dos extratos de rooibos mostraram-se correlacionadas com o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides, flavonóis e *orto*-difenólicos. Os teores de quercetina, isoquercitrina, e rutina e foram correlacionados com ABTS[•], FRAP e capacidade redutora total. Assim, é possível afirmar que tais compostos quantificados estão diretamente ligados às funcionalidades *in vitro* apresentadas pelo extrato aquoso de rooibos. Em relação a atividade antimicrobiana, os extratos nas concentrações de 7,81 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não foram eficazes em inibir o crescimento dos micro-organismos testados. No que diz respeito à atividade inibitória das enzimas α -amilase e α -glucosidase, todas as amostras analisadas mostraram valores similares de extrato para inibir 50% da atividade enzimática (CI₅₀). O chá extraído a 80 °C por 10 min foi usado para o teste de hemólise no qual foi constatado que ocorreu uma interação benéfica com os eritrócitos, diminuindo a ocorrência de hemólise nas células eritrocitárias. Observa-se uma diminuição da atividade hemolítica com o aumento da concentração do extrato de rooibos, tal característica aponta que a inibição da liberação de hemoglobina no plasma é dependente da concentração de extrato de rooibos contido no meio. Conclui-se de modo global, que a temperatura de extração é o fator de maior influência positiva nessas variáveis em rooibos fermentado orgânico.

Palavras-chave: Flavonoides; Funcionalidade *in vitro*; Inibição hemolítica; Espectrofotometria UV/VIS; Antioxidantes.

ABSTRACT

Rooibos (*Aspalathus linearis*) is a leguminous shrub of African origin, which attention has been dedicated to its most important technological product: Aqueous extract (tea). Rooibos tea has a complex chemical composition with various quantities phenolic compounds in addition to high levels of aspalathin, a dihydrochalcone found only in rooibos. Therefore, the objective of this study is to evaluate the effects of time and temperature of extraction the phenolic compounds and functional *in vitro* properties of aqueous extracts of fermented organic *Aspalathus linearis*. Initially been prepared by an aqueous 2² extracts seven experiment design red rooibos for evaluation of the linear and combined effects of temperature and extraction time. By means of spectrophotometric methods primarily extracts were evaluated for the effect of time and temperature of extraction the content of phenolic compounds, flavonoids, flavonols, hydrolyzable condensed tannins and *ortho*-phenolic antioxidant activity against the DPPH[•] and ABTS[•] radical, reducing capability iron and reducing total capacity. Posteriorly it was performed for identification and quantification phenolic compounds 19 by high-performance liquid chromatography. The third step was to evaluate the inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase *in vitro* and hemolytic profile of aqueous extracts of rooibos red in human erythrocytes. The principal component analysis (PCA) was used to associate the chemical composition, antioxidant activity, reducing capacity, and inhibition of enzymes (α -amylase and α -glucosidase). In a general way the extract that was subjected to the extraction process in the higher temperature of the design (85 °C) showed the highest levels of total phenolics, flavonoids, flavonols, hydrolyzable condensed tannins and *ortho*-phenolic and antioxidant activity against the DPPH[•] and ABTS[•], as the reducing capacity of iron and reducing total capacity, with little influence of time. The antioxidant activity and reducing capacity of rooibos extracts were shown to be correlated with the content of phenolic compounds, flavonoids, flavonols and *ortho*-diphenols. The quercetin contents, isoquercitrin, and rutin and were correlated with ABTS[•], DPPH[•], FRAP and total capacity reduction. Thus, we can say that such compounds are *in vitro* directly linked functionality presented by the aqueous extract of rooibos. In relation the antimicrobial activity of the extracts at concentrations from 7.81 to 1000 mg L⁻¹ were not been effective in inhibiting the growth of tested microorganisms. As regards the inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase in general, all analyzed samples showed similar values extract to inhibit 50% of enzyme activity (IC₅₀). The tea extract at 80 °C for 10 min was used for hemolysis test in which it was observed that there was beneficial interaction with the erythrocytes, reducing the occurrence of erythrocyte hemolysis in the cell. Is possible to observe a decrease in haemolytic activity with increased concentration of rooibos extract, this characteristic indicates that inhibition of plasma hemoglobin release is dependent on the concentration of rooibos extract contained in the medium. However, overall, the extraction temperature is the main positive factor that influences these variables in organic red rooibos.

Keywords: Flavonoids; *in vitro* functionality; hemolytic inhibition; UV/VIS spectrophotometry ; Antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cultivo de rooibos na região de Cape Town - África do Sul.....	15
Figura 2 – Oxidação da aspalatina por meio da fermentação do rooibos verde.....	19
Figura 3 - Comparação entre os teores de compostos fenólicos totais (A), poder redutor do ferro (B) e capacidade redutora total (C) de rooibos não fermentado (verde) e fermentado (vermelho).....	20
Figura 4 – Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.....	22
Figura 5 – Esquema representativo do metabolismo vegetal na formação de alguns compostos.....	27
Figura 6 - Biossíntese geral dos compostos fenólicos.....	28
Figura 7 - Estruturas moleculares das principais subclasses de flavonoides e dos principais açúcares que formam seus glicosídeos.....	29
Figura 8 – Procedimento para obtenção de hematócrito 100%.....	41
Figura 9 - Efeito do tempo e temperatura de extração no conteúdo de compostos fenólicos totais (A), flavonóis totais (B) e taninos condensados (C) de rooibos vermelho orgânico.....	47
Figura 10 - Espectro de massas dos íons precursores (A) e fragmentos de íons (MS/MS) (B) de extrato aquoso de rooibos fermentado.....	52
Figura 11 - Efeito do tempo e temperatura de extração no teor de flavonoides totais (A), <i>orto</i> -difenólicos (B) e atividade antioxidante pelos métodos FRAP (C), CRT (D) DPPH [•] (E) e ABTS [•] (F) em rooibos vermelho orgânico.....	58
Figura 12 – Correlação entre compostos quantificados por LC-ESI-MS/MS e atividade antioxidante frente aos radicais DPPH [•] (A), ABTS [•] (B), capacidade redutora do ferro (C) e capacidade redutora total (D) em extratos aquosos de rooibos fermentado.....	60
Figura 13 - Estrutura geral dos ácidos cinâmico (A) e benzoico (B).....	63
Figura 14 - Ácidos fenólicos quantificados por LC-ESI-MS/MS em extrato aquoso de rooibos vermelho orgânico.....	65
Figura 15 – Efeito do tempo e temperatura na capacidade inibitória das enzimas α -glucosidase (A) e α -amilase (B).....	67
Figura 16 – Perfil não hemolítico do extrato aquoso de rooibos vermelho com tipagem O ⁺	69
Figura 17 - Análise por componentes principais para as amostras de extratos aquosos (A) e para as variáveis de resposta (B).....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais compostos fenólicos em rooibos verde e vermelho.....	17
Tabela 2 - Valores codificados e reais para o preparo dos extratos aquosos de rooibos vermelho orgânico.....	31
Tabela 3 - Condições do gradiente de eluição para análise dos compostos fenólicos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.....	34
Tabela 4 - Parâmetros operacionais do espectrômetro de massas otimizados para análise de compostos fenólicos em modo MRM positivo ou negativo.....	35
Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão (n=3) da composição fenólica (classes) dos extratos aquosos de <i>Aspalathus linearis</i>	46
Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão (n=3) dos compostos fenólicos identificados e quantificados por LC-ESI-MS/MS em extrato aquoso de rooibos vermelho orgânico.....	51
Tabela 7 - Propriedades antioxidantes e redutoras de extratos aquosos de <i>Aspalathus linearis</i>	53
Tabela 8 - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta para modelar os efeitos do tempo e temperatura na extração de compostos químicos e atividade antioxidante de extratos aquosos de rooibos vermelho orgânico.....	55
Tabela 9 - Capacidade inibitória dos extratos de rooibos nas enzimas α -amilase e α -glucosidase.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

Aa	Absorbância da amostra
AAE	Ácido Ascórbico Equivalente
Abs	Absorbância
ABTS*	2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina 6-sulfônico)
ACE	Ácido Clorogênico Equivalente
AGE	Ácido Gálico Equivalente
AHT	Absorbância de Hemólise Total
CAT	Catalase
CE	Catequina Equivalente
CIM	Capacidade Inibitória Mínima
CLAE	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
CRT	Capacidade Redutora Total
DPPH*	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro
GPx	Glutathione-Peroxidase
HM	Hemólise Mecânica
HT	Hemólise Total
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
MS	Espectrômetro de Massas
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Componentes Principais
PCA	Análise de Componentes Principais
QE	Quercetina Equivalente
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SOD	Superóxido Dismutase
TPTZ	2,4,6-tripiridyl-s-triazina
UFC	Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 CHÁS	14
3.2 ROOIBOS (<i>Aspalathus linearis</i>)	15
3.3 ESPÉCIES REATIVAS	20
3.4 ANTIOXIDANTES	21
3.4.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	24
3.4.2 Atividade antioxidante em chá de rooibos	25
3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS	26
3.5.1 Flavonoides	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 PRODUTOS QUÍMICOS	30
4.2 MATÉRIA-PRIMA	30
4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E PREPARO DAS AMOSTRAS	30
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CLASSES DE COMPOSTOS QUÍMICOS EM EXTRATO AQUOSO DE ROOIBOS FERMENTADO	31
4.4.1 Determinação de fenóis totais	31
4.4.2 Determinação de flavonoides totais	32
4.4.3 Determinação de flavonóis totais	32
4.4.4 Determinação de <i>orto</i>-difenólicos totais	33
4.4.5 Determinação de taninos condensados totais	33
4.4.6 Análise de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS	34
4.4.7 Identificação quimiotaxonômicos em extrato aquoso de rooibos	36
4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS	36
4.5.1 Capacidade antioxidante de redução do ferro	36
4.5.2 Capacidade redutora total	37
4.5.3 Atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•]	37
4.5.4 Atividade antioxidante frente ao radical ABTS[•]	38
4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	38

4.7 ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS ENZIMAS α -AMILASE E α -GLUCOSIDASE	39
4.9 ATIVIDADE ANTIHEMOLÍTICA DO EXTRATO DE ROOIBOS VERMELHO ORGÂNICO	41
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA E MODELAGEM DOS DADOS.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA MINORITÁRIA EM EXTRATOS DE ROOIBOS .	44
5.2 IDENTIFICAÇÃO QUIMIOTAXONÔMICA EM EXTRATO AQUOSO DE ROOIBOS	52
5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	53
5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	65
5.4 ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS ENZIMAS α -AMILASE E α -GLUCOSIDASE	66
5.5 PERFIL HEMOLÍTICO DO EXTRATO AQUOSO DE ROOIBOS VERMELHO	68
5.6 CORRELAÇÃO PELA ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS.....	70
6 CONCLUSÕES	72
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	74
8 REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A composição química, em especial os fenólicos, e as propriedades funcionais tanto *in vitro* quanto *in vivo* de extratos naturais, em destaque nos chás vêm sendo investigados por pesquisadores em todo o mundo, tornando-a uma promissora linha de pesquisa nos últimos anos (GRANATO et al. 2016). O crescente interesse em estudar os produtos naturais com apelos funcionais vem sendo consequência de uma mudança de hábito alimentar da população mundial. A busca por hábitos saudáveis como uma alimentação livre de aditivos químicos e que traga benefícios ao funcionamento do metabolismo são prioridades nos dias atuais. Os extratos aquosos, vulgarmente conhecidos como chás, já são reconhecidos como uma bebida saudável devido às associações entre o seu consumo e efeitos benéficos à saúde, como atividade antioxidante (MUNIANDYS et al., 2016; KELEBEK, 2016), anti-obesidade (HURSEL et al., 2009) antidiabética (TENORE et al., 2013), anti-inflamatória (CHATTERJEE et al., 2012), bem como várias doenças degenerativas não comunicáveis (MATHIYAZAHAN et al., 2015; PINTO, 2013). Dentre a grande variedade de produtos disponíveis no mercado mundial, o chá de rooibos é digno de destaque pelo elevado consumo em países africanos e europeus.

O extrato aquoso de rooibos é obtido de folhas e talos de um arbusto leguminoso endêmico da África do Sul, produzido na região da cidade de Cape Town denominado *Aspalathus linearis*. O extrato aquoso de rooibos começou a ganhar destaque por ser utilizado há muitos anos como chá benéfico à saúde, fazendo com que houvesse grande interesse comercial neste vegetal (VAN DER BANK et al., 1995). São produzidos dois tipos de chá rooibos, o fermentado e o não fermentado. O produto não fermentado apresenta cor verde, característica natural da planta de origem, foi produzido pela primeira vez na década de 1990 para um projeto de pesquisa em antioxidantes. A partir desta data, essa espécie entrou no mercado de ervas destinadas para produção de chás, com produção muito inferior em comparação ao tradicional chá de rooibos (produto fermentado) (JOUBERT e DE BEER, 2011). O chá de rooibos fermentado é submetido à fermentação natural, o que faz com que a cor mude de verde para vermelho castanho devido à oxidação dos constituintes fenólicos, de modo que o produto final é muitas vezes conhecido comercialmente como chá vermelho (ERICKSON, 2003). Essa bebida é isenta de cafeína e contém baixo teor

de taninos, o que lhe proporciona gosto adocicado e sabor suave, com odor de mel, floral, caramelo e amadurado (KOCH et al., 2012).

O chá de rooibos, produzido a partir de *A. linearis*, não é conhecido apenas na África, mas nas Américas (Central e do Norte) e Europa, e já é comercializado em cerca de 37 países, representando aproximadamente 23% do mercado de chá, com vendas atingindo mais de 5.000 toneladas ao ano (JOUBERT e DE BEER, 2011). O grande consumo de rooibos em todo o mundo, em especial da forma fermentada, é devido às suas propriedades funcionais, dentre elas destacam-se a cardioprotetora (DLUDLA et al., 2014) e antimutagênica (SNIJMAN et al., 2007). Também apresenta propriedades antioxidantes *in vitro* (JOUBERT et al., 2004) e *in vivo* (VILLANO et al., 2010), redução da resistência à insulina (MAZIBUKO et al., 2013) e efeito anticâncer (MARNEWICK et al., 2005), bem como na redução dos efeitos deletérios de diversas doenças metabólicas, como a obesidade e hipercolesterolemia (BELTRÁN-DEBÓN et al., 2011).

Para garantia de um chá com maior potencial funcional, o processo de extração precisa ser avaliado com atenção. Uma vez que a funcionalidade do extrato aquoso depende da composição química, o estudo de parâmetros tecnológicos que podem influenciar diretamente no teor dos compostos extraídos, como o tempo e a temperatura, apresentam-se como fatores relevantes. Essas variáveis poderão influenciar no rendimento de extração dos compostos fenólicos o que poderia interferir diretamente nas funcionalidades apresentadas pelo chá como atividade antioxidante, efeito antimicrobiano, capacidade inibitória das enzimas α -glucosidase e α -amilase e no perfil hemolítico de eritrócitos humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tempo e temperatura de extração no teor de compostos fenólicos e propriedades funcionais *in vitro* de extratos aquosos de *Aspalathus linearis* orgânico fermentado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os compostos fenólicos variando o tempo e temperatura de extração, a partir de um planejamento experimental 2² com três pontos centrais;
- Quantificar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, flavonóis totais, taninos condensados e *orto*-difenólicos dos extratos aquosos por metodologias espectrofotométricas;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* por meio do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), capacidade redutora total (CRT) e capacidade sequestradora dos radicais DPPH[•] e ABTS[•];
- Avaliar os principais constituintes fenólicos nos extratos de rooibos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS);
- Testar o potencial antimicrobiano dos extratos aquosos obtidos com diferentes tempos e temperaturas de extração;
- Analisar a capacidade inibitória das enzimas α -amilase e α -glucosidase dos extratos de rooibos;
- Quantificar e modelar o efeito do tempo e da temperatura de extração nos compostos fenólicos, nas propriedades antioxidantes e capacidade inibitória das enzimas α -amilase e α -glucosidase dos extratos;
- Correlacionar a composição fenólica com as propriedades funcionais *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CHÁS

Os chás além de serem reconhecidos pelos seus mais diversos sabores e aromas, também é considerado em todo o mundo como uma bebida consumida por pessoas que buscam um estilo de vida mais saudável. Assim, atualmente, os chás são as bebidas mais conhecidas e amplamente consumidas em todo o mundo após a água (HONG et al., 2014; ZIELINSKI et al., 2014; YANG e KONG, 2016). Na década passada o consumo de chás, seja na forma de sachê ou bebidas prontas para o consumo, obteve um aumento do consumo de aproximadamente 30% em todo o mundo (DA SILVEIRA et al., 2014).

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Legislação Sanitária Federal Resolução RDC Anvisa nº 277, de 22 de setembro de 2005, definiu como chás “o produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não, constantes de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. O produto pode ser adicionado de aroma e ou especiaria para conferir aroma e ou sabor”. De acordo com a mesma Resolução o produto deve ser designado de “Chá”, seguido do nome comum da espécie vegetal utilizada, podendo ser acrescido do processo de obtenção e ou característica específica. Podem ser utilizadas denominações “consagradas pelo uso” (BRASIL, 2005).

Grande parte do crescente consumo de chá é devido às funcionalidades apresentadas por alguns chás que são tratadas por muitos autores como funções benéficas à saúde além de fatores sensoriais, como aromas atraentes e sabores suaves. Esses benefícios à saúde estão associados a diversos estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstraram uma relação direta entre o consumo contínuo de chás e a diminuição de risco de doenças degenerativas não-transmissíveis (MCKAY e BLUMBERG, 2002; MARTINS et al., 2009; BHATTACHARYA et al., 2011). Essas funcionalidades associadas à ingestão de chás têm sido correlacionadas com a presença de compostos fenólicos, primordialmente os flavonoides, que são reconhecidos antioxidantes *in vitro* e *in vivo* (BOAVENTURA et al., 2012; GRANATO et al., 2014a).

3.2 ROOIBOS (*Aspalathus linearis*)

O gênero *Aspalathus* é composto por cerca de 278 espécies e é endêmico da África do Sul, dentre essas a espécie *linearis*, um arbusto leguminoso, encontrada no entorno da região de Cape Town é o responsável por dar origem ao chá de rooibos (Figura 1). O chá de rooibos verde (não fermentado) é de uso tradicional e começou a ganhar destaque há muitos anos por apresentar propriedades medicinais, em especial para aliviar alergias, problemas dermatológicos, asma, cólica infantil, náuseas e azias (VAN DER BANK et al., 1995; JOUBERT et al., 2008; VAN WYK et al., 2009). Entretanto, para ampliar as opções tecnológicas desse produto amplamente consumido pelos africanos, a indústria de alimentos desenvolveu um processo tecnológico para estabilizar a erva (folhas e talos) e exportar para diversos países, criando o rooibos fermentado (vermelho).

Figura 1 - Cultivo de rooibos na região de Cape Town - África do Sul



Fonte: <http://www.rooibosltd.co.za/>

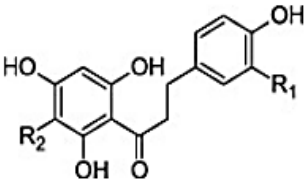
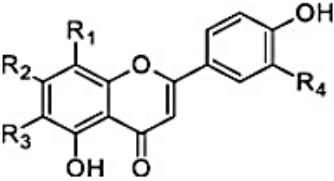
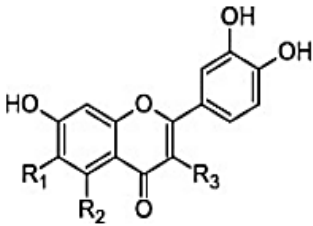
De acordo com Joubert e Beer (2011), o chá de rooibos não tinha valor comercial até o início do século XX, mas hoje é um produto bem conhecido e apreciado em mais de 37 países. A partir de *Aspalathus linearis* obtém-se duas variedades de chá de rooibos, o produto não fermentado (rooibos verde) e o fermentado (rooibos vermelho). Rooibos não fermentado apresenta cor verde brilhante característica natural da planta de origem, também é tradicionalmente

comercializado nos países europeus e americanos, porém em menor escala, representado cerca de 10% do total produzido de chá. O chá de rooibos vermelho também conhecido como tipo *rocklands* é produzido pela fermentação natural das folhas verdes de *A. linearis*, sendo o mais difundido comercialmente e representa 90% da produção total (KOTINA et al., 2012).

Atualmente existe um grande interesse no consumo de rooibos em todo o mundo, em especial na forma fermentada, devido às suas propriedades funcionais citadas em diversos estudos, como antioxidante *in vitro* (JOUBERT et al., 2004) e *in vivo* (VILLANO et al., 2010), antimutagênica (SNIJMAN et al., 2007), diminuição da resistência à insulina (MAZIBUKO et al., 2013), cardioprotetora (DLUDLA et al., 2014), imunomodulador, por meio do aumento da produção de anticorpos (KUNISHIRO et al., 2001) e também já foi relatado efeito anticâncer (MARNEWICK et al., 2005). Uma das teorias mais aceitas é que o rooibos apresenta todas essas propriedades devido à sua composição química (Tabela 1), a qual apresenta quantidades apreciáveis de vários compostos fenólicos (BRAMATI et al., 2002; JOUBERT e BEER, 2011).

Produtos comerciais encontrados em países americanos, europeus e africanos apresentam uma variabilidade considerável nos teores de sólidos totais, compostos fenólicos e atividade antioxidante. O método de extração, os parâmetros tempo e temperatura, e o uso de enzimas (celulase, xilanase, ácido ferúlico esterase e pectinases) são responsáveis pelas variações na concentração dos compostos fenólicos (COETZEE et al., 2014). Os mesmos autores utilizaram diversas enzimas na infusão de rooibos vermelho para aumentar o rendimento na extração de compostos bioativos. Entretanto, obtiveram um menor conteúdo de compostos bioativos, incluindo os flavonoides como a aspatatina, bem como infusões com menor atividade antioxidante. O teor de compostos fenólicos, no rooibos, tornou-se um parâmetro de qualidade por esse produto ser conhecido mais por suas características funcionais do que pelo seu sabor. O conteúdo de compostos fenólicos em rooibos reflete diretamente na capacidade antioxidante do extrato. Joubert et al. (2008) observaram que a capacidade antioxidante do extrato aquoso de rooibos não fermentado e fermentado, apresenta alta e significativa correlação entre o teor de compostos fenólicos totais, e a atividade antioxidante, pelo método de captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina 6-sulfônico) (ABTS[•]), tanto para o não fermentado ($r=0,99$) quanto para o fermentado ($r=0,96$).

