

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**LUIZA DE MARILLAC AZEVEDO CORTÉS EFING**

**COMPOSTOS BIOATIVOS DO MATERIAL RESINOSO, SUBPRODUTO  
DO PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St.- Hil.)**

**CURITIBA**

**2008**

**LUIZA DE MARILLAC AZEVEDO CORTÉS EFING**

**COMPOSTOS BIOATIVOS DO MATERIAL RESINOSO, SUBPRODUTO  
DO PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St.- Hil.)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia,  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial à obtenção do título de Doutor em  
Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Renato João Sossela de  
Freitas.

Co-orientadora: Profa. Dra. Tomoe Nakashima.

**CURITIBA**

**2008**

Efing, Luiza de Marillac Azevedo Cortés

Compostos bioativos do material resinoso, subproduto de processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) / Luiza de Marillac Azevedo Cortés Efing. - Curitiba, 2008.

110 f. : il., tabs, grafs..

Orientador: Prof. Dr. Renato João Sossela de Freitas

Co-orientador: Prof. Dr. Tomoe Nakashima

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

Inclui Bibliografia.

1. Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).
2. Compostos bioativos.
3. Antioxidantes.
4. Resinas. I. Freitas, Renato João Sossela de. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 663.96

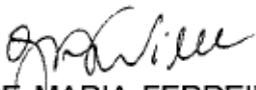
## FOLHA DE APROVAÇÃO

**LUIZA DE MARILLAC AZEVEDO CORTÉS EFING**

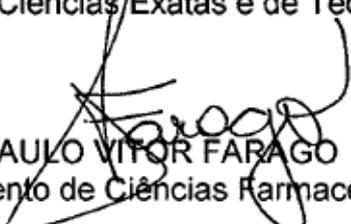
**COMPOSTOS BIOATIVOS DO MATERIAL RESINOSO,  
SUBPRODUTO DO PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE (*Ilex  
paraguariensis* A. St.-Hil).**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:   
Prof. Dr. RENATO JOÃO SOSSELA DE FREITAS  
Setor de Tecnologia, UFPR

  
Prof.ª Dr.ª GRACE MARIA FERREIRA DE CASTRO WILLE  
Setor de Ciências da Saúde, UFPR

  
Prof.ª Dr.ª NERY NISHIMURA DE LIMA  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, PUCPR

  
Prof. Dr. PAULO VITOR FARAGO  
Departamento de Ciências Farmacêuticas, UEPG

  
Prof.ª Dr.ª DIANA THOMÉ FACHIN  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, PUCPR

Curitiba, 29 de abril de 2008.

## DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese

Aos amores e razão da minha vida  
*Luís, Lucas e Vitória* na ordem de  
chegada por todo carinho, apoio,  
orações e compreensão durante  
minha *presença ausente*, necessária  
para a realização deste trabalho.

Aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Nada na vida conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para alcançar os nossos objetivos. Um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso.

Terminar uma Tese de Doutorado é um momento de felicidade. Pessoalmente, desejo partilhar esse momento com todos que participaram e contribuíram no assessoramento desta conquista.

A *Deus*, por sempre me iluminar, me guiar e manter a saúde ...

À *minha família*, por todo apoio, carinho e amor. Aos meus pais, “Justi” e “There”, que me deram não somente a vida, mas principalmente a minha educação e condições de estudos e aperfeiçoamento. Aos meus irmãos (Nando e Ale).

*Eu* fortemente agradeço aos demais familiares que sempre torceram por mim e me apoiaram. Ao tio Luiz, pelas carinhosas e preciosas contribuições. Aos amigos, os de perto e os de longe. Sem o apoio de uma Boa Família, Bons Amigos e Bons Assessores este projeto não teria sido possível.

Ao *Prof. Dr. Renato João Sossela de Freitas*, orientador desta tese que sempre demonstrou acreditar no meu potencial. Pela orientação, dedicação, apoio e principalmente pelo bom convívio neste período de trabalho. Sua colaboração e incentivo, muito contribuíram na elaboração desse trabalho.

à *Profa. Dra. Tomoe Nakashima*, co-orientadora desta tese e que dela participou diretamente. Pela oportunidade oferecida, co-orientação segura, amizade e convívio neste período de trabalho.

Aos *membros* da banca do Exame de Qualificação, Profa. Dra. Nery Nishimura de Lima e Prof. Dr. Agenor Maccari Júnior, por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho. As muitas sugestões, exemplos e críticas foram fundamentais à reelaboração e aprimoramento da abordagem que eu vinha fazendo de meu tema.

Aos *membros* da banca Examinadora de Defesa de Tese, Prof. Dr. Paulo Vitor

Farago, Profa. Dra. Grace M. De Castro Wille, Profa. Dra. Nery Nishimura de Lima e Profa. Dra. Diana Thomé Fachin, pela participação na avaliação deste trabalho e às contribuições oferecidas.

*Ao Instituto de Saneamento Ambiental (ISAM) da PUCPR, pela análises para determinação de minerais.*

*À PUCPR, por meio do Departamento de Farmácia pelas oportunidades e reconhecimento prestados. Agradeço aos “amigos de trabalho”. Pela presença e incentivo constantes em especial às professoras Diana e Márcia, pelo apoio incondicional; a ex-aluna e agora também professora, Joceline, pelo auxílio para realização das análises microbiológicas.*

*Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia da UFPR.*

*À Família Somensi, Sr. Ademir e Sra. Lorete, da Indústria Mate Laranjeiras, por possibilitar o acesso à sua unidade industrial para a coleta das amostras, e seus questionamentos constantes, que serviram de alavanca para viabilizar este trabalho.*

*À Laborclin, pelo gentil fornecimento dos Meios/Placas de Agar Sangue.*

*À Sra. Neusa Gomes de Almeida, da Secretaria Estadual da Agricultura e Abastecimento (SEAB- PR), uma entusiasta da erva-mate.*

*À Silvia Marcon pelo seu trabalho de revisão, normalização e formatação do texto também expresse meus agradecimentos.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da UFPR.*

*A todos que de alguma forma contribuíram para meu aprendizado pessoal e profissional, agradeço e dedico o resultado do trabalho .....*

*"Amai aos pobres, doentes e crianças.  
Respeitai-os como o próprio Jesus Cristo."*

Santa Luiza de Marillac (1591-1660)

## RESUMO

A erva-mate, *Ilex paraguariensis* A. St.- Hil., é uma planta originária da América do Sul, consumida habitualmente na Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil. O gênero *Ilex* é formado por aproximadamente 400 espécies vegetais, que crescem como árvores. Do *I. paraguariensis* podem ser obtidos o composto de erva-mate, a erva-mate para chimarrão, o tererê, o chá-mate, além de outras bebidas e produtos cosméticos. O presente estudo teve como objetivo caracterizar os compostos bioativos do material resinoso, originado pela ação das facas da chipiadeira, no processamento das folhas e dos ramos da erva-mate. Foi realizada a determinação das características física, organoléptica, físico-química e a prospecção fitoquímica. Foram avaliadas a atividades hemolítica e antimicrobiana, ambas segundo a técnica de difusão em ágar, como também a atividade antioxidante utilizando métodos do complexo fosfomolibdênio e de redução do radical DPPH. Ainda foi quantificado o conteúdo de clorofila. O material resinoso apresentou odor característico de erva-mate, resíduo mineral fixo com teor superior ao descrito para as folhas, mas semelhante ao de subprodutos originários dos pós de secadores de moinhos ervateiros. O teor de nitrogênio foi de 1,26%. A análise dos componentes minerais por espectrofotometria de absorção atômica forneceu resultados diferenciados em relação ao descrito para as folhas, assim como elevado teor de sólidos. Na pesquisa de fitocompostos do extrato aquoso do material resinoso de *I. paraguariensis*, os resultados foram positivos para saponinas, taninos e aminogrupos. Para o extrato hidroalcoólico, investigado na mesma concentração, o resultado positivo foi para alcalóides, flavonóides, saponinas, taninos e aminogrupos, sendo que taninos e compostos fenólicos, alcalóides e saponinas foram confirmadas por CCD e particularmente as metilxantinas foram confirmadas por CLAE. Por meio dos testes de cilindro e de disco em meio de ágar sangue, foi verificada ausência de atividade hemolítica e atividade antimicrobiana, a partir de diferentes frações orgânicas analisadas. Foi encontrado um valor de 68% de atividade antioxidante pelo método do complexo fosfomolibdênio em relação à quercetina. Na avaliação da atividade antioxidante, empregando-se o radical DPPH, foi possível verificar que o extrato aquoso do material resinoso apresentou valor superior nas frações acetato de etila e butanólica. No material resinoso, foi observado ainda um conteúdo de clorofila elevado, considerando os solventes estudados. Considerando os resultados relativos da presença de componentes minerais, de compostos bioativos e do teor de clorofila elevado, é possível sugerir a utilização do material resinoso de *I. paraguariensis* como fonte de extração do corante e emprego na atividade antioxidante.

Palavras-chave: erva-mate, *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.; compostos bioativos; material resinoso; atividade antioxidante.

## ABSTRACT

The yerba maté, *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., is a plant originated in South America, usually consumed in Argentina, Paraguay, Uruguay, and Brazil. The *Ilex* gender is formed by approximately 400 vegetal species, the growth of which is like a tree. From the *I. paraguariensis* one can obtain the maté herb compost, the herb for *chimarrão* (infusion with hot water), for *tererê* (drink with very cold water), for a tealike drink, as well as other drinks and cosmetic products. The present study has the purpose of characterizing the bioactive compounds of the resinous material resulted from the action of the chipping knives when processing yerba maté leaves and branches. Physical, organoleptical, and physical-chemical characteristics were determined; phytochemical prospection was concluded. The hemolytic and anti-microbial properties were evaluated, both by the agar diffusion technique, and the antioxidant activity was analyzed by using phosphomolibdenium complex methods and reduction of the DPPH radical. Chlorophyll content was also quantified. The resinous material presented the characteristic odor of the maté herb, a fixed mineral residue with content superior to that described for the leaves, but similar to the subproducts originated from the powder in the dryers of the maté mills. Nitrogen content was 1.26%. The analysis of the mineral components, with use of atomic absorption spectrophotometry, supplied different results as to those described for the leaves, as well as a high content of solids. In the study of phytocompounds present in the liquid extract from the *I. paraguariensis* resinous material, results were positive for saponins, tanines, and amino groups. Investigated in the same concentration, the hydroalcoholic extract showed positive results for alkaloids, phlavonoids, saponins, tanines, and amino groups. The tanines and phenolic compounds, alkaloids and saponins were confirmed by CCD; the methylxanthines were confirmed by CLAE. Via cylinder and disc tests, in blood agar, the absence of hemolytic and anti-microbial activity was confirmed in the different organic fractions analyzed. An antioxidant count of 68% related to quercetin was found using the phosphomolibdenium complex method. When evaluating the antioxidant activity by using the radical DPPH, it was possible to verify that the liquid extract from the resinous material presented higher values in the ethyl acetate and butanolic fractions. A high content of chlorophyll was also observed in the resinous material when considering the solvents under study. Considering the results related to the presence of mineral components, of bioactive compounds, and the high content of chlorophyll, it is possible to suggest the use of *I. paraguariensis* resinous material as a font of colorant extraction and in the antioxidant activity.

