

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Luciana Erzinger Alves de Camargo

**Avaliação das atividades antioxidante e antifúngica da *Camellia sinensis* (L.)
Kuntze obtida por diferentes formas de produção**

GUARAPUAVA
AGOSTO DE 2011

Luciana Erzinger Alves de Camargo

**Avaliação das atividades antioxidante e antifúngica da *Camellia sinensis* (L.)
Kuntze obtida por diferentes formas de produção**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Coorientadora: Prof^a. Dra. Rubiana Mara Mainardes

Guarapuava

2011

C172a Camargo, Luciana Erzinger Alves de
Avaliação das atividades antioxidantes e antifúngica da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze obtida por diferentes formas de produção / Luciana Erzinger Alves de Camargo. -- Guarapuava, 2011
xvi, 55 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Ciências da Saúde, 2011

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rubiana Mara Mainardes

Banca examinadora: Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa, Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso, Prof. Dr. Emerson Carraro, Prof. Dr. Weber Francisco Nunes da Silva

Bibliografia

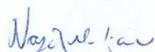
1. *Camellia sinensis*. 2. Compostos fenólicos. 3. Polifenóis. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615.321

TERMO DE APROVAÇÃO
LUCIANA ERZINGER ALVES DE CAMARGO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA DA
CAMELLIA SINENSIS (L.) KUNTZE OBTIDA POR DIFERENTES FORMAS
DE PRODUÇÃO**

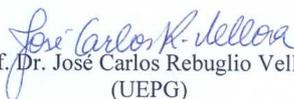
Dissertação aprovada em 10/08/2011 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. Dr. Najeh Maissar Khail,
(Orientador/UNICENTRO)



Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa,
(UFES)



Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso,
(UEPG)

GUARAPUAVA-PR
2011

“O dia mais belo: hoje
A coisa mais fácil: errar
O maior obstáculo: o medo
O maior erro: o abandono
A raiz de todos os males: o egoísmo
A distração mais bela: o trabalho
A pior derrota: o desânimo
Os melhores professores: as crianças
A primeira necessidade: comunicar-se
O que traz felicidade: ser útil aos demais
O pior defeito: o mau humor
A pessoa mais perigosa: a mentirosa
O pior sentimento: o rancor
O presente mais belo: o perdão
o mais imprescindível: o lar
A rota mais rápida: o caminho certo
A sensação mais agradável: a paz interior
A maior proteção efetiva: o sorriso
O maior remédio: o otimismo
A maior satisfação: o dever cumprido
A força mais potente do mundo: a fé
As pessoas mais necessárias: os pais
A mais bela de todas as coisas: O AMOR!!!”

Madre Tereza de Calcutá

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe, ao meu pai e à minha avó, pessoas que não mediram esforços em me ajudar nessa e em todas as batalhas da minha vida.

Em especial, dedico esse trabalho à Maria Eduarda, pois muito do tempo destinado a esse trabalho era por direito seu.

“Às vezes ouço passar o vento; e só de ouvir o vento passar, vale a pena ter nascido.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus, por colocar as pessoas certa no meu caminho e iluminar meus passos.

A minha mãe Arilda e meu pai Carlos Armando, pela oportunidade à vida, carinho, dedicação, preocupação excessiva e formação moral.

A minha avó Irecê, por ser exemplo de fortaleza frente às inúmeras dificuldades já vividas.

Ao meu esposo Raphael, por entender minha ausência sem cobranças.

Aos professores Emerson, Carlos Ricardo, Marco Aurélio Romano, Luiz Fernando, Juliana e Daniel pelos ensinamentos.

À professora Tania pela força.

Aos professores Osmar e Rebeca pela qualificação naquela tarde tão fria.

A Elisangela pelos e-mails, orientações e paçocas.

A Elaine, pela ajuda e paciência.

As colegas de mestrado, Luciana, Michele, Caroline e Thuane pela oportunidade de conhecê-las e pelos momentos de descontração.

Em especial às amigas Lígia e Sheila: “Tu és eternamente responsável por aquilo que
cativas” Antonie de Saint-Exupéry.

Aos colegas do laboratório de nanotecnologia, Leiziane, Débora, Viviane, Talita, Ivan,
Thiago, Diane, Juliana, Lualis, Ana Cristina, Luciane, Aline, Daniel e Clauberto.

Um agradecimento muito especial a Lori, Thaysa e Andreza, pessoas iluminadas.

A professora Rubiana, pela receptividade, pois foi a primeira pessoa que me acolheu na
Universidade Estadual do centro Oeste.

Ao professor Najeh, por ter acreditado no meu potencial, e por ter me ajudado a crescer
profissionalmente, por todas as minhas falhas e erros humildemente peço desculpas.

Muito obrigada!!!

RESUMO

O chá é uma bebida muito utilizada no Oriente e difundida para o mundo inteiro, compreendendo a segunda bebida mais consumida, depois da água. Os produtos da extração da *Camellia sinensis*, sob a forma de chás, têm sido amplamente utilizados preparados por infusão, devido aos benefícios à manutenção da saúde. Para a obtenção das variáveis da *C. sinensis* (chá verde, branco, vermelho e preto) utilizam-se diferentes processos com presença ou ausência de fermentação, capazes de alterar a constituição dos compostos fenólicos. Há um grande interesse no estudo das atividades antioxidante e antifúngica das diferentes formas da *C. sinensis*, devido especialmente à presença dos polifenóis. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as atividades antioxidante e antifúngica dos chás da *C. sinensis*, cujo extrato seco foi obtido por diferentes processos. Conforme os resultados, observou-se que os chás não fermentados, verde e branco, apresentam uma quantidade maior de fenóis totais, expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($76,00 \pm 0,162$ e $85,36 \pm 0,057$) em comparação aos semi e fermentados, vermelho e preto ($45,47 \pm 0,102$ e $43,34 \pm 0,034$), respectivamente. Também, possuem atividade antioxidante mais acentuada, observadas pelo CI_{50} , sendo que os resultados apresentados correspondem aos chás verde, branco, vermelho e preto expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente: i) radical DPPH ($0,073 \pm 0,001$; $0,056 \pm 0,001$; $0,156 \pm 0,075$ e $0,216 \pm 0,007$); ii) ABTS^{*+} ($0,018 \pm 0$; $0,019 \pm 0,001$; $0,050 \pm 0,001$ e $0,053 \pm 0$); iii) $\text{O}_2^{\bullet-}$ ($0,031 \pm 0$; $0,031 \pm 0,001$; $0,491 \pm 0,054$ e $0,796 \pm 0,002$) e iv) HOCl ($0,002 \pm 0$; $0,002 \pm 0,001$; $0,005 \pm 0$ e $0,010 \pm 0$). Sobre a atividade hemolítica induzida pelo radical AAPH, também foi observada uma proteção maior por parte dos chás não fermentados, conforme CI_{50} expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($0,022 \pm 0,001$; $0,050 \pm 0,002$; $0,588 \pm 0,009$ e $0,275 \pm 0,0408$). Observou-se a redução da peroxidação lipídica, sobre soro humano induzida por CuCl_2 , especialmente pelos chás verde e branco, seguidos pelo vermelho; o chá preto não apresentou efeito nesse sistema. Em relação ao efeito sobre a atividade da mieloperoxidase observou-se efeito inibitório mais acentuado exercido pelos chás verde e branco. A atividade antifúngica sobre *Candida spp* foi observada em ordem decrescente pelos chás preto, verde e branco, não sendo observada atividade pelo chá vermelho. Concluiu-se que os chás da *C. sinensis* obtidos pelo método não fermentado,

apresentam melhor atividade antioxidante do que os chás semi fermentado e fermentado. Entretanto esse último alcançou efeito mais pronunciado na avaliação da atividade antifúngica.

Palavras-chave: *Camellia sinensis*, espécies reativas de oxigênio, compostos fenólicos.

Abstract

Tea is a widely used beverage in the East and spread worldwide, it is the second most consumed beverage after water. The extract product of *Camellia sinensis* like teas, have been consumed in the form of infusion, and their habitual consumption has widely been associated with health benefits. The several teas of *C. sinensis* (green, white, red and black teas) are obtained by different methods, the fermentation and non-fermentation methods, which are able to change the phenolics compounds structure. There is an increasing interest in studying of the antioxidant and antifungal activities in the several forms of *C. sinensis*, mainly the polyphenols compounds. The aim of this work was the evaluate the teas of *C. sinensis* antioxidant and antifungal activity, which dry extract was obtained by several processes. It was observed that the non-fermentated teas, green and white, show a higher amount of total phenols expressed in $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($76,00 \pm 0,162$ and $85,36 \pm 0,057$) than the semi or fermentation ones ($45,47 \pm 0,102$ and $43,34 \pm 0,034$) respectively. Also, they have the most antioxidant activity, observed in the IC_{50} , which are expressed by green, white, red and black tea expressed in $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectively: i) DPPH radical ($0,073 \pm 0,001$; $0,056 \pm 0,001$; $0,156 \pm 0,075$ and $0,216 \pm 0,007$); ii) $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ($0,018 \pm 0$; $0,019 \pm 0,001$; $0,050 \pm 0,001$ and $0,053 \pm 0$); iii) $\text{O}_2^{\bullet-}$ ($0,031 \pm 0$; $0,031 \pm 0,001$; $0,491 \pm 0,054$ and $0,796 \pm 0,002$) and iv) HOCl ($0,002 \pm 0$; $0,002 \pm 0,001$; $0,005 \pm 0$ and $0,010 \pm 0$). The hemolytic activity induced by AAPH radical, a higher protection in the non-fermented teas as seem the IC_{50} value expressed in $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($0,022 \pm 0,001$; $0,050 \pm 0,002$; $0,588 \pm 0,009$ and $0,275 \pm 0,0408$) was also observed. It was observed the lipoperoxidation reducing over human serum induced by CuCl_2 , especially by green and white teas followed by red tea; the black tea didn't present effect in this system. Regarding the effects under myeloperoxidase activity we observe a higher inhibitory by green and white teas. The antifungal activity against *Candida spp* was observed in descending order by black, green and white tea, this activity was not observed by red tea. We concluded that, the *C. sinensis* teas obtained from the non-fermented method, showed the most pronounced antioxidant activity and as the semi or fermentative teas. However the latter reached the most pronounced effect in the activity antifungal evaluation .

Keywords: *Camellia sinensis*, reactive Oxygen species, phenols compound.

Lista de Figuras

- Figura 1-** Fotografia do arbusto florido da *C. sinensis* (L.) Kuntze. 2
- Figura 2-** Estrutura química dos polifenóis da classe das catequinas isoladas das folhas *C. sinensis*. 2
- Figura 3-** Possível rota metabólica para a produção de catequinas funcionais da *C. sinensis* 4
- Figura 4-** Dímeros das catequinas monoméricas 9
- Figura 5-** Estrutura molecular da Anfotericina B 20
- Figura 6** – Curva analítica para a determinação de fenóis totais, absorvância x concentração, utilizando o reagente de Folin- Ciocalteau e leitura em $\lambda = 680$ nm 30
- Figura 7** – Efeito *C. sinensis* sobre o DPPH, onde a solução DPPH ($60 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi incubada 30 minutos ao abrigo da luz e temperatura ambiente, com diferentes concentrações da *C. sinensis* sob a forma de infusão. A queda da absorvância do DPPH foi observada a 531 nm 32
- Figura 8** - Efeito *C. sinensis* sobre o ABTS^{++} onde a solução de ABTS^{++} em PBS 50 mmol.L^{-1} pH 7,4 incubada ao abrigo da luz com várias concentrações da *C. sinensis* sob a forma de infusão. A absorvância foi observada a 734 nm 34
- Figura 9** - Efeito *C. sinensis* sobre o sobre $\text{O}_2^{\cdot-}$ que foi formado pelo sistema PMS ($0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$) /NBT /NADH ($2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), realizado em PBS 50 mmol.L^{-1} , na ausência ou presença de diferentes concentrações da *C. sinensis* sob a forma de infusão. A absorvância foi observada em 560 nm 36
- Figura 10** - Efeito *C. sinensis* sobre o sobre HOCl realizada em PBS pH 7,4 onde uma solução HOCl ($75 \mu \text{ mol.L}^{-1}$) foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz com diferentes concentrações da *C. sinensis* sob a forma de infusão. O HOCl remanescente foi revelado com a adição de TMB. A absorvância foi observada em 652 nm 38
- Figura 11** – Efeito *C. sinensis* sobre o sobre a hemólise induzida com AAPH, onde hemácias 1% em PBS 50 mmol.L^{-1} , pH 7,4 foram incubadas por 6 horas com várias concentrações da *C. sinensis* sob a forma de infusão na presença ou ausência de AAPH (50 mmol.L^{-1}) 40
- Figura 12** – Efeito da *C. sinensis* sobre a peroxidação lipídica que foi induzida pela adição de solução $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CuCl_2 em soro normolipêmico com várias concentrações da *C. sinensis* sob a forma de infusão. A variação da absorvância foi monitorada em 245 nm durante 3 horas a cada 10 minutos 42

Figura 13 – Efeito da *C. sinensis* sobre a atividade da MPO obtida pela oxidação do guaiacol 80 mmol.L^{-1} pelo sistema MPO (8 nmol.L^{-1}) / H_2O_2 (48 mmol.L^{-1}) em tampão fosfato salina pH 7,4. A cinética foi monitorada pela variação da absorvância em 470 nm, por 10 minutos, em intervalos de 10 segundos

Lista de tabelas

Tabela 1- Quantificação de fenóis totais, equivalentes em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido gálico, da <i>C. sinensis</i> sob a forma de chás obtidos por diferentes métodos de produção	30
Tabela 2- Análise da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) do DPPH obtido pela exposição do mesmo a diferentes concentrações da <i>C sinensis</i> obtidas pelo método de infusão	32
Tabela 3- Análise da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) das diferentes concentrações da <i>C sinensis</i> obtidas pelo método de infusão sobre o ABTS ^{•+}	34
Tabela 4- Análise da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) das diferentes concentrações da <i>C. sinensis</i> obtidas pelo método de infusão sobre $\text{O}_2^{\bullet-}$	36
Tabela 5- Análise da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) das diferentes concentrações da <i>C sinensis</i> obtidas pelo método de infusão sobre o HOCl	38
Tabela 6- Análise da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) das diferentes concentrações da <i>C sinensis</i> obtidas pelo método de infusão sobre o processo de hemólise induzida pelo tratamento das hemácias com AAPH [•]	40
Tabela 7- Análise da variação de tempo da <i>lag</i> fase, representada pela variação da absorvância em função do tempo à formação de dienos conjugados quando tratados pelas diferentes concentrações da <i>C. sinensis</i> obtidas pelo método de infusão	43
Tabela 8- Análise da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) das diferentes concentrações da <i>C sinensis</i> obtidas pelo método de infusão sobre a cinética enzimática da MPO	45
Tabela 9 – Resultado do teste de susceptibilidade pela determinação do CIM dos chás verde, branco, vermelho e preto sobre cepas ATCC de <i>Candida spp</i> determinado pelo método do LCSIM-27-A2, 2002	47

Lista de esquema

Esquema 1- Etapas do processamento dos chás da <i>C.sinensis</i>	6
Esquema 2- Redução do O ₂ na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial envolvida na geração de ERO	11
Esquema 3- Esquema de oxidantes formados na resposta inflamatória celular	12
Esquema 4- Dismutação do O ₂ ^{•-} pela SOD para produção do intermediário H ₂ O ₂	13
Esquema 5- Reação do HOCl com outras espécies reativas	13
Esquema 6- Formação do HO [•] reação de Fenton	14
Esquema 7- Reação de produção de HO [•] a partir do O ₂ ^{•-}	14
Esquema 8- Reação de Harber-Weiss	14
Esquema 9- Esquema da produção do ¹ O ₂ através do H ₂ O ₂ e O ₂ ^{•-}	15
Esquema 10- Reação em cadeia da peroxidação lipídica	16

Lista de Abreviaturas

AAPH	<i>2,2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride</i>
ABTS	<i>2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)</i>
CAT	Catalase
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Doença de Parkinson
DPPH	<i>1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>
EC	Epicatequina
EGC	Epigallocatequina
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EGCG	Galato de epigallocatequina
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO [•]	Radical hidroxil
HO ₂ [•]	Radical hidroperoxil
HOCl	Ácido hipocloroso
L [•]	Radical lipídico
LOO [•]	Radical lipoperoxil
LPMN	Leucócitos polimorfonucleados
MDA	Malonaldeído
MPO	Mieloperoxidase
NAD	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium chloride</i>
NO	Óxido nítrico
¹ O ₂	Oxigênio singlete
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Ânion radical superóxido
PBS	Solução salina tamponada de fosfato
PMS	<i>Phenazine methosulfate</i>
SOD	Superóxido dismutase
TMB	Tetrametilbenzidina

Sumário

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze.....	1
1.2 CARACTERÍSTICA E MÉTODO DE OBTENÇÃO DOS CHÁS.....	5
1.2.1 Chá verde.....	7
1.2.2 Chá branco.....	8
1.2.3 Chá vermelho.....	8
1.2.4 Chá preto.....	8
1.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	10
1.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E O STRESS OXIDATIVO.....	11
1.5 PANORAMA DAS INFECÇÕES FÚNGICAS.....	18
1.6 AGENTES ANTIFÚNGICOS.....	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 MATERIAIS.....	22
3.1.1 Reagentes.....	22
3.1.2 Equipamentos.....	22
3.1.3 Cepas.....	22
3.2 MÉTODOS.....	22
3.2.1 Preparo do chá.....	22
3.2.2 Obtenção do resíduo seco dos chás da <i>C. sinensis</i>	23
3.2.3 Concentrações testadas dos chás da <i>C. sinensis</i>	23
3.2.4 Quantificação de fenóis totais dos chás da <i>C. sinensis</i>	23
3.2.5 Atividade dos chás da <i>C. sinensis</i> sobre o DPPH.....	24
3.2.6 Atividade dos chás da <i>C. sinensis</i> sobre o ABTS ^{•+}	24
3.2.7 Atividade dos chás da <i>C. sinensis</i> sobre o O ₂ ^{•-}	24
3.2.8 Atividade dos chás da <i>C. sinensis</i> sobre o HOCl.....	24
3.2.9 Atividade dos chás da <i>C. sinensis</i> sobre a ação citotóxica in vitro do AAPH sobre hemácias.....	25
3.2.10 Pesquisa da formação de dienos conjugados no soro.....	26
3.2.11 Avaliação da cinética da MPO.....	26
3.2.12 Teste de susceptibilidade antifúngica.....	26
3.2.13 Análise estatística.....	27
3.2.14 Cálculo da porcentagem de inibição.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO.....	29
4.1.1 Quantificação de fenóis totais dos chás da <i>C. sinensis</i>	29
4.2 ENSAIOS ANTIOXIDANTES.....	31
4.2.1 Atividade dos chás da <i>C. sinensis</i> sobre DPPH.....	31
4.2.2 Atividade dos chás da <i>C. sinensis</i> sobre o ABTS ^{•+}	32
4.2.3 Atividade dos chás da <i>C. sinensis</i> sobre o O ₂ ^{•-}	33
4.2.4 Atividade dos chás da <i>C. sinensis</i> sobre o HOCl.....	35
4.2.5 Atividade dos chás da <i>C. sinensis</i> sobre hemólise induzida por AAPH.....	37
4.3 ENSAIOS CINÉTICOS.....	38
4.3.1 Pesquisa da formação de dienos conjugados.....	38
4.3.2 Atividade cinética da MPO.....	40
4.4 ENSAIO ANTIFÚNGICO.....	42
4.4.1 Susceptibilidade antifúngica à <i>C. sinensis</i>	42
5 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Camellia sinensis* (L.) Kuntze

O chá compreende uma bebida extremamente popular no Oriente e tem sido descrito como a segunda bebida mais ingerida depois da água, sendo consumido por mais de dois terços da população mundial. Dentre os chás mundialmente consumidos destacam-se os produtos resultante do preparo diferencial da planta *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Figura 1) (VENDITTI et al., 2010; GODOIN et al., 2010; MACKENZIE; JURADO; PABLOS, 2010).