Tabela 1 - Principais compostos fenólicos em rooibos verde e vermelho (mg 100 g⁻¹)

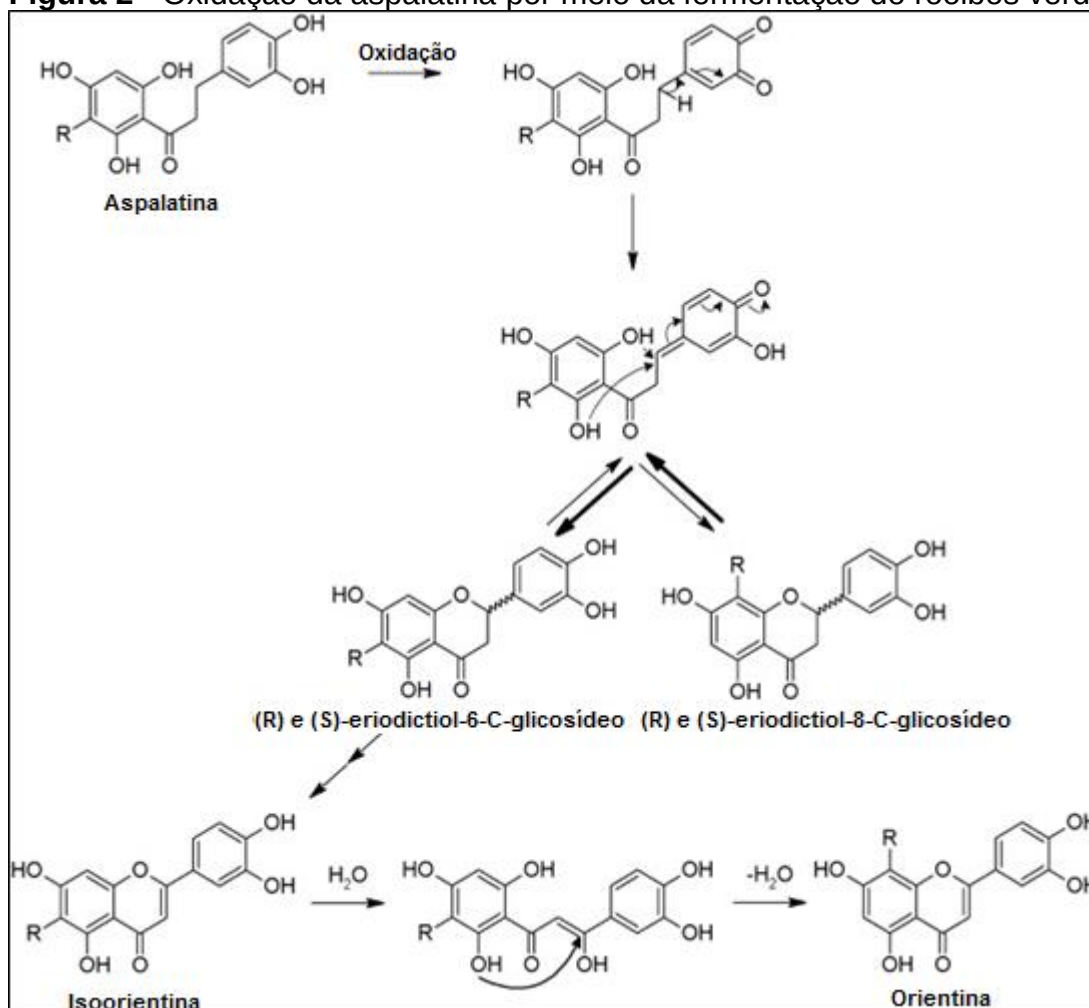
ESTRUTURA	COMPOSTOS	Rooibos verde	Rooibos fermentado
	Dihidrocalconas		
	Aspalatina R1 = OH R2= C-glicosídeo	2559	123 – 421
	Nothofagina R1 = C-glicosídeo R2 = OH	251	40
	Flavonas		
	Orientina R1 = C-glicosídeo R2 = OH R3 = H R4= OH	263	100 – 202
	Isoorientina R1 = H R2 = OH R3 = C-glicosídeo R4= OH	450	83 – 329
	Vitexina R1 = C-glicosídeo R2 = OH R3 = H R4= H	42	33-35
	Isovitexina R1 = H R2 = OH R3 = C-glicosídeo R4= H	49	26-35
	Luteolina 7-O-beta-D-glucuronido R1 = H R2 = (S)-glicosídeo R3 = H R4= OH	15	3-15
	Crisoeriol R1 = H R2 = OH R3 = H R4= OCH ₃	3	2-7
	Flavonóis		
	Quercetina R1 = H R2 = OH R3 = OH	1	10-11
	Heperosídeo R1 = H R2 = OH R3 = O-galactose	21	16-42
	Rutina R1 = H R2 = OH R3 = O-rutinosídeo	245	127- 173

Fonte: Adaptado de Bramati et al. (2002); Joubert e Beer (2011)

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

Algumas décadas depois, Joubert (1996) confirmou que no comprimento de onda de 290 nm a aspalatina apresenta a absorbância máxima e quantificou esse composto, em extrato de rooibos, em diferentes graus de oxidação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O mesmo autor concluiu que ocorre uma diminuição do conteúdo de aspalatina de acordo com o grau de oxidação do rooibos, sendo que quando mais rigoroso o processo de fermentação (oxidação), menor o teor deste composto.

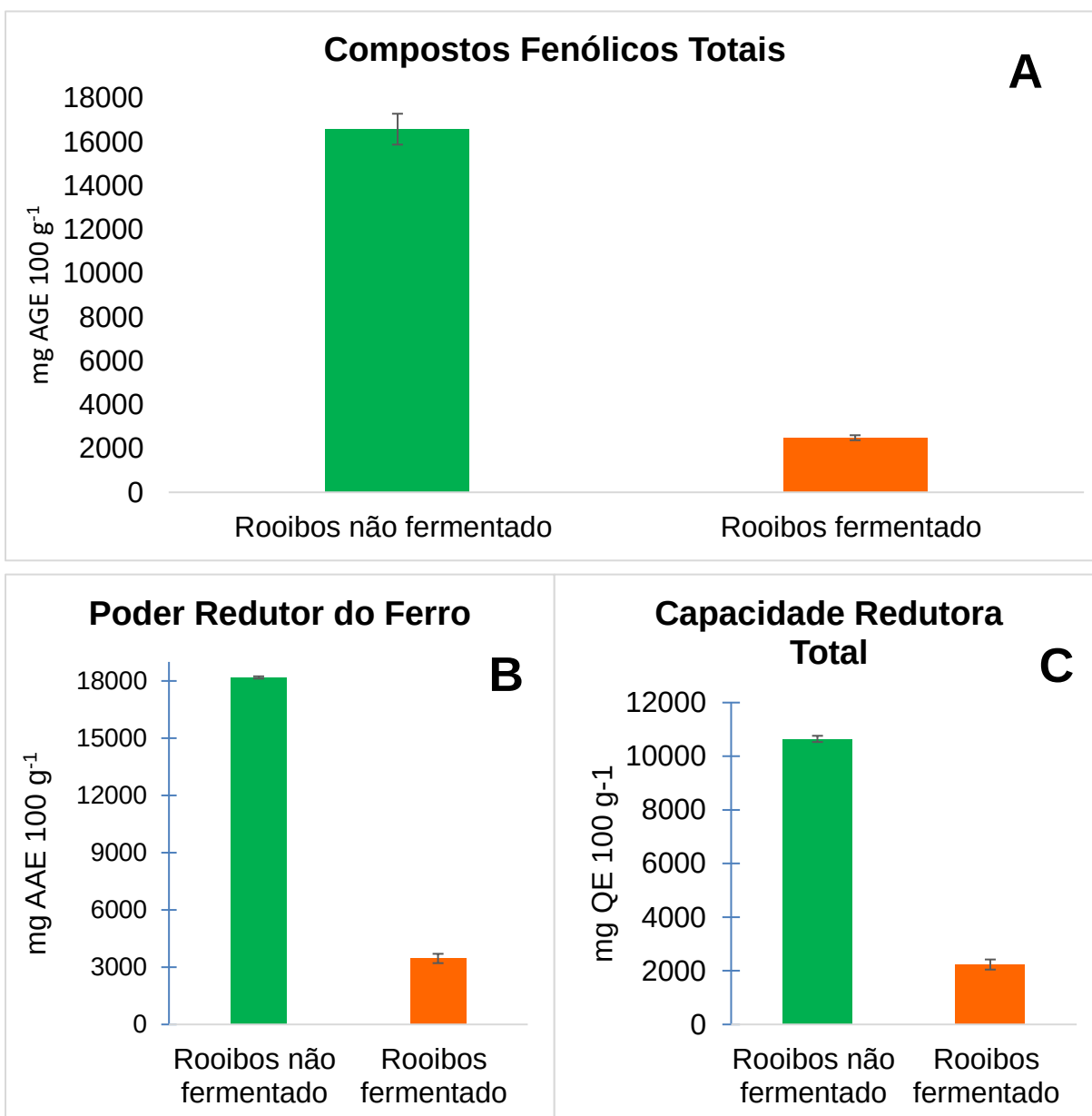
Em relação à interferência do processo de fermentação a qual o rooibos é submetido para produção do chá vermelho (forma oxidada), Koeppen e Roux (1965), Joubert (1996) e Marais et al. (2000) afirmaram que tal processo tecnológico provoca alterações quantitativas significativas em alguns compostos fenólicos. Uma das principais mudanças é a oxidação de aspalatina por meio de seus análogos, tendo como produto quantidades de isoorientina e orientina. O mecanismo de oxidação foi elucidado e apresentado por Krafczyk e Glomb (2008) (Figura 2). As alterações químicas decorrentes do processo fermentativo são as principais responsáveis pela mudança de coloração das folhas devido às fortes alterações no cromóforo dos compostos, passando de verde para uma cor vermelha-castanha características de ervas fermentados. De acordo com Heinrich et al. (2012) as reações responsáveis pela mudança de coloração iniciam-se com a oxidação de aspalatina para a sua *orto*-quinona que também é oxidada formando compostos coloridos de estruturas dibenzofurânicas.

Figura 2 - Oxidação da aspalatina por meio da fermentação do rooibos verde

Fonte: Krafczyk e Glomb (2008)

O processo fermentativo não se limita apenas a oxidação da aspalatina, mas sim a uma grande variedade de compostos químicos presentes em rooibos. Além da formação de novos compostos durante a fermentação há perdas quantitativamente significativas ($p \geq 0,05$), no teor de compostos fenólicos e consequentemente na atividade antioxidante e poder redutor do extrato aquoso (Figura 3).

Figura 3 - Comparação entre os teores de compostos fenólicos totais (A), poder redutor do ferro (B) e capacidade redutora total (C) de rooibos não fermentado (verde) e fermentado (vermelho)



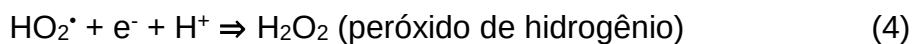
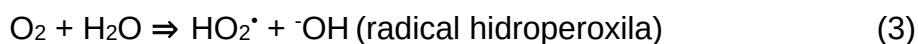
AAE = ácido ascórbico equivalente; AGE = ácido gálico equivalente; QE = quercetina equivalente.

Fonte: Adaptado de Joubert e Beer (2011)

3.3 ESPÉCIES REATIVAS

O estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio entre o surgimento de espécies oxidativas e a habilidade dos sistemas de defesa antioxidante (PERSSON et al., 2014). A formação de espécies reativas é inevitável em organismos aeróbicos, uma vez que normalmente somente 95 a 97% do oxigênio absorvido é reduzido, na cadeia respiratória por meio do transporte de elétrons, bem como no

retículo endoplasmático, tendo por produto final água como apresentado na Equação 1 (KEHRER, 2014). As fontes que cedem os cátions de hidrogênio e os elétrons necessários para a reação são, basicamente, a Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida (NADH), A Flavina-adenina dinucleótido FADH e a coenzima Q (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). As moléculas de oxigênio que não são devidamente reduzidas pelo sistema endógeno (3 a 5%) recebem apenas um elétron, o qual vai ocupar um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua não emparelhado, produzindo intermediários altamente reativos, denominados Espécies Reativas de Oxigênio – EROs, Equação 2, 3 ,4 e 5 (SLATER, 1988)



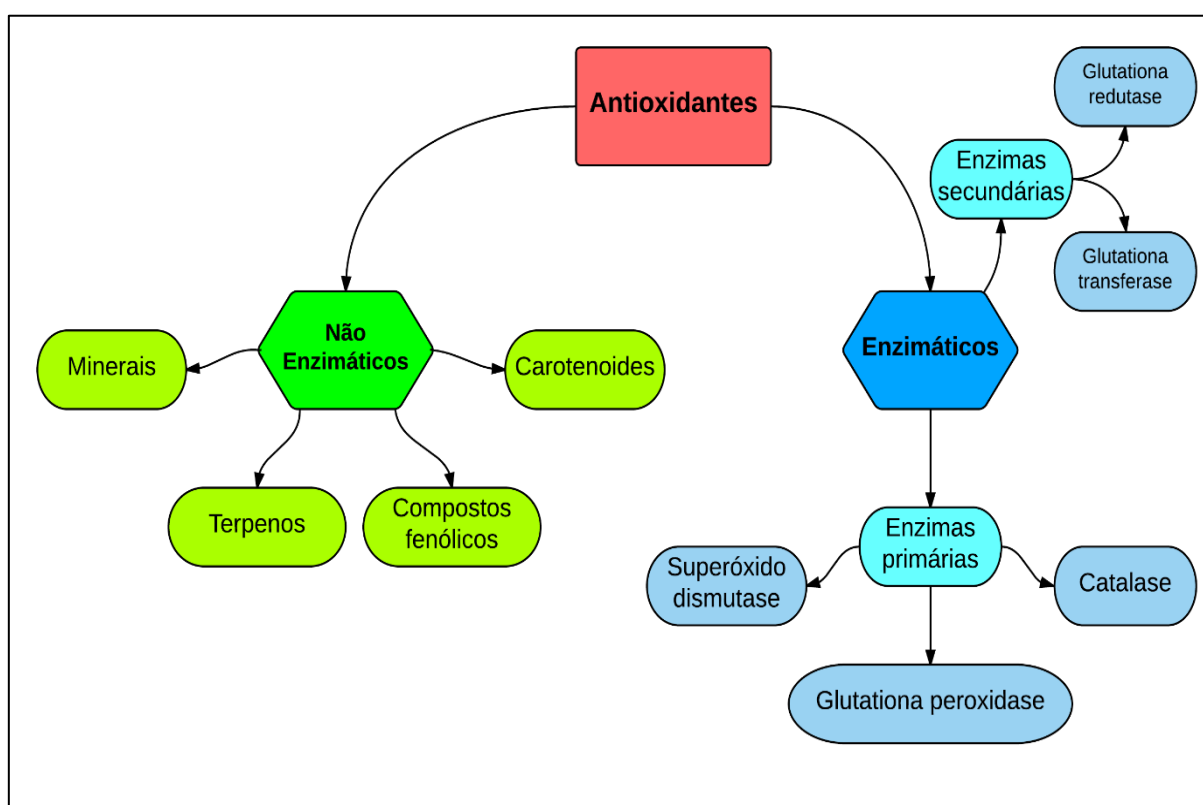
A formação de EROS (estresse oxidativo) tem sido relacionada a danos em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos em diferentes sistemas biológicos e, por conseguinte, deficiência funcional e estrutural em diferentes moléculas (CHACCE et al., 1979; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Para evitar ou retardar os danos ocasionados pelo estresse oxidativo em humanos, o consumo de compostos com propriedades antioxidantes é uma opção viável.

3.4 ANTIOXIDANTES

Como apresentado na Figura 4, as defesas antioxidantes podem ser de origem *endógena* (enzimáticos), como as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione-peroxidase (GPx) e catalase (CAT), quanto *exógena* (não-enzimáticos), os quais apresentam uma gama de minerais e substâncias, destacando-se algumas vitaminas, carotenoides, ácidos fenólicos e flavonoides. Os antioxidantes têm papel

fundamental na prevenção e diminuição dos efeitos prejudiciais do estresse oxidativo (KAO et al., 2010; FUKAI e USHIO-FUKAI, 2011). De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), um antioxidante é uma substância que, quando presente em baixa concentração, em relação ao substrato na forma oxidável, retarda ou inibe a oxidação do mesmo. Os compostos fenólicos e carotenoides são os principais compostos bioativos de plantas consumidas como chás. Por natureza, são capazes de proteger as células dos agentes oxidantes, evitando efeitos deletérios em diversos órgãos.

Figura 4 – Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos



Fonte: LOBO et al. (2010); Cabrera e Serrano (2014)

Os antioxidantes podem ser caracterizados por vários critérios como: sua polaridade, função e mecanismo de ação. Em relação à polaridade, López e Denicol (2013) afirmam que a capacidade de um antioxidante de chegar ao local onde as espécies reativas são geradas é um aspecto crítico e por essa razão, a polaridade do composto antioxidante deve ser levada em consideração no mecanismo de ação. Neste contexto, os compostos antioxidantes podem ser classificados como hidrofílicos (solúveis em água), tais como ácido ascórbico, antocianinas, ácido gálico entre outros, ou como lipofílicos, (solúveis em solventes orgânicos) como α -tocoferol, licopeno e β -

caroteno (SIES, 2007). Quanto à sua função, os antioxidantes podem apresentar a capacidade sequestrante de radicais livres (ácido ascórbico, tocoferóis entre outros), sequestrante de oxidantes não-radicalares (catalase e tióis). Além da função inibitória da geração de oxidantes (agentes quelantes de metais, tais como os compostos fenólicos) e capacidade de induzir a produção de antioxidantes (isotiocianatos) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

O processo de neutralização da ação deletéria de espécies reativas nas membranas celulares, por antioxidantes, pode atuar por três mecanismos principais: a transferência de átomos de hidrogênio, transferência de elétrons e também podem apresentar capacidade de quelar metais de transição, tais como zinco, ferro e cobre (PRIOR et al., 2005). Pode ocorrer uma ação combinada de mecanismos de transferência de átomos de hidrogênio e transferência de elétrons. O mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio ocorre quando o antioxidante, ArOH por exemplo, reage com o radical livre R[•], por meio da transferência de átomo de hidrogênio, Equação 6 (APAK et al., 2016).

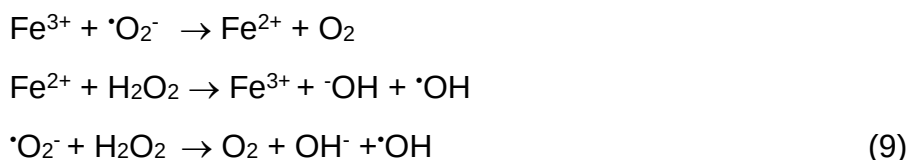
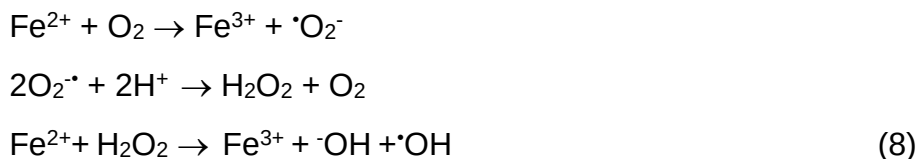


A Equação 7 ilustra o mecanismo de transferência de um elétron, supondo que um antioxidante doa um elétron para a molécula oxidante.



Os produtos de reação por meio dos dois mecanismos são: uma espécie neutra não reativa (HR), um radical fenolato estável (ArO[•]), uma espécie catiônica também estabilizada por ressonância (ArOH⁺) e uma espécie reduzida e energeticamente estável (R⁻), respectivamente (OROIAN e ESCRICHE, 2015). O radical livre, ArO[•], e a espécie catiônica, ArOH⁺, são estabilizadas pela deslocalização de elétrons pi do anel aromático. Além destes dois mecanismos de reação, tem sido citado na literatura análises que medem capacidade antioxidante por meio da habilidade de um composto em quelar íons metálicos. De acordo com Ferreira e Matsubara (1997), os íons de cobre e ferro estão altamente relacionados com a produção de diferentes espécies reativas, em especial as de oxigênio, decorrentes das reações de Fenton (Equação 8) e de Haber-Weiss (Equação 9). Canabady-

Rochelle et al. (2015) afirmam que compostos com capacidade de quelar metais de transição atuam indiretamente como antioxidante uma vez que a reação de Fenton e de Haber-Weiss são inibidas por sua ação.



Fonte: Ferreira e Matsubara (1997)

3.4.1 Atividade antioxidante *in vitro*

Por definição o termo *in vitro* é aplicado em todos os processos químico e/ou biológicos executados fora dos sistemas vivos, em ambiente controlado e que são realizados normalmente em recipientes de vidro. Os métodos de avaliação antioxidante *in vitro* diferem entre si pelos princípios das suas reações químicas específicas, molécula alvo, o modo de expressar os resultados, o pH do meio reacional, tempo de reação, solvente, concentração de substratos, entre outros (OLIVEIRA et al., 2015).

A eficiência da aplicação de um método depende das características dos compostos químicos presentes no extrato, estrutura e solubilidade dos compostos, além da diluição da amostra, pH do meio reacional, tempo de reação, concentração dos reagentes, dentre outros (SCHAICH et al., 2015; SHAHIDI e ZHONG, 2015). Uma vez que muitos mecanismos e reações múltiplas estão envolvidos, nenhum método irá refletir de forma fidedigna a atividade de todos os compostos antioxidantes em uma matriz complexa como sucos, chás e vinhos (APAK et al., 2013). Como ainda não há disponível um procedimento universal para avaliar a atividade antioxidante, faz-se necessário a utilização de mais de um método e com distintos mecanismos de ação (LI et al., 2009).

3.4.2 Atividade antioxidante em chá de rooibos

Entre as diversas funcionalidades apresentadas em extratos aquosos e orgânicos de rooibos, a atividade antioxidante vem se destacando. Shimol et al. (1996) avaliaram os efeitos radioprotetores e antioxidantes dos flavonoides da planta *in vivo* e concluíram que os flavonoides presentes em rooibos apresentam atividade antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica em roedores. Comparando a atividade antioxidante de chá de rooibos (*Aspalathus linearis*) com chá verde, oolong e preto, Von Gadow et al. (1997) constataram atividade antioxidante de captura do radical DPPH^{*} na seguinte ordem decrescente de atividade antiradicalar: chá verde > rooibos não fermentado > rooibos fermentado > rooibos semifermentado > chá preto > chá oolong.

Capacidade antioxidante em extratos aquosos e de acetato de etila de rooibos frente ao DPPH^{*} foram relatadas por Joubert (2004), o qual afirma que tal vegetal pode ser potencialmente explorado como antioxidante natural. Villaño et al. (2010) obtiveram dados que mostraram, pela primeira vez, que ambos os chás de rooibos fermentados e não fermentados são capazes de aumentar a capacidade antioxidante total plasmática em humanos saudáveis.

Estudo conduzido por Marnewick et al. (2011) fornece evidência clínica de que o consumo contínuo de chá de rooibos fermentado (6 xícaras/dia) durante 6 semanas melhora significativamente vários biomarcadores do perfil de lipídios em humanos. O estudo fornece provas de que rooibos tem capacidade de reduzir o estresse oxidativo, diminuindo significativamente a peroxidação lipídica e melhorando o estado redox de adultos com risco de desenvolver doença cardiovascular. Resultado semelhante foi relatado por Chen et al. (2013), os quais afirmaram que o consumo de chá de rooibos pode ajudar a diminuir o risco de problemas de saúde oriundos do estresse oxidativo. Com esses trabalhos anteriores é possível afirmar que extrato aquoso de rooibos fermentado apresenta atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*.