Key words: yerba mate; *Ilex paraguariensis* A. St.- Hil.; bioactives compounds; antioxidant activity; resinous material.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FOLHAS DE ERVA-MATE .....	20
FIGURA 2 - FLORES DE ERVA-MATE .....	20
FIGURA 3 - FRUTOS DE ERVA-MATE.....	20
FIGURA 4 - ÁREA DE OCORRÊNCIA NATURAL DE <i>Ilex paraguariensis</i> .....	22
FIGURA 5 - PRODUÇÃO DE ERVA-MATE NOS ANOS DE 1990, 1995, 2000, 2005 E 2006 .....	24
FIGURA 6 - RECEPÇÃO DA ERVA-MATE NA INDÚSTRIA MATE LARANJEIRAS.	26
FIGURA 7 - ERVA-MATE CANCHEADA NA INDÚSTRIA MATE LARANJEIRAS ...	28
FIGURA 8 - ERVA-MATE EM ARMAZENAMENTO NA MATE LARANJEIRAS.....	29
FIGURA 9 - ESTRUTURA QUÍMICA DA PORÇÃO AGLICONA DAS SAPONINAS	33
FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DA CAFEÍNA .....	38
FIGURA 11 - ESTRUTURA QUÍMICA DA TEOBROMINA .....	40
FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DA TEOFILINA .....	41
FIGURA 13 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO CLOGRÊNICO .....	46
FIGURA 14 - ESTRUTURA QUÍMICA DO FLAVONÓIDE.....	47
FIGURA 15 - ESTRUTURA QUÍMICA DA CLOROFILA a E DA CLOROFILA b .....	50
FIGURA 16 - DIAGRAMA DO PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE NA INDÚSTRIA MATE LARANJEIRAS .....	54
FIGURA 17 - DIAGRAMA ANALÍTICO PARA O MATERIAL RESINOSO .....	55
FIGURA 18 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A PARTIR DO MATERIAL RESINOSO TRITURADO, DE <i>I. paraguariensis</i> .....	63
FIGURA 19 - ASPECTO MACROSCÓPICO DO MATERIAL RESINOSO DE ERVA- MATE.....	75
FIGURA 20 - PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CCD PARA COMPOSTOS POLIFENÓLICOS .....	83
FIGURA 21 - PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CLAE PARA MATERIAL RESINOSO PROVENIENTE DO PROCESSAMENTO DA ERVA- MATE .....	85
FIGURA 22 - HALOS DE NECROSE FORMADOS PELO SOLVENTE ÉTER ETÍLICO .....	87

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ERVA-MATE .....	21
TABELA 2 - CONDIÇÕES TÉCNICAS PARA A ANÁLISE DE ELEMENTOS MINERAIS PRESENTES NO MATERIAL RESINOSO RESULTANTE DO PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE POR MEIO DO EQUIPAMENTO DE ABSORÇÃO ATÔMICA.....	56
TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL E pH DO MATERIAL RESINOSO RESULTANTE DO PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE .....	75
TABELA 4 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MATERIAL RESINOSO PROVENIENTE DA ERVA-MATE .....	76
TABELA 5 - COMPONENTES MINERAIS DO MATERIAL RESINOSO PROVENIENTE DA ERVA-MATE .....	78
TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSO E HIDROALCOOLICO DO MATERIAL RESINOSO PROVENIENTE DA ERVA-MATE.....	80
TABELA 7 - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DAS FRAÇÕES DO MATERIAL RESINOSO PROVENIENTE DA ERVA-MATE.....	87
TABELA 8 - CONCENTRAÇÕES DE CLOROFILAS DOS TIPOS <i>a</i> (Ca) E <i>b</i> (Cb) NAS FRAÇÕES DO MATERIAL RESINOSO PROVENIENTE DA ERVA-MATE.....	90

## LISTA DE SIGLAS

ATCC	- American Type Culture Collection
EMATER	- Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IAL	- Instituto Adolfo Lutz
IC <sub>50</sub>	- Concentração que inibe 50% da concentração inicial do radical DPPH
n-BuOH	- n-butanol
OC	- Ondas-curtas
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
SENAC	- Serviço Nacional do Comércio
DPPH	- 2,2-difenil-1- picrato-hidrazila
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
t	- Tonelada
UV	- Ultravioleta
DL <sub>50</sub>	- Toxicidade média (dose letal que conduz a morte de 50% da espécie animal em avaliação)
LDL <sub>C</sub>	- Lipoproteína de baixa densidade, responsável pelo transporte do colesterol
EAG	- Equivalentes de ácido gálico
PUC-PR	- Pontifícia Universidade Católica do Paraná
FEP	- Fração éter de petróleo
FEEt	- Fração éter etílico
FCHCl <sub>3</sub>	- Fração clorofórmio
FAcEt	- Fração acetato de etila
F <sub>n</sub> -But.	- Fração <i>n</i> -butanol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo geral	18
1.1.2	Objetivos específicos	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	19
2.1	DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.- Hil. (ERVA-MATE)	19
2.2	CLASSIFICAÇÃO E TAXONOMIA	21
2.3	DISTRIBUIÇÃO E CULTURA ERVATEIRA	21
2.4	PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE	25
2.4.1	Ciclo do cancheamento	26
2.4.2	Ciclo do beneficiamento	28
2.5	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ERVA-MATE	29
2.5.1	Componentes minerais	31
2.5.2	Saponinas	32
2.5.3	Metilxantinas	36
2.5.3.1	Cafeína	37
2.5.3.2	Teobromina	40
2.5.3.3	Teofilina	41
2.5.4	Polifenóis	42
2.5.4.1	Ácido clorogênico	45
2.5.4.2	Flavonóides	46
2.5.5	Clorofila	48
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	53
3.1	MATERIAL	53
3.2	MÉTODOS	54
3.2.1	Caracterização física	55
3.2.2	Caracterização físico-química	56
3.2.3	Caracterização de fitocompostos	57
3.2.4	Extrato aquoso	57
3.2.4.1	Determinação do pH e caracterização organoléptica	58
3.2.4.2	Determinação do teor de sólidos	58
3.2.4.3	Pesquisa de metabólitos secundários	58

3.2.5 Extrato hidroalcoólico .....	61
3.2.5.1 Pesquisa de metabólitos secundários das frações.....	64
3.3 EXTRAÇÃO DE SAPOGENINAS.....	67
3.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	67
3.4.1 Taninos e compostos polifenólicos.....	68
3.4.2 Saponinas .....	68
3.4.3 Xantinas .....	69
3.4.3.1 CCD .....	69
3.4.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	69
3.5 ATIVIDADE HEMOLÍTICA .....	69
3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	70
3.6.1 Método do fosfomolibdênio .....	71
3.6.2 Método do DPPH (2,2-difenil-1-picrato-hidrazila).....	71
3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	73
3.8 ANÁLISE DA CLOROFILA <i>a</i> E DA CLOROFILA <i>b</i> .....	74
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
4.1 MATERIAL RESINOSO .....	75
4.1.1 Caracterização física .....	75
4.1.2 Caracterização físico-química .....	76
4.1.3 Pesquisa de fitocompostos .....	79
4.1.4 Teor de sólidos.....	82
4.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS E DAS FRAÇÕES.....	83
4.2.1 Determinação de taninos e compostos polifenólicos.....	83
4.2.2 Determinação de xantinas.....	84
4.2.3 Determinação de saponinas (fração butanólica).....	86
4.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA .....	86
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	88
4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	89
4.6 CLOROFILA <i>a</i> E CLOROFILA <i>b</i> .....	90
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>92</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil.) é uma árvore de médio porte, que floresce entre os meses de setembro a dezembro, tendo a maturação de seus frutos de janeiro a abril. Na sua industrialização são utilizadas folhas que segundo Scucato (1998), é a parte do vegetal que contém a maior concentração dos princípios ativos, pecíolos e ramos finos.

A erva-mate está distribuída no Brasil nos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, em algumas áreas do Mato Grosso do Sul e ainda no Paraguai, Argentina e Uruguai (Da CROCE, 2002), e a bebida obtida a partir de suas folhas tem profundo significado cultural e é venerada nessas localidades. A importância cultural da preparação da erva-mate (chimarrão) tem sido comparada à cerimônia do chá na cultura japonesa e é de conhecimento que nos países da América do Sul, extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.- Hil são consumidos numa razão de mais de um litro por dia por milhões de pessoas (MOSIMANN, WILHELM e SILVA, 2006). Substâncias químicas presentes na erva-mate fazem parte de um grupo de compostos peculiares que são utilizados devido a uma imagem de tradição associada à força e mística. A erva-mate contém alcalóides (cafeína, teofilina e teobromina), taninos, ácidos fólico e caféico, vitaminas, sais minerais, proteínas, glicídios e lipídios

Para a elaboração da erva-mate emprega-se as etapas de colheita, sapeco, secagem, canheamento, estacionamento e a moagem que podem originar produtos e subprodutos/resíduos.

Os principais produtos derivados da erva-mate são chimarrão, o tererê, o chá mate tostado natural, o chá mate solúvel e chás saborizados, o concentrado de mate tostado natural, o xarope de mate tostado natural, e segundo Contreras (2007) dos subprodutos industriais (pós e palitos) podem ser extraídas substâncias de importante valor comercial como clorofila, polifenóis e cafeína. Em alguns casos os subprodutos podem se transformar em um problema para a indústria ervateira, ou ainda podem apresentar emprego na indústria de carvão (GONÇALVES *et al.*, 2007) e o uso como fertilizante (BRISOLARA *et al.*, 2004).