A *C. sinensis* é uma planta perene do tipo arbustiva pertencente à família das Theaceae, sendo a mais importante dessa família, podendo chegar até 3-4 m de altura (FERRARA; MONTESANO; SENATORE, 2001). Trata-se de uma planta originária da China, tendo seu uso difundido para Índia e o Japão inicialmente seguida, então, da Europa e da Rússia, chegando ao Novo Mundo no final do século XVII (SHARANGI, 2009). Para o cultivo há duas variedades de plantas para a produção do chá: A *C. sinensis* var. *sinensis*, que cresce extensivamente na China, Japão e Tailândia, enquanto que a *C. sinensis* var. *assamica*, cresce predominantemente no sul e sudeste da Ásia, incluindo a Malásia e mais recentemente a Austrália e Brasil (CHAN; LIM; CHEW, 2007). Para a produção do chá são utilizados as folhas e brotos apicais, ambos colhidos manualmente após o surgimento das duas primeiras folhas e, em seguida processados (KOMES et al., 2010).

Os componentes químicos das folhas da *C. sinensis* são bem variados, entre os quais destacamos: polifenóis (catequinas e flavonóides), alcalóides (cafeína, teofilina e teobromina), óleos voláteis, polissacarídeos, aminoácidos, lipídios, vitaminas (vitamina C), elementos inorgânicos (alumínio, flúor e manganês), entre outros, sendo que muitos dos efeitos benéficos dos chás são atribuídos aos compostos fenólicos (FERRARA; MONTESANO; SENATORE, 2001; PEREIRA et al., 2009).

Compostos fenólicos ou polifenóis é nome dado a um conjunto de compostos metabólicos das plantas superiores, caracterizados por possuírem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus seus derivados funcionais, muitos desses compostos fenólicos são flavonóides, chamados de catequinas (HERNANDEZ; ALEGRE; MUNNE-BOSH, 2006; LIMA et al., 2009; ASHIHARA et al., 2010). As catequinas são sintetizadas nas folhas, sendo as folhas jovens altamente ricas em catequinas, constituindo cerca de 30% do seu peso seco (CHAN; LIM; CHEW, 2007), compreendem compostos incolores solúveis em água responsáveis pelo amargor e adstringência das folhas da *C. Sinensis* (ASHIHARA et al., 2010; PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011).

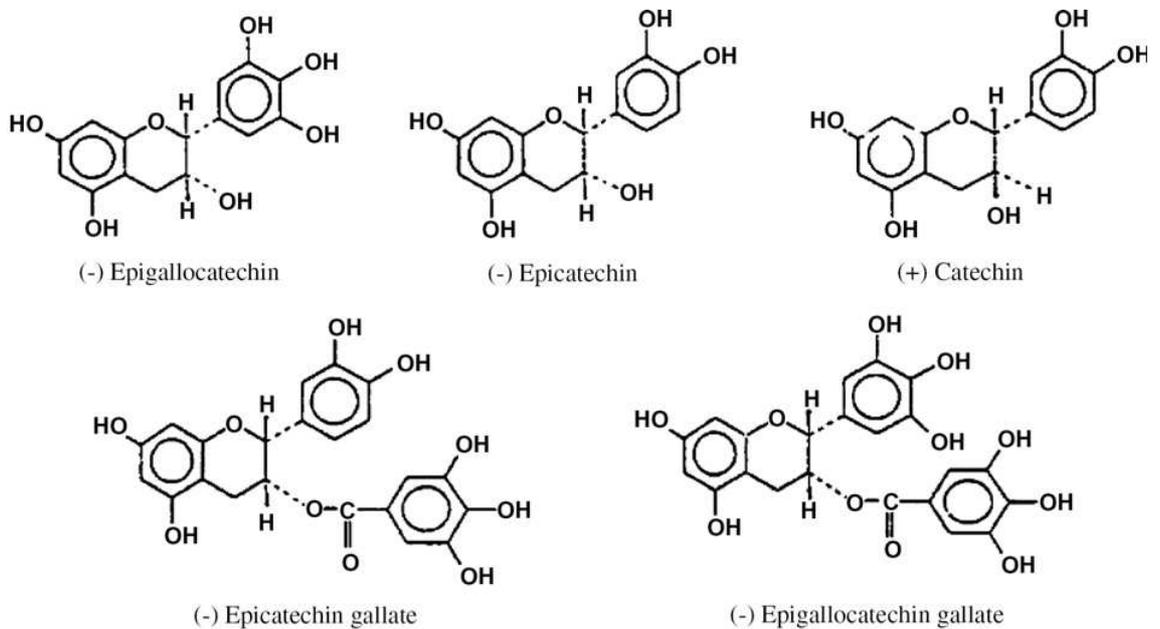
Figura 1- Fotografia do arbusto florido da *C. sinensis* (L.) Kuntze

Fonte: <http://www.msstate.edu/org/arboretum/camsin.htm>: acessado em 21/04/2011



As catequinas que são encontradas nas folhas jovens da *C. sinensis* estão na forma de catequinas primárias, monoméricas: galato de epigalocatequina (EGCG), epigalocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG), epicatequina (EC) e catequina (C), por ordem de atividade (Figura 2) (WANG; HELLIWEL, 2001; CAMARGO; DAGUER; BARBOSA, 2006).

Figura 2- Estrutura química dos polifenóis da classe das catequinas isoladas das folhas *C. sinensis*



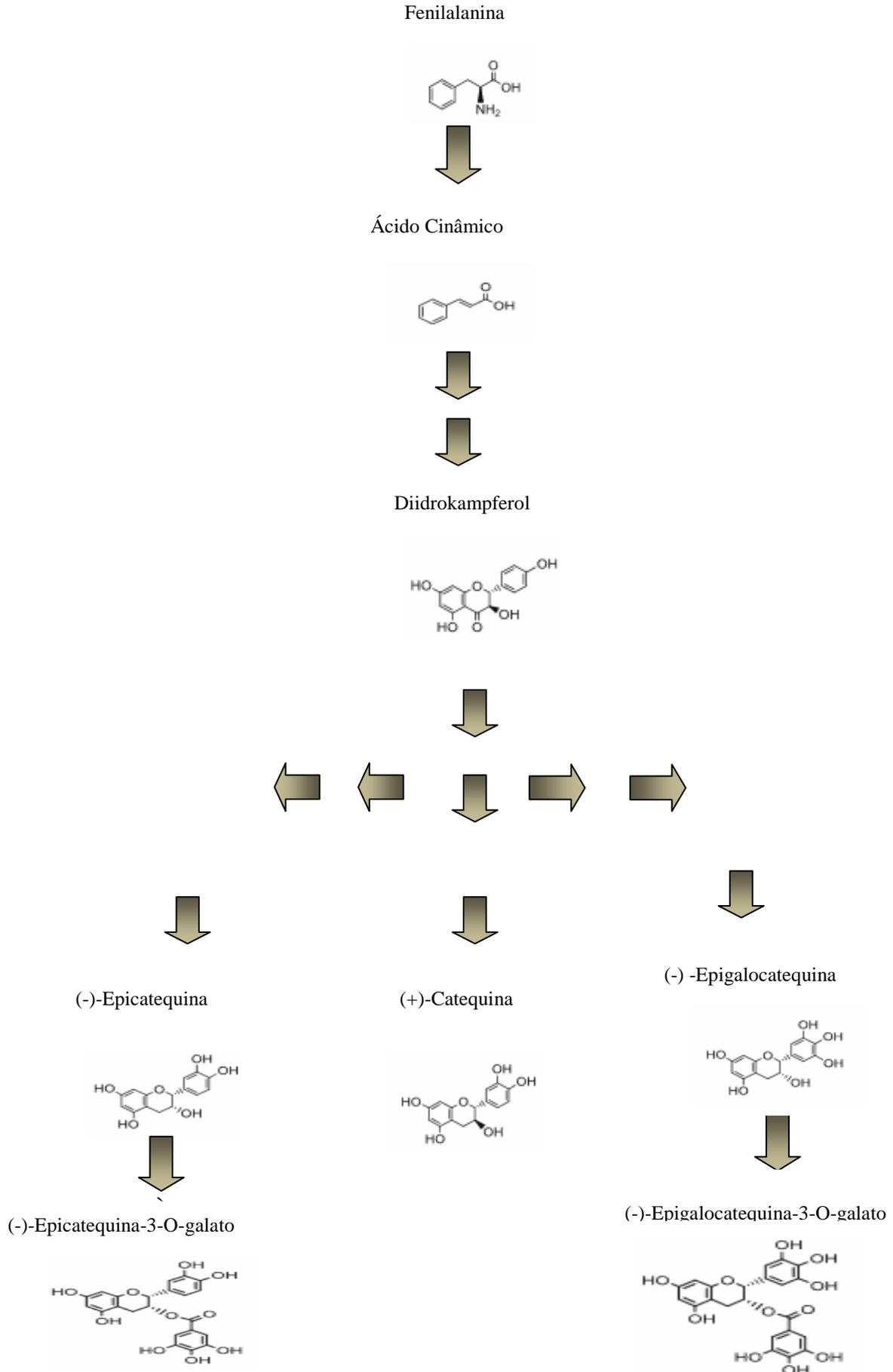
Segundo Ashihara et al., (2010) uma possível rota para a produção dos flavonóides presentes nas folhas da *C. Sinensis* (Figura 3) inicia-se com a conversão do anel ^{14}C -fenilalanina a ácido cinâmico e então metabolizados pelos fenilpropanóides e vias metabólicas

de flavonóides até a formação do diidrokaempferol que é então convertido à EGC pelas enzimas flavonoide 30,50-hidroxilase, diidroflavonol 4-redutase, antocianina sintetase e antocianina redutase. A EGC é rapidamente convertida à EGCG pela esterificação com ácido gálico. Uma parte do diidrokaempferol formado é convertido para diidroquercetina e em seguida convertido para EC, pela mesma sequencia de enzimas que dão origem à EGC. Sugere-se que a ^{14}C -fenilalanina seja convertida também ao ácido gálico.

A EGCG é a mais importante e mais estudada catequina devido a sua alta concentração, mais de 50%, e por possuir a maioria das propriedades fisiológicas, enquanto que a C e a EGC estão presentes em traços (PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011). Em especial a EGCG tem se mostrado eficiente na proteção de hepatotoxicidade induzida por 2-nitropropano e nefrotoxicidade induzida por cisplatina em ratos (HSU et al., 2011).

Em recente estudo Park et al. (2006) demonstraram que a EGCG possui atividade antifúngica sobre 21 isolados clínicos de 7 tipos de *Candida spp*, sendo a *Candida glabrata* a mais susceptível. Evensen e Braun, (2009) apresentaram resultados onde culturas de *C. albicans* tratadas com uma concentração de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de EGCG tiveram uma redução de 75% na viabilidade celular durante a formação do biofilme e cepas com biofilme estabilizados tiveram uma redução de 80% na viabilidade celular, apresentando a EGCG e a ECG similaridade da inibição fúngica. Entretanto, o conteúdo das catequinas pode variar de acordo com estações do ano, clima, condições de cultivo, idade das folhas, variedade além do método empregado para a obtenção dos variados produtos de extração da *C. sinensis* que dará origem aos chás comerciais mundialmente utilizados (ALMAJANO et al., 2008).

Figura 3- Possível rota metabólica para a produção das catequinas funcionais da *C.sinenses* (ASHIHARA et al., 2010)



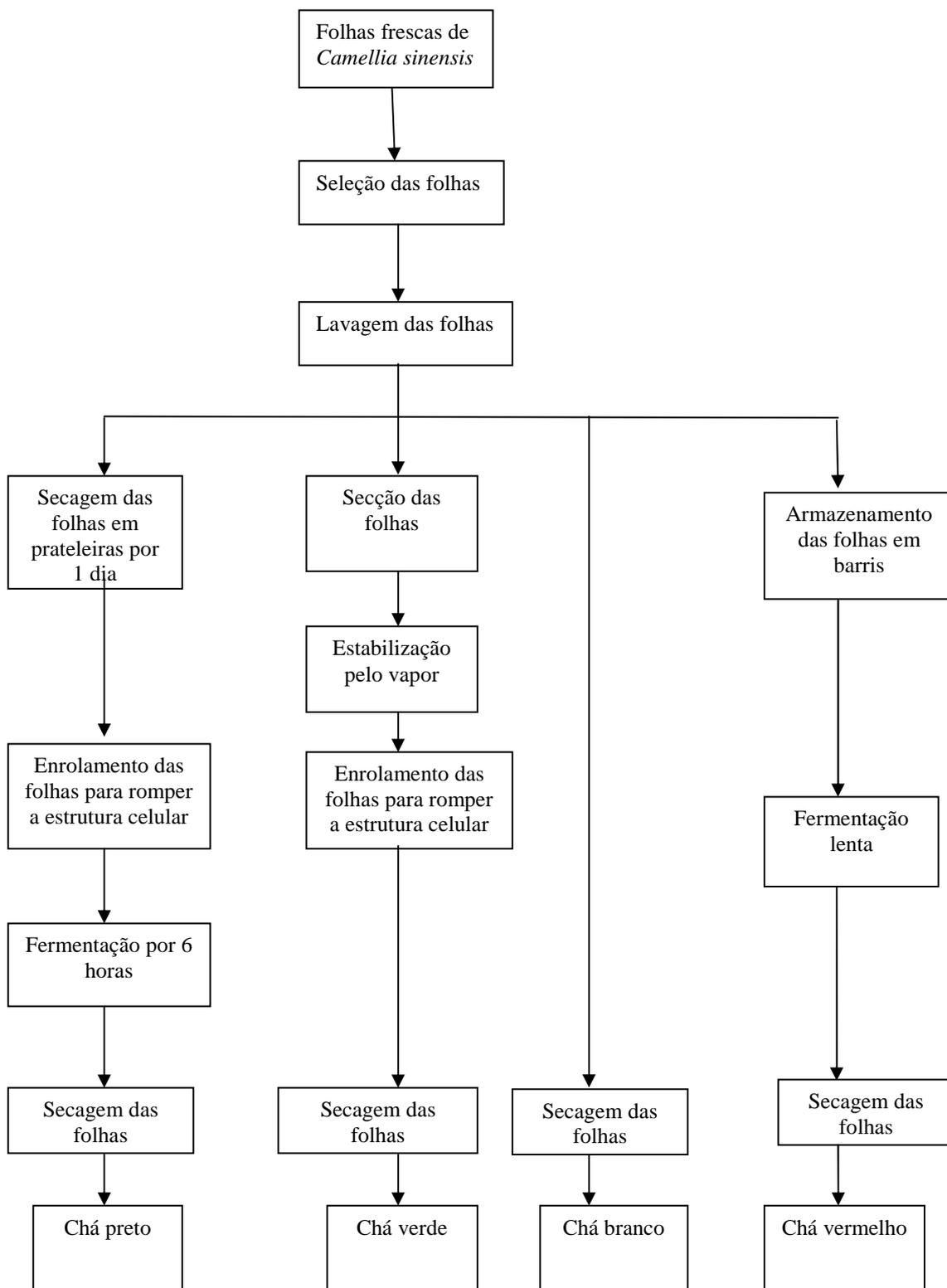
Desde a antiguidade associa-se o consumo dos vários tipos de chás extraídos da *C. sinensis*, a uma diversidade de atividades mantenedoras e protetoras da saúde, entre elas, a redução dos níveis de glicose e colesterol (PEREIRA et al., 2009; STASZEWSKI; PILOSOFF; JAGUS, 2011), efeito antioxidante (HIGDON; FREI, 2006), antifúngico (PARK et al., 2006), antibacteriana, que no chá verde tem se mostrado eficiente sobre bactérias gram positivas e gram negativas (TODA et al., 1990; FREIDMAN et al., 2007) e antitumoral (BODE; DONG, 2009). Os efeitos dos polifenóis sobre o metabolismo lipídico ainda não está completamente elucidado, entretanto, tem se observado que uma dieta rica em polifenóis leva a um aumento plasmático das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e redução nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (CAMARGO; DAGUER; BARBOSA, 2006). O consumo mais habitual desses chás tem sido sob a forma de infusão, uma vez que esse tipo de preparo favorece a extração dos compostos fenólicos (MORAIS et al., 2009; PEREIRA et al., 2009). Compostos fenólicos são os constituintes funcionais dos chás da *C. sinensis* que em especial na sua forma monomérica apresentam grande atividade antioxidante (CHAN; LIM; CHEW, 2007; MORAIS et al., 2009; SHARANGI, 2009).

1.2 Característica e método de obtenção dos chás

Para a obtenção dos chás verde, branco, vermelho e preto são empregados processos diferenciados, que compreendem: o processo não fermentativo (chás verde e branco), o parcialmente fermentativo, (chá vermelho) e o fermentativo (chá preto) (BARCIROVA, 2010). O chá preto constitui aproximadamente 78-80% do montante produzido mundialmente, e é o mais consumido no ocidente (SHARANGI, 2009), já o chá verde e branco constituem cerca de 20%, enquanto 2% perfazem a produção de chá vermelho (GRUPTA; SAHA; GIRI, 2002).