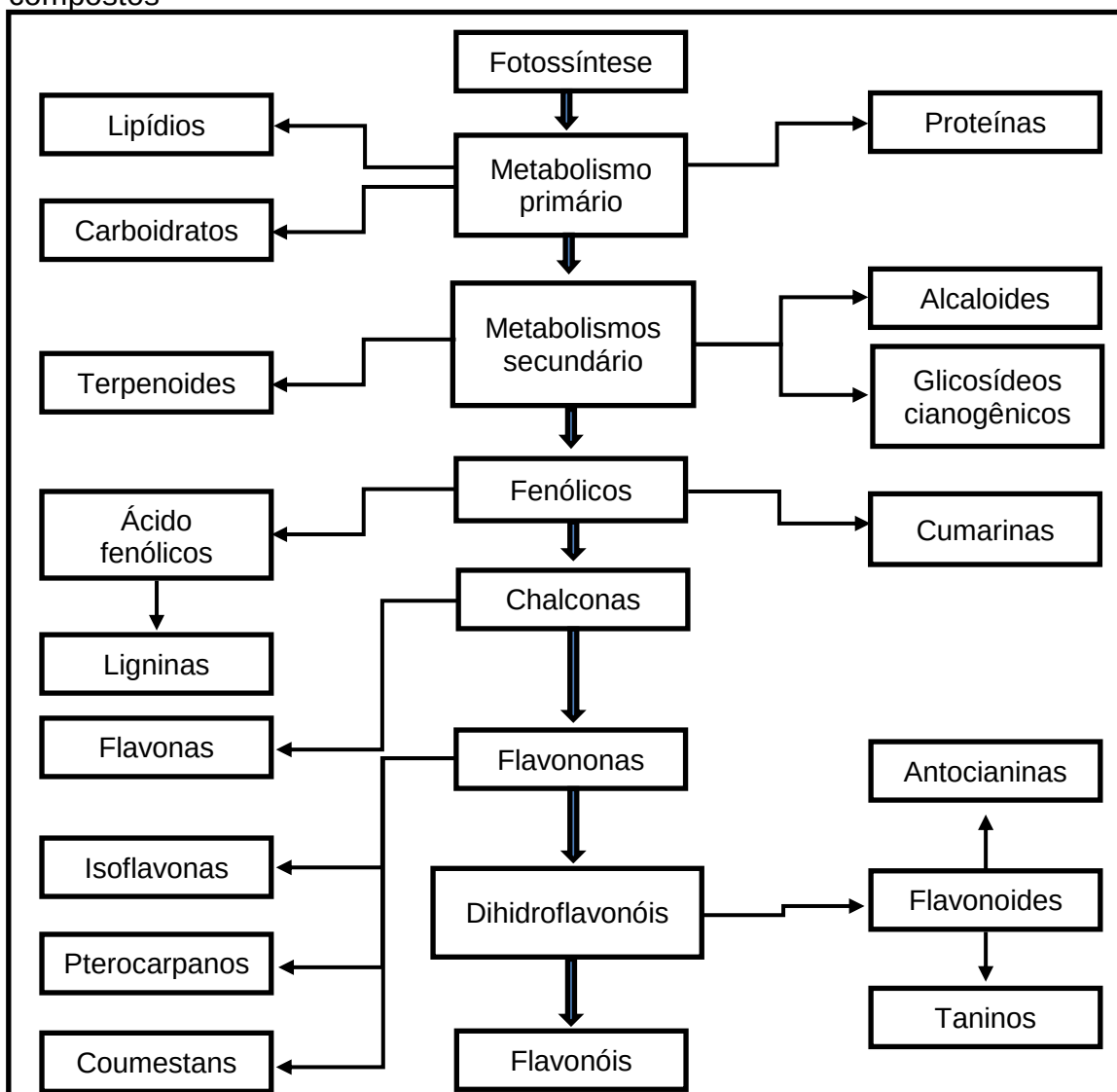
3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

Nos últimos anos, aumentou o interesse em investigar o perfil químico e atividades biológicas de compostos fenólicos presentes em alimentos que fazem parte da dieta. De acordo com Giada (2013), o consumo de alimentos que contenham tais compostos pode reduzir o risco do desenvolvimento de várias doenças, devido ao seu poder antioxidante. O metabolismo vegetal divide-se em primário e secundário, como é mostrado na Figura 5. O metabolismo primário é responsável pela produção de substâncias comuns e essenciais para os seres vivos, como os lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (MARTINS et al., 2015; GIADA 2013).

Os produtos do metabolismo secundário nem sempre são necessários para o ciclo de vida de um vegetal. Porém o metabolismo secundário atua na biossíntese de compostos orgânicos que derivam dos metabólitos primários. O direcionamento do metabolismo vegetal para a via secundária ocorre em situações de estresse do vegetal. Os quais podem ser bióticas como, ataque de patógenos e competição entre planta. Como abióticos, como alterações de temperatura, disponibilidade de água, níveis de luz, exposição à radiação ultravioleta e deficiência de nutrientes (VICKERY e VICKERY, 1981).

Os metabólitos secundários de plantas, em especial os compostos fenólicos, desempenham funções especializadas como antioxidante *in vivo* (BOAVENTURA et al., 2012), anti-inflamatório (BURRIS et al., 2011; CHATTERJEE et al., 2012), atividade hipoglicêmica (TENORE et al., 2013), imunomoduladora (CHATTOPADHYAY et al., 2012), antimutagênico (MIRANDA et al., 2008), em uma ampla variedade de organismos vivos, sendo considerados como compostos biologicamente ativos (NELSON e COX, 2000; GOUVEA et al., 2012).

Figura 5 – Esquema representativo do metabolismo vegetal na formação de alguns compostos



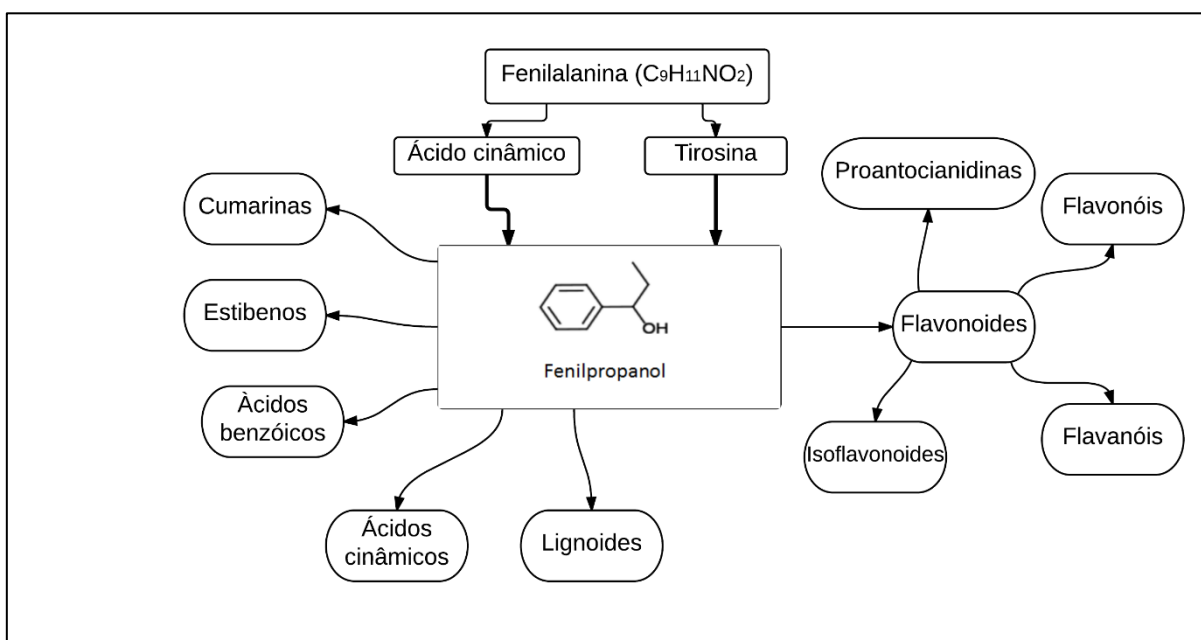
Fonte: Adaptado de Giada (2013).

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

Do ponto de vista genético, os compostos fenólicos resultam de duas vias metabólicas dividindo-se em via do ácido chiquímico e via do ácido mevalônico. A via

mais importante é a do ácido chiquímico formado a partir da fenilalanina (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; HOLLMAN, 2001). A fenilalanina perde amina para formar ácido cinâmico, o qual entra na via do fenilpropanol, que tem como ponto chave, a introdução de um ou mais grupos hidroxilas no anel aromático produzindo os compostos fenólicos. A maioria dos compostos fenólicos é sintetizada por meio da via metabólica fenilpropanóide, como mostra a Figura 6 (HOLLMAN, 2001). A combinação de ambas as vias conduz à formação dos flavonoides, o grupo mais abundante de compostos fenólicos na natureza (SÁNCHEZ-MORENO, 2002)

Figura 6 - Biossíntese geral dos compostos fenólicos



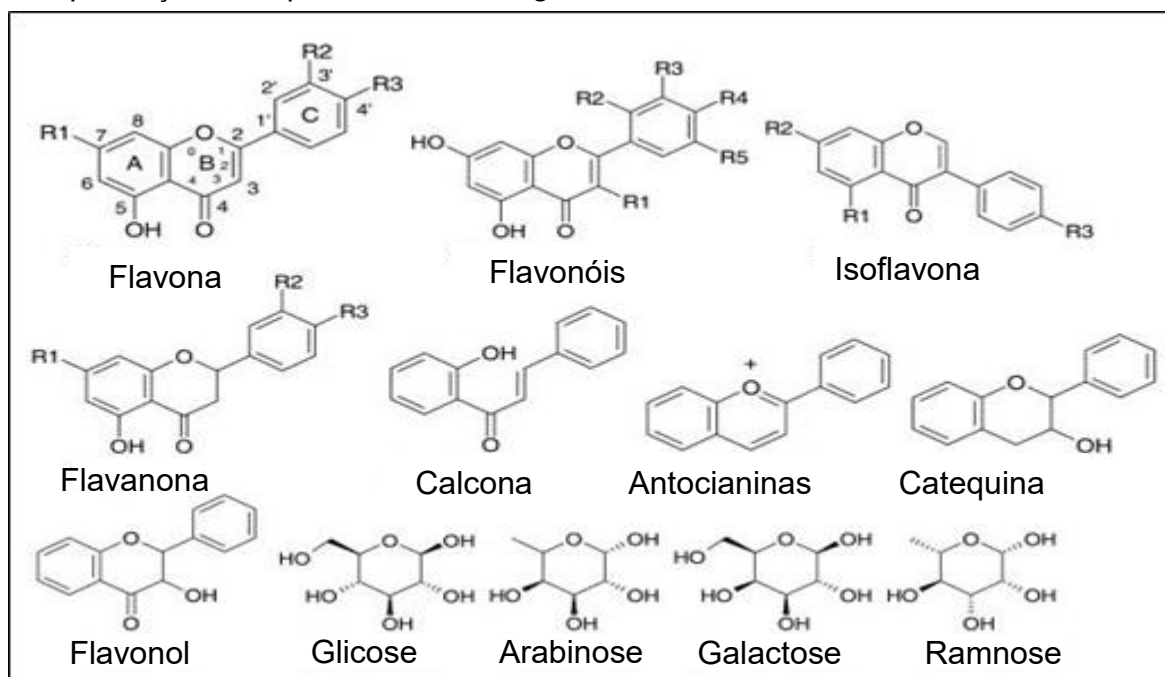
Fonte: Hollman (2001)

3.5.1 Flavonoides

Os flavonoides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, sendo os mais amplamente distribuídos em alimentos vegetais (BRAVO, 1998). Entretanto, tais compostos apresentam uma série de propriedades funcionais que os fazem atuar sobre sistemas biológicos, tornando-se componentes importantes na dieta humana (HERTOG et al., 1992; JOVANOVIĆ et al., 1994). Por conseguinte, muitas dessas propriedades atuam de forma benéfica para a saúde humana. Atualmente, já foram identificadas mais de cinco mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonoides (PETERSON e DWYER, 1998; DUTHIE et al., 2003).

Flavonoides são os compostos fenólicos mais abundantes na dieta humana. Os compostos flavonoides podem ser divididos em várias subclasses (Figura 7), de acordo com o grau de hidroxilação e presença de dupla ligação no anel heterocíclico (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Dependendo desses quesitos são classificados como flavonas, flavonóis, isoflavonas, antocianinas, flavanonas e proantocianidinas (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000). No entanto, dentro de cada classe ocorre uma grande variação estrutural de acordo com o grau de hidrogenação e hidroxilação em torno do anel heterocíclico (PETERSON e DWYER, 1998; GIADA 2013).

Figura 7 - Estruturas moleculares das principais subclasses de flavonoides e dos principais açúcares que formam seus glicosídeos



Fonte: Rijke et al. (2006)

Estudos *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* e epidemiológicos vêm sendo executados para avaliar a relação entre os flavonoides e propriedades funcionais (HOENSCH e OERTEL 2015). Dessa forma extratos ricos em flavonoides como é o caso do extrato aquoso de roibos fermentado mostra-se como um promissor objeto de estudo. Diversas funcionalidades precisam ser testadas em uma matriz com complexa composição química com determinada quantidade de flavonoides, como atividade antioxidante, capacidade inibitória de enzimas digestivas, atividade antimicrobiana e perfil hemolítico frente a eritrócitos humanos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUTOS QUÍMICOS

Ácido gálico, ácido clorogênico, reagente de Folin-Ciocalteu, 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH[•]), álcool etílico, cloreto de ferro(III) hexahidratado, 2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina 6-sulfônico) (ABTS[•]), molibdato de sódio, quercetina, α -amilase tipo VI-B de pâncreas de suíno e α -glucosidase do tipo I de *Saccharomyces cerevisiae*, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Carbonato de sódio, Cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ácido clorídrico (HCl), isobutanol, persulfato de potássio, acetato de sódio anidro, ácido ascórbico e 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Propanona e hidróxido de sódio foram adquiridos da Synth (Diadema, Brasil). Caldo Mueller-Hinton foi adquirido na Merck (Darmstadt Germany). Clorhexidina da Colgate-Palmolive (Campos, Brasil). Cepas de micro-organismos forma adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC) *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Candida albicans* ATCC 10231. Água ultrapura foi usada em todo os experimentos.

4.2 MATÉRIA-PRIMA

Folhas trituradas de autêntico roiboos vermelho (*Aspalathus linearis*) orgânico (*fair trade*) foi obtido da Simon Lévelt® (Países Baixos). Inicialmente as folhas foram trituradas em moinho analítico (QUIMIS-6298^a21) para obtenção de uma amostra com o tamanho de 20-40 Tyler mesh, e em seguida armazenadas em frascos de polietileno de baixa densidade à temperatura de 8 °C até o momento de preparo dos extratos.

4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E PREPARO DAS AMOSTRAS

Os efeitos lineares e combinados da temperatura e tempo (fatores) de extração no teor de compostos fenólicos, poder antioxidante, atividade antimicrobiana e capacidade inibitória das enzimas α -amilase e α -glucosidase nos extratos aquosos de rooibos foram avaliados a partir de um delineamento 2^2 com três pontos centrais (Tabela 2).

Os extratos foram preparados usando uma relação amostra:água na proporção de 1,5:50 (m/v) com o intuito de simular a preparação natural de chá de *Aspalathus linearis*. As extrações foram realizadas em uma cela termostatzada (Microquímica MQBTC 99-20 – Germany), em agitação magnética constante. Após a extração, os extratos foram centrifugados por 10 min a 10000 xg a 4 °C (Hitachi, Himac CR21GII) e em seguida filtrados com papel filtro Whatman n °1. O conteúdo de compostos fenólicos e os testes de atividade antioxidante foram realizados imediatamente após a extração. Em torno de 2 litros do extrato resultante foi dividido em alíquotas de 50 mL em tubos falcon e armazenado a -25 °C para posterior liofilização.

Tabela 2 - Valores codificados e reais para o preparo dos extratos aquosos de rooibos vermelho orgânico

Amostras	Temperatura (°C)	Tempo (min)
(A)	-1 (65±0,1)	-1 (5)
(B)	-1 (65±0,1)	1 (10)
(C)	1 (85±0,1)	-1 (5)
(D)	1 (85±0,1)	1 (10)
(E)	0 (75±0,1)	0 (7,5)
(F)	0 (75±0,1)	0 (7,5)
(G)	0 (70±0,1)	0 (7,5)

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CLASSES DE COMPOSTOS QUÍMICOS EM EXTRATO AQUOSO DE ROOIBOS FERMENTADO

4.4.1 Determinação de fenóis totais

Os compostos fenólicos totais foram quantificados de acordo com a metodologia descrita por Singleton et al. (1999), com modificações. Inicialmente uma alíquota do extrato foi diluída (1:20 v/v) em água ultrapura. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 25 µL do extrato diluído e 25 µL do reagente de Folin–Ciocalteu (0,7 N). Em seguida foram adicionados 200 µL de água ultrapura, a mistura

foi agitada e após 5 min foram adicionados 25 µL de Na₂CO₃ a 0,943 mol L⁻¹, a microplaca foi agitada por 15 s. A mistura resultante foi protegida da luz por 60 min a 25 °C, e a absorbância foi registrada no comprimento de onda de 725 nm num leitor de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA).

A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com todos os reagentes nas proporções utilizadas com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. Para quantificação do teor de compostos fenólicos totais uma curva analítica ($R^2=0,977$) com ácido gálico foi preparada na faixa de concentração de 40 – 180 mg L⁻¹. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de amostra seca (mg AGE 100 g⁻¹).

4.4.2 Determinação de flavonoides totais

Os flavonoides foram quantificados de acordo com a metodologia descrita por Lees e Francis (1972). Em um balão de 5 mL foram adicionados 125 µL do extrato de rooibos e o volume completado com água ultrapura para obter a absorbância próxima de 1,0. A absorbância foi registrada em um espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) no comprimento de onda de 374 nm. O conteúdo dos flavonoides foi determinado a partir da Equação 10, na qual 76,6 corresponde ao coeficiente de extinção da quercetina. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em mg quercetina equivalente por 100 g de amostra seca (mg QE 100g⁻¹).

$$\text{Flavonoides} = \frac{A_{374nm} * \text{fator de diluição}}{76,6} \quad (10)$$

4.4.3 Determinação de flavonóis totais

O conteúdo de flavonóis foi estimado de acordo com Yermakov et al. (1987), com modificações para microplaca. Uma alíquota de 80 µL do extrato de rooibos vermelho diluído em água ultrapura na proporção (1:20) foi colocada em microplaca, seguida de 80 µL de uma solução etanólica de cloreto de alumínio hexahidratado (82,84 mmol L⁻¹) e de 120 µL de acetato de sódio (0,6 mol L⁻¹). A microplaca foi agitada por 20 s e após 2,5 h, em reação a temperatura ambiente, a absorbância foi registrada no comprimento de onda de 440 nm em leitor de microplaca. A linha de base do equipamento foi registrada com uma solução com todos os reagentes nas proporções

utilizadas, com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. Para quantificação dos flavonóis dos extratos uma curva analítica ($R^2=0,999$) foi construída com quercetina na faixa de concentração de 7 a 80 mg L⁻¹. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em mg de quercetina equivalente por 100 g de amostra seca (mg QE 100 g⁻¹).

4.4.4 Determinação de *orto*-difenólicos totais

Os compostos *orto*-difenólicos foram quantificados de acordo com Durán et al. (1991) com modificações para microplaca. Para isso, uma alíquota de 50 µL do extrato diluído em água ultrapura (1:20 v/v) foi adicionada a 200 µL de uma solução alcoólica de molibdato de sódio dihidratado (0,204 mol L⁻¹). A mistura foi agitada e permaneceu reagindo durante 25 min. A absorbância foi registrada em leitor de microplacas, no comprimento de onda de 370 nm. A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com todos os reagentes nas proporções utilizadas com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. O teor de compostos *orto*-difenólicos presentes no extrato foi calculado a partir de uma curva analítica ($R^2=0,972$) de ácido clorogênico na faixa de concentração de 20 - 160 mg L⁻¹. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido clorogênico equivalentes por 100 g de amostra seca (mg ACE 100 g⁻¹).

4.4.5 Determinação de taninos condensados totais

O teor de taninos condensados foi determinado de acordo com Horszwald e Wilfried (2011). Uma alíquota de 25 µL da amostra diluída em metanol (1:20) foi adicionada na microplaca, seguida de 150 µL de uma solução de vanilina (0,260 mol L⁻¹) e 75 µL de uma solução de ácido sulfúrico (0,323 mol L⁻¹). A microplaca foi agitada e permaneceu em repouso por 15 min à temperatura ambiente. A absorbância foi registrada num espectrofotômetro de microplacas, no comprimento de onda de 500 nm. A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com todos os reagentes nas proporções utilizadas com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. O teor de taninos condensados presentes no extrato foi calculado a partir de uma curva analítica ($R^2=0,999$) de catequina, na faixa de concentração de 30 - 240 mg L⁻¹. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em mg de catequina equivalente por 100 g amostra seca (mg CE 100 g⁻¹).

4.4.6 Análise de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) 1290 Infinity, adquirido de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, Estados Unidos), equipado com bomba binária, sistema degaseificador, amostrador automático com controle de temperatura e forno para colunas, acoplado a um espectrômetro de massas (MS) do tipo triplo quadrupolo QTRAP 5500 fabricado pela Sciex (Framingham, MA, Estados Unidos), seguindo-se o método desenvolvido por Seraglio et al. (2016), com adaptações. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o *software* Analyst (versão 1.6.2). A separação cromatográfica foi conduzida em uma coluna de fase reversa C18(L) Venusil XBP de 100 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno, 3 µm de tamanho da partícula e 150 Å de tamanho de poro, fabricada por Bonna-Agela Technologies, Inc. (Wilmington, DE, Estados Unidos). Para a separação cromatográfica, foi utilizado modo de eluição em gradiente (Tabela 3). A temperatura da coluna foi mantida em 30 °C. O volume de injeção de amostra foi de 5 µL, com vazão de 300 µL min⁻¹ mantendo-se aberta a válvula de descarte até 1,9 min de corrida.

Tabela 3 - Condições do gradiente de eluição para análise dos compostos fenólicos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Tempo (min)	Vazão (µL min ⁻¹)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	300	98	2
4	300	98	2
7	300	80	20
14	300	10	90
15	300	10	90
17	300	98	2

Fase móvel A: água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (A); fase móvel B: acetonitrila adicionada de 0,1 % de ácido fórmico.

Os parâmetros do espectrômetro de massa foram otimizados por diluição direta dos analitos em uma solução contendo água e acetonitrila acidificados por ácido fórmico a 0,1% (1:1 v/v), determinando-se o melhor modo de ionização para cada composto (Tabela 4). Outros parâmetros foram: gás de cortina (25 psi), gás de colisão

alta, voltagem de IonSpray (5500 V), temperatura (400 °C), fonte de gás íons 1 e 2 (55 psi), além de outros informados na Tabela 4. As amostras foram infundidas de acordo com o protocolo anteriormente descrito e diluídas 50 vezes em fase móvel inicial (95A:5B, v/v). Para os analitos rotina, ácido ferúlico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico e isoquercitrina, as amostras foram diluídas 500 vezes. Todos os extratos foram preparados e injetados em triplicata. Os compostos fenólicos foram monitorados por reações múltiplas. A identificação dos compostos foi realizada com base no tempo de retenção, íon precursor, fragmento principal (íon de quantificação) e fragmento secundário (íon de confirmação), por comparação com padrões comerciais (Apêndice A). Para quantificação dos compostos fenólicos nas amostras, curvas de calibração foram preparadas em triplicata, com seis níveis de concentração (0,5 – 155 µg L⁻¹), distribuídos de forma equidistante.

Tabela 4 - Parâmetros operacionais do espectrômetro de massas otimizados para análise de compostos fenólicos em modo MRM positivo ou negativo

Composto fenólico	TR	Massa molar	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
Ácido salicílico	6,10	138,1	136,9*	93,10 / 64,90	-15	-10	-22 / -36	-5 / -11
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	3,18	154,1	152,9*	109,0 / 90,90	-75	-10	-20 / -32	-7 / -13
Ácido <i>p</i> -cumárico	4,99	164,2	162,9*	119,0 / 93,00	-90	-10	-20 / -40	-7 / -5
Ácido gálico	2,32	170,1	168,9*	124,9 / 79,00	-110	-10	-20 / -30	-7 / -11
Ácido cafeico	4,25	180,2	178,9*	135,0 / 107,0	-115	-10	-22 / -30	-9 / -7
Sinapaldeído	5,64	208,2	206,9*	177,0 / 148,9	-20	-10	-26 / -34	-11 / -9
Ácido sinápico	5,13	224,2	223,0*	163,9 / 192,9	-120	-10	-20 / -28	-9 / -11
Pinobanksin	6,83	272,2	271,0*	150,9 / 119,5	-140	-10	-24 / -32	-9 / -7
Quercetina	6,29	302,2	301,0*	150,9 / 121,0	-50	-10	-28 / -34	-9 / -7
Isoramnetina	6,92	316,3	315,0*	300,0 / 150,9	-225	-10	-28 / -38	-15 / -9
Naringina	5,32	580,5	579,0*	271,0 / 151,0	-255	-10	-42 / -48	-13 / -9
Rutina	4,82	610,5	609,0*	299,9 / 270,9	-230	-10	-48 / -70	-15 / -9
Siringaldeído	5,07	182,2	183,0	123,1 / 77,00	41	10	17 / 31	8 / 10
Ácido ferúlico	5,20	194,2	195,0	176,9 / 89,00	21	10	11 / 41	10 / 10
Ácido siríngico	4,30	198,2	199,0	140,0 / 155,1	16	10	21 / 13	10 / 10
Luteolina	6,24	286,2	286,9	153,0 / 68,90	111	10	43 / 89	10 / 10
Catequina	3,82	290,3	291,0	139,0 / 123,0	16	10	21 / 19	10 / 8

* Analitos com modo de ionização negativo. MRM: *multiple reaction monitoring*; TR: tempo de retenção (min); Q1: massa molar (g mol⁻¹) do íon precursor no modo positivo ou negativo; Q3: massa molar (g mol⁻¹) do íon de quantificação e de confirmação, respectivamente; DP: *declustering potential*; EP: *entrance potential*; CE: *collision energy*; CXP: *collision cell exit potential*.