Particularmente entre as etapas de sapeco e secagem no processamento da erva-mate pode estar localizada a chipiadeira, onde ocorre a quebra e trituração das folhas e ramos originando um subproduto denominado “material resinoso”, que na indústria pesquisada é descartado no ambiente e gera a necessidade de interrupção

do processamento para sua retirada. Uma vez que pode travar o sistema de processamento e/ou inutilizar o sistema de facas. Ressalta-se que não se obteve na literatura descrições desse material.

Assim, considerando-se a composição química da erva-mate e de seus produtos derivados e subprodutos, este trabalho se propõe avaliar os compostos bioativos do material resinoso resultante do processamento das folhas e ramos da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os compostos bioativos do material resinoso, resultante do processamento das folhas e ramos da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- a) Determinar as características física, organoléptica e físico-química;
- b) Determinar os componentes minerais;
- c) Caracterizar os metabólitos secundários: metilxantinas (cafeína, teobromina, teofilina), saponinas, flavonóides, taninos;
- d) Avaliar a atividade hemolítica dos extratos brutos (aquoso e hidroalcoólico);
- e) Avaliar a atividade antimicrobiana;
- f) Determinar a potencial atividade antioxidante;
- g) Quantificar a clorofila.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (ERVA-MATE)

A erva-mate é uma árvore perene, de crescimento lento, caule de cor acinzentada, com 20 a 25 cm de diâmetro, podendo chegar a 50 cm. A altura é variável, dependendo da idade e do tipo de solo, podendo atingir 15 m (quando podada não passa de 7 m) (EDWIN e REITZ, 1967).

As folhas de erva-mate (FIGURA 1) são alternadas, estreitas na base e ligeiramente obtusas no vértice. Suas bordas são denteadas, especialmente da metade para a extremidade (URBAN, 1990), medindo 8 a 10 cm de comprimento e 4 a 5 cm de largura, com nervuras salientes, apresentando coloração verde escura na face adaxial e verde clara na abaxial (FAGUNDES, 1980). O pecíolo é curto e retorcido e as flores são pequenas, dispostas na região axilar das folhas superiores, brancas, com quatro pétalas agrupadas em cachos de 30 a 40 flores (FIGURA 2) actinomorfas e unissexuais (FAGUNDES, 1980; GOSMANN, 1989).

O fruto de erva-mate (FIGURA 3) consiste de uma baga dupla, globular, muito pequena, de 4 a 8 mm, de cor verde, quando novo, e vermelho-arroxeadado, quando maduro. Os pássaros que se alimentam dos frutos são os disseminadores dessa espécie. Cada fruto maduro é composto de quatro sementes e um tegumento ou casca (MAZUCHOWSKI, 1989; MAZUCHOWSKI, SILVA e MACARI JÚNIOR, 2007).



**FIGURA 1 – FOLHAS DE ERVA-MATE**

FONTE: NAKASHIMA (2005).



**FIGURA 2 – FLORES DE ERVA-MATE**

FONTE: NAKASHIMA (2005).



**FIGURA 3 - FRUTOS DE ERVA-MATE**

FONTE: NAKASHIMA (2005).

## 2.2 CLASSIFICAÇÃO E TAXONOMIA

Em 1822, o naturalista francês August de Saint-Hilaire, em uma de suas viagens ao Brasil, enviou amostras da planta erva-mate à Academia de Ciências do Instituto da França, da qual ele fazia parte, como membro. A planta foi classificada com o nome científico de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (LINHARES, 1969; FAGUNDES, 1980).

O enquadramento taxonômico pode ser avaliado pelo Sistema de Engler (1964) e pelo Sistema de Cronquist (1981), conforme apresenta a Tabela 1.

**TABELA 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ERVA-MATE**

Sistema de Engler	Sistema de Cronquist
Divisão: Angiospermae	Divisão: Magnoliophyta
Classe: Dicotyledoneae	Classe: Magnoliosidae
Subclasse: Archichlamydeae	Subclasse: Rosidae
Ordem: Celestrales	Ordem: Celestrales
Família: Aquifoliaceae	Família: Aquifoliaceae
Gênero: <i>Ilex</i> L.	Gênero: <i>Ilex</i> L.
Espécie: <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	Espécie: <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.

FONTE: ANDRADE (2003).

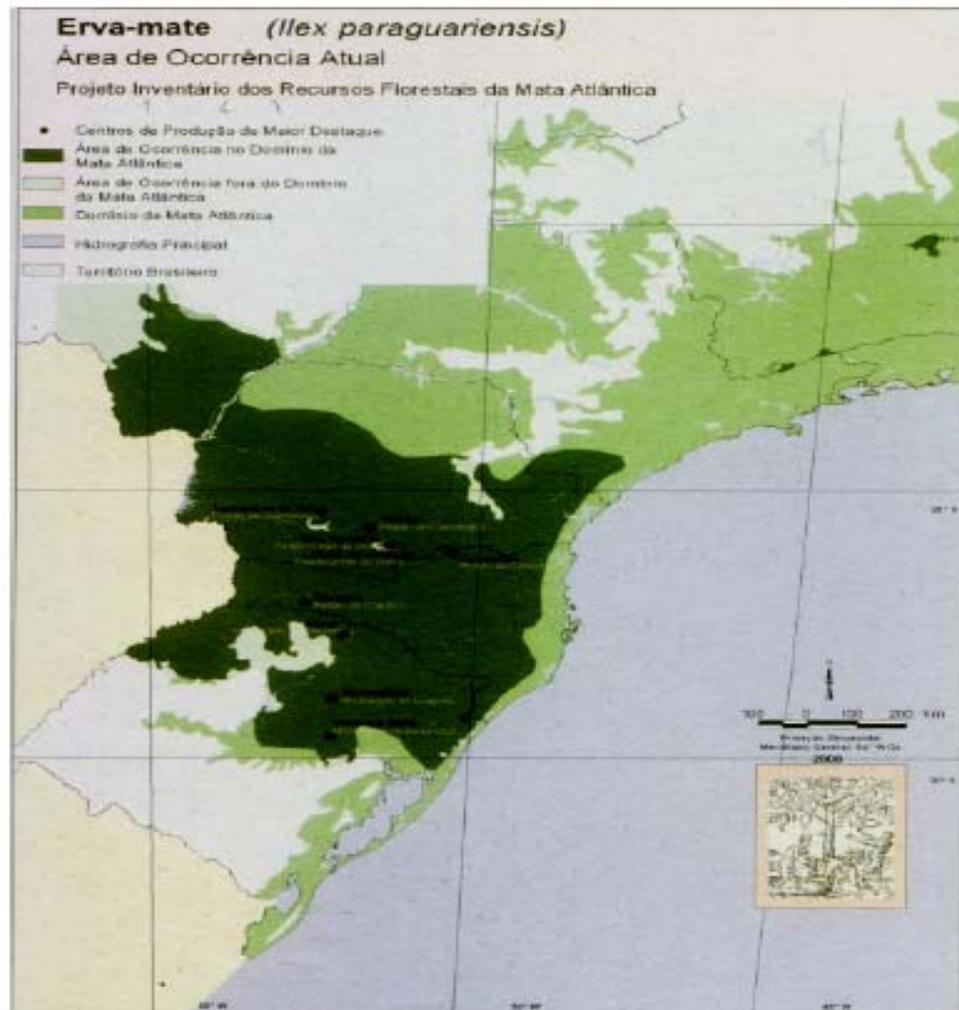
## 2.3 DISTRIBUIÇÃO E CULTURA ERVATEIRA

Sendo originária da América do Sul, a erva-mate desenvolve-se naturalmente na Argentina, no Paraguai, no Uruguai e no sul do Brasil, especialmente nos estados do Paraná, de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, sendo ainda cultivada, em reduzidos nichos, nos estados de Mato Grosso do Sul, de São Paulo e do Rio de Janeiro (MAZUCHOWSKI, 1989; FILIP e FERRARO, 2004).

A *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. é uma das plantas mais comercializadas na América Latina (SANZ e ISASA, 1991), sendo que cerca de 80% da área de ocorrência pertence ao Brasil (ESMELINDRO *et al.*, 2002), como pode ser observado na Figura 4.

O consumidor do mercado ervateiro é, freqüentemente, vítima dos sucedâneos da erva-mate, havendo numerosas plantas da mesma família e gênero, e até de outras

famílias, que são empregadas na falsificação (GOSMANN, 1989). Assim, a avaliação taxonômica pode ser útil a partir do desenvolvimento de métodos apropriados para o controle da qualidade, tanto dos alimentos, quanto das preparações farmacêuticas contendo *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.



**FIGURA 4 - ÁREA DE OCORRÊNCIA NATURAL DE *Ilex paraguariensis***  
 FONTE: ANDRADE (2004<sup>1</sup>).

A erva-mate, cuja cultura foi incentivada pelos jesuítas, entre os séculos XVII e XVIII, era popularmente conhecida sob várias denominações, como mate, chá-mate, chá-do-paraguai, chá-dos-jesuítas (FILIP *et al.*, 1998; FILIP, LÓPEZ e FERRARO, 1999; POMILIO, TRAJTEMBERG e VITALE, 2002), chá-das-missões, mate-do-

<sup>1</sup> SUSTENTÁVEL mata atlântica: a exploração de seus recursos florestais. São Paulo: Editora SENAC, 2002. 197 p.

paraguai, congonha, congonha-das-missões, congonha, erva, mate-legítimo, mate-verdadeiro, entre outras (GOSMANN, 1989).

As bebidas contendo de erva-mate já eram consumidas pelos indígenas que habitavam a América do Sul (Guaranis do Paraguai e Caingangues do Paraná que a chamavam de congonha ou o que alimenta), antes da chegada dos colonizadores europeus, sendo que suas propriedades estimulantes eram largamente conhecidas devido à presença da cafeína.