Ao se empregar o método de fermentação em grau variado para a obtenção dos chás, ocorre a oxidação ou condensação das catequinas primárias monoméricas para moléculas diméricas e poliméricas. Isso confere características organolépticas peculiares e únicas, como por exemplo, a ausência da adstringência no chá preto, peculiar ao verde e branco além de odor e cor própria (CHAN; LIM; CHEW, 2007).

Esquema 1- Etapas do processamento dos chás da *C.sinensis* (PAGANINI-COSTA; CARVALHO DA-SILVA, 2011)



1.2.1 Chá verde

O chá verde possui suas propriedades amplamente estudadas (CHEN; PING DOU, 2008; CHACKO et al., 2010). Sua obtenção ocorre pela extração das folhas frescas da *C. sinensis* (BARCIROVA, 2010). O processo ocorre de forma não fermentativa (Esquema 1), onde a simples secagem e estabilização das folhas inativa a enzima polifenoloxidase. Tal processo impede a oxidação das catequinas monoméricas, conserva quase todo seu conteúdo original de polifenóis, a coloração verde das folhas, tal qual o chá obtido das folhas frescas e torna as folhas flexíveis e maleáveis para serem trabalhadas (ALMAJANO et al., 2007; BARCIROVA, 2010). As folhas são enroladas e colocadas em bandejas aquecidas, para romper a estrutura celular e assim obter o sabor desejado do chá. Em seguida as folhas são secas até que retenham apenas 2% da sua umidade original (PAGANINI-COSTA; CARVALHO DA-SILVA, 2011)

Vários estudos têm evidenciado as propriedades farmacológicas do chá verde, entre elas: imunoestimulatória, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiinflamatória, antimutagênico, hipoglicêmico e hipocolesterolêmico (CHEN; PING DOU, 2008; VELAYUTHAM; BABU; LIU, 2008; CHACKO et al., 2010; NISHIYAMA et al., 2010).

A propriedade antitumoral do chá verde se deve à interferência na indução, desenvolvimento e progressão do tumor através da modulação de diversos mecanismos, incluindo proliferação celular, diferenciação, apoptose, angiogênese e metástase. Segundo Chen e Ping-Dou, (2008) a EGCG é um inibidor potente e específico da atividade da via proteosômica / ubiquitina, proteína essencial para a proliferação do tumor e desenvolvimento de resistência às drogas antineoplásicas. A EGCG, também inibe a atividade da DNA metiltransferase, responsável pela metilação do DNA e conseqüente indução do processo carcinogênico.

As catequinas possuem propriedades cardioprotetoras, devido à inibição da oxidação da LDL, ocasionando assim a redução da sua captação pelos macrófagos (LU; CHEN, 2008), e da inflamação vascular, os riscos de trombogênese e da reatividade vascular (VELAYUTHAM; BABU; LIU, 2008).

O consumo de chá verde também tem sido relacionado à prevenção de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson e de promover aumento da densidade óssea, reduzindo o risco de fraturas (CHACKO et al., 2010).

1.2.2 Chá branco

O chá branco é o menos processado (Esquema 1), obtido a partir dos brotos e folhas selecionadas da *C. sinensis* que são apenas lavados e secos, impedindo a oxidação das catequinas monoméricas. Os brotos utilizados podem ainda serem protegidos da luz para evitar a formação de clorofila (PASTORE; FRATELLONI, 2006; ZHAO et al., 2011) e desse modo, as folhas após secagem conservam seus pelos brancos, de onde deriva seu nome (GODOIN et al., 2010).

Os principais compostos presentes nesse chá são os polifenóis monoméricos, caracterizados pelas epicatequinas e seus derivados, além de vários ácidos, como gálico, cumárico, cafeico e alcalóides, representados pela cafeína e purina (RUSAK et al., 2008).

O aumento no consumo do chá branco tem sido associado à menor incidência de doenças crônicas, como disfunções cardiovasculares e câncer, semelhantes às do chá verde. Ao chá branco também tem sido associada atividade anti-obesidade, devido à inibição da lipase pancreática, além de sua ampla atividade antioxidante (KOUTELIDACS et al., 2009; VENDITTI et al., 2010).

1.2.3 Chá vermelho

O chá vermelho é considerado semi fermentado (Esquema 1), obtido por fermentação lenta levando ao menos três anos para sua produção. Nesse processo há uma leve oxidação das catequinas monoméricas, dando origem a dímeros e polímeros, teaflavinas e tearubiginas (Figura 4), responsáveis pelo aroma e sabor acentuado, com redução da adstringência (CHAN; LIM; CHEW, 2007; ALMAJANO et al., 2008). Poucas informações são encontradas sobre as atividades biológicas desse chá, no entanto, sabe-se que é eficaz quanto à atividade antioxidante sobre a oxidação lipídica, bem como atimutagênica e antibacteriana semelhante aos outros extratos dos chás (WU et al., 2007; DUH et al., 2010).

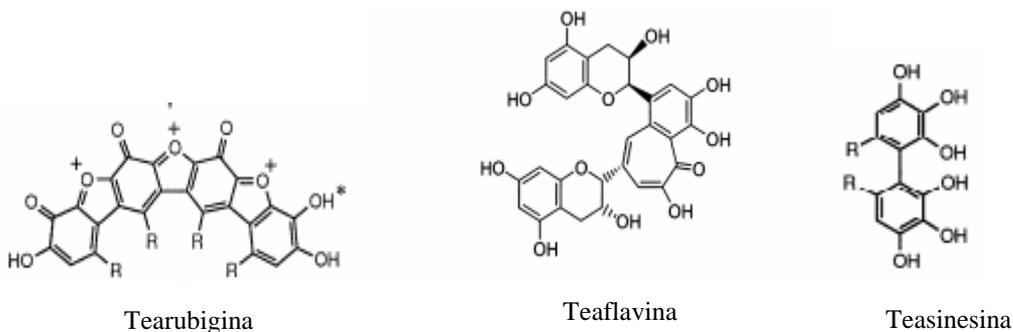
1.2.4 Chá preto

O chá preto é obtido pela fermentação completa das catequinas pela enzima polifenol-oxidase (Esquema 1), que resulta em dímeros e polímeros, das catequinas, que conferem o sabor e cor característicos a esse produto, sendo responsável por cerca de 80% do chá consumido no mundo (SCHMITZ et al., 2005; SHARANGI, 2009). O processo compreende inicialmente em deixar as folhas espalhadas em prateleiras durante um dia para reduzir sua umidade. Ao final desse processo, as folhas apresentam-se macias o suficiente para serem enroladas no formato de pequenas bolas. O rompimento da estrutura celular das folhas

permite a liberação da enzima polifenoloxidase responsável pela oxidação das catequinas (PAGANINI-COSTA; CARVALHO DA-SILVA, 2011).

O chá preto apresenta na sua composição, além de polifenóis, outros compostos orgânicos como aminoácidos, metilxantinas, carboidratos, proteínas, compostos voláteis e elementos minerais. A oxidação enzimática das catequinas gera uma mistura complexa de dímeros e polímeros das catequinas monoméricas, constituída de teaflavinas, teasinesinas e tearubiginas (Figura 4), fenômeno esse conhecido como "escurecimento enzimático" (PAGANINI-COSTA; CARVALHO DA-SILVA, 2011).

Figura 4 – Dímeros das catequinas monoméricas (HASLAM, 2003)



As teaflavinas são liberadas no citoplasma quando o tecido é danificado por meio da técnica da fabricação. Dos polifenóis oxidados há no chá preto cerca de 2-6% de teaflavinas e mais de 20% de tearubiginas, comparado ao chá verde que é composto de 20-42% de catequinas monoméricas (LIMA et al., 2009; SHARANGI, 2009).

As teaflavinas e teasinesinas são os principais produtos oxidados do chá preto apresentando-se em maior quantidade (TANAKA et al., 2003), além das tearubiginas, em menor quantidade. As teaflavinas dão coloração e brilho vermelho-laranja, sendo produzidas a partir da condensação oxidativa entre EC e EGC ou EGCG (HASHIMOTO et al., 1988). As tearubiginas possuem estruturas complexas e heterogêneas ainda não completamente elucidadas, monoméricas ou poliméricas, com coloração marrom-ferrugem, tendo como principais precursores EGC e EGCG (HASLAM, 2003). Leung et al. (2001) relataram que a polimerização das catequinas ocorrida na produção do chá preto não afetaria de forma significativa a sua atividade antioxidante uma vez que as teaflavinas formadas no chá preto e catequinas do chá verde possuem atividade antioxidante similares.

O chá preto possui ação antioxidante contra radicais livres (MORAIS et al., 2009), quimioprotetora (SCHMITZ et al., 2005), além de potencial antimutagênico e capacidade para reduzir doenças cardiovasculares (LIMA et al., 2009). O extrato de chá preto nas concentrações de 0,6 e 1,25% reduziu o tamanho dos focos neoplásicos induzidos pela dietil-etil-nitrosamina (10mg/kg) em ratos, em aproximadamente 63% dos animais (SCHMITZ et al., 2005). Outros estudos com o chá preto mostram resultados favoráveis na melhoria da função vasomotora, redução de peso e circunferência da cintura, e diminuição no colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade (TJIBURG et al., 1997; CHAN; LIM; CHEW, 2007; BARCIROVA, 2010). Nenhum estudo feito com o chá resultou em efeitos deletérios à saúde (RODRIGUES, 2007).

1.3 Atividade antioxidante dos compostos fenólicos

A atividade antioxidante principal dos produtos obtidos da *C. sinensis* por diferentes processos é atribuída aos compostos fenólicos (FERRARA; MONTESANO; SENATORE, 2001; PEREIRA et al., 2009; ASHIHARA et al., 2010). Atualmente, inúmeros estudos têm demonstrado a intensa atividade antioxidante dos compostos fenólicos, apresentando atividade similar ou até superior em relação aos antioxidantes já consagrados β -carotenóides e α -tocoferol (TIJBURG et al., 1997; LIN; LIU; MAU, 2008; BARCIROVA, 2010).

Straszewski, Pilosof e Jargus (2011) demonstraram que, para uma excelente atividade antioxidante, além da grande concentração de compostos fenólicos, é de grande importância a composição dos mesmos. Os compostos fenólicos apresentam propriedades antioxidantes, devido ao seu potencial redox, que os permite agir como doadores de hidrogênio, atuando como redutores, quelantes de íons metálicos sendo assim capazes de estabilizar e desativar espécies reativas de oxigênio (ERO) (COSTA et al., 2009).

A presença de hidrogênios ativos na hidroxila dos polifenóis suprime a reação em cadeia de ERRO, e atuam como supressores de oxigênio singlete (1O_2), geradas pelas diversas vias metabólicas do organismo, que poderiam culminar em estados patológicos (BARCIROVA, 2010; STASZEWSKI; PILOSOFF; JARGUS, 2011). O uso dos polifenóis colabora para a atividade de várias enzimas antioxidantes endógenas, como a glutathione peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) entre outras (SHARANGI, 2009). Khan et al. (2007) concluiu no seu trabalho que a ingestão de chá verde produziu um aumento da atividade de várias enzimas antioxidante, estando essa atividade fortemente relacionada à presença dos compostos fenólicos, reforçando o efeito benéfico destes compostos presentes no chá. Os compostos fenólicos são responsáveis pela inibição da

peroxidação lipídica, possuindo assim uma atividade protetora sobre constituintes lipídicos do organismo, bem como o DNA celular (FARHOOSH; GOLMOVAHHED; KHODAPARAST, 2007; PEREIRA et al., 2009).

1.4 Espécies reativas de oxigênio e o stress oxidativo

A redução tetravalente completa do oxigênio molecular (O_2) pela citocromo oxidase na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, compreende um processo fisiológico e necessário para a derivação da Adenosina trifosfato (BARREIROS; DAVID, 2006).

O termo ERO refere-se aos compostos radicalares, produzidos durante o processo incompleto de redução tetravalente do O_2 (Esquema 2) (SHAMI; MOREIRA, 2004; FRANCO et al., 2009; KORDE et al., 2011). Radicais livres compreendem moléculas que, apresentam um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada de valência (SHAMI; MOREIRA, 2004; FRANCO et al., 2009; ARSALANI-ZADEH et al., 2010), tornando-os assim altamente instáveis e reativos, com capacidade de se difundir entre inúmeras organelas celulares levando a oxidação destas (MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009).

A produção de ERO é parte integrante do metabolismo aeróbico celular, estando a sua produção associada a processos fisiológicos e patológicos (FRANCO et al., 2009; BARGALI et al., 2009).

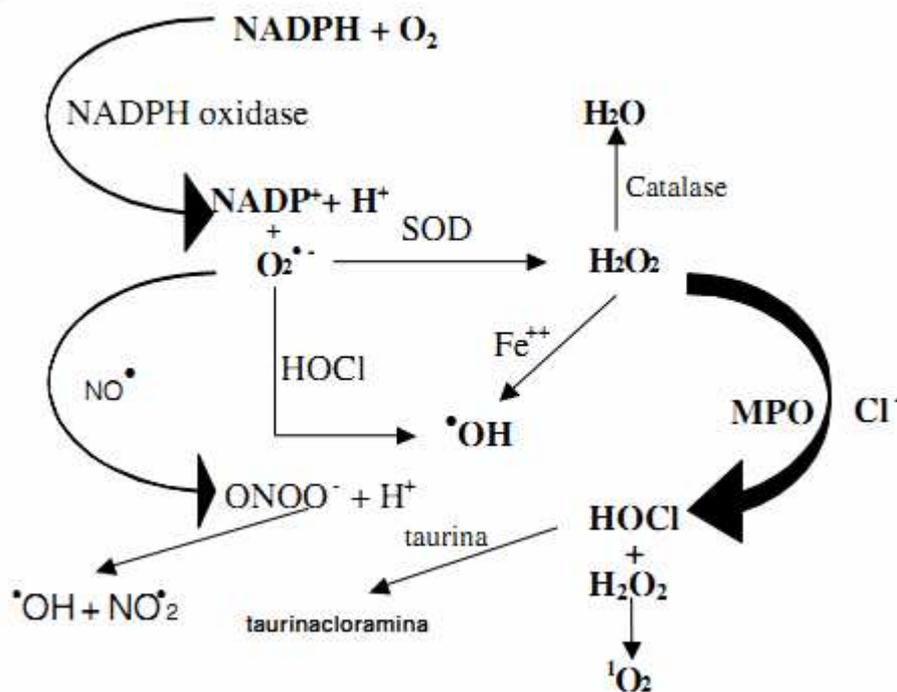
Esquema 2- Redução do O_2 na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial envolvida na geração de ERO



O envelhecimento é consequência dos diferentes processos fisiológicos em que há geração das ERO está associada (BARREIROS; DAVID, 2006), tais como, sinalização celular, fagocitose e produção de energia celular (BARREIROS; DAVID, 2006) pode estar relacionado de modo secundário ao estresse oxidativo. Durante o processo inflamatório a geração de ERO pode ser fortemente induzida para a sinalização da defesa do organismo pela NADPH oxidase, um complexo enzimático de membrana, que cataliza a redução monovalente

do O_2 a radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e pela mieloperoxidase (MPO), enzima que utiliza o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para oxidar íons cloretos a ácido hipocloroso (HOCl), um potente oxidante, durante a ativação de fagócitos no processo inflamatório (Esquema 3) (FRANCO et al., 2009; REUTER et al., 2010; KHALIL, 2005). O aumento da produção de ERO, durante o processo inflamatório ocorre devido a uma elevação do consumo de oxigênio levando o organismo ao chamado estresse oxidativo, o qual está relacionado a processos patológicos degenerativos, tais como danos ao DNA, aos constituintes protéicos celulares, a peroxidação lipídica entre outros (ARSALANI-ZADEH et al., 2011) levando a patologias comuns da velhice, como Parkinson, Alzheimer, arterosclerose e neoplasias entre outras (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Esquema 3- Formação de oxidantes na resposta inflamatória celular (KHALIL, 2005)

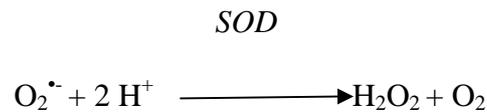


As ERO produzidas nos organismos aeróbicos abrangem: $O_2^{\bullet-}$, radical hidroxil ($HO\bullet$), radical hidropéroxil ($HO_2\bullet$), bem como seus derivados não radicalares, porém igualmente reativos e com capacidade de continuar reagindo, como, o H_2O_2 , 1O_2 e o HOCl (FRANCO et al., 2009; MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009).

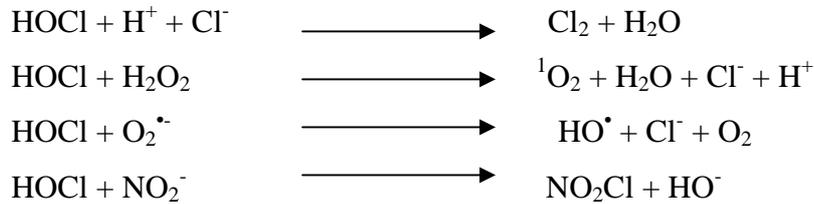
A formação do $O_2^{\bullet-}$ é decorrente da primeira redução monovalente do O_2 ocorrendo em quase todas as células aeróbicas, onde de 1-2% do O_2 consumido pelas mitocôndrias é convertido a $O_2^{\bullet-}$ (MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009). Outra via para sua produção pode ocorrer durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (FERREIRA;

MATSUBARA, 1997). O $O_2^{\bullet-}$ é considerado pouco reativo devido a sua dificuldade de difusão, porém, têm sido observadas lesões biológicas associadas a sua presença, geralmente quando reage com óxido nítrico em situações de hipóxia mitocondrial (VASCONCELOS et al., 2007). O $O_2^{\bullet-}$, quando dismutado pela superóxido dismutase (SOD) (Esquema 4), produz O_2 e H_2O_2 (FRANCO et al., 2009).