4.4.7 Identificação quimiotaxonômicos em extrato aquoso de rooibos

A Identificação dos marcadores quimiotaxonômicos em extrato aquoso de rooibos foi realizada por espectrometria de massas. Para preparo do extrato aquoso, foi pesado 1,5 g de rooibos. Adicionaram-se 50 mL de água ultrapura a 85°C e manteve-se a mistura sob agitação por 10 minutos. Em seguida, todo o conteúdo foi transferido para um tubo de polipropileno e centrifugado a 3488 g por 10 minutos, a 4°C. Filtrou-se o extrato em filtro Whatman n°1 e o filtrado foi diluído de 500 a 1000 vezes com água ultrapura e injetado diretamente no espectrômetro Sciex 5500 QTRAP, controlado pelo software Analyst (Framingham, MA, USA).

Com o objetivo de identificar os compostos aspalatina, notofagina, orientina e vitexina, foi realizada a varredura no primeiro quadrupolo (Q1), na faixa de 400 a 500 m/z . Em seguida, foi realizada a fragmentação dos precursores no segundo quadrupolo (Q2), utilizando nitrogênio como gás de colisão. Esses fragmentos foram então monitorados no terceiro quadrupolo (Q3), na faixa de 200 a 500 m/z .

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS.

4.5.1 Capacidade antioxidante de redução do ferro

A determinação da capacidade antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi realizada de acordo com Benzie e Strain (1996), com modificações. A solução FRAP foi preparada a partir de 2,5 mL da solução de TPTZ (10 mmol L^{-1} diluída com HCl a 40 mmol L^{-1}), com 2,5 mL FeCl_3 (20 mmol L^{-1}) em 25 mL da solução tampão de acetato de sódio pH 3,6 (300 mmol L^{-1}). Resumidamente, 20 μL da amostra diluída (1:20) foram misturados com 280 μL de reagente de FRAP recém preparado, em uma microplaca de 96 poços com capacidade de 340 μL . As amostras foram incubadas durante 30 min, a 37 °C e em seguida, a absorbância foi registrada, em espectrofotômetro de microplacas em 593 nm. A linha de base do equipamento foi registrada a partir de uma solução com todos os reagentes nas proporções utilizadas com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. A capacidade antioxidante dos extratos foi quantificada por meio de uma curva analítica ($R^2=0,999$) construída com ácido ascórbico na faixa de concentrações de 15 - 150 mg L^{-1} . O experimento foi

realizado em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido ascórbico equivalente por 100 g de amostra seca (mg AAE 100 g⁻¹).

4.5.2 Capacidade redutora total

A determinação da capacidade redutora total (CRT) dos extratos, possibilita quantificar o poder redutor tanto de compostos hidrofílicos quanto lipofílicos. A quantificação do poder redutor total foi realizada com base no método de Folin-Ciocalteu modificado descrito por Berker et al. (2013), com pequenas modificações. O reagente de Folin-Ciocalteu foi diluído com isobutanol (99%), na proporção 1:2 (v/v) e uma alíquota de 75 µL dessa solução foi adicionada a 50 µL da amostra diluída 1:20 em acetona em tubos de ensaio. A mistura foi agitada e após 2 min, posteriormente foram adicionados 875 µL de NaOH (0,1 mol L⁻¹) e 1,5 mL de água ultrapura. A mistura foi novamente agitada por 10 s. Após 20 min de reação, 250 µL dessa solução foram transferidos para microplacas de 96 poços e a absorbância foi registrada em 665 nm. A linha de base do equipamento foi registrada por meio de uma solução com todos os reagentes nas proporções utilizadas com exceção da amostra, substituída por acetona. A capacidade redutora total das amostras foi calculada a partir de uma curva analítica ($R^2=0,992$) de quercetina na faixa de concentração de 25 - 360 mg L⁻¹. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em mg de quercetina equivalente por 100 g de amostra (mg QE 100 g⁻¹).

4.5.3 Atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•]

A atividade antioxidante também foi determinada pelo método de captura do radical DPPH[•] descrito por Brand-Williams et al. (1995), com modificações. Uma alíquota de 40 µL do extrato aquoso diluído em água ultrapura (1:20 v/v) foi adicionada em microplacas com 260 µL de uma solução metabólica de DPPH[•] (0,10 mmol L⁻¹). A microplaca foi agitada e deixou-se reagir por 30 min no escuro a 25 °C. A absorbância foi registrada, em um leitor de microplacas, no comprimento de onda de 517 nm. A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com todos os reagentes nas proporções utilizadas com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. A capacidade de captura do radical foi determinada a partir da Equação 11, e os resultados foram expressos em percentual de inibição do radical DPPH[•].

$$\% \text{ inibição} = \left(1 - \left(\frac{\text{Abs}_{517} \text{ amostra}}{\text{Abs}_{517} \text{ branco}} \right) \right) \times 100 \quad (11)$$

4.5.4 Atividade antioxidante frente ao radical ABTS[•]

A determinação da atividade antioxidante por meio da captura do radical ABTS[•] foi realizada conforme Re et al. (1999) com modificações. As soluções de ABTS[•] e persulfato de potássio foram preparadas nas concentrações 7 e 140 mmol L⁻¹, respectivamente. A solução de ABTS[•] foi preparada a partir de 5 mL da solução estoque de ABTS[•] (7 mmol L⁻¹) e 88 µL da solução de persulfato de potássio (140 mmol/L⁻¹), a mistura permaneceu no escuro por 16 h à temperatura ambiente. Uma alíquota de 10 µL do extrato aquoso de rooibos diluído em etanol (1:20 v/v) seguido de 290 µL da solução do radical ABTS[•], previamente preparada, foram adicionados numa microplaca. A mistura foi agitada e permaneceu no escuro durante 6 min., em seguida a absorbância foi registrada no comprimento de onda de 734 nm. A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com todos os reagentes nas proporções utilizadas com exceção da amostra, substituída por etanol. Uma curva analítica (R²=0,984) com ácido ascórbico na faixa de concentração de 30 - 300 mg L⁻¹ foi preparada para a quantificação da capacidade de captura do radical ABTS[•]. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico equivalente por 100 g (mg AAE100 g⁻¹).

4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A capacidade inibitória mínima, CIM, dos extratos de rooibos foi determinada segundo a metodologia descrita na norma M7-A6 do Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006) para bactérias e M27-A3 (CLSI, 2008) para fungos, modificada para microplacas de 96 poços. A atividade antimicrobiana foi testada frente aos micro-organismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Candida albicans* ATCC 10231. As soluções dos extratos liofilizados foram preparadas em caldo Muller-Hinton na concentração de 0,67 mg mL⁻¹. Em seguida foram preparadas oito diluições seriadas (1:2 v/v) em tubos com caldo Muller-Hinton para as bactérias e caldo Muller-Hinton com 2% de glicose para leveduras. Para os extratos de rooibos utilizaram-se as concentrações de 1000 a 7,8 µg mL⁻¹.

Posteriormente 200 μL do meio de cultura com os extratos diluídos foram transferidos para as microplacas. As suspensões dos micro-organismos foram preparadas segundo a escala 0,5 de MacFarland, diluídos 1:10 (v/v) para bactérias e 1:100 (v/v) para leveduras e 10 μL das suspensões dos micro-organismos foram adicionados em cada cavidade teste. As suspensões dos micro-organismos continham cerca de $10^5 - 10^4 \text{ UFC mL}^{-1}$ para bactérias e $10^3 - 10^2 \text{ UFC mL}^{-1}$ para leveduras. Como controle positivo da atividade antimicrobiana foi utilizado clorhexidina a 0,12%. Também foram preparados os controles negativos e de crescimento dos micro-organismos. As microplacas foram incubadas em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. Em seguida foram adicionados 50 μL do corante microbiológico 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, em cada poço da placa. A ação do composto testado é observada a partir da ausência de cor do indicador, a qual informa inibição do crescimento microbiano. Cada amostra foi testada em microplaca distinta, e todos os testes foram realizados em triplicata apenas considerou-se como satisfatória a menor concentração do extrato vegetal capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas (HÖRNER et al., 2008).

4.7 ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS ENZIMAS α -AMILASE E α -GLUCOSIDASE

A atividade inibidora da α -amilase foi determinada de acordo com o método estabelecido pelo *Worthington Enzyme Manual* (1993a) com modificações. Um total de 500 μL de cada extrato e 500 μL de tampão de fosfato de sódio 20 mmol L^{-1} (pH 6,9 com NaCl a 6 mmol L^{-1}) contendo solução de enzima (0,5 mg mL^{-1} de α -amilase a partir de pâncreas suíno) foram incubadas a 25°C durante 10 min. Posteriormente, 500 μL de uma solução de amido a 1% em tampão de fosfato de sódio 20 mmol L^{-1} (pH 6,9 com NaCl a 6 mmol L^{-1}) foi adicionado a cada tubo e deixou-se em reação por 10 min. A reação foi cessada pela adição de 1,0 mL do ácido dinitrossalicílico como corante. Os tubos de ensaio foram em seguida incubados em banho de água fervente durante 5 min e posteriormente resfriado até à temperatura ambiente. A mistura foi finalizada com a adição de 15 mL de água destilada, em seguida a absorbância foi registrada no comprimento de onda de 540 nm utilizando um espectrofotômetro (Genesys UV-visível, Milton Roy, Inc., EUA). As leituras foram comparadas com uma amostra controle, contendo uma solução tampão em vez dos extratos de rooibos. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição da α -amilase a qual foi calculada de acordo com a Equação 12:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(\text{Abs}_{540}^{\text{controle}} - \text{Abs}_{540}^{\text{extrato de rooibos}})}{\text{Abs}_{540}^{\text{controle}}} \times 100 \quad (12)$$

O poder inibitório da α -glucosidase foi mensurado conforme método descrito no *Worthington Enzyme Manual* (1993b), com algumas modificações (MCCUE e OTHERS, 2005). α -glucosidase (1 unidade mL⁻¹) foi usada para realização do ensaio que consistiu na adição de 50 μ L de extrato aquoso de rooibos em microplacas de 96 poços, seguido de 100 μ L de uma solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,9) contendo solução de α -glucosidase, que foi adicionada a cada poço. Essa mistura foi incubada a 25 °C durante 10 min. Posteriormente, 50 μ L de uma solução de p-nitrofenil- α -D- glicopiranosídeo a 5 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,9) foi adicionado, a cada poço e deixou-se reagir por mais 10 minutos a 25 °C.

Antes e após a incubação, as absorbâncias foram registradas a 405 nm em leitor de microplacas (Synergy H1 hybrid reader, Biotek, IL, EUA) e comparados com um controle que continha 50 μ L de solução tampão em vez do extrato de rooibos. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição da α -glucosidase de acordo com a Equação 13.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{Abs}_{405} \text{ c5} - \text{Abs}_{405} \text{ c0}) - (\text{Abs}_{405} \text{ ex5} - \text{Abs}_{405} \text{ ex0})}{(\text{Abs}_{405} \text{ c5} - \text{Abs}_{405} \text{ c0})} \times 100 \quad (13)$$

No qual Abs corresponde à absorbância, c0 ao controle no tempo 0, c5 ao controle após 5 min de incubação, ex0 ao extrato no tempo 0, ex5 corresponde ao extrato após 5 min de incubação.

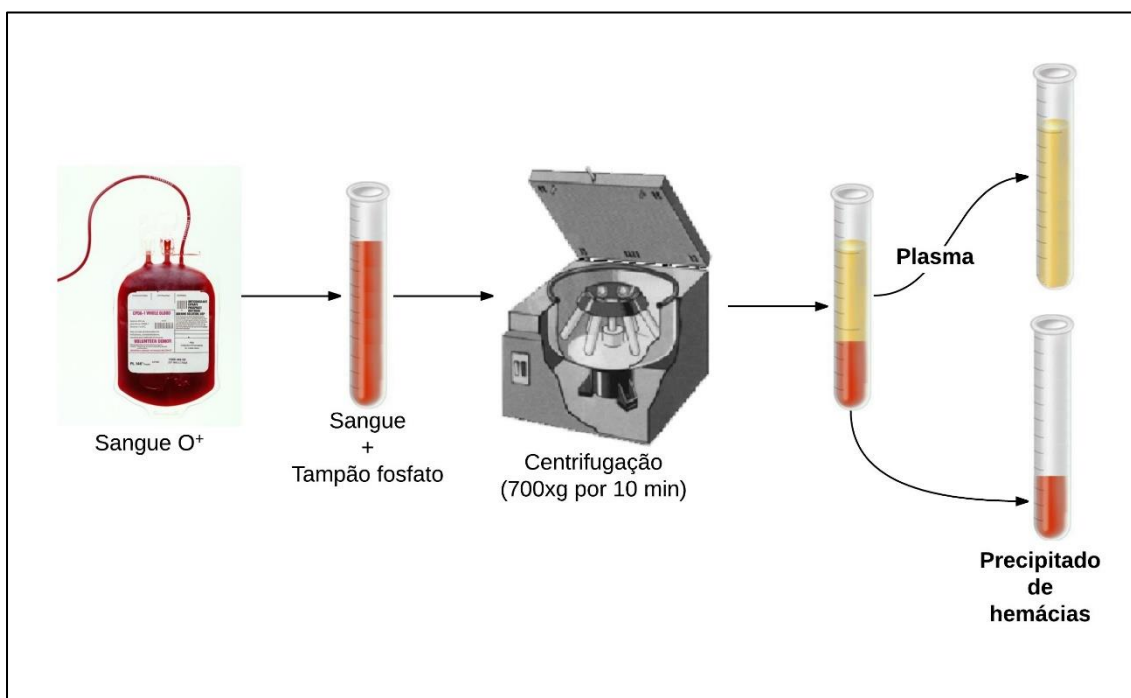
Para ambos os ensaios, as atividades de inibição foram expressas como IC₅₀ (concentração necessária para inibir a atividade da enzima em 50%). Os valores de IC₅₀ foram obtidos por regressão de mínimos quadrados utilizando diferentes concentrações, em triplicata, e os resultados foram apresentados como o valor médio dos dados.

4.9 ATIVIDADE ANTIHEMOLÍTICA DO EXTRATO DE ROOIBOS VERMELHO ORGÂNICO

Por meio de projeto aprovado pelo Hospital Universitário da UEPG (nº 08.2015/02), sangue controle tipagem sanguínea O⁺ de três doadores distintos foi obtido junto ao Hospital Universitário da UEPG, Ponta Grossa (PR), Brasil.

Concentrados de hemácias foram obtidos pela lavagem de sangue total em tampão fosfato de potássio 5 mmol L⁻¹, NaCl 154 mmol L⁻¹, pH 7,3 (PBS- *Phosphate Buffered Saline*). O sangue foi submetido a sucessivas centrifugações (HT Centribio, TDL 80-2B) a 700 xg por 10 min até obtenção do sobrenadante límpido e precipitado contendo um hematócrito de 100%, conforme esquema experimental da Figura 8.

Figura 8 – Procedimento para obtenção de hematócrito 100%



Concentrações de extrato liofilizado de rooibos em PBS (Phosphate Buffered Saline), entre 10 e 50 µg mL⁻¹, foram obtidas pela extração de 1 g de rooibos (20-40 Tyler mesh) em 50 mL de água ultrapura em temperatura de 85 °C por 10 min e incubados com hematócrito de 0,8%, à temperatura ambiente (20-25 °C). Os tubos contendo essa mistura permaneceram em repouso por 15 min, na sequência, foram centrifugados a 700 xg por 10 min. Do sobrenadante (200 µL) foram transferidos para microplaca de 96 poços e a absorbância em comprimento de onda 576 nm foi registrada em um leitor de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA). Os

ensaios foram conduzidos, tendo como controle positivo hemólise total (HT) – solubilização de eritrócitos em água ultrapura, causando a ruptura total das células e hemólise mecânica (HM) – hematócrito em tampão fisiológico, nesse caso, lise mínima.

As medidas hemolíticas foram obtidas por espectrofotometria de absorção UV-Vis, em comprimento de onda de 576 nm para acompanhamento da hemoglobina liberada, ou seja, da ruptura parcial ou total da membrana eritrocitária (ANTONINI et al., 1971). O efeito hemolítico (% de hemólise) é uma medida do aumento de permeabilidade da membrana eritrocitária e foi acompanhado medindo a concentração de hemoglobina no sobrenadante, de acordo com a Equação 14:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{Aa}{AHT} * 100 \quad (14)$$

No qual: Aa corresponde à absorbância da amostra de rooibos e AHT corresponde à absorbância do controle de hemólise total.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA E MODELAGEM DOS DADOS

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão combinado. Para comparar as variáveis de resposta, foram checadas a normalidade e homocedasticidade dos dados pelos testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe respectivamente, sendo que as diferenças entre os valores médios foram avaliadas pela análise de variâncias (ANOVA) unifatorial seguida do teste de Fisher de mínima diferença significativa (LSD). As correlações lineares entre as variáveis foram medidas e expressas pelo coeficiente de correlação de Pearson (GRANATO et al., 2014b). p-valores abaixo de 5% foram considerados para rejeição da hipótese nula. Os resultados foram avaliados por regressão linear múltipla (Metodologia de superfície de resposta, MSR). Os modelos polinomiais de segunda ordem foram gerados para explicar a influência dos efeitos lineares, e de interação entre a temperatura (T) e tempo (t) de extração dos compostos fenólicos. A Equação 15 foi aplicada para estimar os coeficientes de regressão.

$$y = \beta_0 + \beta_1 T_i + \beta_2 t_j + \beta_{ij} T_i t_j \quad (15)$$

No qual: Y representa a resposta predita; β_0 corresponde ao coeficiente de intercepção; β_i representa o coeficiente do efeito linear; β_{ij} corresponde ao coeficiente da interação dos efeitos; T_i e t_j são as variáveis independentes codificadas.

A qualidade estatística dos modelos propostos foi avaliada pela porcentagem de variabilidade explicada pela equação de regressão linear múltipla (R^2), pelo coeficiente de determinação ajustado aos dados experimentais (R^2_{adj}), e pela significância do modelo, $p \leq 0,20$, (GRANATO et al., 2014a). Os modelos também foram avaliados quanto à distribuição estatística dos resíduos pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk e pela falta de ajuste do modelo linear proposto.

A análise de componentes principais (PCA) foi usada para associar a composição química, atividade antioxidante, capacidade redutora, e inibição das enzimas (α -amilase e α -glucosidase). Para este fim, os extratos obtidos por diferentes tempos e temperaturas de extração ($n=7$) foram inseridos em linhas e as respostas ($n=30$) foram colocadas em colunas, num total de 210 pontos de dados. Os valores médios de cada resposta foram auto-escalonados à variância unitária antes da análise. A PCA foi baseada em correlação linear entre as variáveis de resposta. Fatores de carga maiores ou iguais a 0,60 foram usados para projetar as variáveis no plano bidimensional (ZIELINSKI et al., 2014). Os *software* Statistica v. 7 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA) e Action 2.9 (Statcamp, Campinas, SP, Brasil) foram usados para todas as análises estatísticas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA MINORITÁRIA EM EXTRATOS DE ROOIBOS

Os valores médios quantificados para todos os compostos químicos analisados por espectrofotometria e os quantificados por LC-ESI-MS/MS estão dispostos nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Foram constatadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) para todas as variáveis de resposta avaliadas por meio da análise de variâncias unifatorial. De acordo com Granato et al. (2014a) esses requisitos são imprescindíveis para a aplicação da metodologia de superfície de resposta.

O conteúdo de compostos fenólicos totais apresentou diferença estatística ($p < 0,001$) entre as amostras, variando de 1.623 ± 151 a 2.492 ± 114 mg GAE 100 g^{-1} . Chan et al. (2010) quantificaram o conteúdo de compostos fenólicos em extrato de *Aspalathus linearis* extraídos em água fervente por uma hora, determinaram o teor de 3.750 ± 235 mg GAE 100 g^{-1} , este valor difere do observado neste trabalho. Mas de acordo com Valls et al. (2009) e Bhebhe et al. (2015) o conteúdo dos compostos fenólicos em chás de ervas está relacionado às condições de cultivo, métodos de extração e quantificação, bem como às partes utilizadas da planta. Outra variável que pode influenciar no conteúdo de compostos fenólicos totais extraídos de espécies vegetais, especialmente em ervas fermentadas como é o caso do rooibos vermelho é o grau de oxidação (fermentação) da erva. Granato et al. (2014b) avaliando a composição fenólica de extratos aquosos de *C. sinensis* em diferentes graus de oxidação (chá verde, amarelo e vermelho), afirmaram que o processo de oxidação de ervas (fermentação) apresenta alta influência na composição fenólica.

O teor de compostos fenólicos determinado no chá de rooibos foi superior quando comparado com os chás de outras fontes como *Hibiscus sabdariffa*, *Jasminum sambac* e *Ilex paraguariensis*, 210,90, 126,60 e 176 mg 100 g^{-1} , respectivamente (CHEN et al., 2015; MEJÍA et al., 2010). Estes chás são conhecidos por apresentar grande quantidade de compostos fenólicos. A partir dos dados da Tabela 5 pôde-se verificar que a maior concentração de compostos fenólicos totais foi obtida da amostra (D), a qual foi submetida ao maior tempo (10 min) e temperatura (85 °C) de extração.

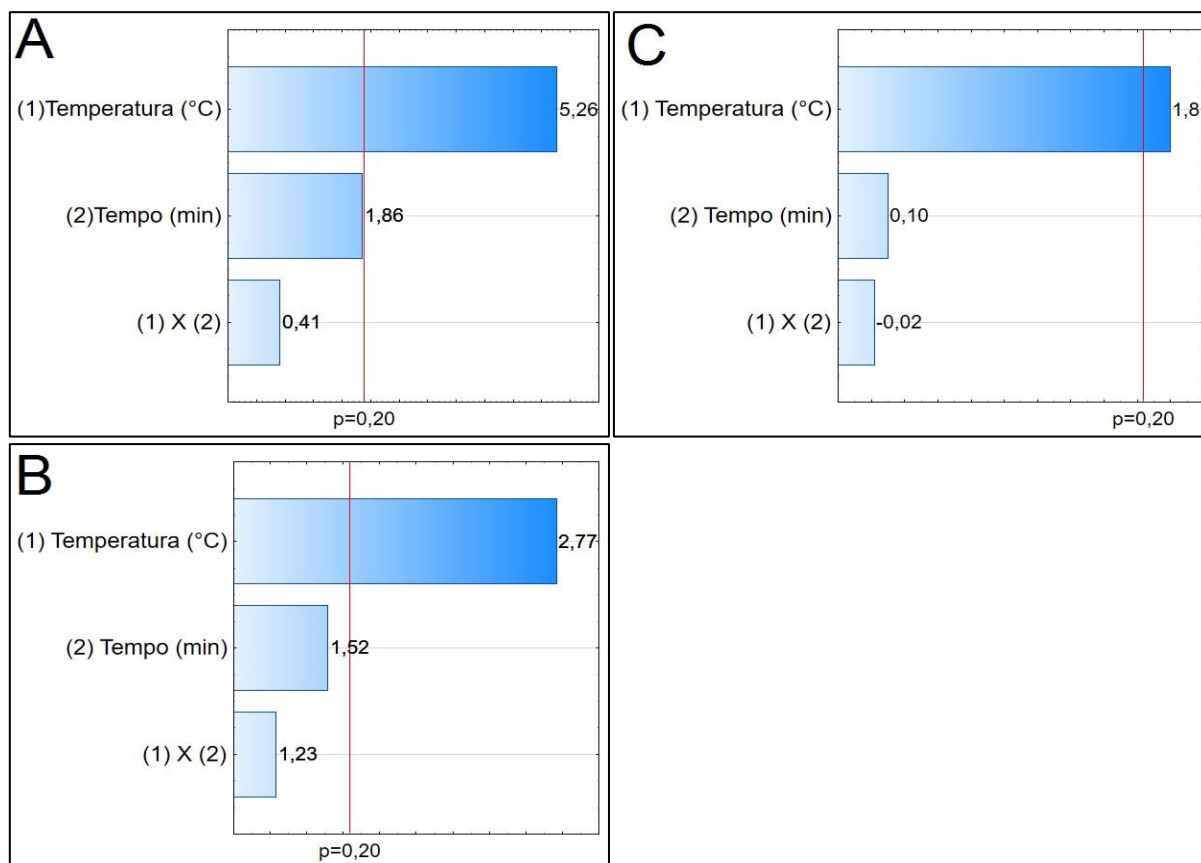
Analisando os efeitos apresentados na Figura 9A, observa-se que a temperatura de extração apresenta efeito significativo ($p \leq 0,20$), no aumento da extração dos compostos fenólicos totais em extrato aquoso de rooibos fermentado. Enquanto que o efeito do tempo não influenciou de forma significativa para extração dessa classe de compostos.