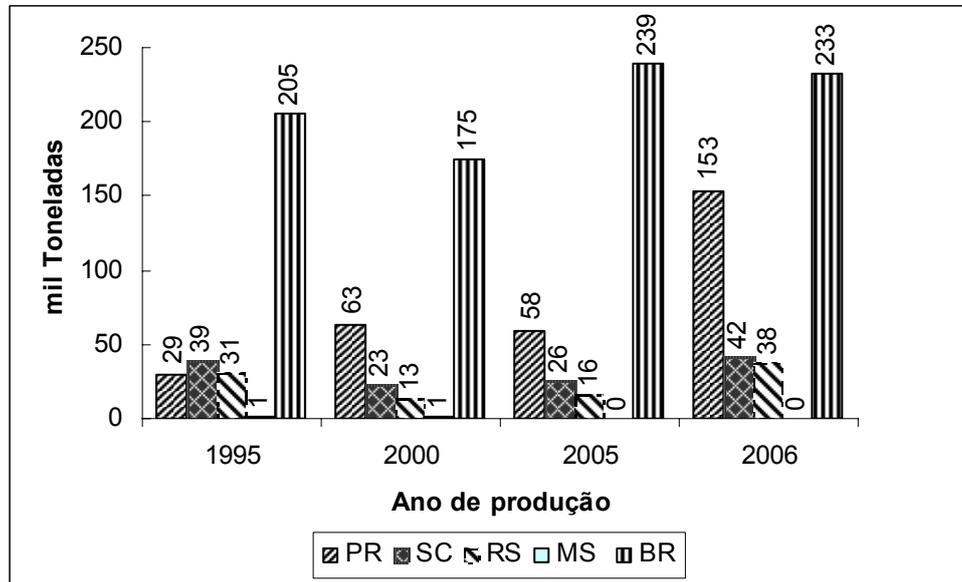
A erva-mate silvestre (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), também chamada de nativa, cresce espontaneamente em associação com as araucárias (*Araucária angustifolia* Bertol. O. Kuntze). É uma planta que vegeta, preferencialmente, em solos úmidos e sombrios. Pela limitação de ervais nativos, agrônomos buscaram alternativas para a cultura da erva-mate. Considerando o cultivo, duas condições são possíveis utilizando o manejo de ervais nativos, quando é feito através da formação de novos ervais, ou empregando o adensamento, que é o aumento do número de plantas sob as araucárias (EMATER, 1991).

A formação de ervais nativos é iniciada com a limpeza da área, mantendo as árvores de grande porte e alguns exemplares de erva-mate que estejam crescendo espontaneamente. No ato da limpeza, as sementes dormentes no solo têm a possibilidade de germinar e se desenvolver. O processo de adensamento de ervais nativos consiste em ocupar espaços vazios neles existentes, por não haver uniformidade na distribuição das plantas espontâneas (EMATER, 1991).

Assim, desde o século XVI, com os Jesuítas, o cultivo da erva-mate tem importância agrônômica, sendo, hoje, uma cultura tradicional, com significativo impacto econômico nos países do sul da América do Sul. Seu potencial econômico ficou evidente durante a Guerra do Paraguai (1864-1870), quando foram cortadas as comunicações do rio Paraná para o rio do Prata, o que impediu a distribuição comercial da erva-do-paraguai, deslocando o interesse dos importadores argentinos para o Paraná. Esse cenário permaneceu até os anos de 1930 quando a concorrência argentina encerrou a predominância do comércio da erva-mate paranaense (PARANÁ, 2007).

Segundo dados do IBGE (2008), a produção anual brasileira de erva-mate foi de 206.000 t em 2001, 246.837 t em 2004, e 233.360 t em 2006. Neste último ano, a participação do Paraná foi de 152.971 t, representando cerca de 65 % da produção nacional, sendo o município de São Mateus do Sul o maior produtor (14 % da produção nacional).

A Figura 5 apresenta a produção de erva-mate cancheada dos estados brasileiros produtores nos anos de 1995, 2000, 2005 e 2006, comparativamente ao total nacional.



**FIGURA 5 - PRODUÇÃO DE ERVA-MATE NOS ANOS DE 1995, 2000, 2005 E 2006**

FONTES: IBGE (2008).

Existe uma infinidade de usos para a erva-mate, além do tradicional chimarrão e do tererê, do chá-mate queimado e do solúvel. O extrato das folhas, a clorofila, os compostos voláteis, a cafeína, os flavonóides e as saponinas contidas na erva-mate podem ser empregados na fabricação de sucos, refrigerantes, corantes, sorvetes, chicletes, medicamentos, produtos cosméticos (perfumes, sabonetes, desodorantes), ampliando as possibilidades de mercado (MIRANDA e URBAN, 1998).

Entretanto, há muito a ser aprimorado, com relação à qualidade dos produtos, mesmo que seja em sua forma de apresentação tradicional. Os processos de beneficiamento e industrialização têm evoluído pouco e os atributos de qualidade dos produtos devem ser reavaliados.

O sucesso, em ambos os casos - desenvolvimento de novos produtos e melhoria da qualidade -, pode levar a um crescimento na demanda da erva-mate e também a um aumento do valor agregado do produto (BERTONI<sup>2</sup> *et al.*, 1992, citado por ESMELINDRO *et al.*, 2002).

<sup>2</sup> BERTONI, M. H.; PRAT KRICUM, S. D.; KANZIG, R. G.; CATTANEO, P. Fresh leaves of *Ilex paraguariensis* Saint Hil. III. Effect of different stages of the tradicional process for yerba mate production on the composition of fresh leaves. **Anales de la Association Quimica Argentina**, Buenos Aires, v. 80, n. 6, p. 493-501, 1992.

## 2.4 PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE

Saint-Hilaire, em sua viagem pelo Brasil entre 1816 e 1822, observou e descreveu a natureza e os costumes locais, entre eles, a antiga maneira de fabricar o mate nos arredores de Curitiba, conforme apresentada por Miranda e Urban (1998):

“Não se dava nenhuma atenção para a época do ano em que se cortavam os galhos, não se usava lenha verde para tostar as follhas, não se lenha verde para tostar as folhas, não se construía barbaquás, nem se aproveitava as madeiras dos ramos, foram as observações do botânico francês Saint-Hilaire, quando comparou as diferenças significativas com o modo paraguaio e o brasileiro de preparo da erva-mate, resultado de séculos de dominação, que começou quando o primeiro índio guarani ofereceu a primeira cuia ao colonizador espanhol recém- chegado ao continente americano”.

O processamento da erva-mate é iniciado com a etapa de colheita, seguida do processo agroindustrial que, segundo Malheiros (2007), consiste das etapas de cancheamento e beneficiamento. O cancheamento envolve as etapas de sapeco, secagem e cancheamento propriamente dito. O ciclo do beneficiamento consiste nas operações de retificação da umidade (por secagem), separação (folhas e palitos) e mistura (visando a formação dos tipos especiais de erva-mate para comercialização).

Para o processamento, inicialmente, as folhas e os ramos da erva-mate, cortados das árvores, são transportados às indústrias em caminhões abertos e colocados em um pátio antes do processamento. Geralmente, o tempo transcorrido entre o corte do material e o processamento varia de 6 e 16 h, dependendo da distância entre a plantação e a indústria, e das condições climáticas (que podem alterar grandemente, devido às variações de intensidade da precipitação pluviométrica e de incidência solar, especialmente porque a temperatura pode oscilar entre 0 e 40 °C, podendo produzir danos ao material colhido) (SCHMALKO e ALZAMORA, 2001).

O melhor período para a colheita da erva-mate ocorre entre os meses de maio e agosto, quando a erva está em processo de dormência e as seivas concentram-se nas folhas, com maior desfrute industrial (MACCARI JÚNIOR e SANTOS, 2000).

Fatores naturais interferem diretamente na composição química, assim como os sistemas de processamento determinam a qualidade dos efeitos biológicos e as características organolépticas e sensoriais. A partir da avaliação de sua composição

química, é possível vislumbrar diferentes aplicações potenciais, que justificam seu comércio (MACCARI JÚNIOR e SANTOS, 2000).

A Figura 6 ilustra o pátio de recepção das folhas e os ramos da erva-mate (Indústria Mate Laranjeiras).



**FIGURA 6 - RECEPÇÃO DA ERVA-MATE NA INDÚSTRIA MATE LARANJEIRAS**

FONTE: NAKASHIMA (2005).

#### 2.4.1 Ciclo do cancheamento

Após a colheita, as folhas e os ramos da erva-mate seguem para o sapeco, que é um processo de tratamento térmico em que se aplica uma alta temperatura, sendo realizado para impedir a ação de enzimas como a oxidase e a polifenoloxidase. Essas enzimas são capazes de enegrecer as folhas verdes nas condições ambientais. Assim, o sapeco deve ser realizado logo após a colheita, no prazo de até 24 h, para evitar a fermentação, que é favorecida pela umidade e temperatura, causando a perda da erva-mate colhida (MACCARI JÚNIOR e SANTOS, 2000).

Essa operação é viabilizada conduzindo o material ao fogo direto e consiste na passagem rápida dos ramos com as folhas sobre as chamas do sapecador (cilindro metálico, perfurado e inclinado). A temperatura média da erva-mate na entrada do sapecador é de 400 °C e, na saída, 65 °C. O tempo de permanência oscila em torno de 8 min. Esse processo permite a retirada da umidade superficial (ESMELINDRO, 2002), evitando que as folhas se tornem pretas/pardas (oxidadas), mantendo uma coloração

uniforme, de verde-amarelado a verde-oliva e despreendendo um aroma agradável. Caso contrário, a coloração passa a verde-escuro ou preto, com aspecto queimado (VALDUGA, BATESTIN e FINZER, 2003).

O sapeco pode ser considerado como o estágio primário para liberação dos componentes voláteis, que se despreendem mais tarde, durante o armazenamento. Devido ao alto conteúdo de umidade e ao tratamento térmico, diversas alterações físicas e químicas, na cor, no teor de vitaminas e na densidade aparente são produzidas nessa etapa (RAMALLO *et al.*, 2001).

A secagem, processo subsequente, pode ser desenvolvida em duas etapas que consistem da pré-secagem, visando reduzir o teor de água nas folhas e nos ramos, em cilindro rotativo semelhante ao do sapeco, com tempo de permanência de 2 a 9 min e temperatura variável, entre 80 e 250 °C (KAWAKAMI e KOBAYASHI<sup>3</sup>, 1991, citado por BURGDARDT, 2000). A secagem propriamente dita, desidratação da massa foliar, pode ser realizada em barbaquás, cilindros rotativos ou esteiras rolantes.

Para a secagem, o tempo de permanência e a temperatura média da erva dependem das características operacionais de cada secador. Para o secador de esteira, com temperatura entre 90 e 110 °C, o tempo é de 3 h. No secador rotativo, o produto permanece em contacto direto com a fumaça por cerca de 30 min, com menor uniformidade de temperatura, 50 °C na entrada e 110 °C na saída (ESMELINDRO *et al.*, 2002). Quando em secadores de cilindros rotativos, o processo ocorre com temperatura média interna de 80 °C e pode necessitar de um tempo de até 4 h para ser completado, dependendo das condições operacionais e do equipamento (VALDUGA, BATESTIN e FINZER, 2003).