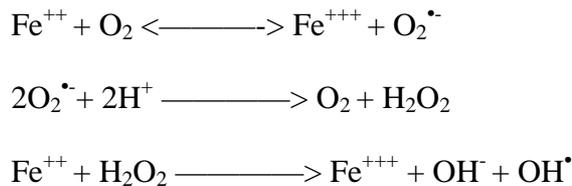
Esquema 4- Dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela SOD para produção do intermediário H_2O_2



O intermediário não radicalar H_2O_2 é extremamente tóxico para as células, pois tem vida longa, e é capaz de atravessar camadas lipídicas podendo reagir com membranas ou proteínas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). É utilizado como substrato para MPO, que em presença de íons Cl^- gera o HOCl (ANTWERPEN et al., 2007). A MPO é uma enzima pertencente à família das heme proteínas, normalmente encontrada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e liberada quando os mesmos são ativados em resposta a defesa imunitária inata, produzindo assim o intermediário metabólico HOCl com função de destruir patógenos invasores durante o processo inflamatório (EGGERS et al., 2010). A atividade da MPO apresenta-se aumentada em pacientes com risco coronariano, pois age como ativadora de monócitos envolvidos na formação das placas de ateroma, e catalisa o início da peroxidação lipídica também associada à aterogênese (EGGERS et al., 2010; WANG et al., 2010). A presença excessiva de HOCl, intermediário metabólico produzido pela MPO, pode estar associada a processos inflamatórios crônicos, como a artrite reumatóide, o HOCl apresenta também a capacidade de reagir com outras ERO e formar novas espécies (Esquema 5), que podem facilmente provocar alterações oxidativas em constituintes protéicos e outros compostos celulares (ANTWERPEN et al., 2007).

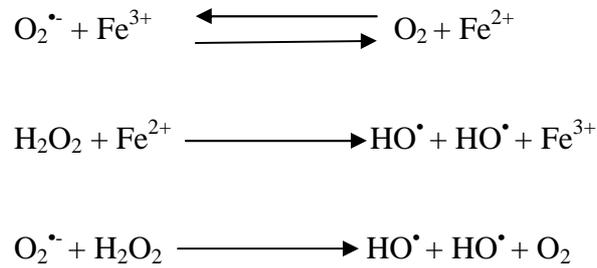
Esquema 5- Reação do HOCl com outras espécies reativas

O H_2O_2 apesar de não ser um radical, pois não apresenta elétrons desemparelhados na última camada de valência, é um metabólito intermediário do oxigênio extremamente deletério, pois além de servir como substrato para a MPO, participa da reação denominada reação de Fenton que produz HO^{\bullet} , especialmente em presença de metais de transição (Cu^{2+} e Fe^{2+}) agindo como redutores (Esquema 6) (FRANCO et al., 2009).

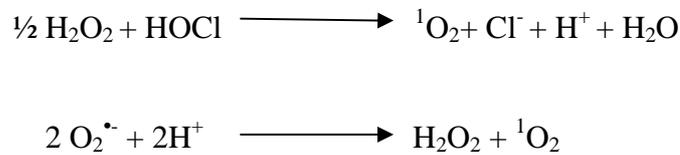
Esquema 6- Formação do OH^{\bullet} - reação de Fenton

O HO^{\bullet} é considerado a ERO mais reativa em sistemas biológicos, devido a sua rápida capacidade em se combinar com metais ou outros radicais, o seu curto tempo de meia vida, e por possuir a capacidade de oxidar biomoléculas, sem preferência ou especificidade (TSANG; CHUNG, 2009). Portanto, se essa ERO for produzida próxima ao DNA, poderão ocorrer modificações de bases púricas e pirimídicas, ocasionando mutações no DNA, que culminaria com a produção neoplásica a longo prazo. O HO^{\bullet} pode inativar várias proteínas e iniciar a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (MAES et al., 2011). Essa ERO pode ser produzida a partir da reação do HOCl e $\text{O}_2^{\bullet -}$ (Esquema 7) ou pelas reações de Fenton e Harber-Weiss (Esquema 8).

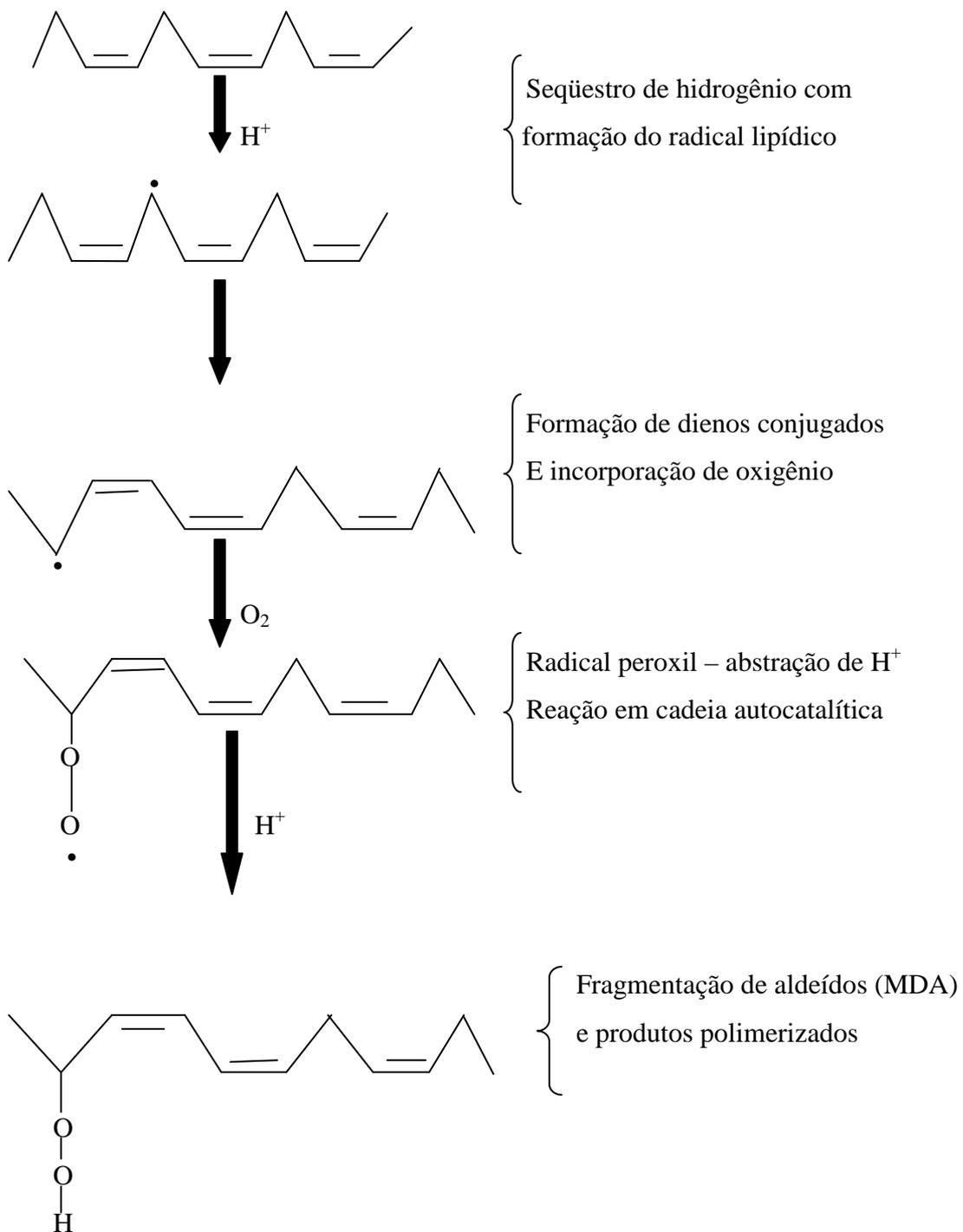
Esquema 7- Reação de produção de HO^{\bullet} a partir do $\text{O}_2^{\bullet -}$ 

Esquema 8- Reação de Harber-Weiss

A presença do $^1\text{O}_2$, forma excitada do O_2 , comumente não tem sido associada a patologias. Porém, quando ocorre produção excessiva e concomitante com a redução na produção de antioxidantes, o $^1\text{O}_2$ está relacionado com processos patológicos (VASCONCELOS et al., 2007). Pode ser produzido através da reação do H_2O_2 com HOCl, ou pela dismutação espontânea do $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Esquema 9) (VASCONCELOS et al., 2007).

Esquema 9- Esquema da produção do $^1\text{O}_2$ através do H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$ 

Os ácidos graxos poliinsaturados presentes nos lipídeos de membrana e outras organelas são alvos freqüentes das ERO, ocorrendo uma reação denominada de peroxidação lipídica (FRANCO et al., 2009). A peroxidação lipídica ocorre em ácidos graxos poliinsaturados quando as ERO retiram um H^+ do grupo metileno das cadeias de ácido graxo poliinsaturado formando o radical lipídico (L^{\bullet}) (Esquema 10) (DEL RIO; STWART; PELLEGRINI, 2005). O L^{\bullet} sofre rearranjo molecular, formando então um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma simples. Os dienos (Esquema 10) reagem com o O_2 , levando a formação de radicais lipídicos peroxil (LOO^{\bullet}), que sofrem reações em cascata, gerando uma série de produtos de hidroperóxidos lipídicos com grande longevidade e alta reatividade o que permite que tais moléculas apresentem atividade dentro e fora da célula, exacerbando o dano oxidativo. Um exemplo é o malonaldeído (MDA) (Esquema 10), aldeído secundário a oxidação lipídica altamente tóxico ao organismo, pois possui a capacidade de reagir com nucleotídeos individuais, aminoácidos nucleofílicos e proteínas (DEL RIO; STWART; PELLEGRINI, 2005).

Esquema 10- Reação em cadeia da peroxidação lipídica

O radical HO_2^\bullet representa a forma protonada do O_2^\bullet e tem sua presença associada à destruição de membranas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS et al., 2007).

O excesso de ERO está intimamente relacionado com a etiopatogenia de diversas doenças crônicas como, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (TSANG; CHUNG, 2009). O cérebro compreende um tecido com elevado consumo de O_2 , baixa concentração de antioxidantes e composto de grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, substratos da peroxidação lipídica, rico em metais, como o ferro, que possuem a capacidade de catalisar a formação de ERO (MAES et al., 2011), conseqüentemente esse tecido torna-se alvo freqüente de danos oxidativos.

Os lipídeos são os alvos principais do ataque das ERO (MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009), que por sua vez originam metabólitos reativos secundários, interagindo também com ácidos nucleicos e proteínas, muitas vezes de modo irreversível (MENA; ORTEGA; ESTRELA, 2009; REUTER et al., 2010; ARSALANI-ZADEH et al., 2011). Com o objetivo de conter a geração excessiva das ERO é necessária a intervenção com antioxidantes, que podem ser definidos segundo Halliwell, (2000) como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada ao substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo.

O organismo é dotado de processos intrínsecos formados por antioxidantes. Estes, dividem-se em enzimáticos e os não enzimáticos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS et al., 2007). Dentre os antioxidantes enzimáticos, citam-se a SOD, a CAT (TSANG; CHUNG, 2009) e as isoformas da GPx (FRANCO et al., 2009; REUTER et al., 2010). Os antioxidantes não enzimáticos são, dentre outros, a glutatona (GSH), vitamina C, vitamina E e vitamina D (REUTER et al., 2010; MAES et al., 2011).

A SOD é a enzima que cataliza a conversão do O_2^\bullet em H_2O_2 , o qual é convertido a O_2 e H_2O por ação da CAT (TSANG; CHUNG, 2009). A GPx também é responsável pela redução nos níveis de H_2O_2 , entretanto, este processo ocorre em presença de GSH (FRANCO et al., 2009; REUTER et al., 2010).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, considera-se a GSH a molécula com maior poder antioxidante devido a sua alta concentração citosólica e por agir diretamente sobre O_2^\bullet , HO^\bullet e NO (MAES et al., 2011). Sabe-se também que a maioria dos aldeídos, como o MDA podem ser inativados também pela conjugação com GSH (FRANCO et al., 2009), ou por antioxidantes oriundos da alimentação (FERREIRA et al., 1997; BARREIROS; DAVID, 2006; ARSALANI-ZADEH et al., 2011).

O chamado estresse oxidativo, nada mais é que a condição de desequilíbrio entre produção de ERO e atividade antioxidante do organismo (FRANCO et al., 2009; REUTER et al., 2010). Em condições de estresse oxidativo há então a necessidade de adicionar extrinsecamente na dieta antioxidantes naturais (VASCONCELOS et al., 2007; LU; CHEN, 2008; STASZEWSKI; PILOSOFF; JARGUS, 2011).

O consumo de antioxidantes naturais, como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonóides) presentes na maioria das plantas superiores, diminuem a formação de radicais livres (MORAIS et al., 2009). Em especial os compostos fenólicos, entre eles as catequinas, que agem como agentes redutores, doadores de hidrogênio estabilizando ou desativando as ERO formadas, contribuindo com uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (ALMAJANO et al., 2008; STASZEWSKI; PILOSOFF; JARGUS, 2011). Portanto, a adesão ao consumo destes compostos antioxidantes é cada vez maior, devido aos benefícios de sua ação sobre o balanço redox das funções fisiológicas (TIJBURG, et al., 1997; HALLIWELL, 2000; ALMAJANO et al., 2008; BARCIROVA, 2010).

1.5 Panorama das infecções fúngicas

De acordo com recentes trabalhos, tem-se observado alterações das características microbiológicas envolvidas nas infecções invasivas ao longo das últimas décadas (LUMBRERAS et al., 2007; MURDOCH et al., 2009). Uma emergência das infecções fúngicas invasivas, sistêmicas e sepse, com elevada morbimortalidade associada, principalmente em imunossuprimidos tem sido observada (METCAF; DOCKRELL, 2007). Isso vem ocorrendo em resposta aos inúmeros avanços tecnológicos em diversas áreas da medicina, entre elas, uma crescente incidência de transplantes de órgãos, o avanço na terapia e sobrevida sobre neoplasias, e o emprego da antibioticoterapia de amplo espectro, associado a um número elevado de procedimentos e uso de cateteres invasivos de longa permanência (SONI; WAGSTAFF, 2005; LUMBRERAS et al., 2007; MURDOCH et al., 2009). O padrão microbiológico da sepse também foi amplamente influenciado pela alta prevalência de infecções pelo HIV, o envelhecimento da população e o surgimento de resistência bacteriana (MURDOCH et al., 2009).

Tradicionalmente a epidemiologia das infecções fúngicas sistêmicas tem sido atribuída comumente a *Candida albicans*, mas ultimamente tem ocorrido um crescimento nas infecções por *Candida* não *albicans* e aspergilose, uma vez que a gravidade da infecção é dependente da suscetibilidade individual apresentada pelo paciente (SONI; WAGSTAFF, 2005; CASTRON-

OSÓRIO et al., 2008). A vulnerabilidade à infecção fúngica tem sido definida como dependente da severidade da doença de base, associada à fatores secundários, como dano tecidual, presença de cateteres intravenosos e antibioticoterapia de amplo espectro (ERJAVEC; VERWEIJ, 2002; SONI; WAGSTAFF, 2005).

O índice de infecções fúngicas invasivas em pacientes transplantados de medula óssea representa um grande fator de risco para a morte dos mesmos. Outros fatores de risco associados à incidência e prevalência destas infecções: neutropenia prolongada, doença do enxerto x hospedeiro, altas doses de corticosteróides, imunossupressão associados à exposição ambiental (METCAF; DOCKRELL, 2007).

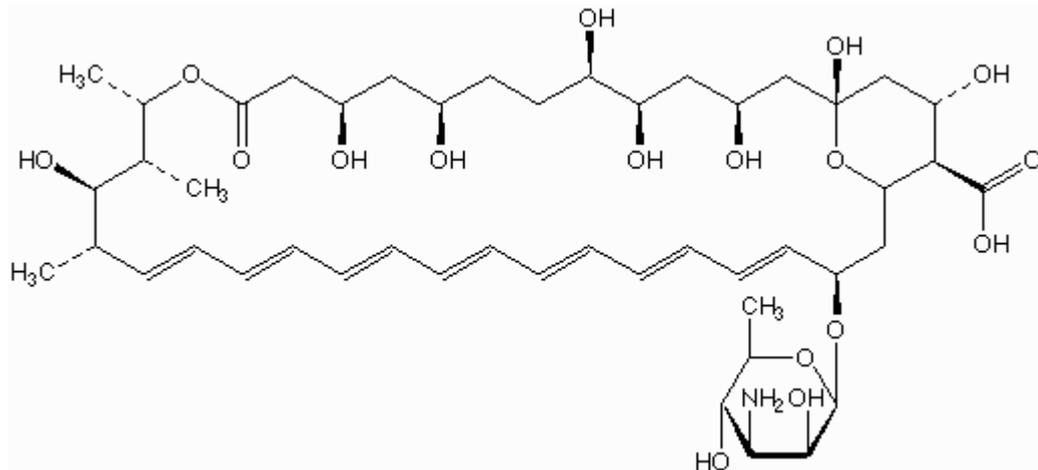
Em recente revisão do panorama séptico, observou-se um aumento significativo de 200% na incidência da sepse fúngica nos últimos 20 anos, ocorrendo um aumento progressivo, da ordem de 1,7 para cada 100.000 habitantes em 1985 para 12,5 para cada 100.000 habitantes em 2006, com grande prevalência da *C. albicans* em infecções nosocomiais, havendo também um significativo aumento de infecções por *C. não albicans*, fato esse relacionado ao uso de fluconazol, em associação a anfotericina B, na tentativa de reduzir a dose desta, e conseqüentemente reduzir seus efeitos adversos (de PAUW; PICAZO, 2008; CASTRON-OSÓRIO et al., 2008; MURDOCH et al., 2009).

1.6 Agentes Antifúngicos

Dentre os agentes antifúngicos de uso sistêmico destacam-se principalmente a anfotericina B e os azóis, tendo como representante o fluconazol. A anfotericina B (Figura 4), é o agente de escolha em infecções fúngicas sistêmicas. É de um antibiótico poliênico natural sendo introduzido seu uso em meados de 1955. É obtida a partir de cepas do actinomiceto *Streptomyces nodosus* e tem sido considerada como fármaco de escolha para o tratamento antifúngico desde meados de 1960 (LANIADO-LABORIN et al., 2009). Devido a sua estrutura anfifílica, a anfotericina B apresenta baixa solubilidade em soluções aquosas e pH fisiológico apresentando a capacidade de gerar agregados, formando uma combinação de monômeros solúveis e agregados solúveis e insolúveis, com grande capacidade de se ligarem ao colesterol da membrana celular, causando desse modo grande toxicidade (VANDERMEULEN et al., 2005; LANIADO-LABORIN et al., 2009; JUNG et al., 2009). Entretanto, sua grande utilização deve-se ao seu amplo espectro de ação e relativamente poucos exemplos de resistência micológica ao fármaco (LANIADO-LABORIN et al., 2009; JUNG et al., 2009). O fluconazol, tem sido utilizado no tratamento de infecções fúngicas

invasivas, porém o mesmo não apresenta atividade fungicida, apenas fugistática e tem havido relatos de resistência fúngica ao tratamento com azóis (de PAUW; PICAZO, 2008).