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão (n=3) da composição fenólica (classes) dos extratos aquosos de *Aspalathus linearis*

Temperatura	Tempo	Amostras	Compostos fenólicos totais (mg GAE100 g ⁻¹)	Flavonoides totais (mg QE 100 g ⁻¹)	orto-difenólicos (mg CAE 100 g ⁻¹)	Flavonóis totais (mg QE/100 g ⁻¹)	Taninos condensados (mg CE 100 g ⁻¹)
-1 (65)	-1(5)	A	1623±151 ^c	759±10 ^c	1427±19 ^c	560±20 ^d	300±42 ^d
-1(65)	1(10)	B	1800±150 ^c	747±10 ^c	1463±121 ^{bc}	567±3 ^d	305 ±13 ^{cd}
1 (85)	-1(5)	C	2216±69 ^b	835±7 ^{ab}	1600±63 ^b	626±19 ^{bc}	380±15 ^{ab}
1 (85)	1(10)	D	2493±114 ^a	849±10 ^a	1739±35 ^a	637±3 ^{ab}	384±22 ^{ab}
0 (75)	0 (7,5)	E	2077±11 ^b	835±5 ^{ab}	1570±86 ^{bc}	620±16 ^{bc}	347±12 ^{bc}
0 (75)	0 (7,5)	F	2313±23 ^{ab}	809±9 ^b	1511±51 ^b	597±1 ^{cd}	308±4 ^{cd}
0 (75)	0 (7,5)	G	2248±184 ^{ab}	816±31 ^b	1570±116 ^b	664±43 ^a	413±26 ^{ab}
p-valor (normalidade)			0,544	0,054	0,853	0,352	0,978
p-valor (homocedasticidade)			0,360	0,83	0,700	0,193	0,521
p-valor (ANOVA)			<0,001	<0,001	0,006	<0,001	0,002

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Fisher LSD

Figura 9 - Efeito do tempo e temperatura de extração no conteúdo de compostos fenólicos totais (A), flavonóis totais (B) e taninos condensados (C) de rooibos vermelho orgânico



O teor de flavonóis apresentou diferença estatística ($p < 0,001$) entre as amostras variando de 560 ± 20 a 664 ± 43 mg AGE100 g⁻¹. Na Tabela 5, observa-se que os extratos aquosos extraídos em maior temperatura apresentaram os maiores teores de flavonóis totais. Os resultados evidenciaram uma relação diretamente proporcional entre o conteúdo de flavonóis total extraído e a temperatura aplicada no processo de extração. De acordo com Hollman et al. (1995) ervas destinadas para produção de chá são fonte de flavonóis, tais como luteolina, kaempferol, quercetina, rutina isoquercitrina, isoramnetina entre outros. Na Figura 9B observam-se que o efeito do tempo de extração não se apresentou como significativo ($p > 0,20$) na extração dessa classe de compostos. Por outro lado, a temperatura influenciou de forma significativa ($p \leq 0,20$) e positiva na extração dos flavonoides.

O teor de taninos condensados nos extratos de rooibos apresentou diferença significativa ($p = 0,002$) variando de 300 ± 42 a 413 ± 26 mg CE100 g⁻¹. A Figura 9C mostra que a quantidade de taninos condensados extraídos no chá de rooibos fermentado foi influenciado, significativamente pela temperatura. Quanto maior a

temperatura do processo de extração, mais elevado foi conteúdo de taninos condensados. O teor de taninos condensados determinado foi considerado baixo por representar apenas 0,41% da massa de amostra seca utilizada. Estes dados estão de acordo com os observados por Morton (1983) e Koch et al. (2012), que também verificaram que o chá de rooibos apresenta baixo teor de taninos, o que lhe proporciona sabor suave. Bernays et al. (1989) ressaltaram que baixos teores de taninos são desejáveis em amostras de plantas alimentares, pois quantidades excessivas destes compostos podem inibir a absorção de minerais tais como ferro, além de restringirem a aceitação sensorial por apresentar alta adstringência.

O teor de flavonoides totais apresentou diferença significativa ($p < 0,001$) entre as amostras avaliadas, variando de 747 ± 10 a 849 ± 10 mg QE 100 g^{-1} . A análise de regressão linear múltipla indicou que o modelo proposto é significativo ($p = 0,009$) e adequado para explicar os dados experimentais, apresentando $P_{\text{lack of fit}} = 0,336$. Os valores de R e R^2_{adj} (Tabela 8) foram 0,863 e 0,835, respectivamente, o que indica que o modelo MSR foi capaz de explicar mais de 83% da variância. Analisando a Tabela 5 e Figura 11A, fica evidente que o teor de flavonoides total é altamente influenciado pela temperatura de extração. Este comportamento também foi observado por Xie et al. (2015) que constataram um aumento na concentração de flavonoides extraído de *C. paliurus* com a elevação da temperatura de extração.

O teor de *orto*-difenólicos apresentou diferença estatística ($p = 0,006$) variando de 1427 ± 19 a 1739 ± 35 mg AGE 100 g^{-1} . A maior concentração de *orto*-difenólicos foi obtida quando a amostra foi tratada com os maiores níveis de temperatura e tempo de extração. O elevado valor de *orto*-difenólicos pode estar relacionado com os compostos majoritários em rooibos fermentado, incluído quantidades de flavonoides (orientina, isoorientina, quercetina, isoquercitrina e rutina) e o ácido 3,4-dihidroxibenzóico. A análise de regressão linear múltipla (Tabela 8) mostrou que o modelo foi significativo ($p = 0,053$) e ajustado adequadamente aos dados experimentais. Apresentou $P_{\text{lack of fit}} = 0,46$ e os valores do R^2 e R^2_{adj} do modelo foram 0,990 e 0,880 respectivamente. Isso mostrou que o modelo de regressão linear múltipla proposto foi capaz e apropriado para explicar 88% da variância. Os efeitos estudados no modelo linear apresentados na Tabela 8 evidenciam que o aumento no teor de *orto*-difenólicos foi influenciado tanto pelo tempo como pela temperatura de extração, contudo não ocorreu uma interação significativa entre os dois fatores.

Granato et al. (2014a) observaram teores de *orto*-difenólicos entre 336 a 586 mg L⁻¹ em chás verde, vermelho e amarelo (*Camellia sinensis*). Os autores constataram que *C. sinensis* submetida a elevados tempos de oxidação e de fermentação resultavam num menor conteúdo de *orto*-difenólicos. Estes compostos quando oxidados produzem *orto*-quinonas, as quais se polimerizam de maneira enzimática, formando pigmentos marrons, pretos ou vermelhos, melaninas (RAMSDEN et al., 2014; CHAKRABORTY et al., 2015). Em chás de *C. sinensis*, a formação da *orto*-quinona é catalisada pela polifenoloxidase (POP), a qual degrada as catequinas durante o processo de fermentação (KRAFCZYK et al., 2009; HEINRICH et al., 2012). Assim, as reações para *C. sinensis* seguem de forma diferente em comparação com *Aspalathus linearis* (KRAFCZYK et al., 2009). As folhas de *Aspalathus linearis* passam por um processo de degradação oxidativa não enzimática resultando em uma diminuição substancial de quase 98% de aspalatina (composto majoritário em rooibos verde) durante a fermentação (HEINRICH et al., 2012; BARANSKA et al., 2006). Os principais produtos desse processo são isoorientina e orientina (KOEPPEN e ROUX, 1965; MARAIS et al., 2000; KRAFCZYK e GLOMB 2008), que também apresentam grupos hidroxilas na posição *orto*, assim os teores de *orto*-difenólicos, permanece elevado mesmo após o processo de fermentação do *A. lineares*.

Analisando a Tabela 6, observa-se diferença estatística significativa entre as amostras ($p < 0,05$) para todos os compostos fenólicos analisados. Constata-se que entre os compostos identificados e quantificados por LC-ESI-MS/MS nos sete extratos de rooibos vermelho orgânico, as amostras que foram extraídas com a maior temperatura do delineamento (85 °C) mostraram-se com os maiores teores na grande maioria dos compostos identificados como: ácido sirínico; ácido salicílico; ácido gálico; luteolina; catequina; ácido 3,4-dihidroxibenzoico; sinapaldeído; naringenina; pinobanskin; quercetina; isoquercitrina; isohramenetina; naringina; rutina; siringaldeído. Pietta et al. (2003) ressaltam que os flavonóis estão presentes nos alimentos de origem vegetal, principalmente nas folhas e nas partes externas das plantas sendo que a quercetina e kaempferol são os mais comuns. Beelders et al. (2012) observaram que os principais flavonóis detectados no rooibos são a quercetina, isoquercitrina, hiperosídeo e rutina.

Mais uma vez é possível afirmar que a temperatura de extração é o fator de maior influência positiva na extração de compostos fenólicos em extrato aquoso de rooibos fermentado. A forte influência da temperatura no aumento da extração dos compostos pode encontrar-se diretamente ligada a polaridade individual de cada composto. Na Tabela 6 observa-se uma menor variabilidade nos teores de compostos polares extraídos, como a rutina com o aumento da temperatura de extração em relação, aos compostos apolares como o siringaldeído teve seus teores quase que duplicados variando de 575 a 1008 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ com o aumento da temperatura de 65 para 85 °C. A porção de compostos polares é extraída quase em sua totalidade em temperaturas menores (65 °C) por sua afinidade com a água (solvente usado na extração). Tendo em vista que essa característica não se estende aos compostos apolares tornando necessário o aumento da temperatura, para melhorar a solubilidade e tornar possível uma maior extração desses compostos.

Tabela 6 – Valores médios e desvio padrão (n=3) dos compostos fenólicos identificados e quantificados por LC-ESI-MS/MS em extrato aquoso de rooibos vermelho orgânico

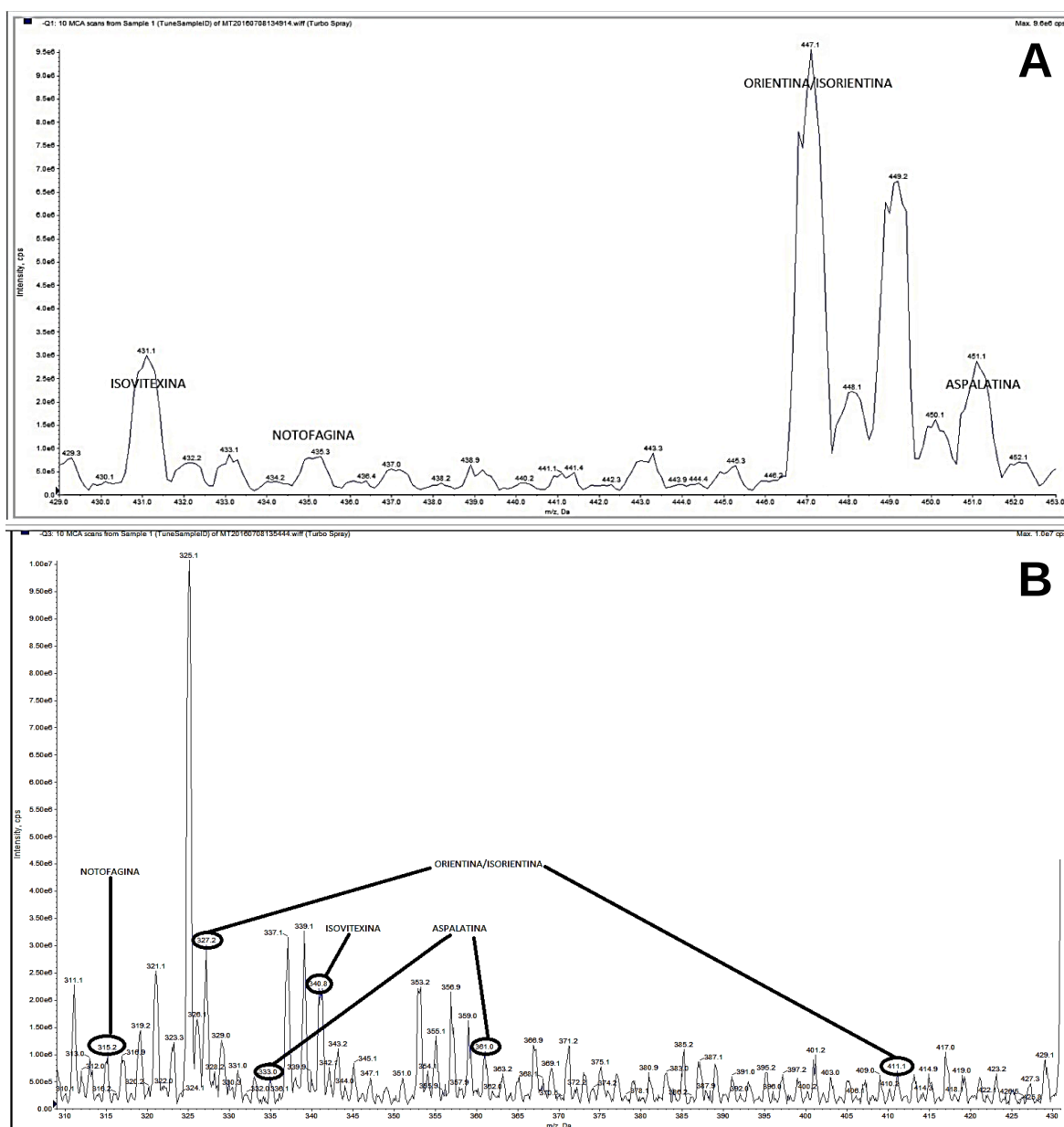
Compostos identificados	Amostras							p-valor (ANOVA)
	A (65 °C/5min)	B (65 °C/10min)	C (85 °C/5min)	D (85 °C/10min)	E (75 °C/7,5min)	F (75° C/7,5min)	G (75 °C/7,5min)	
Ácidos fenólicos								
Ácido ferúlico ¹	22,17 ±0,21 ^b	27,22 ±0,25 ^a	20,89 ±0,07 ^c	22,53 ±0,18 ^b	19,75 ±0,15 ^d	18,54 ±0,29 ^e	19,52 ±0,26 ^d	<0,001
Ácido siríngico ¹	4,34 ±0,04 ^a	4,07 ±0,04 ^c	4,20 ±0,05 ^b	4,38 ±0,03 ^a	4,24 ±0,05 ^b	4,24 ±0,04 ^b	4,17 ±0,06 ^b	<0,001
Ácido salicílico ¹	4,59 ±0,03 ^f	5,01 ±0,05 ^d	5,57 ±0,09 ^a	5,43 ±0,03 ^b	4,93 ±0,03 ^d ^e	5,13 ±0,05 ^c	4,87 ±0,03 ^e	<0,001
Ácido <i>p</i> -cumarico ¹	3,20 ±0,03 ^b	3,63 ±0,01 ^a	3,17 ±0,04 ^b	3,17 ±0,01 ^b	2,95 ±0,02 ^c	2,96 ±0,03 ^c	2,95 ±0,01 ^c	<0,001
Ácido gálico ¹	2,37 ±0,03 ^d	2,92 ±0,03 ^a	2,94 ±0,02 ^a	2,77 ±0,03 ^b	2,69 ±0,01 ^c	2,77 ±0,01 ^b	2,76 ±0,04 ^b	<0,001
Ácido cafeico ¹	3,17 ±0,01 ^c	3,55 ±0,03 ^a	3,02 ±0,01 ^{ef}	3,24 ±0,03 ^b	3,04 ±0,01 ^e	2,99 ±0,02 ^f	3,10 ±0,04 ^d	<0,001
Ácido sináptico ¹	2,06 ±0,01 ^b	2,21 ±0,02 ^a	1,86 ±0,01 ^c	2,07 ±0,01 ^b	1,73 ±0,01 ^f	1,81 ±0,01 ^d	1,78 ±0,02 ^e	<0,001
Ácido 3 4-dihidroxibenzóico	26,09 ±0,01 ^c	26,83 ±0,01 ^b	26,87 ±0,01 ^b	27,73 ±0,01 ^a	23,65 ±0,01 ^e	24,66 ±0,01 ^d	24,73 ±0,01 ^d	<0,001
Flavonoides								
Sinapaldeido ¹	0,62 ±0,01 ^c	0,64 ±0,01 ^b	0,60 ±0,01 ^d	0,68 ±0,01 ^a	0,57 ±0,01 ^e	0,53 ±0,01 ^f	0,54 ±0,01 ^f	<0,001
Naringenina ¹	0,28 ±0,01 ^d	0,29 ±0,01 ^{cd}	0,35 ±0,01 ^b	0,39 ±0,01 ^a	0,29 ±0,01 ^{cd}	0,30 ±0,01 ^c	0,28 ±0,01 ^d	<0,001
Pinobanskim ¹	0,24 ±0,01 ^d	0,24 ±0,01 ^d	0,31 ±0,01 ^b	0,34 ±0,01 ^a	0,26 ±0,02 ^c	0,24 ±0,01 ^d	0,23 ±0,01 ^d	<0,001
Luteolina ¹	3,10 ±0,04 ^e	2,04 ±0,03 ^f	4,40 ±0,04 ^b	5,87 ±0,05 ^a	3,59 ±0,05 ^c	3,60 ±0,06 ^c	3,50 ±0,05 ^d	<0,001
Catequina ¹	1,57 ±0,01 ^d	2,04 ±0,04 ^b	2,08 ±0,02 ^b	2,18 ±0,02 ^a	1,93 ±0,03 ^c	1,97 ±0,03 ^c	1,94 ±0,03 ^c	<0,001
Quercetina ¹	7,09 ±0,04 ^f	9,23 ±0,14 ^e	12,00 ±0,12 ^b	14,31 ±0,12 ^a	9,88 ±0,07 ^c	9,74 ±0,06 ^c	9,57 ±0,09 ^d	<0,001
Isoquercitrina ¹	26,11 ±0,26 ^e	31,43 ±0,17 ^d	48,37 ±0,46 ^b	49,40 ±0,67 ^a	39,02 ±0,44 ^c	39,38 ±0,41 ^c	39,15 ±0,48 ^c	<0,001
Isoramenetina ¹	0,93 ±0,01 ^f	0,94 ±0,01 ^e	1,00 ±0,01 ^b	1,03 ±0,01 ^a	0,99 ±0,01 ^b ^c	0,99 ±0,01 ^{cd}	0,98 ±0,01 ^d	<0,001
Naringina ¹	0,18 ± 0,01 ^f	0,26 ±0,01 ^c	0,31 ±0,01 ^b	0,34 ±0,01 ^a	0,24 ±0,01 ^e	0,25 ±0,01 ^d	0,26 ±0,01 ^{cd}	<0,001
Rutina ¹	94,90 ±0,39 ^e	109,38 ±1,35 ^d	137,00 ±0,30 ^b	141,09 ±0,77 ^a	117,14 ±0,61 ^c	117,15 ±0,96 ^c	117,04 ±0,41 ^c	<0,001
Siringaldeido ²	575,13 ±4,99 ^g	657,52 ±11,96 ^f	774,20 ±8,29 ^b	1008,98 ±10,11 ^a	673,76 ±8,53 ^e	703,89 ±1,92 ^d	741,36 ±8,80 ^c	<0,001
Total identificado*	203,59	232,60	275,74	287,96	237,58	237,96	238,12	

¹ mg 100 g⁻¹; ² µg100 g⁻¹; *Somatória dos teores de todos os compostos quantificados em mg 100 g⁻¹ de amostra. Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Fisher LSD.

5.2 IDENTIFICAÇÃO QUIMIOTAXONÔMICA EM EXTRATO AQUOSO DE ROOIBOS

Foi possível identificar os compostos quimiotaxonômicos de rooibos fermentado (aspalatina, notofagina, orientina e vitexina) em extrato aquoso por espectrometria de massas (Figura 10) confirmando a autenticidade da matéria prima.

Figura 10 - Espectro de massas dos íons precursores (A) e fragmentos de íons (MS/MS) (B) de extrato aquoso de rooibos fermentado



Na Figura 10A, observa-se o íon precursor, correspondente a cada um dos analitos. Os compostos foram identificados por comparação com as razões m/z ⁻¹ reportadas por Iswaldi et al. (2011). Não foi possível diferenciar a orientina da

isorientina separadamente, por isso os isômeros foram avaliados juntos. Dois fragmentos foram identificados para cada composto, possibilitando uma maior seletividade e identidade para a futura quantificação com materiais de referência. Na Figura 10B, é apresentado o espectro de massas dos fragmentos monitorados, sendo possível a identificação de alguns dos fragmentos mais abundantes de cada analito (aspalatina: 333,1 m z⁻¹; isovitexina: 341,0 m z⁻¹; orientina/isorientina: 327,2 m z⁻¹ e 411,0 m z⁻¹; notofagina: 315,2 m z⁻¹).

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os valores médios e desvios padrões combinados das avaliações de antioxidante estão dispostos na Tabela 7 os quais assim como os compostos químicos, apresentaram diferenças significativas para todas as variáveis de resposta avaliadas por meio da análise de variâncias unifatorial ($p \leq 0,05$). Os resultados da atividade antioxidante por meio do radical ABTS* apresentou diferença estatística ($p=0,006$) variando de 207±15 a 303±40 mg AAE 100 g⁻¹ de amostra seca. Os dados experimentais foram ajustados adequadamente, apresentando $P_{\text{lack of fit}}=0,811$ e os valores do $R^2=0,910$ e $R^2_{\text{adj}}=0,877$ foram obtidos, mostrando que o modelo de regressão linear múltipla proposto foi capaz e apropriado para explicar satisfatoriamente a variância. Entretanto, a análise de regressão múltipla mostrou que o modelo não foi significativo $p=0,897$ tornado a sua aplicação inviável.

Tabela 7 - Propriedades antioxidantes e redutoras de extratos aquosos de *Aspalathus linearis*

Temperatura	Tempo	Amostras	ABTS*	DPPH*	FRAP	CRT
-1 (65)	-1(5)	A	207±15 ^c	63±5 ^{de}	2947±208 ^b	1406±87 ^c
-1(65)	1(10)	B	256±24 ^b	62±2 ^e	2947±174 ^b	1903±80 ^b
1 (85)	-1(5)	C	271±24 ^{ab}	73±1 ^{ab}	3417±260 ^a	2060±100 ^{ab}
1 (85)	1(10)	D	303±40 ^a	73±1 ^a	3457±244 ^a	2234±188 ^a
0 (75)	0 (7,5)	E	254±14 ^b	73±1 ^{bc}	3261±105 ^a	2002±211 ^{ab}
0 (75)	0 (7,5)	F	272±14 ^{ab}	67±2 ^{cd}	3177±5 ^{ab}	2027±158 ^{ab}
0 (75)	0 (7,5)	G	246±10 ^b	67±1 ^{cd}	3389±95 ^a	2085±117 ^{ab}
p-valor (normalidade)			0,518	0,648	0,390	0,063
p-valor (homoscedasticidade)			0,859	0,853	0,774	0,965
p-valor (one-way ANOVA)			0,006	< 0,001	0,010	<0,001

ABTS* expresso em mg de AAE 100 g⁻¹; DPPH* expresso em % inibição do radical; FRAP expresso em mg AAE 100 g⁻¹; CRT expresso em mg QE 100 g⁻¹; Letras distintas na mesma coluna indica diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Fisher LSD.

A atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH^{*} apresentou diferença estatística ($p < 0,001$) variando de 62 a 73% de inibição do radical. A análise de regressão linear múltipla mostrou que o modelo foi significativo $p=0,027$ e ajustado adequadamente aos dados experimentais, apresentando $P_{\text{lack of fit}}=0,925$ e $R^2_{\text{adj}}=0,925$ mostrando que o modelo de regressão linear múltipla proposto foi capaz e apropriado para explicar 92% da variância. Os efeitos estudados no modelo linear são apresentados na Tabela 8 e evidenciam que o aumento da atividade antioxidante está associado somente a temperatura.