O cancheamento é a etapa que consiste na trituração da erva-mate, após o processo de secagem. É realizada em trituradores ou cancheadores e tem o objetivo de reduzir o tamanho das folhas e dos ramos secos, que em seguida são submetidos ao soque, através de uma rosca sem fim ou, mecanicamente, por meio de uma bateria de pilões, até atingir a granulometria desejada (MENDES, 2005).

---

<sup>3</sup> KAWAKAMI, M.; KOBAYASHI, A. Volatile constituents of green and roasted mate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 39, p. 1275-1279, 1991.

#### 2.4.2 Ciclo do beneficiamento

Nessa etapa procede-se a retificação da umidade por secagem feita com ar quente e seco. Após, o material é conduzido à limpeza, por meio de peneiras, ventiladores, filtros e coletores de pó, os quais promovem a separação da erva cancheada dos pecíolos e caule lignificados (MENDES, 2005).

Em seguida, a erva-mate é peneirada de acordo com o tamanho das partículas separando-se os palitos e as folhas. As impurezas e o material inerte são descartados, procedendo-se a mistura do material selecionado, conforme a granulometria desejada pela empresa produtora, para compor o produto a ser comercializado (CONTRERAS, 2007).

A Figura 7 apresenta a erva-mate cancheada (Indústria Mate Laranjeiras).



**FIGURA 7 - ERVA-MATE CANCHEADA NA INDÚSTRIA MATE LARANJEIRAS**

FONTE: NAKASHIMA (2005).

Finalizada a etapa de beneficiamento, a erva-mate é conduzida ao estacionamento, que significa colocar o material cancheado e embalado em sacos em depósito por um período mínimo de 15 dias. Mas nunca superior a 2 anos. Nessa etapa há uma transformação no produto, adquirindo uma cor amarelada que é apreciada pelo mercado interno brasileiro (SENAI, 2006).

A Figura 8 apresenta a etapa de armazenamento da erva-mate beneficiada na Indústria Mate Laranjeiras.



**FIGURA 8 - ERVA-MATE EM ARMAZENAMENTO NA MATE LARANJEIRAS**

FONTE: NAKASHIMA (2005).

## 2.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ERVA-MATE

Segundo o relatado por Borille (2004), as investigações químicas relativas à erva-mate foram iniciadas por Trommsdorff, em 1836, quando verificou a presença de diversas substâncias resinosas, matéria corante amarelo e ácido tânico, entre outros compostos. Stenhouse, em 1843, descobriu a cafeína e, em 1848, Rchleder obteve o ácido do mate (ácido cafeoil-tânico). Em 1918, Lohman identificou a cafeína como o principal componente químico da erva-mate.

Diferentes efeitos biológicos foram estabelecidos da elucidação das estruturas químicas constituintes da erva-mate. A espécie tem indicação como estimulante cardíaco intensificando a atividade circulatória e ser efetiva no tratamento da hiperlipidemia (ALIKARIDIS, 1987). Consumida como chá ou chimarrão, a erva-mate pode ser uma provável fonte de vitaminas e minerais.

Para Veronese<sup>4</sup> (1944), citado por Valduga *et al.* (1997), são constituintes da erva-mate: celulose, gomas, mucilagens, dextrina, glucose, pentoses, substâncias graxas e uma resina aromática, formada por uma mistura de oleína, palmitina, lauroestearina e por um óleo, cujas características muito se aproximam da cumarina. Além disso, estão presentes: legumina, albumina, cafeína, teofilina, cafearina, cafamarina, ácidos orgânicos (matetânico, fólico, caféico, virídico e clorogênicos) e ainda, clorofila, colesterina e óleo essencial. Na análise das cinzas, o autor encontrou grande quantidade de potássio, lítio, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido carbônico, ácido

---

<sup>4</sup> VERONESE, A. **Contribuição ao estudo do mate**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1944. 213p.

clorídrico, ácido cítrico, além de magnésio, ferro, alumínio e traços de arsênico. Vitaminas; flavonóides, principalmente rutina, quercitina e canferol; taninos; ácido clorogênico e ácido cafeoil-quínico foram citados por Andrade (2003).

Para Valduga *et al.* (1997), a composição química da erva-mate está intimamente relacionada ao estágio evolutivo da planta, à época da colheita, às características climáticas, além das condições do solo e do clima.

Reffatti, Lorenzetti e Rodrigues (2006) obtiveram 0,78% e 0,42% de nitrogênio, respectivamente, para as folhas e para o caule de erva-mate. Henrichs e Malavolta (2001) encontraram na erva-mate para chimarrão 1,6% de nitrogênio. Quando da análise da infusão, os mesmos autores evidenciaram 1,1%, enquanto Schmalko *et al.* (2000) registraram teores de 0,34 %, quando estudaram infusão de mate quente.

Esmelindro *et al.* (2002) verificaram que as etapas do processamento industrial têm influencia nos teores dos compostos presentes no táxon e, conseqüentemente, os respectivos conteúdos de cinzas, fibras, lipídeos, proteínas, glucose e sacarose.

O conhecimento sobre as variações de concentração dos constituintes da erva-mate, com relação ao material genético amostrado, às variáveis ambientais, às técnicas de cultivo, às formas de processamento e dos métodos extrativos utilizados para a quantificação foi estabelecido como de elevada importância por Cardozo Júnior *et al.* (2003).

Os mesmos autores destacam o uso tradicional da erva-mate como antioxidante, e a potencial utilização da planta como uma matéria-prima na elaboração de produtos, assim como a presença das metilxantinas, como um dos principais grupos de compostos químicos.

Especificamente para o chimarrão, Bastos *et al.* (2006) encontraram uma correlação linear entre o conteúdo de substâncias bioativas e de sólidos solúveis, sendo uma indicação de que a erva-mate é uma importante fonte de compostos fenólicos, que podem proteger os sistemas biológicos contra processos oxidativos.

### 2.5.1 Componentes minerais

Os minerais constituem um grupo de elementos amplamente distribuídos na natureza e exercem diversas funções no organismo, que incluem a ativação, a regulação, a transmissão e o controle de processos bioquímicos (LOBO e TRAMONTE, 2004).

Considera-se, ainda, que diversos fatores podem influenciar no teor dos minerais em vegetais, principalmente o aspecto genético. Dessa forma, as concentrações minerais da erva-mate podem ser específicas para cada espécimen e órgão vegetal, bem como podem depender do ambiente, como citado por Robassa, Reismann e Maccari Júnior (2003).

Para Schmalko *et al.* (2000), o estudo dos minerais e das vitaminas na erva-mate mostrou que o conteúdo nutricional das folhas depende da forma de cultivo e de consumo, considerando os experimentos com o extrato aquoso em suas três formas de obtenção: infusão preparada a partir de saquinhos, o mate quente e o mate frio (tererê). Com relação ao cultivo, o conteúdo de nutrientes das folhas de erva-mate pode variar em função dos diferentes níveis de sombreamento, a partir dos estudos realizados em ervais na região de São Mateus de Sul, Paraná. Os autores também apresentaram dados relativos aos teores de Ca, Mg, K, N, P e taninos, no solo e nas folhas de *Ilex paraguariensis*, relacionando com a luminosidade. Os teores de macronutrientes no solo dos três sítios avaliados não foram diferentes, sendo que a luminosidade foi estabelecida como o principal fator de influência sobre os teores foliares.

Maiocchi *et al.* (1989) observaram, quando da análise de folhas de erva-mate, na ausência de gravetos, valores para o Cu, Zn, Fe, Mn, Ca, Mg e K, respectivamente, de 0,047 mg/kg<sup>-1</sup>; 0,422 mg/kg<sup>-1</sup>; 0,473 mg/kg<sup>-1</sup>; 5,98 mg/kg<sup>-1</sup>; 83,58 mg/kg<sup>-1</sup>; 71,64 mg/kg<sup>-1</sup> e 129,90 mg/kg<sup>-1</sup>. Os autores utilizaram a espectrofotometria de emissão atômica para a quantificação do Cu, Zn, Fe e Mn, a espectrometria de absorção atômica para a determinação quantitativa do Ca e Mg e, para o K, foi empregada a fotometria de chama.

Os resultados descritos por Carneiro, Reissmann e Marques (2006) no estudo das folhas de erva-mate foram, respectivamente, de 7,97 g/kg<sup>-1</sup>, 8,82 g/kg<sup>-1</sup>, 8,20 g/kg<sup>-1</sup> e 495,2 mg/kg<sup>-1</sup> para K, Ca, Mg e Al, após a digestão nitroperclórica, a partir de diferentes métodos de análise química. Esses autores verificaram a presença de

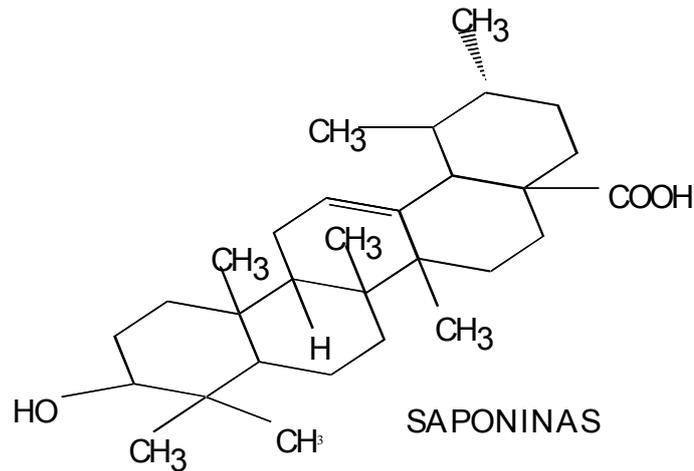
diferenças nos resultados obtidos nos diversos procedimentos empregados. Com relação ao valor elevado para o AI, esse achado pode estar relacionado a uma boa digestão da amostra. Além disso, foi preconizado que as determinações devem ser conduzidas em chama que proporcione maior temperatura, permitindo que a sensibilidade do equipamento seja maior. Comumente, são utilizadas chamas de óxido nitroso-acetileno, aumentando o grau de dissociação dos compostos, o que prejudica a análise.

### 2.5.2 Saponinas

As saponinas são moléculas derivadas de esteróides ou terpenos ,amplamente, encontradas nas plantas superiores. Sua estrutura hidrofílica-hidrofóbica (anfipática) promove a redução da tensão superficial de uma solução aquosa, formando espuma mediante a agitação. Apresentam, ainda, ação detergente, emulsionante e de formação de micelas (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997; GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ e MAZZA, 2007). Possuem elevada massa molar (600 a 2000 g.mol<sup>-1</sup>) e, geralmente, ocorrem como misturas complexas, devido à presença concomitante de estruturas com um número variável de açúcares, que podem ter cadeia linear ou ramificada (SIMÕES *et al.*, 2001).