Figura 5 - Estrutura molecular da anfotericina B



Para reduzir os efeitos adversos da anfotericina B, a mesma tem sido frequentemente associada a outros antifúngicos, como por exemplo os azóis, fluconazol. Porém dados recentes têm apresentado aumento da resistência da candida aos azóis (HAN, 2007; ROSATO et al., 2008).

Faz-se importante o estudo de produtos naturais com atividade antifúngica e antibacteriana. Tem crescido o número de autores que vêm estudando associações de inúmeros produtos naturais, como por exemplo: i) a atividade do extrato de sementes de uvas com atividade antifúngica contra candidíase (HAN, 2007); ii) a demonstração da atividade sinérgica entre óleos essenciais e anfotericina B contra candidíase (ROSATO et al., 2008); iii) a atividade do resveratrol sobre cepas de *C. albicans* patogênicas (JUNG et al., 2007); iv) o efeito anticandida do óleo essencial do *Ocimum sanctum* e sua atividade sinérgica com fluconazol e cetoconazol (AMBER et al., 2010), v) e a demonstração da atividade antifúngica da EGCG sobre isolados clínicos de 7 cepas de *Candida* comparando o CIM obtido por esse produto com o CIM de 5 drogas conhecidas para o tratamento antifúngico: fluconazol, miconazol, anfotericina B, fluouracil, micafungin e itraconazol, sugerindo um possível uso sinérgico entre EGCG e as drogas sintéticas com a finalidade de redução da dose (PARK et al., 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal desse trabalho foi o de analisar qual a forma de *C. sinensis* possui a mais eficiente atividade antioxidante, e se a forma de obtenção interfere nessa atividade, bem como analisar a atividade antifúngica dessas formas.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificação de fenóis totais;
- Avaliação da atividade antioxidante sobre os radicais artificiais: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) e 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH);
- Avaliação da atividade antioxidante sobre: HOCl e O₂^{•-};
- Efeito das diferentes formas da *C. sinensis* sobre a hemólise induzida pelo 2,2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH);
- Análise da capacidade de resistência à peroxidação lipídica pelo processo de formação de dienos conjugados,
- Avaliação sobre a atividade da MPO e
- Teste de susceptibilidade antifúngica sobre cepas ATCC de *Candida spp.*

1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

ABTS, AAPH, DPPH, *nicotinamide adenine dinucleotide* (NADH), *phenazine methosulfate* (PMS), *nitroblue tetrazolium chloride* (NBT), reagente de *Folin-Ciocalteu*, ácido gálico, tetrametilbenzidine (TMB), meio RPMI-1640, ácido 3-N-morfolino propanosulfônico (MOPS) e ágar saboraud dextrose foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os demais reagentes utilizados apresentam padrão analítico.

3.1.2 Equipamentos

Espectrofotômetro UV-Vis (Jasco); Leitora de Micro placas (Spectra Max190), Microcentrífuga refrigerada – CT 15000R (Cientec), pHmetro pH 221 (Lutron), Balança analítica (Tecnol), Estufa (Quimis), Homogeneizador AP 22 (Phoenix), agitador magnético mini com resistência (Quimis), câmara de fluxo laminar (Veco), estufa bacteriológica (Quimis) e purificador de água miliQ.

3.1.3 Cepas

Para os testes de susceptibilidade antifúngica foram utilizadas as seguintes cepas ATCC: *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida albicans* ATCC 64548 e *Candida krusei* ATCC 6258.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo do chá

Para os ensaios de avaliação da atividade antioxidante e antifúngica da *C. sinensis* foram adquiridos no mercado local quatro tipos de chás, cada qual representando diferentes métodos de obtenção, não fermentado (verde e branco), semi fermentado (vermelho) e fermentado (preto). Os chás foram comprados embalados, de uma determinada marca como referência. Desde sua obtenção até o final dos experimentos propostos foram utilizados chás de mesmo lote, ficando as caixas armazenadas em suas respectivas embalagens originais ao abrigo da luz e umidade. Cada amostra de 0,1 g foi preparada separadamente sob a forma de infusão onde foi adicionado 5 mL de água destilada em ebulição, em um erlenmeyer de 25 mL, que teve sua boca tampada por papel alumínio, permanecendo em infusão por 30 minutos, no escuro (LU et al., 2011). Em seguida os chás foram filtrados por 16 camadas de gaze hidrófila 9 fios, originando a solução mãe dos diferentes chás. A partir da solução mãe

procederam-se diluições sucessivas com água destilada ou tampão fosfato salina (PBS) 10 ou 50 mmol.L⁻¹ e 15 mmol.L⁻¹ NaCl, conforme ensaio. Os resultados foram expressos em µg.mL⁻¹ e mg.mL⁻¹ baseando-se nos volumes utilizados para as preparação das soluções testadas.

3.2.2 Obtenção do resíduo seco dos chás da *C. sinensis*

Várias placas de petri sem tampa foram minuciosamente lavadas com água e sabão, em seguida passado álcool 70° para posterior secagem em estufa. Depois de totalmente secas, as placas foram cuidadosamente retiradas da estufa com o auxílio de pinça para não agregar peso às mesmas, sendo então resfriadas e obtidas as taras individuais em balança analítica. Os chás foram preparados conforme subitem 3.2.1, seu conteúdo foi vertido às placas específicas e mantido em estufa à 37°C até a completa evaporação do líquido. Em seguida as placas foram deixadas esfriar e pesadas, para o correto cálculo da concentração utilizada nas análises que seguem.

3.2.3 Concentrações testadas dos chás da *C. sinensis*

A concentração da *C. sinensis* utilizada para a quantificação de fenóis totais foi de 270µg/mL. Para as análises sobre DPPH, ABTS^{•+}, O₂^{•-}, Atividade citotóxica in vitro sobre hemácias, pesquisa da formação de dienos conjugados, avaliação da cinética da MPO, foram utilizadas a solução de 270µg.mL⁻¹ quatro diluições sucessivas na razão de 1:3 que corresponde respectivamente a 90µg.mL⁻¹, 30µg.mL⁻¹, 10µg.mL⁻¹. Para a atividade sobre o HOCl foram usadas as seguintes concentrações: 30µg.mL⁻¹, 15µg.mL⁻¹, 10µg.mL⁻¹, 5µg.mL⁻¹, 3,33µg.mL⁻¹, 1,66 µg.mL⁻¹ e 1,11 µg.mL⁻¹. Para o teste de susceptibilidade forma utilizadas as concentrações 270µg.mL⁻¹e sucessivas diluições 1:2, correspondendo a 135µg.mL⁻¹, 67,5µg.mL⁻¹, 33,75µg.mL⁻¹, 16,87µg.mL⁻¹e 8,43µg.mL⁻¹.

3.2.4 Quantificação de fenóis totais dos chás da *C. sinensis*

A quantificação de fenóis totais da *C. sinensis*, foi determinada pelo método de *Folin-Ciocalteu* modificado, compreendendo na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas em meio alcalino. À solução de 1 µg.mL⁻¹, foi acrescentada a solução de Folin-Ciocalteu; sendo a reação iniciada pelo acréscimo de uma solução de carbonato de sódio (7,5% p/v). Posteriormente a mistura foi incubada a 37° C por 15min e determinada a absorvância em 680 nm. Utilizou-se como padrão o ácido gálico (BORA et al., 2005).

3.2.5 Atividade dos chás da *C. sinensis* sobre o DPPH

Foi determinada a atividade antioxidante sobre o DPPH utilizando o método de Yamaguchi et al. (2000), modificado. O DPPH apresenta forte absorção no espectro visível caracterizado por uma coloração violácea intensa, devido à presença de elétrons livres. Quando o DPPH reage com um elétron doado por um composto antioxidante, ocorre proporcionalmente queda na absorvância. Uma solução de DPPH ($60 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi preparada em etanol 99%. Em uma microplaca, foram adicionados às diferentes concentrações da *C. sinensis* à solução de DPPH. A mistura foi incubada ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 30 minutos, sendo então, observada a alteração da absorvância do DPPH em 531 nm.

3.2.6 Atividade dos chás da *C. sinensis* sobre o ABTS^{•+}

Foi determinada a atividade antioxidante sobre ABTS^{•+} utilizando o método de Re et al. (1999), modificado. O ABTS^{•+} é um radical catiônico que pode ser gerado por reação química, eletroquímica ou enzimática a partir de uma solução de ABTS. Quando o ABTS é oxidado pelo persulfato de potássio, ocorre a formação do ABTS^{•+}. A atividade antioxidante dos chás pôde ser mensurada quantitativamente pela redução da absorvância, devido o ABTS^{•+} receber um elétron de um agente antioxidante para se estabilizar. Inicialmente uma mistura aquosa de ABTS (7 mmol.L^{-1}) e persulfato de potássio ($2,45 \text{ mmol.L}^{-1}$) foi incubada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 12 horas. A solução formada de ABTS^{•+} foi diluída em PBS 50 mmol.L^{-1} , pH 7,4 a uma absorvância de 0,70 (734 nm). Diferentes concentrações da *C. sinensis* foram então incubadas com o ABTS^{•+} por 30 minutos a temperatura ambiente, a redução do ABTS^{•+} pelos chás foi observada em 734 nm.

3.2.7 Atividade dos chás da *C. sinensis* sobre o O₂^{•-}

O ensaio foi realizado conforme Kakkar et al. (1984) modificado. A reação ocorreu em PBS 50 mmol.L^{-1} , pH 8,3, contendo PMS ($0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$) e NBT ($0,045 \text{ mmol.L}^{-1}$), na presença das diferentes concentrações da *C. sinensis*, com incubação de 2 minutos a temperatura ambiente. A reação (formação de O₂^{•-}) foi iniciada pela adição de NADH ($2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) após 90 segundos, com a formação de uma formazana, obtida pela redução do NBT. Compostos com potencial antioxidante competem com o NBT pelo O₂^{•-} diminuindo a redução do NBT e, conseqüentemente, a formação da formazana. A leitura foi realizada em 560 nm.

3.2.8 Atividade dos chás da *C. sinensis* sobre o HOCl

a) Preparo do HOCl:

A solução de HOCl 1 mmol.L^{-1} foi preparada a partir de uma solução de NaOCl em NaOH 50 mmol.L^{-1} . A concentração da solução de HOCl foi verificada espectrofotometricamente usando o coeficiente de extinção molar $350 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ em 292 nm .

b) Preparo do TMB:

A solução de TMB $0,014 \text{ mol.L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se $0,017\text{g}$ de TMB em $2,5 \text{ mL}$ de dimetilformamida, $2,45 \text{ mL}$ de ácido acético $0,8 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,05 \text{ mL}$ de KI $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$.

c) Análise experimental:

Para a análise antioxidante sobre o HOCl foi utilizado o método de Paino et al.(2005). A reação ocorreu em PBS 50 mmol.L^{-1} , pH $7,4$ contendo diferentes concentrações da *C. sinensis* e $75 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ de HOCl, com incubação de 15 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. O HOCl remanescente foi revelado pela adição de uma solução de TMB ($0,014 \text{ mol.L}^{-1}$), cujo produto de oxidação possui absorvância máxima em 652 nm .

3.2.9 Atividade dos chás da *C. sinensis* sobre a ação citotóxica *in vitro* do AAPH sobre hemácias

Para a obtenção das hemácias foram coletados 10mL de sangue total de três indivíduos voluntários sadios, acima de 18 anos . A coleta foi efetuada por punção venosa periférica obedecendo às normas de biossegurança, como assepsia do local da punção, com a utilização de álcool 70% e equipamento de proteção individual como, luva de procedimento pelo responsável pela coleta. Para todas as análises em que foram utilizadas amostra de sangue, os procedimentos foram iguais aos citados. O sangue coletado (10mL) foi colocado em tubo de vidro contendo $10\mu\text{L}$ de heparina 5.000 UI (laboratório Cristália) e homogeneizado, sempre nessa mesma proporção. O sangue foi centrifugado por 5 minutos a 4°C e 1200g , e em seguida retirado o plasma e a camada de leucócitos por aspiração. A suspensão de hemácias foi lavada com solução gelada de PBS 10 mmol.L^{-1} , pH $7,4$ por três vezes. As hemácias foram ressuspensas em PBS 50 mmol.L^{-1} , pH $7,4$ acertando-se o volume globular para 1% . Diferentes concentrações da *C. sinensis* foram incubadas com a solução de hemácias 1% e na presença ou ausência de AAPH (50 mmol.L^{-1}) por 6 horas a temperatura de 37°C , sob constante homogeneização. A reação foi finalizada pela centrifugação da solução a 1200g a 4°C por 5 minutos . O conteúdo de hemoglobina liberado, devido à ação citotóxica do AAPH, foi determinado no sobrenadante através da medida da absorvância em 540 nm . Para esse experimento os chás foram preparados conforme descrito no item 3.1.2, sendo substituída a

água do preparo por PBS 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4 (ESPADA et al., 2008). Esse ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Centro Oeste, sob o ofício nº - 408/2010.

3.2.10 Pesquisa da formação de dienos conjugados no soro

Para a pesquisa da formação de dienos conjugados, foram coletados 3mL de sangue de um indivíduo voluntário sadio maior de 18 anos normolipêmico segundo o método de Schnitzer et al. (1998) modificado, onde após a retração do coágulo o sangue foi centrifugado por 5 minutos a 4°C e 1200g. Em seguida, foi retirado o soro e diluído numa proporção de 1:100 em PBS 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4. O soro foi incubado com diferentes concentrações da *C. sinensis*. O processo de peroxidação lipídica foi iniciado pela adição de uma solução de CuCl₂ (30 µmol.L⁻¹), sendo o processo monitorado a 245 nm a cada 10 minutos, durante 5 horas. O perfil cinético da peroxidação lipídica pode ser analisado em três fases: i) a fase de latência (*lag fase*), a fase de propagação, e a fase de degradação. Na primeira fase, há o consumo dos antioxidantes, endógenos e exógenos (chás), entretanto ainda não se observa a oxidação significativa dos ácidos graxos. Logo após o consumo dos antioxidantes, caracterizado pelo um tempo de resistência dos ácidos graxos à oxidação, ocorre uma rápida oxidação dos ácidos graxos com formação de dienos conjugados durante a fase de propagação. Na fase de degradação observa-se uma lenta queda nos níveis de dienos (SCHNITZER et al., 1998). Esse ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Centro Oeste, sob o ofício nº 408/2010.

3.2.11 Avaliação da cinética da MPO

A oxidação do guaiacol (80 mmol.L⁻¹) pelo sistema MPO (8 nmol.L⁻¹) / H₂O₂ (48mmol.L⁻¹) foi realizada em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,4 a temperatura de 37°C na presença de diferentes concentrações da *C. sinensis* em uma microplaca, segundo Jerlich et al. (2000) modificado. A reação foi monitorada espectrofotometricamente pela formação de tetrahidroguaiacol a 470 nm, com verificação da absorvância de 10 em 10 segundos no tempo total de 10 minutos.

3.2.12 Teste de susceptibilidade antifúngica

a) Preparo do meio RPMI 1640:

O meio de cultura RPMI 1640 é um meio sintético com vermelho fenol, glutamina e

sem bicarbonato, foi preparado em água miliQ, tamponado com MOPS e ajustado pH com solução $0,1\text{mol.L}^{-1}$ de NaOH e esterilizado por filtração.

b) Culturas:

Para o inoculo do teste de susceptibilidade foram utilizadas cepas ATCC com cultura por esgotamento em agar saboraud dextrose com 24 horas de incubação a 37°C .

c) Análise experimental:

O teste de susceptibilidade foi realizado de acordo com o documento M-27-A2, 2002 publicado pelo CLSI, antigo NCCLS. Inicialmente o inóculo da levedura foi padronizado em solução salina visualmente à turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala padrão de McFarland e então confirmado espectrofometricamente à 530 nm (DO 0,08-0,1). De acordo com a normativa M-27 procedeu-se a microdiluição, diluindo o inóculo ajustado em salina nas proporções de 1:50 e 1:20 respectivamente em RPMI, com o objetivo de se obter 1×10^3 a 5×10^3 UFC.mL⁻¹. Em uma microplaca foi inoculado 100 μL da suspensão de leveduras e 10 μL dos chás verde, branco, vermelho e preto, completando-se o volume final de cada poço da microplaca para 200 μL com meio RPMI. Paralelamente foram efetuados controles positivos de crescimento, onde na mesma microplaca foi inoculado 100 μL da suspensão de leveduras sem a adição dos chás estudados, completando-se o volume final do poço para 200 μL com meio RPMI. O controle negativo consistiu em preencher os poços da microplaca apenas com meio RPMI para evidenciar a eficácia do sistema e a ausência de contaminação no meio puro. As placas foram incubadas a 37°C e o resultado foi analisado em 24 horas, por inspeção visual da turvação. A menor concentração onde não houve turvação foi considerada a concentração inibitória mínima (CIM) (PARK et al., 2006).

3.2.13 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Comparações estatísticas foram feitas pela ANOVA com 95% de confiança. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$ pela comparação entre as médias pelo pós teste Tukey, onde os resultados expressos significam que letras diferentes correspondem a valores que diferem entre si significativamente, e letras iguais valores que não diferem entre si significativamente nas colunas, as análises foram repetidas em triplicata.

3.2.14 Cálculo da porcentagem de inibição

As análises cujos resultados foram expressos em % de inibição tiveram seus resultados

determinados pela fórmula a baixo esquematizada.

$$\% \text{ de inibição} = (A_c - A_t) / A_c \times 100$$

Sendo que: A_c = absorbância do controle e A_t = absorbância do teste

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de quantificação

4.1.1 Quantificação de fenóis totais dos chás da *C. sinensis*

Determinou-se a concentração de fenóis totais presentes nos chás obtidos por diferentes processos baseando-se na equivalência da concentração de ácido gálico, conforme demonstrada na curva padrão (Figura 6). De acordo com os valores apresentados (Tabela 1) demonstrou-se que o processo de obtenção dos chás interferiu na concentração de fenóis totais, pois a concentração desses compostos foi superior nas amostras de chás verde ($76,00 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,162$) e branco ($85,36 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,057$) quando comparados ao vermelho ($45,47 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,102$) e preto ($43,34 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,034$). O resultado obtido sugere que além do processo não fermentativo manter a estrutura dos polifenóis na sua forma monomérica, mais estável (ALMAJANO et al., 2008), também contribui para proteger tais compostos da degradação, sugerindo assim que os chás que possuem um conteúdo de fenóis totais mais elevado, conseqüentemente apresentam uma maior atividade antioxidante.