A atividade antioxidante pelo método de FRAP apresentou diferença estatística ($p=0,010$) variando de 2947 ± 208 a 3457 ± 244 mg AAE 100 g^{-1} . A análise de regressão linear múltipla mostrou que o modelo foi significativo ($p=0,010$) e ajustado adequadamente aos dados experimentais, apresentando $P_{\text{lack of fit}}=0,777$. Os valores do R^2 e R^2_{adj} do modelo foram de 0,879 e 0,855, respectivamente mostrando que o modelo de regressão linear proposto explica 85% da variância e apresenta 87% de capacidade preditiva. Entre os efeitos estudados no modelo linear apresentados na Tabela 8, constata-se que o aumento da atividade antioxidante no extrato de rooibos está diretamente associado a temperatura.

A capacidade redutora total (CRT) mede a atividade de redução dos compostos lipofílicos e hidrofílicos presentes no extrato frente aos íons de molibdênio e tungstênio. A CRT apresentou diferença estatística ($p < 0,001$) variando de 1406 ± 87 a 2234 ± 188 mg QE 100 g^{-1} . A análise de regressão linear múltipla mostrou que o modelo foi significativo ($p=0,049$) e ajustado adequadamente aos dados experimentais, apresentando $P_{\text{lack of fit}}=0,855$ e $R^2_{\text{adj}}=0,828$, mostrando que o modelo de regressão múltipla proposto foi capaz e apropriado para explicar 82% da variância. O valor de R^2 do modelo foi de 0,914 sendo satisfatório e apontando o modelo como de boa qualidade. Com base nos efeitos no modelo linear apresentados na Tabela 8, constata-se que o aumento da capacidade redutora total foi influenciado pelo tempo e temperatura, sendo que a interação tempo/temperatura influenciou de forma negativa.

Tabela 8 - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta para modelar os efeitos do tempo e temperatura na extração de compostos químicos e atividade antioxidante de extratos aquosos de roibos vermelho orgânico

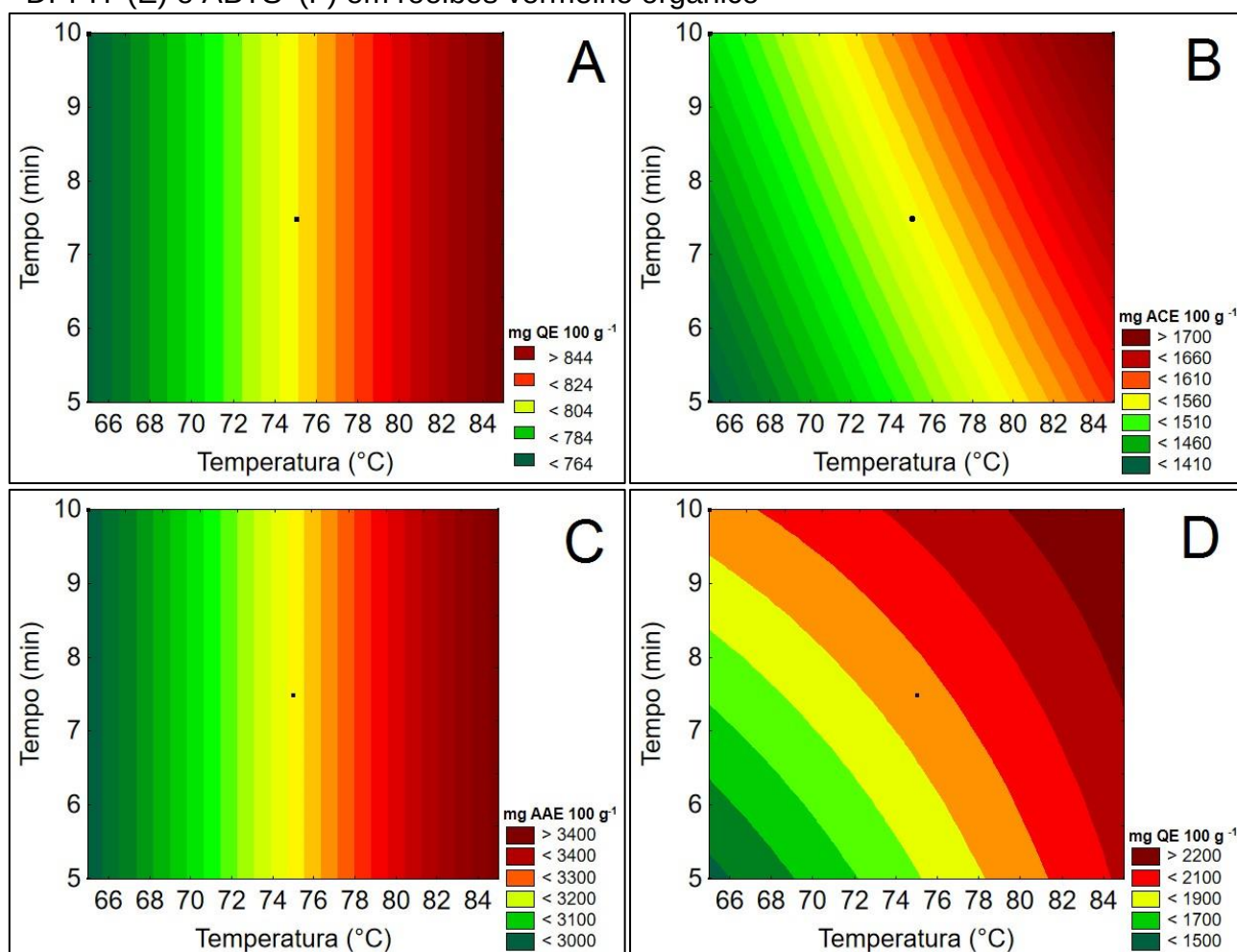
Componentes do modelo	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor	-95% Confiança	95% Confiança
Capacidade de captura do radical – ABTS*						
Constante	-7,70	52,51	-0,15	0,90	-233,65	218,24
Temperatura	2,74	0,65	4,23	0,05	-0,04	5,52
Tempo	8,09	2,59	3,12	0,09	-3,05	19,24
R ²	0,92					
R ² ajustado	0,88					
p valor (falta de ajuste)	0,81					
p valor (normalidade dos resíduos)	0,74					
Capacidade de captura do radical – DPPH*						
Constante	27,06	4,51	5,99	0,03	7,64	46,48
Temperatura	0,54	0,06	0,01	0,01	0,28	0,80
R ²	0,97					
R ² ajustado	0,96					
p valor (falta de ajuste)	0,92					
p valor (normalidade dos resíduos)	0,93					

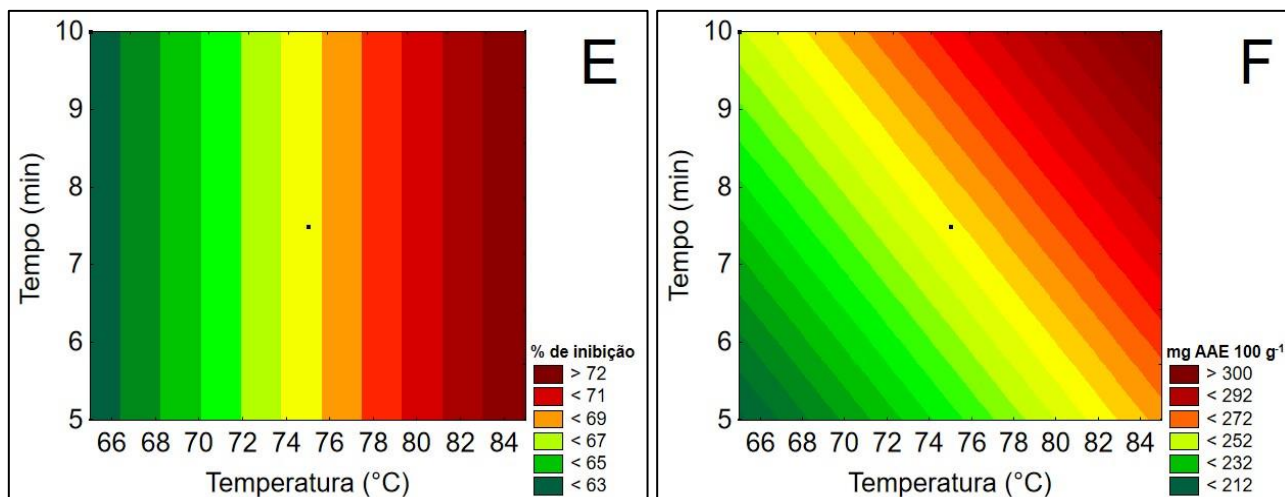
Capacidade antioxidante de redução do ferro						
Constante	1391,20	384,26	3,62	0,07	-262,15	3044,55
Temperatura	24,47	5,10	4,80	0,04	2,54	46,40
R ²	0,88					
R ² ajustado	0,85					
p valor (falta de ajuste)	0,78					
p valor (normalidade dos resíduos)	0,02					
Capacidade redutora total						
Constante	-2210,04	508,50	-4,35	0,05	-4397,94	-22,13
Temperatura	48,89	6,72	7,27	0,02	19,96	77,81
Tempo	309,48	64,34	4,81	0,04	32,63	586,33
Temperatura vs Tempo	-3,23	0,85	-3,80	0,06	-6,89	0,43
R ²	0,91					
R ² ajustado	0,83					
p valor (falta de ajuste)	0,05					
p valor (normalidade dos resíduos)	0,03					

Flavonoides						
Constante	473,34	51,30	9,23	0,01	252,61	694,07
Temperatura	4,45	0,68	6,54	0,02	1,52	7,38
R ²	0,86					
R ² ajustado	0,83					
p valor (falta de ajuste)	0,34					
p valor (normalidade dos resíduos)	0,58					
orto-difenólicos						
Constante	579,19	138,52	4,18	0,05	-16,82	1175,20
Temperatura	11,25	1,72	6,58	0,02	3,80	18,59
Tempo	17,53	6,83	2,57	0,12	-11,85	46,92
R ²	0,99					
R ² ajustado	0,88					
p valor (falta de ajuste)	0,46					
p valor (normalidade dos resíduos)	0,14					

Os gráficos de contorno apresentadas na Figura 11 mostram os efeitos do tempo e da temperatura na extração dos compostos fenólicos e influência na atividade antioxidante. A temperatura de forma isolada foi o fator que influenciou significativamente na extração dos flavonoides totais, atividade antioxidante de redução do ferro e atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•]. Contudo, a interação linear entre tempo/temperatura mostrou uma significativa e sinérgica influência no rendimento dos flavonóis, *orto*-difenólicos e na atividade antioxidante por meio da captura do radical ABTS[•]. Para González-Montelongo et al. (2010) o rendimento de extração dos compostos antioxidantes é influenciado principalmente pelas condições nas quais o processo de extração sólido-líquido é realizado.

Figura 11 - Efeito do tempo e temperatura de extração no teor de flavonoides totais (A), *orto*-difenólicos (B) e atividade antioxidante pelos métodos FRAP (C), CRT (D) DPPH[•] (E) e ABTS[•] (F) em rooibos vermelho orgânico





A atividade antioxidante do extrato aquoso de rooibos tem sido relacionada, principalmente, à presença de flavonoides (ERICKSON, 2003; JOUBERT et al., 2004; JOUBERT e BEER, 2011). Os flavonoides são compostos que consistem em quinze átomos de carbono, dispostos em configuração de C₆-C₃-C₆, os quais podem ser classificados em: antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavanonas e flavonóis. São compostos que apresentam elevada atividade antioxidante devido ao seu elevado potencial redox, o que lhes permite agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio e supressores de oxigênio. Os flavonoides apresentam também um potencial como quelante de metais (MERKEN e BEECHER, 2000; TSAO e YANG, 2003). No presente trabalho, a atividade antioxidante e capacidade redutora dos extratos de rooibos mostraram-se correlacionadas com o teor de compostos fenólicos totais ($r_{\text{DPPH}^{\bullet}}=0,808$ e $p=0,028$; $r_{\text{ABTS}^{\bullet}}=0,849$ e $p=0,016$, $r_{\text{FRAP}}=0,879$ e $p=0,001$, $r_{\text{CRT}}=0,901$ e $p=0,004$), flavonoides ($r_{\text{DPPH}^{\bullet}}=0,931$ e $p=0,002$; $r_{\text{ABTS}^{\bullet}}=0,761$ e $p=0,047$, $r_{\text{FRAP}}=0,943$ e $p=0,001$, $r_{\text{CRT}}=0,847$ e $p=0,016$), flavonóis ($r_{\text{FRAP}}=0,925$ e $p=0,002$, $r_{\text{CRT}}=0,762$ e $p=0,046$) e *orto*-difenólicos ($r_{\text{DPPH}^{\bullet}}=0,900$ e $p=0,006$; $r_{\text{ABTS}^{\bullet}}=0,817$ e $p=0,025$, $r_{\text{FRAP}}=0,896$ e $p=0,006$, $r_{\text{CRT}}=0,805$ e $p=0,028$).

Dentre os compostos quantificados por LC-ESI-MS/MS constatou-se correlação positiva entre atividade antioxidante de captura dos radicais DPPH[•] e ABTS[•], como para capacidade redutora do ferro e capacidade redutora total (Figura 12) indicando uma relação diretamente proporcional entre o aumento do teor destes compostos contidos na amostra e a ampliação da atividade antioxidante e capacidade redutora dos extratos aquosos de rooibos fermentado.

Figura 12 – Correlação entre compostos quantificados por LC-ESI-MS/MS e atividade antioxidante frente aos radicais DPPH[•] (A), ABTS[•] (B), capacidade redutora do ferro (C) e capacidade redutora total (D) em extratos aquosos de roibos fermentado (Continua)

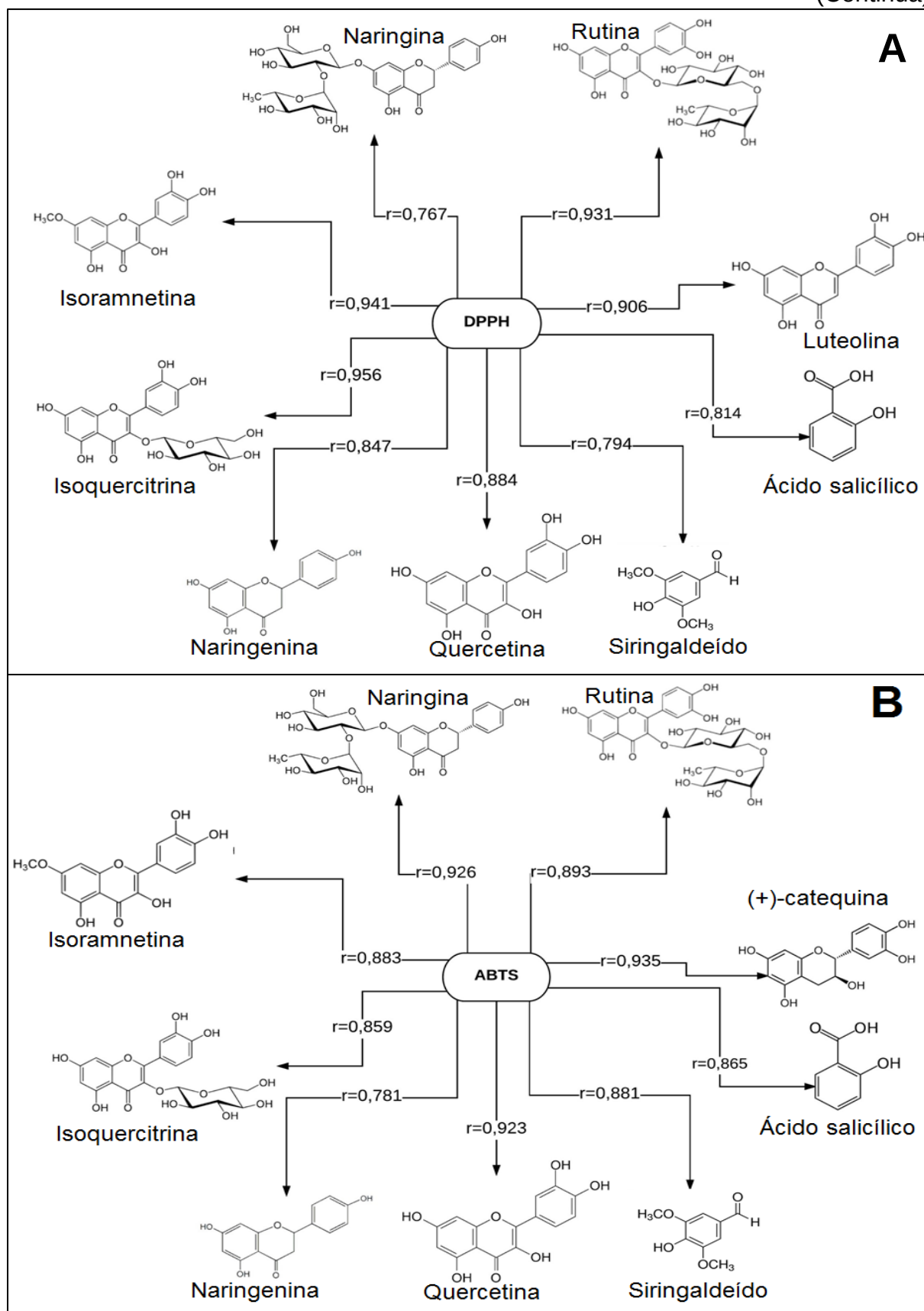
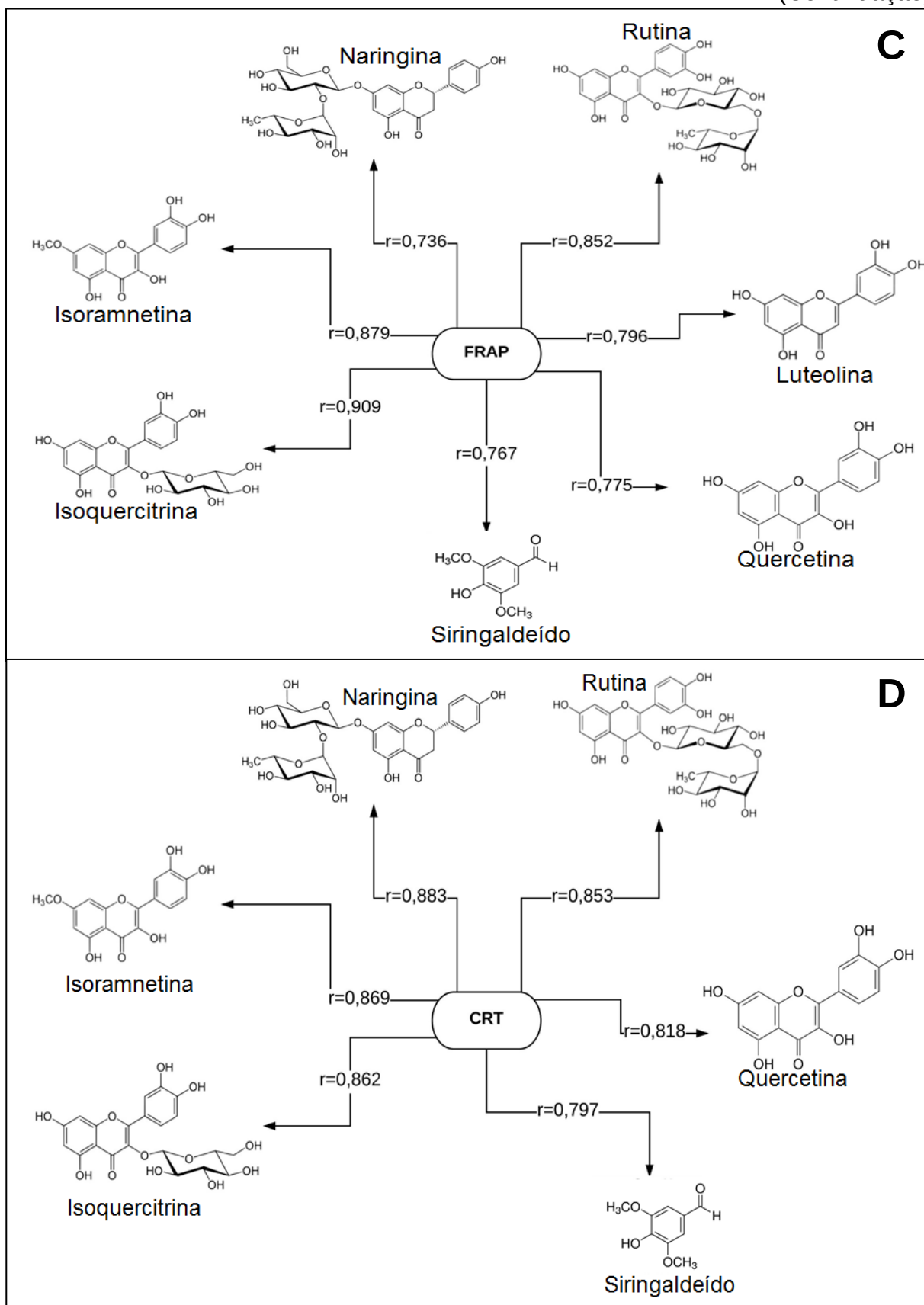


Figura 12 – Correlação entre compostos quantificados por LC-ESI-MS/MS e atividade antioxidante frente aos radicais DPPH[•] (A), ABTS[•] (B), capacidade redutora do ferro (C) e capacidade redutora total (D) em extratos aquosos de roibos fermentado (Continuação)



O conteúdo de luteolina foi bem correlacionado com DPPH[•] ($r=0,906$) e FRAP ($r=0,796$), enquanto (+)-catequina apresentou forte correlação com ABTS[•] ($r=0,935$), o ácido salicílico e naringenina foram bem correlacionados com ABTS[•] ($r=0,865$ e $r=0,781$) e DPPH[•] ($r=0,814$ e $r=0,847$) respectivamente. Os teores de quercetina, Isoramnetina, isoquercitrina, naringina, rutina e siringaldeído foram correlacionados com ABTS[•] ($r=0,923$, $r=0,883$, $r=0,859$, $r=0,926$, $r=0,893$, e $r=0,881$ respectivamente), DPPH[•] ($r=0,884$, $r=0,941$, $r=0,956$, $r=0,767$, $r=0,931$, e $r=0,794$ respectivamente), FRAP ($r=0,775$, $r=0,879$, $r=0,906$, $r=0,736$, $r=0,852$, $r=0,767$ respectivamente) e capacidade redutora total ($r=0,818$, $r=0,869$, $r=0,862$, $r=0,883$, $r=0,853$, $r=0,797$ respectivamente) todas apresentando $p<0,05$. Assim, é possível afirmar que tais compostos estão diretamente ligados as funcionalidades *in vitro* apresentadas pelo extrato aquoso de rooibos.

A forte atividade antioxidante frente a um radical livre exercida pela quercetina é devido à combinação de cinco grupos hidroxilas sendo que dois desses grupos estão na posição *orto*. Além da presença de dupla ligação no anel heterocíclico (VAN ACKER et al., 1996). A estabilização do radical ocorre pela deslocalização de elétrons na estrutura aromática. Formas glicosiladas de quercetina com diferentes açúcares como isoquercitrina (quercetina-3-O-glucosídeo) e rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo), apresentam características semelhantes por serem grupos doadores de elétrons. A glicosilação da quercetina apresenta influencia na sua absorção *in vivo* tanto de forma benéfica quando ligado a glicose, quanto de forma não favorável como é o caso da glicolização por rutinosídeo (CAO et al., 1997; HEIM et al., 2002).