Por hidrólise ácida, é formada uma aglicona, conhecida como sapogenina. Assim, a saponina pode ser subdividida, quimicamente, em duas classes de compostos, sendo que a porção esteroidal e/ou triterpênica representa a extremidade lipofílica e que diferentes açúcares e/ou ácidos urônicos relacionados constituem a extremidade hidrofílica. As sapogeninas são insolúveis em água e, usualmente, extraídas com solventes orgânicos (EVANS, 2002; ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997).

A Figura 9 representa a estrutura química geral da porção aglicona das saponinas.



**FIGURA 9 - ESTRUTURA QUÍMICA DA PORÇÃO AGLICONA DAS SAPONINAS**

FONTE: MERCK INDEX (1996).

Em geral, as saponinas, na forma de glicosídeo, são muito solúveis em água e podem causar desorganização das membranas de células sangüíneas (ação hemolítica) e de células das brânquias de peixes (ação ictiotóxica). Além disso, complexam esteróides, podendo exercer ação antifúngica, hipocolesterolêmica e/ou hepatoprotetora (SIMÕES *et al.*, 2001; GNOATTO, SCHENKEL e BASSANI, 2005; HECK e MEJIA, 2007).

A detecção de saponinas no reino vegetal é realizada a partir de suas propriedades químicas e/ou físico-químicas, em testes qualitativos ou quantitativos, pela reação com ácidos minerais, aldeídos aromáticos ou sais de metais, produzindo compostos coloridos, pela diminuição da tensão superficial e/ou ação hemolítica (SIMÕES *et al.*, 2001).

Para a extração das saponinas, geralmente, são utilizadas misturas hidroalcoólicas ou alcoólicas, por meio de maceração, percolação ou extração exaustiva sob refluxo, uma vez que a solubilidade das saponinas em água permite preparar um extrato aquoso isento de lipídeos e clorofila (SIMÕES *et al.*, 2001).

Robbers, Speedie e Tyler (1997) afirmaram que, para purificação das saponinas, após a eliminação do álcool, o extrato obtido é submetido à partição com um solvente pouco polar, diclorometano ou clorofórmio, visando a retirada de compostos apolares. Em seguida, deve ser realizada a partição com *n*-butanol para a eliminação de açúcares livres, aminoácidos e ácidos orgânicos, entre outros compostos hidrofílicos que permanecem na fase aquosa. Dessa forma, é separada uma fração purificada de saponinas na fase butanólica.

Considerando que as saponinas ocorrem na forma de misturas complexas com variações nas agliconas e nos açúcares presentes, seu isolamento é um processo bastante trabalhoso. Para isso, é possível empregar diversos tipos de processos cromatográficos e, eventualmente, é feita a hidrólise do extrato bruto, procedimento que permite a melhor caracterização dos constituintes alúmicos. No caso da determinação estrutural, para Simões *et al.* (2001) e Evans (2002), além da análise da aglicona, é imprescindível a avaliação dos açúcares e/ou ácidos urônicos por meio de métodos espectrométricos, como espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear.

Os estudos com saponinas descritos por Gosmann (1989), Taketa e Schenkel (1994), Schenkel *et al.* (1995), Kraemer *et al.* (1996), Ferreira *et al.* (1997), Schenkel *et al.* (1997), Martinet *et al.* (2001), a partir de diferentes variedades de *Ilex*, permitiram identificar as diferenças significativas na composição desses constituintes na fração glicona e/ou na fração aglicona, por meio de métodos diversificados.

Schenkel, Montanha e Gosmann (1996) detectaram cerca de 10% de saponinas em folhas secas de *I. paraguariensis*. Gnoatto, Schenkel e Bassani (2005), considerando a dificuldade de quantificar as saponinas, compostos fracamente cromóforos, descreveram um método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para a quantificação do conteúdo de saponinas totais, a partir de extratos aquosos de *I. paraguariensis*, expressas em ácido ursólico.

Inicialmente, as saponinas foram consideradas como um fator antinutricional em alimentos e apresentavam uso restrito, devido ao seu gosto amargo. Mais recentemente, a partir de fontes alimentícias e não alimentícias, foram confirmadas evidências de seus benefícios para a saúde, como a diminuição do colesterol e propriedades anticancerígenas (GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ e MAZZA, 2007). Os autores relacionaram, ainda, quarenta e nove atividades biológicas atribuídas às saponinas, sendo que as mesmas possuem baixa toxicidade, quando administradas por via oral, devido à sua baixa absorção e, considerando a estrutura química, a atividade hemolítica pode ser muito reduzida na presença de constituintes do plasma. Com relação às aplicações comerciais, a diversidade de propriedades físico-químicas e biológicas tem sido explorada com sucesso em produtos de fins alimentícios, cosméticos, farmacêuticos e de uso na agricultura.

Ainda, acerca dos possíveis efeitos biológicos, Ferreira *et al.* (1997) e Simões *et al.* (2001) verificaram, a partir de experimentos *in vitro*, que as saponinas de *I. paraguariensis* inibiram a difusão passiva do ácido cólico, através de membranas de

celulose. Esses estudos visam simular a reabsorção intestinal de ácidos biliares, sendo que os resultados permitiram comprovar uma diminuição da absorção e um aumento da eliminação desses compostos o que acarretou um desvio de parte do colesterol da corrente sanguínea para suprir a carência de bile. Dessa forma, os autores concluíram que a presença das saponinas nas folhas de *I. paraguariensis* tem considerável interesse, devido ao potencial hipocolesterolêmico, além da sua influência no grau de amargor dos produtos da erva-mate e aos possíveis significados fisiológicos para a planta.

Gosmann (1989) relatou o valor terapêutico de *I. paraguariensis* a partir da indicação de uso popular, há muito tempo como espécie moluscicida, canceriostática, antiulcerogênica, tônica (cardiovascular), antiinflamatória e hipocolesterolêmica, reafirmadas por Gnoatto, Schenkel e Bassani (2005).

Para Schenkel<sup>5</sup> *et al.* (1995), citado em Maccari Júnior e Pinto Júnior (2000), a ação antifúngica da erva-mate é decorrente da presença das saponinas ou mais especificamente relacionada à elevada solubilidade em água dessas substâncias e atividade na desorganização das membranas celulares. No entanto, Shenkel, Montanha e Gosmann (1996) relataram que o extrato bruto do referido táxon e a fração de saponinas purificadas não apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Porém, essa ação biológica deve ser avaliada sob diferentes aspectos. Uma ação sobre microrganismos pode ser negativa, como no caso do uso de um tensoativo em soluções de microrganismos de interesse agrícola e ou industrial. Por outro lado, essa propriedade pode ser de importância na produção de produtos de limpeza contra contaminantes específicos ou na proteção de plantas (BOWYER<sup>6</sup> *et al.*, 1995, citado em MACCARI JÚNIOR e PINTO JÚNIOR, 2000).

Para Simões *et al.* (2001), a presença de saponinas pode gerar ação hemolítica e icotóxica, complexar esteróides, exercendo ação antifúngica e hipocolesterolêmica, sendo importante o conhecimento de suas ações presentes na amostra estudada e a sua detecção no reino vegetal, que pode ser efetuada por meio da avaliação da atividade hemolítica.

Schenkel *et al.* (1997) afirmaram que a presença de saponinas nas folhas de *Ilex paraguariensis* constitui fato importante, considerando seu alto conteúdo, a influência no grau de amargor do mate e os possíveis significados fisiológicos,

---

<sup>5</sup> SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; HEINZMANN, B. M.; MONTANHA, J. B.; ATHAYDE, M. L.; TAKETA, A. C. Saponinas em espécies do gênero *Ilex*. In: ERVA-MATE: biologia e cultura no cone Sul. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. p. 251-256.

<sup>6</sup> BOWYER, P.; CLARK, B. R.; LUNNES, P.; DANIELS, M. J.; OSBOURN, A. E. Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. **Science**, n. 267, p. 371-374, 1995.

reinterados por Mosimann, Wilhem-Filho e Silva (2006), que atribuíram a esses metabólitos o efeito hipocolesterolêmico do extrato de erva-mate.

Para Kochol *et al.* (2007) e Lopez Campanher *et al.* (2000), saponinas presentes em extratos de *Ilex dumosa* Reiss (contaminantes da *I. paraguariensis*) podem servir para diferenciá-la de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. em estudos cromatográficos, uma vez que *I. dumosa* apresenta seis saponinas do ácido oleanólico e a sétima do ácido ursólico. Destacaram também que existiriam algumas evidências que os extratos da *I. dumosa* tenham produzido alguns efeitos hematológicos adversos, principalmente hemólise em animais de laboratório, mas que esses efeitos não têm sido confirmados nem repetidos.

### 2.5.3 Metilxantinas

As metilxantinas são substâncias orgânicas de origem vegetal, contendo a função amina, podendo ser denominadas, ainda, como pseudoalcalóides. A mais importante xantina é a cafeína, que apresenta uma atividade farmacológica considerável no sistema nervoso central (COSTA, 1994).

De acordo com Simões *et al.* (2001), as metilxantinas são originárias de bases púricas e possuem caráter anfótero, comportado-se como ácidos ou bases em função do pH. Podem ser consideradas como pseudoalcalóides devido à sua atividade biológica, à presença de nitrogênio heterocíclico e a sua distribuição irrestrita, sendo, neste caso, denominadas como alcalóides purínicos, em função de ser purina a substância fundamental das bases púricas ou xânticas.

As metilxantinas são parcialmente solúveis em água, sendo que a solubilidade aumenta em soluções aquosas ácidas a quente, em etanol a quente, em solventes orgânicos clorados e em soluções alcalinas. A cafeína, a teobromina e a teofilina podem ser diferenciadas em função da solubilidade desses compostos, da temperatura de sublimação e da faixa de fusão dos respectivos sublimados (SIMÕES *et al.* 2001).

As metilxantinas mais abundantes - cafeína, teobromina e teofilina - são constituintes químicos importantes de várias bebidas alimentícias e/ou de estimulantes não alcoólicos (café, chá, cola, mate, guaraná) consumidas em todo mundo, seja como preparações caseiras ou como produtos industrializados (SIMÕES *et al.*, 2001).