Os chás verde e branco são obtidos por processo não fermentativo, apenas pela secagem das folhas frescas o que confere ao chá branco a cor característica pela presença dos pelos brancos dos brotos, além da adstringência peculiar (CHAN; LIM; CHEW, 2007; GODOIN et al., 2007).

A fermentação ou semi fermentação dos chás dá origem a dímeros ou polímeros das catequinas, denominadas de teaflavinas, teasinensinas e tearubiginas, responsáveis por conferir a esses chás o sabor e aroma que lhes são característicos livres de adstringência (BARCIROVA, 2010).

Figura 6 – Curva analítica para a determinação de fenóis totais, absorvância x concentração, utilizando o reagente de Folin- Ciocalteau e leitura em $\lambda = 680$ nm

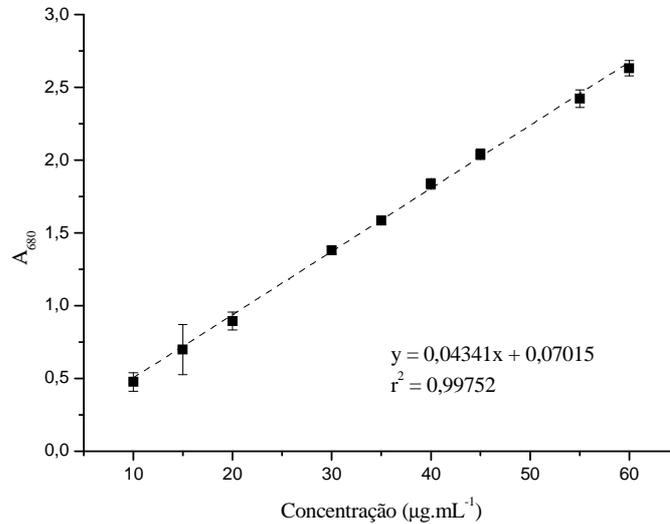


Tabela 1- Quantificação de fenóis totais, equivalentes em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido gálico, da *C. sinensis* sob a forma de chás obtidos por diferentes métodos de produção

AMOSTRA	QUANTIDADE DE FENÓIS TOTAIS (equivalente em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido gálico)
Chá verde	$76,00 \pm 0,162^a$
Chá branco	$85,36 \pm 0,057^b$
Chá vermelho	$45,47 \pm 0,102^c$
Chá preto	$43,34 \pm 0,034^c$

Os resultados expressos correspondem a média $\pm Dp$; onde letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) sendo que as análises foram efetuadas em triplicata

4.2 Ensaio Antioxidantes

4.2.1 Atividade dos chás da *C. sinensis* sobre DPPH

O DPPH é um radical livre artificial capaz de aceitar um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável (LU; CHEN, 2008). A atividade da *C. sinensis* sobre DPPH (Figura 7) é mais pronunciada nos chás verde e branco, mostrando uma forte correlação entre atividade antioxidante e concentração de compostos fenólicos. Contudo não necessariamente o chá que apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos, apresentou a melhor atividade antioxidante (branco), sugerindo que outros fatores além da quantidade de compostos fenólicos interfere na atividade antioxidante dos chás. Os chás verde e branco apresentam grande atividade antioxidante, superior a 50% até a concentração de $30\mu\text{g.mL}^{-1}$. Entretanto, as amostras dos chás vermelho e preto, apresentam-se com a mesma intensidade de atividade antioxidante apenas nas concentrações de 270 e $90\mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando que a atividade antioxidante é dose dependente, pois a medida que a amostra é diluída essa diminui. O valor obtido pelo cálculo da CI_{50} comprova que a atividade antioxidante sobre esse radical é mais pronunciada nos chá branco e verde, seguidos pelo vermelho e preto. O DPPH tem sido amplamente utilizado como modelo de radical artificial estável, na forma de substrato para avaliar a capacidade sequestradora de radicais livres de um antioxidante (LU; CHEN, 2008).

Figura 7 – Efeito *C. sinensis* sobre o DPPH, onde a solução DPPH ($60\mu\text{mol.L}^{-1}$) foi incubada 30 minutos ao abrigo da luz e temperatura ambiente, com diferentes concentrações da *C. sinensis* sob a forma de infusão. A queda da absorvância do DPPH foi observada espectrofotometricamente a 531 nm

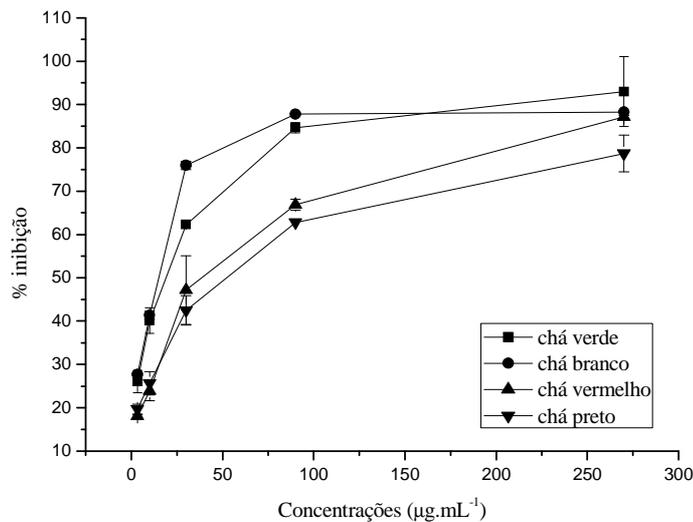


Tabela 2: Análise da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) do DPPH obtido pela exposição do mesmo a diferentes concentrações da *C. sinensis* obtidas pelo método de infusão

AMOSTRA	CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Chá verde	14,45 ± 0,162 ^a
Chá branco	11,38 ± 0,2192 ^a
Chá vermelho	32,69 ± 4,228 ^b
Chá preto	40,16 ± 0,268 ^b

Os resultados expressos correspondem a média ±Dp; onde letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) sendo que as análises foram efetuadas em triplicata

4.2.2 Atividade dos chás da *C. sinensis* sobre o ABTS^{•+}

A pesquisa da atividade antioxidante sobre ABTS^{•+} tem sido usado amplamente como modelo experimental, para a análise da atividade antioxidante de produtos naturais devido a sua característica catiônica semelhante ao HO[•], considerada a ERO mais reativa, capaz de causar danos no material nuclear e peroxidação lipídica. Conforme resultado obtido pela análise do CI₅₀ da atividade antioxidante (Tabela 3) observou-se que, a concentração responsável por inibir a atividade oxidativa em 50% é mais efetiva nos chás verde e branco, não diferindo significativamente, o que vem a reforçar os resultados apresentados na tabela 1, caracterizando que os chás que possuem uma maior quantidade de fenóis totais, proporcionalmente, apresentam uma atividade antioxidante mais eficiente. Contudo, não necessariamente, o chá que apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos, apresentou a melhor atividade antioxidante (branco), sugerindo que outros fatores como, metilxantinas, vitaminas entre outros, além da concentração de compostos fenólicos interfere na atividade antioxidante dos chás. Ao comparar o resultado obtido sobre o ABTS^{•+} com o obtido sobre o DPPH observa-se que radicais artificiais diferentes, porém com mesma característica apresentam resultados semelhantes, pois na atividade sobre o DPPH a concentração de chá necessária para estabilizar o radical artificial foi maior que a necessária para o ABTS^{•+}.

Figura 8 - Efeito *C. sinensis* sobre o ABTS^{•+} onde a solução de ABTS^{•+} em PBS 50 mmol.L⁻¹ pH 7,4 incubada ao abrigo da luz com várias concentrações da *C. sinensis* sob a forma de infusão. A absorvância foi observada espectrofotometricamente a 734 nm

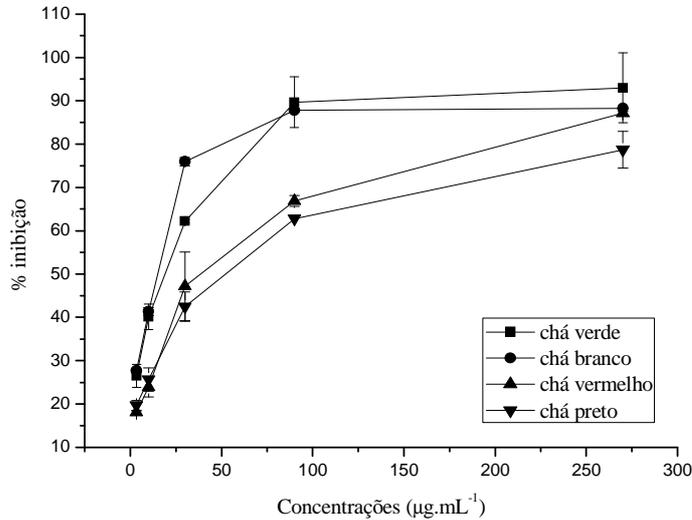


Tabela 3- Análise da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) das diferentes concentrações da *C. sinensis* obtidas pelo método de infusão sobre o ABTS^{•+}

AMOSTRA	CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Chá verde	5,19 ± 0,007 ^a
Chá branco	5,21 ± 0,353 ^a
Chá vermelho	13,55 ± 0,007 ^b
Chá preto	14,55 ± 0,247 ^b

Os resultados expressos correspondem a média ±Dp; onde letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) sendo que as análises foram efetuadas em triplicata

4.2.3 Atividade dos chás da *C. sinensis* sobre o O₂^{•-}

O O₂^{•-} foi formado pela oxidação do NADH e quantificados pela redução do NBT, com concomitante aumento da absorvância a 560 nm (LU; CHEN, 2008), que é reduzida com a adição de um anti-radicalar no meio reacional. O efeito da *C. sinensis* sobre o O₂^{•-} (Figura

9) demonstra que a atividade anti-radicalar diminui à medida que a concentração dos chás diminui. A atividade mais pronunciada, conforme os dados é apresentada pelos chás verde e branco, os quais não diferem estatisticamente (Tabela 4). A atividade antioxidante dos chás vermelho e preto apresentaram um decréscimo a partir da concentração de $90\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Observa-se (Tabela 4) que a atividade anti-radicalar representada pelo CI_{50} apresenta-se em ordem decrescente verde = branco > vermelho > preto.

O resultado obtido sobre o $\text{O}_2^{\cdot-}$, é de grande importância, não pela sua reatividade, mas devido ao seu longo tempo de meia vida, permitindo a formação de novas ERO (HALLIWEL, 2006; FRANCO et al., 2009). Esse radical possui a característica de reagir com enzimas contendo Fe^{2+} , produzindo intermediários metabólicos, como H_2O_2 , que apresenta reatividade intermediária e radicais altamente deletérios, como o HO^{\cdot} (HALLIWEL, 2006). Uma vez que o $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode facilmente ser convertido à HO^{\cdot} , a formação excessiva de $\text{O}_2^{\cdot-}$ está relacionada à toxicidade biológica, incluindo dano ao DNA (WILMS et al., 2008). O $\text{O}_2^{\cdot-}$ também serve como substrato para a formação de H_2O_2 através da sua dismutação pela SOD, o que vem a ativar MPO, originando a produção de HOCl que é um potente oxidante (PEVAIZ; CLEMENTE, 2007).

Figura 9 - Efeito *C. sinensis* sobre o sobre $\text{O}_2^{\cdot-}$ que foi formado pelo sistema PMS ($0,1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)/NBT /NADH ($2,5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), realizado em PBS $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, na ausência ou presença de diferentes concentrações da *C. sinensis* sob a forma de infusão. A absorvância foi observada espectrofotometricamente em 560 nm

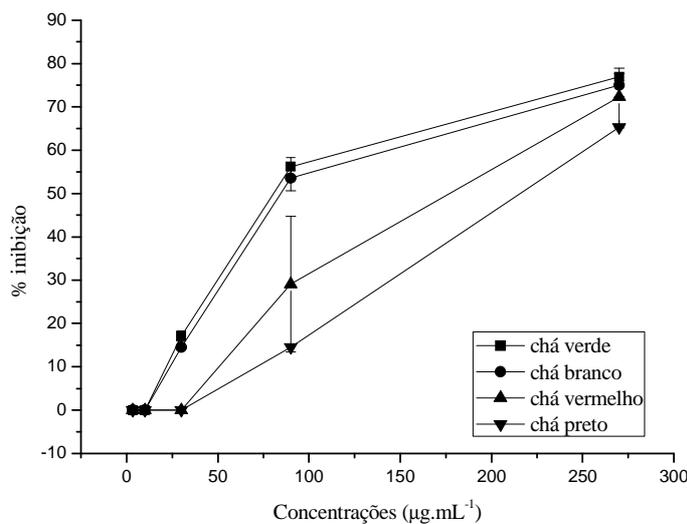


Tabela 4- Análise da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) das diferentes concentrações da *C. sinensis* obtidas pelo método de infusão sobre O₂^{•-}

AMOSTRA	CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Chá verde	89,70±2,687 ^a
Chá branco	98,14±7,021 ^a
Chá vermelho	171,89±4,084 ^b
Chá preto	215,76±0,509 ^c

Os resultados expressos correspondem a média ±Dp; onde letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) sendo que as análises foram efetuadas em triplicata

4.2.4 Atividade dos chás da *C. sinensis* sobre o HOCl

A atividade da *C. sinensis* sobre o HOCl (Figura 10), apresenta-se mais efetiva pelo chá verde, seguido pelo branco, vermelho e preto. O cálculo do CI₅₀ (Tabela 5) apresenta atividade antioxidante superior para o chá verde, que difere significativamente do branco, seguido do vermelho e preto, que não diferem estatisticamente. Nota-se nesse ensaio uma redução da concentração usada em comparação aos demais, o que caracteriza uma forte sensibilidade do HOCl à atividade antioxidante dos chás testados.

O HOCl é um potente oxidante formado como subproduto da atividade da MPO com H₂O₂ e haletos pelo sistema de fagócitos ativados e apresenta uma atividade microbicida importante (CHANTEPIE et al., 2009, JERLICH et al., 2000). Porém a produção excessiva de HOCl contribui para o dano tecidual em processos inflamatórios crônicos, como artrite reumatóide, e está relacionado, entre outros, com a iniciação e propagação da doença crônica cardiovascular (CHANTEPIE et al., 2009). A ativação da micróglia pela proteína β amilóide tem sido associado a concentrações elevadas de HOCl (YAP; WHITEMAN; CHEUNG, 2007; YAP et al., 2010). A concentração de HOCl na doença de Alzheimer pode estar elevada cerca de 3 vezes do normal, estando relacionado à perda neuronal e dano cognitivo (YAP et al., 2010). Também, a sua produção no fagossomo contribui para o dano tecidual no local da inflamação, como inativação de enzimas, oxidação de aminoácidos e cloração de lipídeos (GUILPAIN et al., 2008).

Figura 10 - Efeito *C. sinensis* sobre o sobre HOCl realizada em PBS pH 7,4 onde uma solução HOCl ($75 \mu \text{mol.L}^{-1}$) foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz com diferentes concentrações da *C. sinensis* sob a forma de infusão. O HOCl remanescente foi revelado com a adição de TMB. A absorvância foi observada espectrofotometricamente em 652 nm

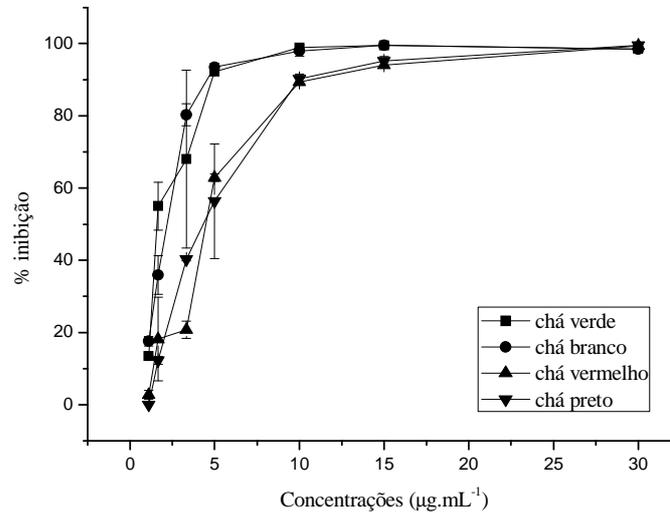


Tabela 5: Análise da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) das diferentes concentrações da *C. sinensis* obtidas pelo método de infusão sobre o HOCl

AMOSTRA	CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Chá verde	$1,61 \pm 0,523^a$
Chá branco	$2,13 \pm 0,070^b$
Chá vermelho	$3,47 \pm 1,965^c$
Chá preto	$4,06 \pm 0,417^c$

Os resultados expressos correspondem a média $\pm Dp$; onde letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) sendo que as análises foram efetuadas em triplicata

4.2.5 Atividade dos chás da *C. sinensis* sobre hemólise induzida por AAPH

A atividade protetora da *C. sinensis* sobre a hemólise induzida pelo AAPH foi demonstrada pelos chás verde e branco, apresentando uma maior atividade do chá verde (Figura 11). A atividade antioxidante dos chás vermelho e preto apresentam-se inferiores, possivelmente, devido a menor concentração dos compostos fenólicos e/ou pela composição dos mesmos, pois apresentam-se polimerizados pela fermentação (LIMA et al., 2009; SHARANGI, 2009). Pelo cálculo do CI_{50} (Tabela 6) uma atividade mais pronunciada do chá verde em relação aos demais, seguindo a ordem decrescente da atividade antioxidante: verde > branco > preto > vermelho. A atividade do chá vermelho é pelo menos 10 vezes menor que a atividade do chá verde levando em consideração o cálculo do CI_{50} . A utilização de hemácias para a análise da citotoxicidade tem sido amplamente empregada devido à composição abundante em proteínas e lipídeos das membranas, fazendo dos eritrócitos um substrato modelo para avaliar a capacidade antioxidante (SIMÃO et al., 2006; BEGUM; TERAQ, 2002; SATO et al., 1995). Ao induzir a hemólise por AAPH, observamos um comportamento antioxidante similar aos obtidos nos modelos de atividade antioxidante descritos anteriormente (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Figura 11 – Efeito *C. sinensis* sobre a sobre a hemólise induzida com AAPH, onde hemácias 1% em PBS 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4 foram incubadas por 6 horas com várias concentrações da *C. sinensis* sob a forma de infusão na presença ou ausência de AAPH (50 mmol.L⁻¹)

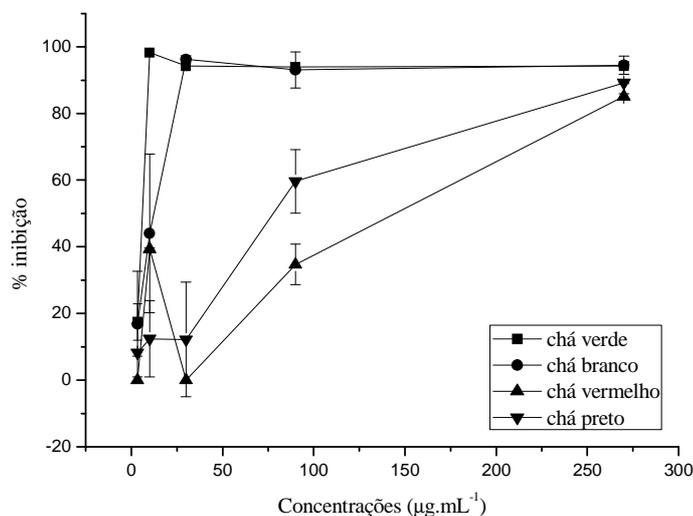


Tabela 6: Análise da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) das diferentes concentrações da *C. sinensis* obtidas pelo método de infusão sobre o processo de hemólise induzida pelo tratamento das hemácias com AAPH*

AMOSTRA	CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Chá verde	12,15±4,362 ^a
Chá branco	19,526±6,470 ^b
Chá vermelho	143,68±1,432 ^c
Chá preto	71,21±6,427 ^d

Os resultados expressos correspondem a média ±Dp; onde letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) sendo que as análises foram efetuadas em triplicata

4.3 Ensaio Cinéticos

4.3.1 Pesquisa da formação de dienos conjugados

Na figura 12 as curvas apresentam a formação dos dienos conjugados característicos da peroxidação lipídica. Esse processo está amplamente relacionado com danos celulares e patologias crônicas, tais como neoplasias, doenças neurodegenerativas, como o mal de Alzheimer e doença de Parkinson, além das doenças inflamatórias. De acordo com o tratamento do soro com as variáveis da *C. sinensis* observou-se uma maior resistência à peroxidação lipídica pelos chás verde e branco, seguido pelo chá vermelho e pelo chá preto, que não difere significativamente do controle, soro não tratado. Observa-se tal diferença pela presença da chamada *lag fase*, período de tempo onde há uma resistência dos lipídeos a peroxidação. Esse resultado está apresentado na tabela 7, em minutos de resistência do soro à peroxidação.