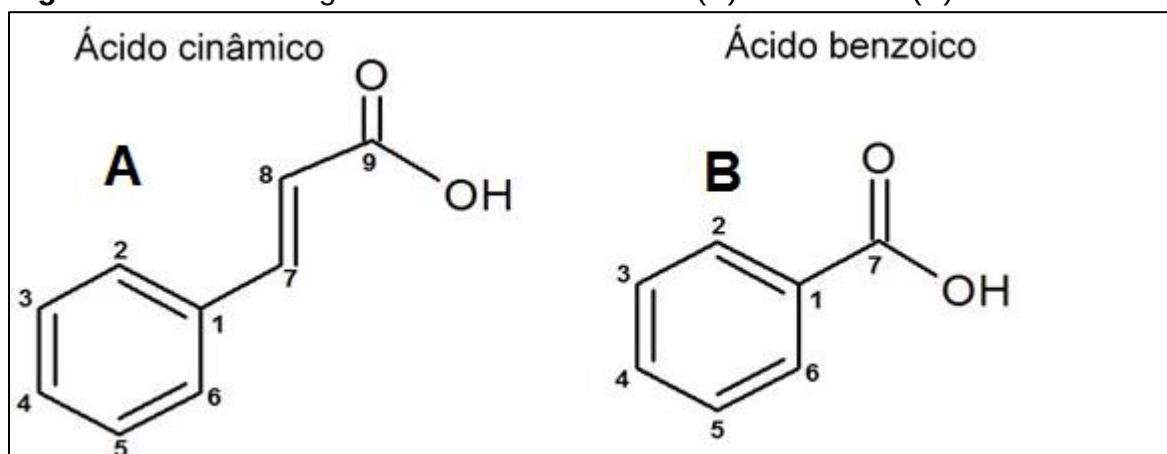
A catequina, composto pertencente ao grupo dos flavan-3-ols, tem por característica a capacidade redutora de metais e atividade de eliminação de radicais livres, que se encontra diretamente ligado ao número (5) e posição dos grupos hidroxilas presentes em sua estrutura química (ARON e KENNEDY, 2008).

Luteolina é um antioxidante natural com alta atividade de eliminação de radicais livres (SEELINGER, et al., 2008). De acordo com Cao et al. (1997) a capacidade antioxidante da luteolina está diretamente ligada à presença de 4 grupos hidroxila contidos em sua estrutura com o diferencial da presença de duas hidroxilas na posição *orto* o que faz com que esse composto apresente maior atividade antioxidante em relação a outros compostos que também contém 4 hidroxilas em sua estrutura, como é o caso do kaempferol, porém sem presença de hidroxila na posição *orto*.

De modo geral a ação antioxidante dos ácidos fenólicos é dependente da quantidade de grupos hidroxila e/ou metoxi presentes em sua estrutura, ou seja, a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos aumenta com o grau de hidroxilação e/ou metoxilação. A posição que se encontra os grupos hidroxila e/ou metoxi na estrutura faz com que o potencial antioxidante varie de mais para menos efetivo na seguinte ordem *orto*, *meta* e *para*. Outro parâmetro que influencia na atividade antioxidante de ácidos fenólicos é sua origem, sendo que os compostos derivados do ácido cinâmico tendem a ser mais eficientes do que os originados do ácido benzoico (RICE-EVANS et al., 1996; NATELLA et al., 1999; GRANATO et al., 2011).

De acordo com Rice-Evans et al. (1996), o ácido gálico (3,4,5-triidroxibenzóico) apresenta uma forte atividade antioxidante, devido ao poder nucleofílico exercido por seus três grupos hidroxilas disponíveis. Menor atividade é observada do ácido 3,4-diidroxidobenzoico que apresentam duas hidroxilas ligadas no anel aromático na posição *orto*. Em relação a atividade antioxidante apresentada pelo ácido cafeico, (ácido 3,4-dihidroxicinâmico) o qual também apresenta dois grupos hidroxilas ligados ao anel benzênico na posição *orto*, mostra-se superior em relação ao ácido 3,4-diidroxidobenzoico. O ácido cafeico por ser um ácido cinâmico (Figura 13A) apresenta nove átomos de carbono (C_6-C_3) no qual a presença de uma dupla entre os carbonos 7 e 9 torna possível a deslocalização de elétrons adicionais em relação aos ácidos benzoicos (Figura 13B) que por sua vez possui sete átomos de carbono (C_6-C_1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza, tendo seu potencial antioxidante restritamente ligados ao número e posição dos grupos funcionais no anel aromático (MARINOVA e YANISHILIEVA, 1992; RICE-EVANS et al., 1996).

Figura 13 - Estrutura geral dos ácidos cinâmico (A) e benzoico (B)

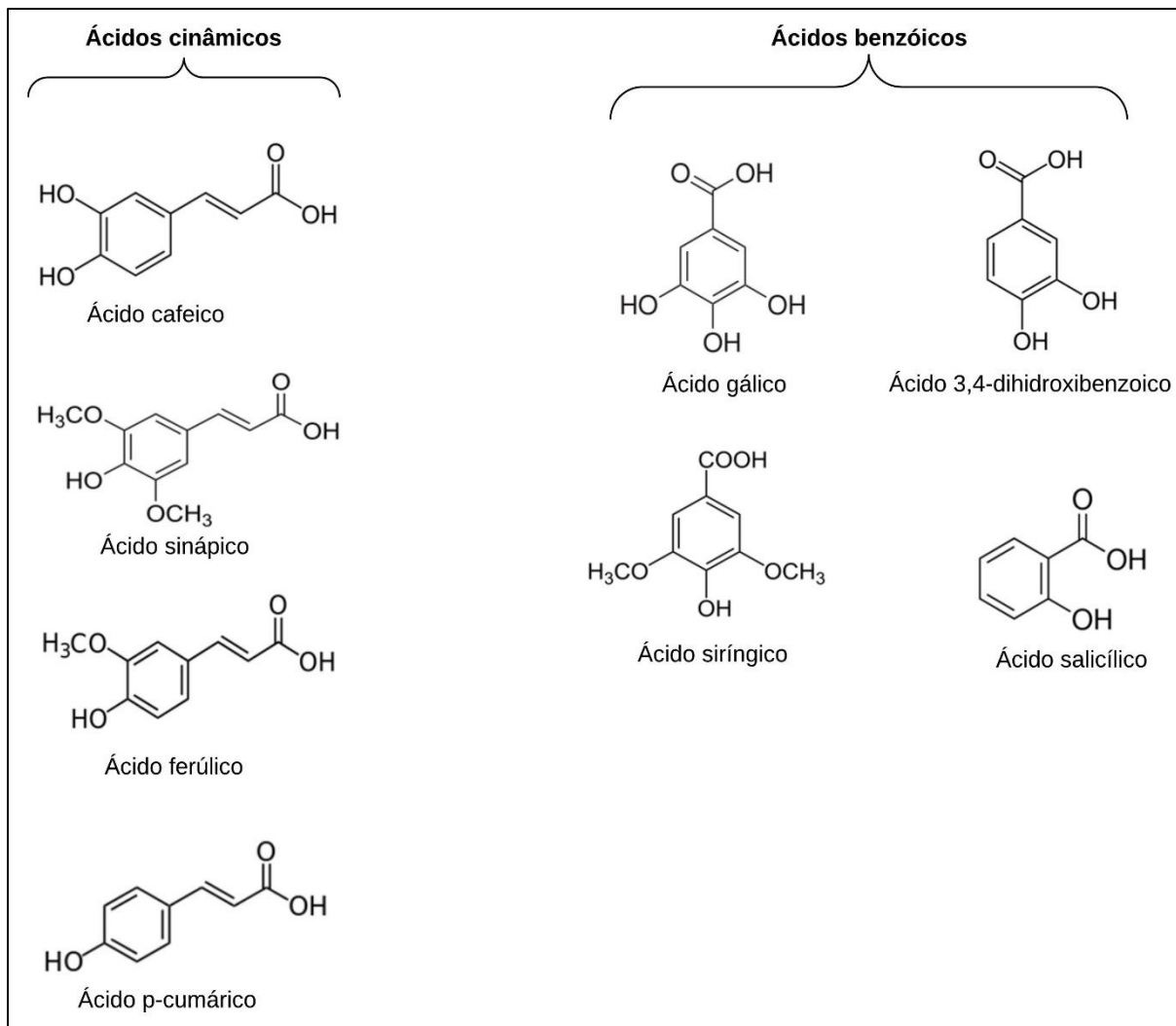


Fonte: Autor

Os ácidos que contêm apenas um grupo hidroxila ligado ao anel como o ácido *p*-cumárico (4-hidroxicinâmico) apresenta fraca atividade antioxidante (ANDERSEN, 2005). Quando ocorre a introdução de um grupo metoxila na posição *orto* em relação a OH presente no anel aromático, aumenta a estabilidade do composto e assim o seu potencial antioxidante. Por essa razão o ácido ferúlico é mais eficaz que o ácido *p*-cumárico no que diz respeito a atividade antioxidante. A presença do grupo metoxi na posição *orto* em relação a hidroxila no ácido ferúlico permite o aumento da estabilização de espécie reativa por meio da deslocalização de elétrons ariloxilo após a doação de hidrogénio do grupo hidroxila (CUVELIER et al., 1992; RICE-EVANS et al., 1996). O ácido sinápico apresenta atividade antioxidante superior ao ácido ferúlico devido a presença de dois grupos metoxi existentes na estrutura aromática na posição *orto* em relação à OH. Cuvelier et al. (1992) afirmam que a eficiência antioxidante é aumentada com a introdução de dois grupos metoxi ambos na posição *orto* em relação a hidroxila presente no anel por tornar possível a deslocalização de maior número de elétrons pela molécula.

Considerando todos os fatores que podem influenciar no potencial antioxidante dos ácidos fenólicos, como número e posição de grupos funcionais e origem (cinâmico ou bezoico), a atividade antioxidante apresentada pelos compostos estudados no presente estudo (Figura 14), possuem a seguinte ordem: ácido gálico > caféico > 3,4-dihidroxibenzóico > sinápico > siríngico > ferúlico > *p*-cumárico > salicílico.

Figura 14 - Ácidos fenólicos quantificados por LC-ESI-MS/MS em extrato aquoso de rooibos vermelho orgânico



Fonte: Autor

5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os setes extratos obtido em tempo e temperatura diferente como estabelecido pelo delineamento experimental, foram liofilizados e avaliados em relação a sua capacidade antimicrobiana, os quais nas concentrações de 7,81 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não foram eficazes em inibir o crescimento dos micro-organismos testados. Estudos mostram que *A. linearis* não apresentou atividade antimicrobiana notável (VAN VUUREN, 2008; NCUBE et al., 2012). De acordo com van Wyk et al. (2009) o extrato de *A. linearis* é mais comumente conhecido por sua atividade antioxidante e antimutagênica. No estudo de Scheepers (2001) o extrato aquoso de rooibos fermentado na concentração de 5.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou inibição de 69% no

crescimento de *E. coli*, porém, esta concentração é bem superior a aplicada no presente trabalho.

Rabanal et al. (2002) e Karaman et al. (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e empregaram concentrações de 31,25 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e Chandrasekaran e Venkatesalu (2004) utilizaram concentrações de extratos de *Syzygium jambolanum* nas concentrações entre 500 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como já bem salientada por Simpson et al. (2013), quando a atividade antimicrobiana de um extrato natural excede 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o uso terapêutico de tais extratos é impedido, o que implica que as substâncias contidas no extrato, que não apresenta atividade antimicrobiana, devem ser removidas para aumentar a atividade do mesmo, desta forma obtendo um extrato purificado. Uma alternativa plausível para aumentar a eficácia sobre a atividade antibacteriana de extrato de rooibos aquoso (principalmente em relação a bactérias Gram-positivas) é a combinação com penicilina G ou nistatina (HÜBSCH et al., 2014).

5.4 ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS ENZIMAS α -AMILASE E α -GLUCOSIDASE

As enzimas α -amilase e α -glucosidase são fatores-chave do metabolismo de carboidratos em seres humanos, de modo que a busca por produtos naturais que apresentam potencial antidiabético é de interesse primordial. Em geral, todas as amostras analisadas mostraram valores similares de extrato para inibir 50% da atividade enzimática (IC_{50}), independente do tempo e temperatura de extração, variando de 5 a 6 e de 0,5 a 0,6 mg de extrato de rooibos liofilizado mL^{-1} para α -amilase e α -glucosidase, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9 - Capacidade inibitória dos extratos de rooibos nas enzimas α -amilase e α -glucosidase

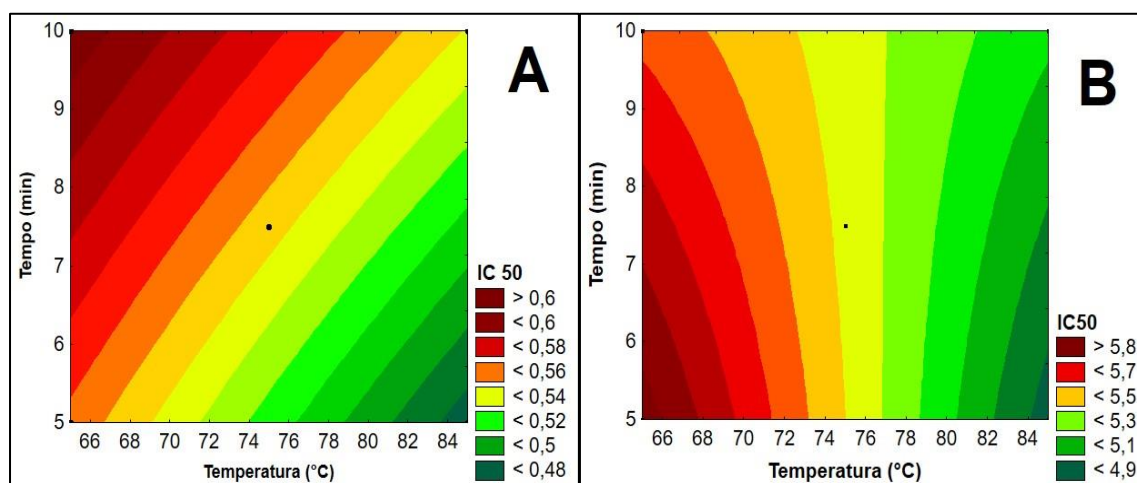
Temperatura	Tempo	Amostras	$\text{IC}_{50}^* \alpha\text{-amilase}$ (mg AL mL^{-1})	$\text{IC}_{50}^* \alpha\text{-glucosidase}$ (mg AL mL^{-1})
-1 (65)	-1(5)	A	6,11	0,58
-1(65)	1(10)	B	5,73	0,61
1 (85)	-1(5)	C	5,01	0,48
1 (85)	1(10)	D	5,28	0,56
0 (75)	0 (7,5)	E	5,33	0,56
0 (75)	0 (7,5)	F	5,06	0,52
0 (75)	0 (7,5)	G	5,10	0,50

AL=Amostra liofilizada de rooibos; *=Capacidade inibitória de 50%.

A α -glucosidase é produzida pelos enterócitos no epitélio do intestino delgado e é responsável por catalisar a clivagem de glicose a partir de dissacarídeos. Portanto, os inibidores desta enzima são desejáveis para controlar diabetes tipo II (GÜDER et al., 2015). Estes resultados são relevantes já que os extratos de roibos vermelho orgânico mostraram-se capazes de inibir a ação da α -amilase e α -glucosidase *in vitro*, o que implica que extratos aquosos de roibos (chá) são capazes de retardar a digestão de hidratos de carbono (absorção de glicose) suprimindo assim a hiperglicemia pós-prandial. Os valores de IC_{50} adquiridos no presente estudo mostram-se superiores do que os determinados em casca, polpa e sementes de jabuticaba (ALEZANDRO et al., 2013).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi aplicada e gráficos são mostrados nas Figuras 15A e 15B. O modelo proposto pela MSR para a inibição da α -glucosidase foi adequada para descrever os dados experimentais, já que 70,2% da variabilidade dos dados foi explicada, não foi observada nenhuma falta de ajuste ($p=0,286$), e nenhuma tendência evidente na análise de resíduos ($p=0,166$). A temperatura ($p=0,096$) e de forma menos significativa, a interação entre o tempo e temperatura ($p=0,199$) foram os responsáveis pelos efeitos observados. Por outro lado, a inibição α -amilase não foi corretamente descrita pelo modelo MSR apresentando $R^2_{adj}=0,439$ e $p_{normalidade}=0,012$. Por isso, este modelo não pode ser utilizado para fins de predição.

Figura 15 – Efeito do tempo e temperatura na capacidade inibitória das enzimas α -glucosidase (A) e α -amilase (B)



No geral, a temperatura ($p=0,063$) atuou diminuindo o valor de IC_{50} , enquanto que o tempo de extração ($p=0,152$) e a interação entre o tempo e temperatura ($p=0,155$) aumentou o valor de IC_{50} . Alu'datt et al. (2015) extraiu os compostos fenólicos de *Thymus vulgaris* L. e verificou que a temperatura desempenhava o papel mais importante e significativo ($p<0,05$) na inibição da α -glucosidase, em comparação com o tempo de extração. Os mesmos autores, observaram a maior taxa de inibição à 40°C (73,76%) e menor em 60 °C (20,94%). Além disso, o tempo de extração (3, 6, e 8 h) não alterou a inibição da α -amilase.

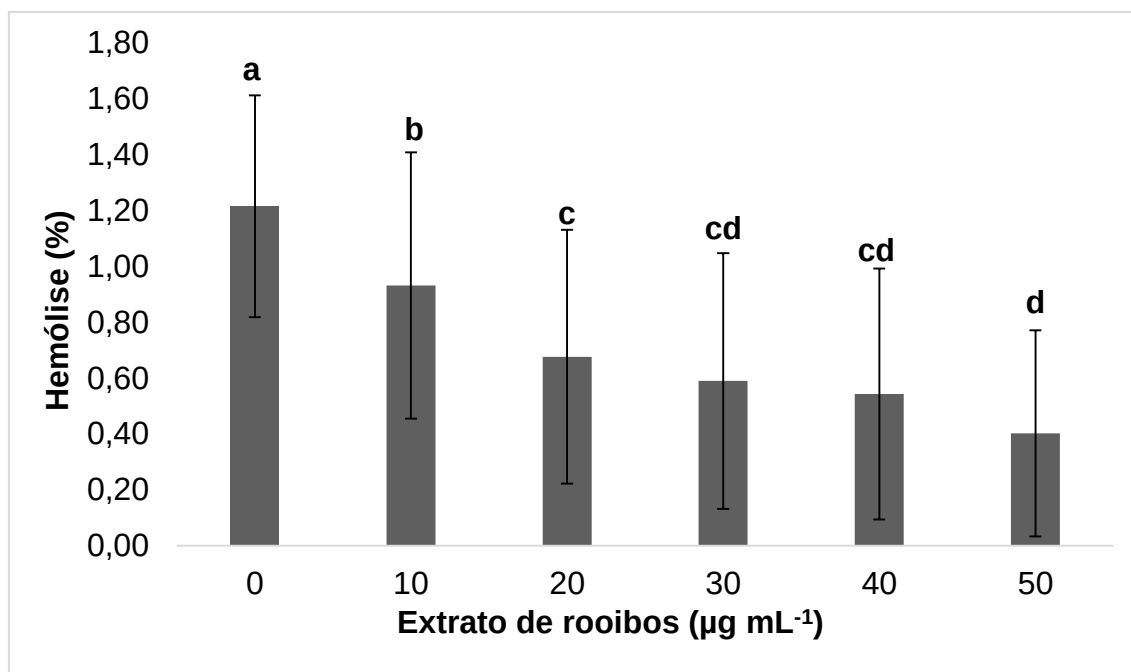
A análise de correlação mostrou que os compostos fenólicos responsáveis pela inibição da enzima α -amilase (IC_{50}) foram ($p<0,05$) Isoramnetina ($r=-0,783$), isoquercitrina ($r=-0,823$), luteolina ($r=-0,783$), ácido salicílico ($r=-0,679$), siringaldeído ($r=-0,750$), enquanto para inibição da α -glucosidase ($p<0,05$) foram siringaldeído ($r=-0,685$), isoquercitrina ($r=-0,610$) e luteolina ($r=-0,595$). Os valores adquiridos para α -amilase (IC_{50}) foram diretamente correlacionados com os compostos fenólicos totais ($r=-0,871$, $p=0,010$), teor de flavonoides total ($r=-0,783$, $p=0,037$), flavonóis totais ($r=-0,784$, $p=0,037$), FRAP ($r=-0,819$, $p=0,024$), e capacidade redutora total ($r=-0,857$, $p=0,014$), enquanto α -glucosidase (IC_{50}) mostrou-se associada com α -amilase ($r=0,808$, $p=0,028$), flavonóis total ($r=-0,686$, $p=0,089$) e FRAP ($r=-0,722$, $p=0,067$). Este é o primeiro relato na literatura que mostra os principais compostos fenólicos de *Aspalathus linearis* vermelho orgânico responsáveis pela inibição da α -glucosidase e α -amilase. Estes resultados corroboram aos observados anteriormente, que os compostos fenólicos são capazes de inibir estas enzimas e podem contribuir no controle da hiperglicemia (GÜDER et al., 2015; JIN et al., 2015).

5.5 PERFIL HEMOLÍTICO DO EXTRATO AQUOSO DE ROOIBOS VERMELHO

Como apresentado na Figura 16, o extrato de rooibos ($T=85$ °C, $t=10$ min) apresentou comportamento não lítico frente aos eritrócitos de sangue humano com tipagem O^+ . Esses resultados demonstram que o extrato de rooibos tem interação benéfica com os eritrócitos, sugerindo efeito protetor, ou seja, diminuindo a ocorrência de hemólise mínima nas células eritrocitárias. A hemólise é caracterizada por ruptura do eritrócito com liberação de hemoglobina. Um extrato natural que apresente efeito inibitório da hemólise é desejado tendo em vista que a presença de hemoglobina livre no plasma pode acarretar em problemas à saúde como danos em diferentes órgãos,

tais como fígado, rins e coração uma vez que não há o transporte de O₂ adequado (SAVITSKY et al., 1978; CARVALHO et al., 2007)

Figura 16 – Perfil não hemolítico do extrato aquoso de rooibos vermelho com tipagem O⁺



Nota: Letras diferentes entre as concentrações representam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste Fisher LSD.