São atribuídas à erva-mate, os efeitos biológicos de depurativo, diurético e estimulante devido ao alto conteúdo de compostos purínicos, podendo ser, inclusive, a fonte primária de metilxantinas da dieta (SIMÕES *et al.*, 2001).

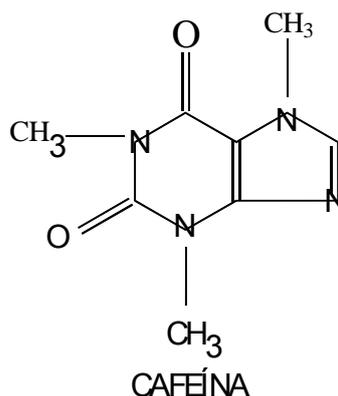
### 2.5.3.1 Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um composto orgânico com a função amina, contendo quatro átomos de nitrogênio, que podem ser utilizados pela planta, sob alta demanda desse elemento químico (MAZZAFERA, 1997). A cafeína está presente no café, no chá, no cacau, na pasta de guaraná na cola e na erva-mate (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER., 1997).

Desde a descoberta da cafeína e teobromina, vários estudos têm demonstrado a presença desses compostos purínicos no mate, com conteúdo entre 0,8% a 1,3% e 0,3% a 0,4% em peso de material, respectivamente (BRENELLI, 2003).

A cafeína possui fórmula molecular  $C_8H_{10}N_4O_2$  e massa molecular de 194,19  $g.mol^{-1}$  (FIGURA 10). Seu ponto de fusão é de 238 °C; sublima em 178 °C, sendo que a sublimação rápida é obtida de 160 a 165 °C sob 1 atm de pressão e 5 mm de distância. Uma grama se dissolve em 46 mL de água a 80 °C, 1,5 mL de água fervente, 22 mL de álcool a 60 °C, 50 mL de acetona, 5,5 mL de clorofórmio, 530 mL de éter, 100 mL de benzeno e 22 mL de benzeno fervente. É levemente solúvel em pirrol e tetra-hidrofurano, contendo cerca de 4% de água; solúvel em acetato de etila e fracamente solúvel em éter de petróleo. A solubilidade em água é aumentada por benzoatos alcalinos, cinamatos, citratos ou salicilatos. A toxicidade média ( $DL_{50}$ ), para camundongos, *hamsters*, ratos e coelhos, a partir da administração oral, respectivamente, é de 127, 230, 355, 246  $mg.kg^{-1}$  (machos) e 137, 249, 247, 224  $mg.kg^{-1}$  (fêmeas). Como característica física, apresenta a forma de agulhas monoidratadas, contendo 8,5% de água, que sofrem completa desidratação em 80 °C (MERCK INDEX, 1996).

A Figura 10 apresenta a estrutura química da cafeína.



**FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DA CAFEÍNA**

FONTES: MERCK INDEX (1996).

O teor de cafeína na erva-mate é utilizado como auxiliar na caracterização da espécie *Ilex*. Estudos realizados por Filip *et al.* (1998) e confirmados por Filip, López e Ferraro (1999) verificaram que *I. paraguayensis* tem as maiores quantidades de cafeína e teobromina, em relação a outras variedades, o que levou Reginatto *et al.* (1999) a sugerirem a possibilidade de identificar adulterações da erva-mate, utilizando essa característica química. Coelho, Athayde e Schenkel (2001) verificaram maiores teores de cafeína e teobromina nas folhas quando coletadas nos meses de verão. Reginatto *et al.* (1999), ao analisarem o extrato clorofórmico das folhas de erva-mate em cromatoplasmas de sílica gel G tendo como eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH (90:5), verificaram a identificação da cafeína e da teobromina, por comparação dos valores de relação de frente (Rf).

Borille, Reissmann e Freitas (2005) obtiveram, na pesquisa de xantinas em folhas de erva-mate, concentrações de 1,67% a 2,22% para a cafeína.

Para Heck e Mejia (2007), as xantinas encontradas no mate incluem a cafeína em maior concentração (de 1% a 2% da massa do material seco), seguida da teobromina (0,3% a 0,9%) e da teofilina (em pequenas quantidades). Schubert *et al.* (2006) obtiveram teores de metilxantinas totais (cafeína + teobromina), expressos em termos de cafeína, para amostras de Ijuí e Santa Maria (Rio Grande do Sul), variando de 0,02% a 0,11%. Pokolenko e Schmalko (2005), entretanto, encontraram conteúdo variante entre 0,95% e 1,24%.

A maior parcela da cafeína sofre metabolização hepática, mas outros órgãos também podem desempenhar essa função, incluindo o cérebro e os rins. Somente uma

pequena quantidade pode ser excretada sem alteração na sua estrutura química (0,5% a 3%), sendo que a sua detecção na urina é relativamente fácil. Tem uma meia-vida variando de 3 a 6 h, não havendo efeito cumulativo no organismo (BRENELLI, 2003).

A proporção de excreção é particularmente importante, uma vez que, durante a execução de exercícios intensos, as mulheres apresentam uma maior eliminação de cafeína do que os homens. Alguns fatores, como a estrutura genética, a dieta, o uso de fármacos, o sexo, a massa corporal, o estado de hidratação, o tipo do exercício físico praticado e o consumo habitual de cafeína, podem afetar o metabolismo de uma pessoa e, conseqüentemente, influenciar na quantidade de cafeína total eliminada através da urina (ALTIMARI *et al.*, 2001).

Possivelmente, as xantinas são os estimulantes mais antigos na história humana, sendo a cafeína um dos mais potentes (BRENELLI, 2003). Esse fármaco, por possuir muitos efeitos benéficos, foi indicado para o uso humano no século 6 a.C., quando o chá de espécies contendo cafeína foi indicado como elixir aos discípulos do taoísmo. Muitas pesquisas sugerem que a cafeína pode trazer benefícios à saúde, auxiliando no tratamento da dor (incluindo as enxaquecas), mitigando os sintomas da asma e melhorando o humor. Como estimulante mental, combate a fadiga e aumenta a cognição e a velocidade de raciocínio. Os principais efeitos biológicos de interesse da cafeína, no organismo humano, são o estimulante, o diurético e o de relaxamento da musculatura lisa dos brônquios, do trato biliar e do trato gastrointestinal. Entretanto, pode aumentar o tônus vascular e gerar dependência química (POR QUE..., 2005).

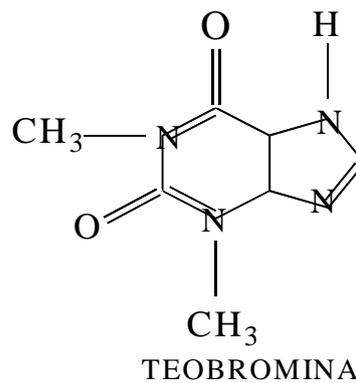
A cafeína pode ser detectada no organismo humano após 20 a 30 min da ingestão. A administração de altas doses de cafeína (10 a 15 mg.kg<sup>-1</sup> de massa corporal) não é recomendada, pois seus níveis plasmáticos podem atingir valores tóxicos de até 20 mg. Fisicamente, a cafeína pode induzir a insônia, o nervosismo, a irritabilidade, a ansiedade, além de náuseas e de desconforto gastrointestinal (ALTIMARI *et al.*, 2001). A dose letal, para um indivíduo adulto de 70 kg, é de cerca de 10 g, o que equivale a ingestão de 285 xícaras de café ou 50 kg de chocolate (SIMÕES *et al.*, 2001; BRENELLI, 2003). Apesar do seu uso quase universal, raramente eventos tóxicos são relatados na literatura (POR QUE..., 2005).

A cafeína é formada biossinteticamente a partir da teobromina; a teofilina (1,3-dimetilxantina) é um intermediário do catabolismo da cafeína, sendo que o seu efeito em humanos tem sido estudado com mais detalhes devido aos seus usos terapêuticos, como vasodilatador periférico, diurético e relaxante muscular (ITO, CROZIER e AISHIHARA, 1997).

Mazzafera (1997) afirmou que a cafeína presente nas folhas da erva-mate justifica, em parte, os efeitos biológicos observados no homem e, paralelamente à cafeína, identificou quantidades significativas de compostos fenólicos.

### 2.5.3.2 Teobromina

A teobromina possui fórmula molecular  $C_7H_8N_4O_2$  e massa molar  $180,17 \text{ g.mol}^{-1}$  (FIGURA 11). Apresenta ponto de fusão de  $357 \text{ }^\circ\text{C}$  e sublima em  $290$  a  $295 \text{ }^\circ\text{C}$ . Um grama dissolve em cerca de 2000 mL de água, 150 mL de água fervente, 2200 mL de álcool 95 %; solúvel em ácidos concentrados em cerca de 22 partes de solução aquosa de fosfato tribásico de sódio a 20%; é moderadamente solúvel em amônia; é quase insolúvel em benzeno, éter, clorofórmio e tetracloreto de carbono (MERCK INDEX, 1996).



**FIGURA 11 - ESTRUTURA QUÍMICA DA TEOBROMINA**

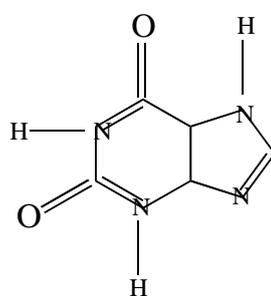
FONTE: MERCK INDEX (1996).

Saldaña *et al.* (2002) apresentaram como sendo de cerca de 0,03% a concentração de teobromina na erva-mate, mas segundo Reginatto *et al.* (1999), os valores variam de 0,29% a 0,69%, nas diferentes espécies de *Ilex*, sendo que a maior concentração encontrada foi nas folhas de *I. paraguariensis* A. St.-Hil..

Schubert *et al.* (2006) utilizaram para a determinação da teobromina método sensível (HPLC) quando obtiveram baixas quantidades desse constituinte, atribuindo as variações às diferentes metodologias e solventes utilizados para extração.

### 2.5.3.3 Teofilina

A teofilina possui fórmula molecular  $C_7H_8N_4O_2$  e peso molecular  $180,1 \text{ g.mol}^{-1}$  (FIGURA 12). Tem ponto de fusão de  $270\text{-}274 \text{ }^\circ\text{C}$ , gosto amargo,  $pK_a$  ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ): 8,77. Um grama se dissolve em 12 mL de água, 80 mL de álcool, cerca de 110 mL de clorofórmio; é solúvel em água quente, em hidróxidos alcalinos, amônia, HCl ou  $\text{HNO}_3$  diluído, sendo levemente solúvel em éter. É um derivado da xantina, isômero da teobromina. Sua síntese orgânica pode ser feita a partir da dimetil-uréia e cianoacetato de etila (MERCK INDEX, 1996).