Os lipídeos de membrana são constituintes celulares ricos em ácidos graxos poliinsaturados, sendo então alvos frequentes das ERO. Essa reação é denominada de peroxidação lipídica (FRANCO et al., 2009). A peroxidação lipídica ocorre quando as ERO retiram um H⁺ do grupo metileno das cadeias de ácido graxo poliinsaturado formando o L[•] (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). O L[•] forma um dieno conjugado, que reage

com o O_2 , levando a formação de LOO^\bullet , que sofre reações em cascata, gerando uma série de produtos de hidroperóxidos lipídicos que possuem uma grande longevidade e uma alta reatividade, apresentando atividade dentro e fora da célula. Os hidroperóxidos lipídicos formados, como por exemplo, o MDA possui a capacidade de reagir com nucleotídeos individuais, aminoácidos nucleofílicos e proteínas exacerbando o dano oxidativo (FRANCO et al., 2009; MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009). De acordo com o balanço redox do organismo com produção de antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos pelo organismo, denominamos de *lag fase* o tempo de resistência dos lipídeos de membrana em sofrer oxidação e dar origem ao que chamamos de dienos conjugados.

Figura 12 – Efeito da *C. sinensis* sobre a peroxidação lipídica que foi induzida pela adição de solução $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CuCl_2 em soro normolipêmico com várias concentrações da *C. sinensis* sob a forma de infusão. A variação da absorvância foi monitorada em 245 nm durante 3 horas a cada 10 minutos

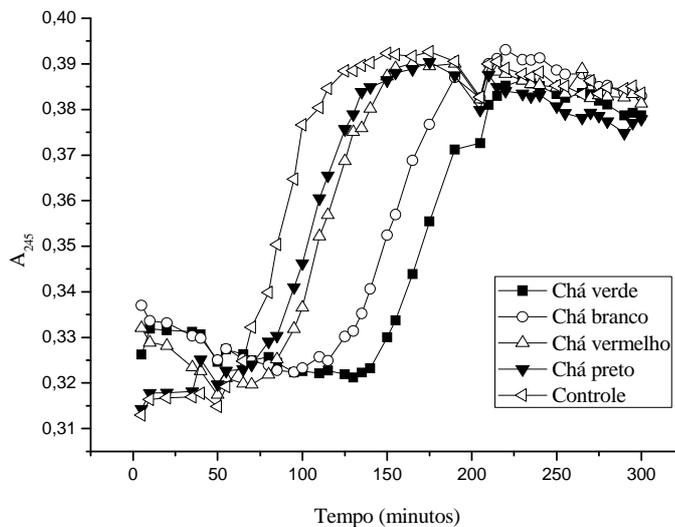


Tabela 7- Análise da variação de tempo da *lag* fase, representada pela variação da absorvância em função do tempo à formação de dienos conjugados quando tratados pelas diferentes concentrações da *C. sinensis* obtidas pelo método de infusão

AMOSTRA	Minutos
Controle	55 ± 0 ^a
Chá verde	167,5 ± 3,535 ^b
Chá branco	152,5 ± 3,535 ^c
Chá vermelho	90 ± 7,071 ^d
Chá preto	55 ± 7,071 ^a

Os resultados expressos correspondem a média ±Dp; onde letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) sendo que as análises foram efetuadas em triplicata

4.3.2 Atividade cinética da MPO

A atividade cinética da MPO (Figura 13) em presença do H₂O₂, foi monitorada pela oxidação do guaiacol, de acordo com o consumo de substrato e formação de produto a 470 nm. Quando se analisa as curvas da atividade enzimática tratados com os diversos chás, observa-se um decréscimo progressivo da cinética enzimática, principalmente na presença dos chás verde e branco. Em ordem decrescente de atividade enzimática, apresenta-se o chá preto, seguido do vermelho, verde e branco. Isso indica que a atividade enzimática é fortemente inibida pelos chás verde e branco. Quantitativamente, analisando o valor do CI₅₀ sobre a cinética da MPO, observou-se uma diferença significativa entre os chá verde e branco, apresentando-se mais eficiente o chá branco na inibição enzimática. O resultado apresentado é importante, pois existe forte correlação entre a elevada concentração de HOCl, que é formado pela MPO, e processos inflamatórios crônicos, como artrite reumatóide.

A MPO é uma heme proteína altamente catiônica abundante em neutrófilos e monócitos (PODREZ; ABU-SOUD; HAZEN, 2000; GUILPAIN et al 2008; ARNHOLD; FLEMING, 2010). Está presente nos grânulos azurófilos dos leucócitos polimorfonucleares (LPMN), e é liberada quando esses são ativados durante o processo inflamatório associado a

uma explosão oxidativa. A MPO amplifica o potencial oxidativo do H_2O_2 ao utilizá-lo como substrato para gerar reativos oxidantes como, por exemplo, o HOCl (PODREZ; ABU-SOUD; HAZEN, 2000). Os produtos formados pela MPO possuem a capacidade de catalisar a atividade oxidativa sobre alvos biológicos como o LDL (PODREZ; ABU-SOUD; HAZEN, 2000). A presença dos metabólitos da MPO está associada a processo arteroscleróticos, sendo que seus níveis plasmáticos elevados são considerados fatores de risco coronariano (ARNHOLD; FLEMING, 2010). A MPO não é encontrada usualmente em macrófagos, porém ocasionalmente está presente em tecidos que contêm macrófagos estando associada à doença de Alzheimer, esclerose múltipla, artrite reumatóide, glomerulonefrites, desordens do tecido conectivo entre outras (GUILPAIN et al., 2008; ARNHOLD; FLEMING, 2010; HALLIWELL, 2006). Conseqüentemente uma atividade inibitória sobre essa enzima representa forte inibição do processo inflamatório.

Figura 13 – Efeito da *C. sinensis* sobre a atividade da MPO obtida pela oxidação do guaiacol 80 mmol.L^{-1} pelo sistema MPO (8 nmol.L^{-1}) / H_2O_2 (48 mmol.L^{-1}) em tampão fosfato salina pH 7,4. A cinética foi monitorada pela variação da absorvância em 470 nm, por 10 minutos, em intervalos de 10 segundos

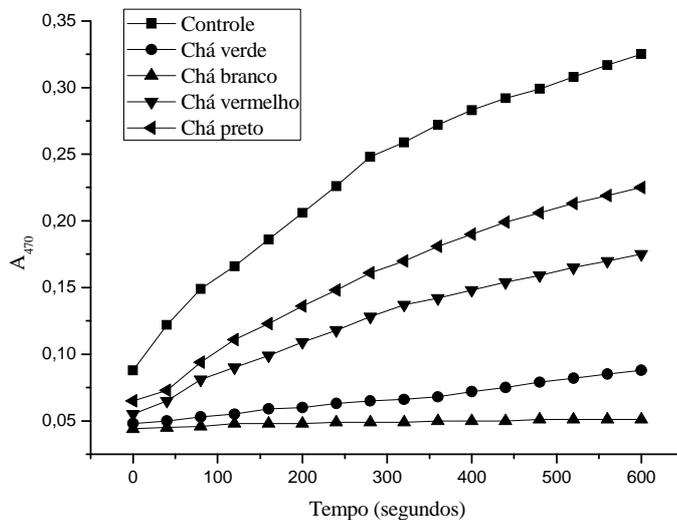


Tabela 8- Análise da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) das diferentes concentrações da *C. sinensis* obtidas pelo método de infusão sobre a cinética enzimática da MPO

AMOSTRA	CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Chá verde	6,86±1,195 ^a
Chá branco	3,94±0,579 ^b
Chá vermelho	14,47±5,077 ^c
Chá preto	42,46±3,422 ^d

Os resultados expressos correspondem a média ±Dp; onde letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) sendo que as análises foram efetuadas em triplicata

4.4 Ensaio antifúngico

4.4.1 Susceptibilidade antifúngica à *C. sinensis*

Nos últimos anos tem se constatado uma emergência de infecções fúngicas sistêmicas, que ocorre em pacientes imunossuprimidos, ou acometidos por doenças crônicas severas, e que possuem um prognóstico evolutivo ruim (NGUYEN et al., 1996). Este fato associado a quantidade reduzida de agentes antifúngicos sistêmicos eficientes, a elevada incidência de efeitos adversos e o aparecimento de resistência aos antimicóticos, como ocorre com a anfotericina B e o fluconazol (PFALER et al., 2000), promove um crescente interesse na busca de produtos naturais com atividade antifúngica (PARK et al., 2006). Martinez et al. (2006) estudaram a atividade da EGCG sobre a diidrofolato redutase da *C. albicans*, observando que esse composto é um potente inibidor dessa enzima, apresentando sinergismo com alguns produtos inibidores da via da síntese do ergosterol, como azóis. A EGCG age perturbando o metabolismo do ácido fólico, o que poderia possivelmente explicar o sinergismo com azóis (PASTRE; FRATELLONI, 2006). No estudo de Park et al. (2006) foi observado a atividade a EGCG sobre 21 isolados clínicos de 7 cepas diferentes de *Candida* com variação na susceptibilidade entre elas. Este estudo sugere o uso da EGCG como adjuvante na terapia antifúngica em associação aos agentes clássicos, anfotericina e fluconazol a fim de uma redução na dose, com concomitante redução de efeitos adversos

(PARK et al., 2006). Vários são os estudos abordando a atividade das catequinas isoladas com atividade antifúngica, por mecanismos variados (PARK et al, 2006; PASTRE; FRATELLONI, 2006; MARTINEZ et al., 2006). O presente estudo avaliou a atividade antifúngica do chá comercial e não apenas de um composto isolado. Conforme a tabela 9, observou-se que todos os chás, exceto o chá vermelho, apresentam atividade antifúngica sobre as cepas testadas. O chá preto foi o que demonstrou melhor atividade antifúngica, observada pelo MIC variável de acordo com o processo de produção dos diferentes chás bem como a alteração da susceptibilidade de acordo com a espécie testada. Em relação as cepas, observou-se que a *C. krusei* ATCC 6258 foi a mais sensível. Poucos estudos são disponíveis relatando atividade antifúngica ao chá preto. A maioria dos estudos tem demonstrado uma grande atividade por parte da EGCG (PARK et al, 2006; PASTRE; FRATELLONI, 2006; MARTINEZ et al., 2006). A atividade antifúngica do chá preto sobre as cepas ATCC testadas pode ser explicada pela maior concentração de cafeína encontrada nesse chá. Kumar, Hewavitharange e Adikaran (1995) demonstraram que os alcalóides cafeína e teobromina, estão envolvidos em estratégias de defesa da planta. Extratos metilénicos de *C. sinensis* inibiram o crescimento do *Monacrosporium ambrosium*, com inibição do crescimento e redução do diâmetro das colônias em até 75% tendo a cafeína como principal agente antifúngico (KUMAR; HEWAVITHARANGE; ADIKARAN, 1995). Em recente estudo foi demonstrado que além da cafeína as teaflavinas, responsáveis pela coloração e brilho vermelho-laranja e produzidas a partir da condensação oxidativa entre EC e EGC ou EGCG (HASHIMOTO et al., 1988) apresentam atividade antifúngica sobre diversas cepas de *Candida* (SITHEEQUE et al, 2009).

Tabela 9 – Resultado do teste de susceptibilidade pela determinação do CIM dos chás verde, branco, vermelho e preto sobre cepas ATCC de *Candida ssp* determinado pelo método do LCSII M-27-A2, 2002

<i>Espécie</i>	<i>Cepa</i>	<i>Chá verde</i>	<i>Chá branco</i>	<i>Chá vermelho</i>	<i>Chá preto</i>
		CIM 50% $\mu\text{g.mL}^{-1}$	CIM 50% $\mu\text{g.mL}^{-1}$	CIM 50% $\mu\text{g.mL}^{-1}$	CIM 50% $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Candida albicans</i>	ATCC 14053	33,75	135	>270	16,87
<i>Candida albicans</i>	ATCC 64548	67,5	135	>270	67,5
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	16,87	16,87	>270	16,87

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos apresentam se relevantes, pois demonstram que:

- i. O método de obtenção dos chás influencia na quantidade de compostos fenólicos; sendo que os chás que apresentam maior quantidade de fenóis totais compreendem os não fermentados (verde e branco), seguidos pelo semi fermentado (vermelho) e fermentado (preto);
- ii. A atividade antioxidante dos chás sobre os radicais artificiais DPPH e ABTS^{•+} foi superior para os chás verde e branco, seguidos pelos vermelho e preto;
- iii. Sobre as ERO, O₂^{•-} e HOCl, o chá verde e branco apresentaram atividade similar, sendo também superior aos chás vermelho e preto;
- iv. Na análise da hemólise induzida pelo AAPH, o chá verde apresentou atividade superior seguido pelo branco preto e vermelho;
- v. Na pesquisa da formação de dienos conjugados, a resistência do soro à peroxidação lipídica induzida pelo CuCl₂ é superior quando o soro foi tratado com o chá verde seguido pelo branco, vermelho sendo que o preto não protegeu;
- vi. A atividade cinética da MPO foi significativamente reduzida quando tratada com os chás verde e branco, seguida pelo vermelho e preto;
- vii. Na avaliação da susceptibilidade antifúngica o chá preto apresentou uma maior inibição no crescimento das cepas de *Candida*, seguido pelo verde e branco, não havendo inibição pelo chá vermelho.

REFERÊNCIAS

- ALMAJANO, M.P.; CARBÓ, R.; JIMENEZ, J.A.L.; GORDON, M.H. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, v. 108, p. 55-63, 2008.
- AMBER, K.; AIJAZ, A.; IMMACULATA, X.; LUQMAN, K. A.; NIKHAT, M. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. *Phytomedicine*, v. 17, p. 921–925, 2010.
- ANTWERPEN, P.V.; DUFRASNE, F.; LEQUEUX, M.; BOUDJELTIA, K.A.; LESSGYER, I.; BABAR, S.; MOREAU, P.; MOGUILJEVSKI, N.; VANHAEVERBEEK, M.; DUCOBU, J.; NÈVE, J. Inhibition of the myeloperoxidase chlorinating activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs: Flufenamic acid and its 5-chloro-derivative directly interact with a recombinant human myeloperoxidase to inhibit the synthesis of hypochlorous acid. *European Journal of Pharmacology*, v. 570, p. 235-243, 2007.
- ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 500, p. 92-106, 2010.
- ARSALANI-ZADEH, R.; ULLAH, S.; KHAN, S.; Mac FIE, J. Oxidative Stress in Laparoscopic Versus Open Abdominal Surgery: A Systematic Review. *Journal of Surgical Research*, doi 10.1016/5. ISS.2011.01.038 v.169, p.259-268, 2011.
- ASHIHARA, H.; DENG, W-W.; MULLEN, W.; CROZIER, A. Distribution and biosynthesis of flavan-3-ols in *Camellia sinensis* seedlings and expression of genes encoding biosynthetic enzymes. *Phytochemistry*. v. 71, p. 559-566, 2010.
- BARCIROVA, M. Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. *Food Research International*, v. 43, p. 1379-1382, 2010.
- BARGAGLI, E.; OLIVIERI, C.; BENNETT, D.; PRASSE, A.; MULLER-QUERNHEIM, J.; ROTTOLI, P. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: A review. *Respiratory Medicine*, v. 103, p. 1245-1256, 2009.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BEGUM, A. N.; TERAQ, J. Protective effects of alpha-tocotrienol against free radical induced impairment of erythrocyte deformability. *Bioscience, Biothechnology and Biochememistry*, v. 66, p. 398-403, 2002.
- BODE, A.M.; DONG, Z.; Epigallocatechin 3-Gallate and Green Tea Catechins: United They Work, Divided They Fail. *Cancer Prevention Research*.v. 2, p. 514-517, 2009.
- BORA, K.; MIGUEL, O.G.; ANDRADE, C.A.; OLIVEIRA, A.O.T. Determinação das concentrações de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, DICKSON IACEAE. *Revista Visão Acadêmica*, v. 6, p. 6-15, 2005.
- CAMARGO, A.E.I.; DAGUER, D.A.E.; BARBOSA, D.S. Green tea exerts antioxidant action in vitro and its consumption increases total serum antioxidant potential in normal and dyslipidemic subjects. *Nutrition Research*, v. 26, p. 626-631, 2006.
- CASTRON-OSÓRIO, J.J.; RIVERO, A.; TORRE-CISNEROS, J. Epidemiology of invasive fungal infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 32 Suppl. 2, p. S103–S109, 2008.