A partir da Figura 16 observa-se que ocorreu uma diminuição da atividade hemolítica com o aumento da concentração do extrato aquoso de rooibos. Zhu et al. (2002) avaliaram o efeito do consumo de bebida de cacau (*Theobroma cacao* L.) em humanos. Eles constataram associação do consumo de bebida de cacau com a redução da taxa de hemólise de eritrócitos induzida pela adição de uma solução de 200 mmol L⁻¹ do radical ABTS[•] na proporção 1:1 (v/v) em eritrócitos a 10% em solução tampão fosfato (pH 7,4). As amostras foram obtidas a partir de indivíduos adultos saudáveis, elevando o tempo de hemólise máxima por pelo menos 2 horas em relação a eritrócitos de adultos. Os mesmos autores, afirmam que flavonoides isolados de extrato de cacau, (-)-epicatequina e (+)-catequina, apresentaram efeito protetor contra a hemólise induzida por radicais livres (ABTS[•]), tendo o efeito potencializado com o aumento da concentração dos flavonoides. Tal tendência corrobora com o efeito de dose-dependência constatado no presente estudo. De forma similar, Wang et al. (2016) avaliaram o efeito protetor do resveratrol glicosilado, quercetina, vinho tinto e

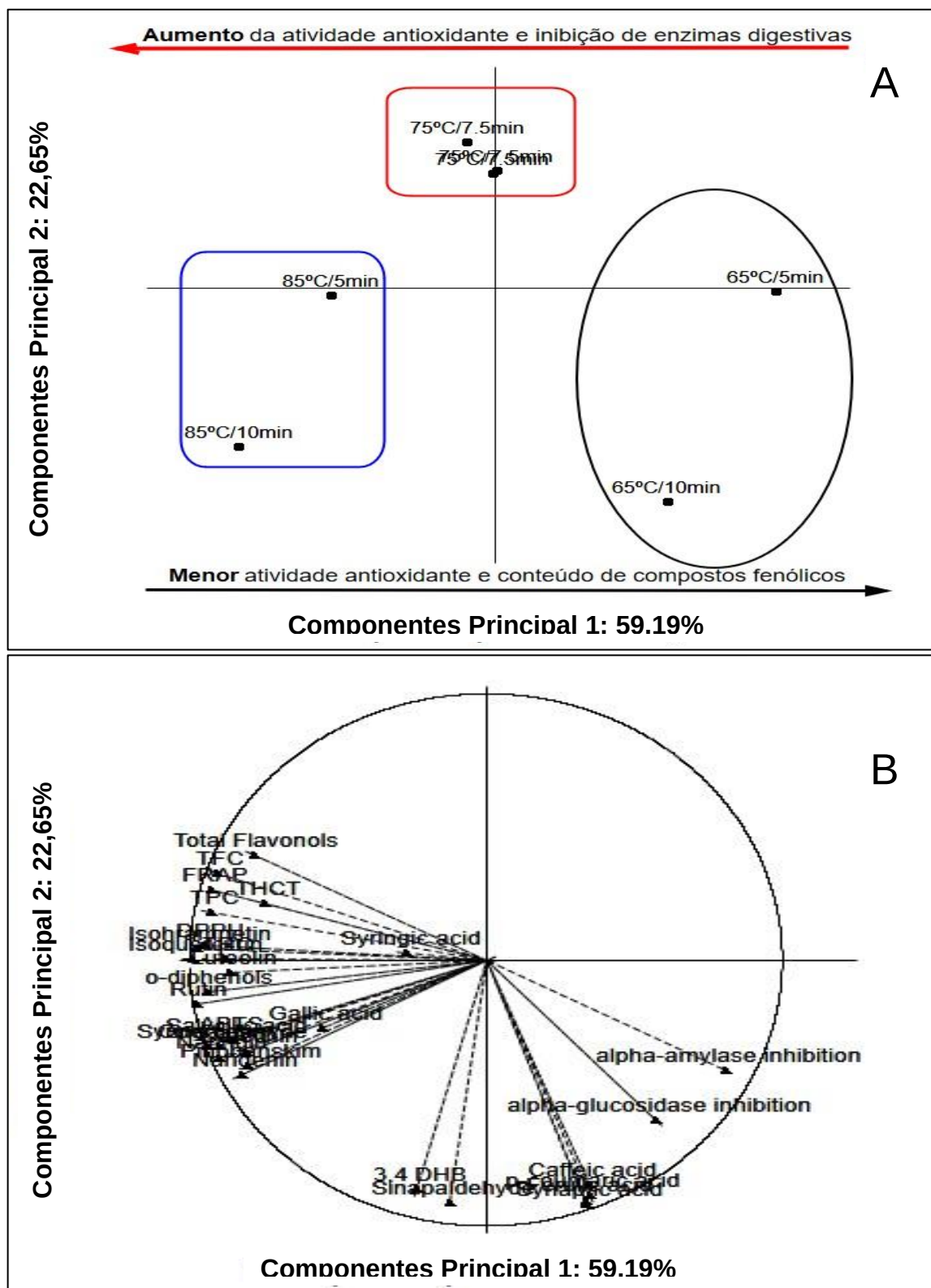
suco de uva roxa frente à hemólise e atividade antioxidante em eritrócitos humanos e verificaram que todas amostras testadas apresentaram efeito protetor nas células submetidas ao estresse induzido por hipoxantina-xantina oxidase.

A capacidade protetora apresentada pelo extrato de rooibos possivelmente se deve a sua composição fenólica. A capacidade protetora em eritrócitos já foi constatada em extratos ricos em compostos fenólicos de diversas fontes, incluindo chá verde de *Camellia sinensis* (ZHANG et al., 1997), cacau *Theobroma cacao* L. (ZHU et al., 2002), e extrato de casca de pinheiro (SHARMA et al., 2003) e em compostos fenólicos isolados como kaempferol, quercetina e rutina (BORRA et al., 2013).

5.6 CORRELAÇÃO PELA ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS

Devido ao grande número de variáveis de resposta as quais foram analisadas em todos os sete extratos aquosos de rooibos vermelho orgânicos, uma projeção multivariada das amostras foi representada graficamente (PC1 por PC2) e os resultados são mostrados na Figura 17A onde pode-se notar uma nítida separação dos extratos apontando a temperatura de extração como o fator mais discriminador destas amostras. Usando a análise de fator de cargas (Figura 17B) em conjunto com a Figura 17A, é possível observar que os chás rooibos extraídos a 85 °C apresentaram a maior atividade antioxidante medida por todos os ensaios, maiores teores de compostos fenólicos (espectrofotometria e pelos dados adquiridos por LC-ESI-MS/MS) e menores valores de CI_{50} para as enzimas digestivas testadas. Por outro lado, rooibos extraídos a 65 °C apresentou o comportamento oposto, enquanto rooibos extraídos a 75 °C apresentou valores intermédios para as respostas. Este resultado indica claramente que a temperatura de extração é o principal fator responsável por proporcionar uma maior extração de compostos funcionais a partir de rooibos vermelho orgânico.

Figura 17 - Análise por componentes principais para as amostras de extratos aquosos (A) e para as variáveis de resposta (B)



6 CONCLUSÕES

No presente estudo, verificou-se que o tempo e a temperatura de extração apresentam forte efeito na extração do conteúdo de compostos presentes no rooibos fermentado.

A condição de extração que proporcionou a maior extração de compostos fenólicos no extrato aquoso de rooibos foi alcançada a 85 °C durante 10 min.

Em geral, os tempos de extração testados (5-10 min) não representam quaisquer efeitos estatisticamente significativos em alguns ensaios de atividade antioxidante (DPPH[•] e FRAP).

Entre as classes de compostos determinadas o tempo de extração não apresentou efeito significativo no aumento dos teores dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais e taninos condensados.

Não foram constatados efeitos significativos do tempo na atividade antimicrobiana e na capacidade de inibição das enzimas α -amilase e α -glucosidase.

A metodologia de superfície de resposta mostrou-se adequada para avaliar os efeitos do tempo e temperatura de extração em extrato aquoso de rooibos fermentado.

Os modelos matemáticos propostos tanto para maior extração dos flavonoides totais e *orto*-difenois totais, quanto para o aumento da atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•] e ABTS[•], capacidade redutora total e capacidade redutora do ferro apresentaram-se de forma satisfatória apresentando $R^2 > 0,85$ e $R^2_{adj} > 0,80$.

O extrato de rooibos apresentou interação benéfica com eritrócitos humanos, sugerindo efeito protetor, ou seja, diminuindo a ocorrência de hemólise nas células eritrocitárias.

Observou-se uma redução hemolítica com o aumento da concentração de extrato de rooibos fermentado indicando efeito de dose dependente na proteção das células eritrocitárias

A temperatura mais elevada de extração proporcionou um chá com maiores teores de compostos bioativos e maior funcionalidade dos extratos aquosos de rooibos vermelhos orgânicos.

Os resultados apresentados nesse trabalho podem ser utilizados pelos consumidores e pelas indústrias alimentares que pretendem desenvolver bebidas à base de rooibos vermelho.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar a influência de outros compostos presentes em rooibos vermelho frente a atividade antioxidante, poder redutora e capacidade inibitória de enzimas digestivas.

Utilizar um sistema biológico (gema de ovo) para avaliação da atividade inibitória da oxidação lipídica em extrato aquoso de rooibos.

Testar a atividade anticancerígena *in vitro* e atividade antioxidante em eritrócitos humanos *in vitro*.

Utilizar diferentes solventes ou proporções entre eles que possibilite maior extração dos composto fenólicos.

Avaliar a estabilidade térmica dos compostos presentes em extrato aquoso de rooibos vermelho.

8 REFERÊNCIAS

- ALEZANDRO M.R, DUBÉ P, DESJARDINS Y, LAJOLO F.M, GENOVESE M.I. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 468-477, 2013.
- ANDERSEN, O.M. e MARKHAM, K.R. (Ed.). **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. CRC Press, 2005.
- ANTONINI, E. e BRUNORI, M. **Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands**. North-Holland, 1971.
- APAK, R., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., ÇAPANOĞLU, E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 1028-1045, 2016.
- APAK, R., GORINSTEIN, S., BÖHM, V., SCHAICH, K. M., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 5, p. 957-998, 2013.
- ARON, P.M. e KENNEDY, J.A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 1, p. 79-104, 2008.
- BARANSKA, M., SCHULZ, H., JOUBERT, E., MANLEY, M. In situ flavonoid analysis by FT-Raman spectroscopy: Identification, distribution, and quantification of aspalathin in green rooibos (*Aspalathus linearis*). **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 22, p. 7716-7721, 2006.
- BHATTACHARYA, U., MUKHOPADHYAY, S., GIRI, A.K. Comparative antimutagenic and anticancer activity of three fractions of black tea polyphenols thearubigins. **Nutrition and Cancer**, v. 63, n. 7, p. 1122-1132, 2011.
- BHEBHE, M., CHIPURURA, B., MUCHUWETI, M. Determination and comparison of phenolic compound content and antioxidant activity of selected local Zimbabwean herbal teas with exotic *Aspalathus linearis*. **South African Journal of Botany**, v. 100, p. 213-218, 2015.
- BEELDERS, T., SIGGE, G.O., JOUBERT, E., DE BEER, D., DE VILLIERS, A. Kinetic optimisation of the reversed phase liquid chromatographic separation of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) phenolics on conventional high performance liquid chromatographic instrumentation. **Journal of Chromatography A**, v. 1219, p. 128-139, 2012.
- BELTRÁN-DEBÓN, R., RULL, A., RODRÍGUEZ, S.F., ISWALDI, I., HERRANZ, L.M., ARAGONÈS, G., CAMPS, J., ALONSO, V.C., MENÉNDEZ, J.A., MICOL, V., SEGURA, C.A., JOVEN, J. Continuous administration of polyphenols from aqueous rooibos (*Aspalathus linearis*) extract ameliorates dietary-induced metabolic disturbances in hyperlipidemic mice. **Phytomedicine**, v. 18, p. 414-424, 2011.

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

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

BERNAYS, E.A., COOPER-DRIVER, G.A., BILGENER, M. **Herbivores and Plant Tannins**. Academic Press, 1989.

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

BORRA, S.K., GURUMURTHY, P., MAHENDRA, J. Antioxidant and free radical scavenging activity of curcumin determined by using different in vitro and ex vivo models. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 36, p. 2680-2690, 2013.

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

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C.L.W.T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Café, Cevada Chá, Erva-Mate e Produtos Solúveis. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 ago.2005.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BURRIS, K.P., DAVIDSON, P.M., STEWART J.R, C.N., HARTE, F.M. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extracts against *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. M456-M462, 2011.

CABRERA, T.C. e SERRANO, D.S. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. **Revista Cubana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular**, v. 14, n. 1, 2014.

CANABADY-ROCHELLE, L.L., Harscoat-Schiavo, C., Kessler, V., Aymes, A., Fournier, F., Girardet, J.M. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. **Food Chemistry**, v. 183, p. 129-135, 2015.

CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749-760, 1997.

CARVALHO, E.B., BORGES, E.L., CARLOS, L.M., SILVA, M.A.M., MAGALHÃES, S.M., GOMES, F., CARVALHO, M.J.C., QUIXADÁ, A.T.S., PITOMBEIRA, M. H. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrado de hemácias. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 149-152, 2007.

CHAKRABORTY, S., RAO, P.S., MISHRA, H.N. Kinetic modeling of polyphenoloxidase and peroxidase inactivation in pineapple (*Ananas comosus* L.) puree during high-pressure and thermal treatments. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 57-68, 2015.

CHAN, E.W.C., LIM, Y.Y., CHONG, K.L., TAN, J.B.L., WONG, S.K. Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 2, p. 185-189, 2010.

CHANDRASEKARAN, M., E VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 105-108, 2004.

CHATTERJEE, P., CHANDRA, S., DEY, P., BHATTACHARYA, S. Evaluation of anti-inflammatory effects of green tea and black tea: A comparative *in vitro* study. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 3, n. 2, p. 136, 2012.

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

CHACCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian tissues. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CHEN, G.L., CHEN, S.G., XIE, Y.Q., CHEN, F., ZHAO, Y.Y., LUO, C.X., GAO, Y.Q. Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to *in vitro* digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 243-259, 2015.

CHEN, W., SUDJI, I.R., WANG, E., JOUBERT, E., VAN WYK, B.E., WINK, M. Ameliorative effect of aspalathin from rooibos (*Aspalathus linearis*) on acute oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. **Phytomedicine**, v. 20, n. 3, p. 380-386, 2013.

CUVELIER, M.E., RICHARD, H., BERSET, C. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 2, p. 324-325, 1992.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts**; approved standards, *Document M27-A3*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2008.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; approved standards-6th ed. *Document M7-A6* performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

COETZEE, G., JOUBERT, E., VAN ZYL, W.H., VILJOEN-BLOOM, M. Improved extraction of phytochemicals from rooibos with enzyme treatment. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 4, p. 393-401, 2014.

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

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

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

DLUDLA, P.V., MULLER, C.J F., LOUW, J., JOUBERT, E., SALIE, R., OPOKU, A.R., JOHNSON, R. The cardioprotective effect of an aqueous extract of fermented rooibos (*Aspalathus linearis*) on cultured cardiomyocytes derived from diabetic rats. **Phytomedicine**, v. 21, n. 5, p. 595-601, 2014.

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

DUTHIE, G.G., GARDNER, P.T., KYLE, J.A.M. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 3, p. 599-603, 2003.

ERICKSON, L. Rooibos tea: Research into antioxidant and antimutagenic properties. **HerbalGram**, v. 59, p. 34-45, 2003.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43 n. 1, p. 61-68, 1997.

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

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

GONZÁLEZ-MONTELONGO, R., LOBO, M.G., GONZÁLEZ, M. The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. **Separation and Purification Technology**, v. 71, n. 3, p. 347-355, 2010.

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

GRANATO, D., KATAYAMA, F.C.U., DE CASTRO, I.A. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 366-373, 2011.

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

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

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

GÜDER, A.; GÜR, M.; ENGIN, M.S. Antidiabetic and antioxidant properties of bilberry (*Vaccinium myrtillus* Linn.) fruit and their chemical composition. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 17, n. 2, p. 387-400, 2015.

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

HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

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

HERTOG, M.G.L., HOLLMAN, P.C.H., VENEMA, D.P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1591-1598, 1992.

HOENSCH, H.P. e OERTEL, R. The value of flavonoids for the human nutrition: Short review and perspectives. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 3, p. 8-14, 2015.

HOLLMAN, P.C., DE VRIES, J.H., VAN LEEUWEN, S.D., MENGELERS, M.J., KATAN, M.B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1276-1282, 1995.

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

HONG, I.S., LEE, H.Y., KIM, H.P. Anti-oxidative effects of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on immobilization-induced oxidative stress in rat brain. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e87061, 2014.

HÖRNER, M., WESTPHALEN, A.B., IGLESIAS, B.A., MARTINS, P.R., HENRIQUE, C., DO AMARAL, T.M.M., REETZ, L.G.B., HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

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

HÜBSCH, Z., VAN VUUREN, S. F., VAN ZYL, R. L. Can rooibos (*Aspalathus linearis*) tea have an effect on conventional antimicrobial therapies? **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 148-156, 2014.

HURSEL, R., VIECHTBAUER, W., WESTERTERP-PLANTENGA, M.S. The effects of green tea on weight loss and weight maintenance: a meta-analysis. **International Journal of Obesity**, v. 33, n. 9, p. 956-961, 2009.

JIN, Q., YANG, J., MA, L., CAI, J., LI, J. Comparison of polyphenol profile and inhibitory activities against oxidation and α -glucosidase in mulberry (genus *morus*) cultivars from China. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 11, p. C2440-C2451, 2015.

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

JOUBERT, E., GELDERBLOM, W.C.A., LOUW, A., DE BEER, D. South African herbal teas: *Aspalathus linearis*, *Cyclopia* spp. and *Athrixia phylicoides* — a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 376–412, 2008.

JOUBERT, E., WINTERTON, P., BRITZ, T.J., 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**, v. 37, n. 2, p. 133-138, 2004.

JOUBERT, E. HPLC quantification of the dihydrochalcones, aspalathin and nothofagin in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by processing. **Food Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 403-411, 1996.

JOVANOVIC, S.V., STEENKEN, S., TOSIC, M., MARJANOVIC, B., SIMIC, M.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 11, p. 4846-4851, 1994.

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

KARAMAN, I., ŞAHİN, F., GÜLLÜCE, M., ÖĞÜTÇÜ, H., ŞENGÜL, M., ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2, p. 231-235, 2003.

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

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

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

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

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

KRAFCZYK, N., HEINRICH, T., PORZEL, A., GLOMB, M.A. Oxidation of the dihydrochalcone aspalathin leads to dimerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6838-6843, 2009.

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

KUNISHIRO, K., TAI, A., YAMAMOTO, L., Effects of rooibos tea extract on antigen-specific antibody production and cytokine generation *in vitro* and *in vivo*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, p. 2137–2145. 2001.

LEES, D.H. e FRANCIS, F.J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **Hortscience** v. 7, p. 83–84, 1972.

LI, H.; WANG, X.; LI, Y.; LI, P.; WANG, H. LI, Hua et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 454-460, 2009.

LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A., CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

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

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

MARINOVA, E.M. e YANISHLIEVA, N.V.L. Inhibited oxidation of lipids II: Comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids. **Lipid/Fett**, v. 94, n. 11, p. 428-432, 1992.

MARNEWICK, J.L., RAUTENBACH, F., VENTER, I., NEETHLING, H., BLACKHURST, D.M., WOLMARANS, P., MACHARIA, M. Effects of rooibos (*Aspalathus linearis*) on oxidative stress and biochemical parameters in adults at risk for cardiovascular disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 46-52, 2011.

MARNEWICK, J., JOUBERT, E., JOSEPH, S., SWANEVELDER, S., SWART, P., GELDERBLOM, W. Inhibition of tumour promotion in mouse skin by extracts of rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia intermedia*), unique South African herbal teas. **Cancer Letters**, v. 224, n. 2, p. 193-202, 2005.

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

MARTINS, F., SUZAN, A.J., CERUTTI, S.M., ARÇARI, D.P., RIBEIRO, M.L., BASTOS, D.H.M., OLIVEIRA CARVALHO, P. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 04, p. 527-532, 2009.

MATHIYAZAHAN, D.B., THENMOZHI, A.J., MANIVASAGAM, T. Protective effect of black tea extract against aluminium chloride-induced Alzheimer's disease in rats: A behavioural, biochemical and molecular approach. **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 423-435, 2015.

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

MCCUE, P.P., SHETTY, K. Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using Kefir cultures. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1791-1797, 2005.

MCKAY, D.L., BLUMBERG, J.B. The role of tea in human health: an update. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2002.

MEJÍA, E.G., SONG, Y.S., HECK, C.I., RAMÍREZ-MARES, M. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

MERKEN, H.M. e BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

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

MORTON, L.W., CACCETA, R.A.A., PUDDEY, I.B., CROFT, K.D. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 3, p. 152-159, 2000.

MORTON, J.F. Rooibos tea, *Aspalathus linearis*, a caffeineless, low-tannin beverage. **Economic Botany**, v. 37, n. 2, p. 164-173, 1983.

MUNIANDY, P., SHORI, A.B., BABA, A.S. Influence of green, white and black tea addition on the antioxidant activity of probiotic yogurt during refrigerated storage. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 8, p. 1-8, 2016.

NATELLA, F., NARDINI, M., DI FELICE, M., SCACCINI, C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 4, p. 1453-1459, 1999.

NCUBE, B., FINNIE, J.F., VAN STADEN, J. In vitro antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 81-89, 2012.

NELSON, D.L. e COX, M.M. Biological membranes and transport. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 3rd ed. New York: Worth, v. 389, p. 436, 2000.

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

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

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

PETERSON, J., DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

PIETTA, P., MINOGGIO, M., BRAMATI, L. Plant polyphenols: Structure, occurrence and bioactivity. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 28, p. 257-312, 2003.

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

RABANAL, R.M., ARIAS, A., PRADO, B., HERNÁNDEZ-PÉREZ, M., SÁNCHEZ-MATEO, C.C. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 287-292, 2002.

RAMSDEN, C.A. e RILEY, P.A. Tyrosinase: the four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 8, p. 2388-2395, 2014.

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

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIJKE, E., OUT, P., NIESSEN, W.M., ARIESE, F., GOOIJER, C., UDO, A.T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography**, v. 1112, n. 1, p. 31-63, 2006.

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

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

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

SAVITSKY, J.P., DOCZI, J., BLACK, J., ARNOLD, J.D.A. clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 1, p. 73-80, 1978.

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

SCHAICH, K.M., TIAN, X., XIE, J. HURDLES and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 111–125, 2015.

SCHEPERS, S. **Anti-microbial activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on food spoilage organisms and potential pathogens**. 2001.

SEELINGER, G., MERFORT, I., SCHEMPP, C.M. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. **Planta medica**, v. 74, n. 14, p. 1667-1677, 2008.

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

SHAHIDI, F., ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757-781, 2015.

SHARMA SC, SHARMA S, GULATI O.P. Pycnogenol® prevents haemolytic injury in G6PD deficient human erythrocytes. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 6, p. 671-674, 2003.

SHIMOI, K., MASUDA, S., SHEN, B., FURUGORI, M., KINAE, N. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 350, n. 1, p. 153-161, 1996.

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

SIMPSON, M.J., HJELMQVIST, D., LÓPEZ-ALARCÓN, C., KARAMEHMEDOVIC, N., MINEHAN, T.G., YEPREMYAN, A., SALEHANI, B., LISSI, E., JOUBERT, E., UDEKWU, K.I., ALARCÓN, E.I. Anti-peroxyl radical quality and antibacterial properties of rooibos infusions and their pure glycosylated polyphenolic constituents. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 11264-11280, 2013.

SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

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

SNIJMAN, P.W., SWANEVELDER, S., JOUBERT, GREEN, I.R., GELDERBLOM, W.C.A. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): Some dose-response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 631, p. 111-123, 2007.

SWALDI, I., ARRÁEZ-ROMÁN, D., RODRÍGUEZ-MEDINA, I., BELTRÁN-DEBÓN, R., JOVEN, J., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Identification of phenolic compounds in aqueous and ethanolic rooibos extracts (*Aspalathus linearis*) by HPLC-ESI-MS (TOF/IT). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 10, p. 3643-3654, 2011.

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

TSAO, R., YANG, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1018, n. 1, p. 29-40, 2003.

VALLS, J., MILLÁN, S., MARTÍ, M. P., BORRÀS, E., AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 43, p. 7143-7172, 2009.

VAN ACKER, S.A., TROMP, M.N., GRIFFIOEN, D.H., VAN BENNEKOM, W.P., VAN DER VIJGH, W.J., BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VAN DER BANK, M., VAN WYK, B.E., VAN DER BANK, H. Biochemical genetic variation in four wild populations of *Aspalathus linearis* (Rooibos Tea). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 23, p. 257–262, 1995.

VAN VUUREN, S.F. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 462-472, 2008.

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

VICKERY, M.L. VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. Macmillan Press., 1981.

VILLAÑO, D., PECORARI, M., TESTA, M.F., RAGUZZINI, A., STALMACH, A. Crozier, A., Tubili, C., Serafini, M. Unfermented and fermented rooibos teas (*Aspalathus linearis*) increase plasma total antioxidant capacity in healthy humans. **Food Chemistry**, v. 123, p. 679-683, 2010.

VON GADOW, A., JOUBERT, E., HANSMANN, C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 632-638, 1997.

WANG, G., ZHANG, M., ZHONG, Q., LEI, Z., WU, H., LAI, F. Protective effects of resveratrol against hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity on human erythrocytes. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 144-153, 2016.

WORTHINGTON, V. Alpha amylase. **Worthington enzyme manual**, p. 36-41, 1993a.

WORTHINGTON, V., Maltase-r-glucosidase. **Worthington Enzyme Manual**, p. 261, 1993b.

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

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

ZHANG A, ZHU QY, LUK YS, HO KY, FUNG KP, CHEN ZY. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sciences**, v. 61, n. 4, p. 383-394, 1997.

ZHU, Q.Y., HOLT, R.R., LAZARUS, S.A., OROZCO, T.J., KEEN, C.L. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, n. 5, p. 321-329, 2002.

ZIELINSKI, A.A.F., HAMINIUK, C.W.I., ALBERTI, A., NOGUEIRA, A., DEMIATE, I. M., GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246-254, 2014.

APÊNDICE A - Cromatogramas típicos de extratos aquosos de roibos vermelho orgânico