- CHACKO, S.M.; THAMBI, P.T.; KUTTAN, R.; NISHIGAKI, I. Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chinese Medicine*, v. 5, p. 1-9, 2010.
- CHAN, E.W.C.; LIM, Y.Y.; CHEW, Y.L. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chemistry*, v. 102, p. 1214-1222, 2007.
- CHANTEPIE, S.; MALLE, E.; SATTLER, W.; CHAPMAN, M.J.; KONTUSH, A. Distinct HDL subclasses present similar intrinsic susceptibility to oxidation by HOCl. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 487, p. 28-35, 2009.
- CHEN, D.; PING DOU, Q. Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy. *International Journal of Molecules Sciences*, v. 09, p. 1196-1206, 2008.
- COSTA, R.M.; MAGALHÃES, A.S.; PEREIRA, J.A.; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P.; CARVALHO, M.; SILVA, B.M. Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (*Cydonia oblonga*) leaf: A comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 860-865, 2009.
- de PAUW, B. E.; PICAZO, J. J. Present situation in the treatment of invasive fungal infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 32, Suppl. 2, p. S167–S171, 2008.
- DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v. 15, p. 316-328, 2005.
- DUH, P-D.; WANG, B-S.; LIOU, S-J.; LIN, C-J. Cytoprotective effects of pu-erh tea on hepatotoxicity in vitro and in vivo induced by tert-butyl-hydroperoxide. *Food Chemistry*, v. 119, p. 580-585, 2010.
- EGGERS, K.M.; DELLBORG, M.; JOHNSTON, N.; OLDGREN, J.; SWAHN, E.; VENGE, P.; LINDAHL, B. Myeloperoxidase is not useful for the early assessment of patients with chest pain. *Clinical Biochemistry*, v. 43, p. 240-245, 2010.
- ESPADA, R.; VALDESPINA, S.; ALFONSO, C. RIVA, G. BALLESTEROS, M.P. TORRADO. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 361, p. 64-69, 2008.
- EVENSEN, N.A.; BRAUN, P.C. The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. *Canadian Journal of Microbiology*. v. 55, p. 1033-1039, 2009.
- ERJAVEC, Z.; VERWEIJ, P.E. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the Immunocompromised host. *Drug Resistance Updates*., v. 5, p. 3–10, 2002.
- FARHOOSH, R.; GOLMOVAHHED, G.A.; KHODAPARAST, M.H.H. Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis* L.). *Food Chemistry*, v. 100, p. 231-236, 2007.
- FERRARA, L.; MONTESANO, D.; SENATORE, A. The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant (*Camellia sinensis*). *Il Fármaco*, v. 56, p. 397-401, 2001.
- 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, p. 61-68, 1997.

- FRANCO, R.; SANCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E.M.; PANAYIOTIDIS, M.I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutation Research*, v. 674, p. 3-22, 2009.
- FRIEDMAN, M.; MACKEY, BE, KIM, HJ, LEE, I.S.; LEE, K.R. LEE, S.U.; KORZUKE, E.; KORZUQUE, N. Structure-activity relationships of tea compounds against human cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 55, p. 243-253, 2007.
- GODOIN, A.; GRUSU, D.; STEWART, D.; McDOUGALL, G. White and green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase in vitro. *Food Research International*, v. 43, p. 1537-1544, 2010.
- GRUPTA, S.; SAHA, B.; GIRI, A.K. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review. *Mutation Research*, v. 512, p. 37-65, 2002.
- GUILPAIN, P.; SERVETTAZ, A.; BATTEUX, F.; GUILLEVIN, L.; MOUTHON, L. Natural and disease associated anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies. *Autoimmunity Reviews*, v. 7, p. 421-425, 2008.
- HAN, Y. Synergic effect of grape seed extract with amphoterinin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. *Phytomedicine* , v. 14, p. 733–738, 2007.
- HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. *Lancet*, v. 355, p. 1179-1180, 2000.
- HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends in Biochemical Sciences*, v. 31, p. 509-515, 2006.
- HASLAM, E. Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry*, v. 64, p.61-73, 2003.
- HASHIMOTO, F. Tannins and related compounds. LXIX. Isolation and structure elucidation of B,B'-linked bisflavanoids, theasinensins D-G and oolongtheanin from oolong tea. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 2, p.1676-1684, 1988.
- HERNANDEZ, I.; ALEGRE, L.; MUNNE-BOSH, S. Enhanced oxidation of flavan-3-ols and proanthocyanidin accumulation in water-stressed tea plants. *Phytochemistry*, v. 67, p. 1120-1126, 2006.
- HIGDON, J.V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions, *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, v. 43, p.89-143, 2003.
- HSU, Y-W.; TSAI, C-F.; CHEN, W-K.; HUANG, C-F.; YEN, C-C.; A subacute toxicity evaluation of green tea (*Camellia sinensis*) extract in mice. *Food and Chemical Toxicology*, in press (2011) doi 10.1016/5.fct.2011.07.007.
- JERLICH, A; FABJAN, JS; TSCHABUSCHNIG, S; SMIRNOVA, AV; HORAKOVA, L; HAYN, M; AUER, H; GUTTEMBERGER, H; LEIS, HJ; TATZBER, F; WAEG, G; SCHAUR, J. Human low density lipoprotein as a target of hypochlorite generated by myeloperoxidase. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 24, p. 1139-48, 1998.
- JERLICH, A.; FRITZ, G.; KHARRAZI, H.; HAMMEL, M.; TSCHABUSCHING, S.; GLATTER, O.; SCHAUR, J.R. Comparison of HOCl traps with myeloperoxidase inhibitors in prevention of low density lipoprotein oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1481, p. 109-118, 2000.
- JUNG, S.H.; LIM, S.H.; JUNG, S.H.; JUNG, E.L.; JEONG, K.S.; SEONG, H.; SHIN, B.C. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their *in vitro* and *in vivo* characteristics. *European Journal of Pharmaceutical Science*, v. 37, p. 313-320, 2009.

KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P.N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 21, p. 130-132, 1984.

KHALIL, N.M. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - *Interação das aminas terciárias nicotina, quinina, ranitidina e trimetilamina com ácido hipocloroso: Efeitos em biomoléculas e sistemas enzimáticos*. 2005. 95f. – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

KHAN, S.A.; PRIYAMVADA, S.; ARIVARASU, N.A.; KHAN, S.; YUSUFI, A.N.K. Influence of green tea on enzymes of carbohydrate metabolism, antioxidant defense, and plasma membrane in rat tissues. *Nutrition*, v. 23, p. 687-695, 2007.

KOMES, D.; HORZIC, D.; BELSCAK, A.; GANIC, K. K.; VULIC, I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Research International*, v. 43, p. 167-176, 2010.

KORDE, A. S.; YADAV, V. R.; ZHENG, Y.-M.; WANG, Y.-X. Primary role of mitochondrial Rieske iron-sulfur protein in hypoxic ROS production in pulmonary artery myocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 50, p. 945-952, 2011.

KOUTELIDAKIS, A.E.; SERAFINI, M.; KOMAITIS, M.; KAPSOKEFALOU, M. Oxidative activity of some iron compounds on colon tissue homogenates from mice after administration of green tea, white tea and *Pelargonium purpureum*. *Nutrition*, v. 25, p. 453-458, 2009.

KUMAR, S.N.; HEWAVITHARANAGE, P.; ADIKARAM, N.K.B. Attack on tea by *Xyleborus forficatus*: Inhibition of the symbiont *Monacrosporium ambrosium*, by caffeine. *Phytochemistry*, v. 40, p. 1113-1116, 1995.

LANIARDO-LABORIN, R.; CABRALES-VARGAS, M.N. Amphotericin B: Side effects and toxicology. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 26, p.223-227, 2009

LEUNG, L. K.; SU, Y. L.; CHEN, R. Y.; ZHANG, Z. S.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *Journal of Nutrition*, v. 131, p. 2248-2251, 2001.

LIMA, J.D.; MAZZAFERA, P.; MORAES, W.S.; SILVA, R.B. Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. *Ciência Rural*, v.39, p. 35-39, 2009.

LIN, S.-D.; LIU, E.-H.; MAU, J.-L. Effect of different brewing methods on antioxidant properties of steaming green tea. *Food Science and Technology*, v. 41, p. 1616-1623, 2008.

LU, M.-J.; CHEN, C. Enzymatic modification by tannase increases the antioxidant activity of green tea. *Food Research International*, v. 41, 130-137, 2008.

LU, Y.; ZHANG, J.; WAN, X.; LONG, M.; LI, D.; LEI, P.; ZHANG, Z. Intestinal transport of pure theanine and theanine in green tea extract: Green tea components inhibit theanine absorption and promote theanine excretion. *Food Chemistry*, v. 125, p. 277-281, 2011.

LUMBRERAS, C.; ÁLVAREZ-LERMA, F.; CARRERAS, E.; CISNEROS, J.M.; GARNACHO, J.; MARTIN-MAZUELOS, E.; PEMAN, J.; QUINDOS, G.; RUBIO, C.; TORRE-CISNEROS, J.; TUDELA, J. L. R. Update on invasive fungal infections: the last two years. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 25 (Supl.1), p. 19-27, 2007

- MACKENZIE, J.S.; JURADO, J.M.; PABLOS, F. Characterization of tea leaves according to their total mineral content by means of probabilistic neural networks. *Food Chemistry*, v. 123, p. 859–864, 2010.
- MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y. S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the neuro degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 35, p. 676-692, 2011.
- MARTINEZ, N.; GARCIA-CÁNOVAS, F.; RODRIGUEZ-LÓPEZ, J.N. Tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits ergosterol synthesis by disturbing folic acid metabolism in *Candida albicans*. *Journal Antimicrobiology Chemotherapy*, v. 57, p. 1083-1092, 2006.
- MENA, S.; ORTEGA, A.; ESTRELA, J. M. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 674, p. 36–44, 2009.
- METCAF, S.C.; DOCKRELL, D.H. Improved outcomes associated with advances in therapy for invasive fungal infections in immunocompromised hosts. *Journal of Infection*, v. 55, p. 287-299, 2007.
- MIGLIORE, L.; COPPEDE, F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 674, p. 73–84, 2009.
- MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, S.M.O.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, p. 110-115, 2009.
- MURDOCH, D. R. Microbiological patterns in sepsis: what happened in the last 20 years. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 34S, p. S5-S8, 2009.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standards- 2 ed. NCCLS document M27-A2. Pennsylvania: NCCLS – 2002.
- NGUYEN, M.H.; PEACOCK, J.E.; MORRIS, A.J.; TAUNNER, D.C.; NGUYEN, M.L.; SNYDAM, D.R.; WAGENER, M.M.; RINALDI, M.G.; YU, V.L. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance, *American Journal of Medicine*, v. 100, p. 617- 623, 1996.
- NISHIYAMA, M.F.; COSTA, M.A.F.; COSTA, A.M.; SOUZA, C.G.M.; BÔER, C.G.; BRACHT, C.K.; PERALTA, R.M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência da extração dos bioativos e sobre a estabilidade das bebidas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, p. 191-196, 2010.
- PAGANINI-COSTA, P.; CARVALHO DA-SILVA, D. Uma xícara (chá) de química. *Revista Virtual de Química*, v 3, p 27-36, 2011.
- PAINO, I.M.M.; XIMENES, V.F.; FONSECA, L.M.; KANEGAE, M.P.P.; KHALIL, N.M.; BRUNETTI, IL. Effect of therapeutic plasma concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the production of reactive oxygen species by activated rat neutrophils. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, p. 543-51, 2005.

- PARK, B.J.; PARK J-C.; TAGUCHI, H.; FUKUSHIMA, K.; HYON, TAKATORI, K.; Antifungal susceptibility of epigallocatechin 3-O-gallate (EGCg) on clinical isolates of pathogenic yeasts *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 347, p401-405, 2006.
- PASTORE, R.; FRATELLONE, P. Potential health benefits of green tea (*Camellia sinensis*): A narrative review. *Diet and Nutrition*, v. 2, p. 531-537, 2006.
- PERUMALLA, A.V.S.; HETTIARACHCHY, N.S. Green tea and grape seed extracts — Potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, v. 44, p 827–839, 2011.
- PEREIRA, A.V.; ALMEIDA, T.C.; BELTRAME, F.L.; COSTA, M.E.; GARRIDO, L.H. Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chá verde e preto - *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, v. 31, p. 119-124 , 2009.
- PERVAIZ, S.; CLEMENT, M.-V. Superoxide anion: Oncogenic reactive oxygen species? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, p. 297-1304, 2007.
- PFALLER, A.; DIEKEMA, D.J.; JONES, R.N.; MESSER, S.A., HOLLIS R. J. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with blood- stream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Journal Clinical Microbiology*, v. 40, p. 852 – 856, 2002.
- PODREZ, E.A.; ABU-SOUD, H.M.; HAZEN, S.L.MYELOPEROXIDASE-GENERATED OXIDANTS AND ATHEROSCLEROSIS. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 28, p. 1717–1725, 2000.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourisation assay. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, p. 1231-1237, 1999.
- REUTER, S.; GRUPTA, S.C.; CHATURYEDI, M.M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, p. 1603-1616, 2010.
- RODRIGUES, U.T.F.M. Revisão sistemática sobre a ação do chocolate, chá, vinho tinto e café na saúde cardiovascular. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, v. 1, p. 36-46, 2007.
- ROSATO, A.; VITALI, C.; GALLO, D.; BALLEZZANO, L.; MALAMACI, R. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, v.15, p. 635–638, 2008
- RUSAC, G.; KOMES, D.; LIKIC, S.; HORZIC, D.; KOVAC, M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, v. 110, p. 852-858, 2008.
- SATO, Y.; KAMO, S.; TAKAHASHI, T.; SUZUKI, Y. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-solution radical initiator. *Biochemistry*, v. 34, p. 8940-8949, 1995.
- SCHMITZ, W.; SAITO, A.Y.; ESTEVÃO, D.; SARIDAKIS, H.O. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 26, p. 119-130, 2005.

- SCHNITZER, E.; PINCHUK, I.; BOR, A.; FAINARU, M.; SAMUNI, A.M.; LICHTENBERG, D. Lipid oxidation in unfractionated serum and plasma. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 92, p. 151-179, 1998.
- SHAMI, N.J.I.E., MOREIRA, E.A.M. - Licopeno como agente antioxidante. *Nutrition*, v. 17, p. 227-236, 2004.
- SHARANGI, A.B. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. *Food Research International*, v. 42, p. 529-535, 2009.
- SIMÃO, A. N. C.; SUZUKAWA, A. A.; CASADO, M. F.; OLIVEIRA, R. D.; GUARNIER, F. A.; CECCHINI, R. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2'-Azobis (Amidinopropane). *Life Sciences*, v. 78, p. 1202-1210, 2006.
- SITHEEQUE, M. A.; PANAGODA, G. J.; YAU, J.; AMARAKOON, A.M.; UDAGAMA, U.R.; SAMARANAYAKE, L.P. Antifungal activity of black tea polyphenols (catechins and theaflavins) against *Candida* species. *Chemotherapy*, v. 55, p. 189-196, 2009.
- SONI, N.; WAGSTAFF, A.; Fungal Infection. *Current Anaesthesia & Critical Care*; v. 16, p. 231-241; 2005.
- STASZEWSKI, M.; PILOSOFF, A.M.R.; JAGUS, R.J. Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chemistry*, v. 125, p. 186-192, 2011.
- TANAKA, T. Production of theasinensins A and D, epigallocatechin gallate dimers of black tea, by oxidation–reduction dismutation of dehydrotheasinensin. *Tetrahedron*, v.59, p.7939-7947, 2003.
- TIJIBURG, L.B.M.; WISEMAN, S.A.; MEIJER, G.W.; WESTRATE, J.A. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis*, v. 135, p. 37-47, 1997.
- TODA, M.; OKUBO, S.; IKIGAI, H.; SHIMAMURA, T. Antibacterial and antihaemolysin activities of tea catechins and their structural relative. *Japanese Journal of Bacteriology*, v. 45, p. 561-566, 1990.
- TSANG, A.H.K.; CHUNG, K.K.K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1792, p. 643-650, 2009.
- VANDERMEULEN, G.; ROUXHET, L.; ARIEN, A.; BREWSTER, M.E. Encapsulation of amphotericin B in poly(ethyleneglycol)-block- poly(ϵ -caprolactone-co-trimethylene carbonate) polymeric micelles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 309, p. 234–240, 2006.
- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; BENFATO, M.S.; MANFREDINI, V.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v. 30, p. 1323-1338, 2007.
- VELAYUTHAM, P.; BABU, A.; LIU, D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 1840-1850, 2008.
- VENDITTI, E.; BACCHETTI, T.; TIANO, L.; CARLONI, P.; GRECI, L.; DAMIANI, E. Hot vs. cold water steeping of different teas: Do they affect antioxidant activity? *Food Chemistry*, v. 119, p. 1597-1604, 2010.

WANG, A.Y.-M.; LAM, C.W.-K.; CHAN, I.H.-S.; WANG, M.; LUI, S.-F.; Prognostic Value of Plasma Myeloperoxidase in ESRD Patients. *American Journal of Kidney Diseases*, v. 56, p. 937-946, 2010.

WANG, H.; HELLIWEL, K. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance chromatography. *Food Research International*, v. 34, p. 223-227, 2001.

WILMS, L.C.; KLEINJANS, J.C.S.; MOONEN, E.J.C.; BRIEDÉ, J.J. Discriminative protection against hydroxyl and superoxide anion radicals by quercetin in human leucocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, v. 22, p. 301-307, 2008.

WU, S.-C.; YEN, G.-C.; WANG, B.-S.; CHIU, C.-K.; YEN, W.-J.; CHANG, L.-W.; DUH, P.-D. Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *Food Research International*, v. 40, p. 506-512, 2007.

YAMAGUCHI, F.; ARIGA, T.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 180-185, 2000.

YAP, W.Y.; CHEN, M.J.; CHOY, M.S.; PENG, Z.F.; WHITEMAN, M.; MANIKADAN, J.; MELENDEZ, A.J.; CHEUNG, N.S. Temporal transcriptomic profiling reveals cellular targets that govern survival in HOCl-mediated neuronal apoptosis. *Life Sciences*, v. 87, p. 4570-467, 2010.

YAP, W.Y.; WHITEMAN, M.; CHEUNG, N.S. Chlorinative stress: An under appreciated mediator of neurodegeneration? *Cellular Signalling*, v. 19, p. 219-228, 2007.

ZHAO, Y.; CHEN, P.; LIN, L.; HAMLBY, J.M.; YU, L.; LI, Z. Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS. *Food Chemistry*, v. 126, p. 1269-1277, 2011.