TEOFÍLINA

**FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DA TEOFILINA**

FONTE: MERCK INDEX (1996).

Para Mazzafera (1997), a bebida preparada a partir da infusão das folhas verdes e secas da erva-mate é altamente apreciada por seu flavor peculiar, pelas propriedades estimulantes que em grande parte são provenientes da presença da teofilina. Reginatto *et al.* (1999) estabeleceram concentrações variando de 0,07 % a 0,29 % de teofilina obtidas em CCD em folhas de *Ilex*, e Saldaña *et al.* (2002) descrevem valores de 0,01% a 0,08%, enquanto que Gnoatto *et al.* (2007) não detectaram a presença desta xantina.

#### 2.5.4 Polifenóis

Os compostos fenólicos ou polifenóis pertencem a um grupo de substâncias com grande diversidade de estruturas químicas, simples e complexas, que possuem número variável de grupamentos hidroxila, estando amplamente distribuídos no reino vegetal, nos microrganismos e no metabolismo de animais (SIMÕES *et al.*, 2001; ÇOKUĞRAŞ e BODUR, 2003; SANTOS *et al.*, 2004).

As principais classes de polifenóis são definidas de acordo com a natureza de sua estrutura hidrocarbônica, sendo denominadas como ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, antocianinas, cumarinas, antraquinonas e, menos comumente, estilbenos e lignanas (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000; EVANS, 2002).

O termo polifenol é utilizado para designar os compostos formados pela esterificação de um ou mais derivados do ácido *trans*-cinâmico com o ácido quínico, ou ácido 3-*O*-cafeoilquínico, metabólitos secundário, amplamente distribuídos no reino vegetal e encontrados em numerosas plantas superiores (SIMÕES *et al.*, 2001; ÇOKUĞRAŞ e BODUR, 2003; DE MARIA e MOREIRA, 2004).

Para Scalbert e Williamson (2000), os polifenóis são compostos ambiental e biologicamente importantes, uma vez que possuem não só atividades biológica e farmacológica, mas também influenciam a qualidade sensorial de alimentos de origem vegetal e algumas bebidas, sendo encontrados em plantas, frutas, sucos e vinhos.

São agentes redutores e, em conjunto com outras substâncias redutoras, como a vitamina C, a vitamina E e os carotenóides, podem proteger os tecidos contra o estresse oxidativo, sendo comumente mencionados como antioxidantes. Por isso, estão associados à prevenção do câncer, de doenças cardiovasculares e inflamatórias e à inibição da oxidação do colesterol proveniente da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000; VAHER e KHOEL, 2003).

Os polifenóis possuem dois grupos fenólicos que permitem sua ação como antioxidante natural e também podem estar relacionados ao efeito anticarcinogênico. No sistema biológico, o ácido clorogênico é capaz de se ligar às enzimas e às proteínas, como a  $\alpha$ -amilase, tripsina, lisozima e albumina, modificando suas propriedades estruturais (SIMÕES *et al.*, 2001; ÇOKUĞRAŞ e BODUR, 2003). Entretanto, estes compostos diferem de outros antioxidantes, devido à sua diversidade estrutural e por atingirem, em algumas plantas, níveis elevados para a dieta humana (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

Para Sies e Stahl (1995), antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparada a do substrato oxidável, retarda ou evita a oxidação desse substrato de maneira efetiva.

Quanto à biodisponibilidade, a evidência indireta da sua absorção através da barreira intestinal é o aumento verificado na capacidade antioxidante do plasma, quando da análise após o consumo de alimentos ricos em polifenóis. Os poucos estudos de biodisponibilidade em humanos mostraram que as quantidades de polifenóis encontrados intactos na urina variariam em função dos compostos fenólicos administrados (SANTOS *et al.*, 2004).

Saldanha e Bastos (2006) comprovaram a perda desses componentes, à partir da análise do material torrado, visto que a concentração de compostos polifenólicos na erva-mate verde foi superior ao presente na erva-mate tostada, tanto nos extratos aquosos, quanto nos extratos alcoólicos, com valores de 7,4 mg.mL<sup>-1</sup>, 6,8 mg/mL e 4,1 e 3,4 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Entretanto, Holoatty, Arguello e Malec (2006) avaliaram o conteúdo de polifenóis durante o processamento e o estacionamento da erva-mate, utilizando o método de Folin Ciocalteau, a partir de extratos aquosos e não observaram alterações significativas no parâmetro analisado.

Donaduzzi *et al.* (2003) procederam a quantificação dos polifenóis no mate verificando uma variação média em torno de 8,8% nas folhas secas em estufa, a partir das diferentes procedências estudadas. Esses resultados foram inferiores ao encontrado por Holoatty, Arguello e Malec (2006), que observaram uma variação do conteúdo de polifenóis durante o processamento da erva-mate desde a folha verde até o produto final estacionado de forma natural, concentração de 18% a um valor de 16,4%, com 12 meses de armazenamento.

Navarro *et al.* (2006) descreveram para as folhas de erva-mate a presença de 299,0 mg de ácido gálico.g<sup>-1</sup> de folha nas condições ensaiadas e Bastos *et al.* (2006) relatam para o extrato aquoso de chá de erva-mate 145 mg EAG.g<sup>-1</sup> de folha seca.

Segundo Machado e Bastos (2007), a erva-mate tem despertado a atenção da comunidade científica nos últimos anos, por seus efeitos benéficos à saúde humana, principalmente nos aspectos relacionados à atividade antioxidante à ação protetora frente aos processos degenerativos.

É atribuída à erva-mate a propriedade de diminuir a peroxidação lipídica do colesterol presente nas lipoproteínas de baixa densidade encontrados no sangue em função da presença de cafeoil-derivados e outros polifenóis. O ácido caféico e seus derivados têm apresentado atividade antioxidante em sistemas biológicos e químicos.

A espécie *I. paraguariensis* tem sido usada na medicina popular para o tratamento da artrite, reumatismo, obesidade, entre outras patologias. Estudos têm confirmado esses efeitos, a partir de extratos de *I. paraguariensis* administrados em coelhos. No entanto, não foi observada a diminuição nos níveis de colesterol dos animais hipercolesterolêmicos (MOSIMANN, WILHEM-FILHO e SILVA, 2006).

Navarro *et al.* (2006) avaliaram o conteúdo de polifenóis totais e a capacidade antioxidante de diferentes extratos vegetais, entre os quais o obtido da erva-mate, quando submetidos a processos de conservação. Os autores verificaram que a concentração dos compostos fenólicos, em ordem decrescente, foi constatada no chá, na erva-mate, na melissa, na menta e no ginkgo e que as operações de extração e secagem estudadas (tempo e temperatura) não afetaram significativamente o conteúdo de fenóis e capacidade antioxidante, no entanto, o congelamento diminuiu significativamente a concentração desses compostos. A concentração de antioxidantes fenólicos na erva-mate foi de 299 mg de ácido gálico.g<sup>-1</sup>.

Nesse estudo a fração butanólica apresentou a menor concentração dentre as frações testadas, analisando-se a intensidade das manchas obtidas. Esse resultado é coincidente com os resultados de Cardozo Júnior *et al.* (2007), que encontraram nas frações aquosa e butanólica as maiores concentrações de compostos em análise da mistura clorofórmio:ácido acético:água, revelador anisaldeído sulfúrico, tendo nas frações aquosa e butanólica as maiores concentrações de compostos

Bravo, Goya e Lecumberri (2007) quantificaram os constituintes fenólicos em bebidas de consumo convencional (chás e vinho tinto), utilizando o método de Folin Ciocalteu. Os autores observaram que a infusão de erva-mate, em relação a outras bebidas nas quais são atribuídas a presença de polifenóis e de atividade antioxidante, apresentou as maiores concentrações de compostos polifenólicos e atividade antioxidante.

Filip *et al.* (2000) avaliaram a atividade antioxidante de espécies do gênero *Ilex* relacionadas à *Ilex paraguariensis* como a *Ilex theezans* Mart. ex Reissek, *Ilex dumosa* Reissek, *Ilex argentina* Lillo, *Ilex breviscuspis* Reissek, e *Ilex pseudobuxus* Reissek dentre as quais a *I. paraguariensis* A. St.-Hil. apresentou a maior atividade antioxidante, e Furlong *et al.* (2003) encontraram para erva-mate comercial analisada pelo método de Folin resultado de 2,14 mg fenol.g<sup>-1</sup> de material.

#### 2.5.4.1 Ácido clorogênico

Clifford e Ramirez-Martinez (1991) identificaram concomitantemente à cafeína quantidades significativas de compostos fenólicos. Uma quantidade maior do que 9,8% de ácidos clorogênicos foi confirmado por BASTOS<sup>7</sup> *et al.*, 2005, citado em BASTOS *et al.* (2006).

O ácido clorogênico foi descoberto, em 1907, na forma de um complexo cristalino, denominado de clorogenato de cafeína, a partir do qual se preparou um ácido puro (DE MARIA e MOREIRA, 2004).

Quando introduzido por Payen, em 1864, o termo ácido clorogênico designava um composto fenólico com característica ácida, mas de estrutura química ainda desconhecida, que conferia cor verde ao meio aquoso, quando em solução levemente alcalina e exposição ao ar (DE MARIA e MOREIRA, 2004). A estrutura química do composto foi determinada como sendo o ácido 3-cafeoilquínico, conhecido como ácido 5-cafeoilquínico (DE MARIA e MOREIRA, 2004).

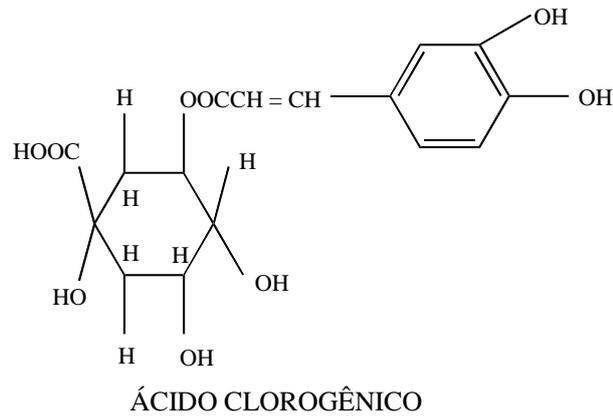
Considerados como pseudo-taninos, os compostos fenólicos possuem massa molar inferior aos taninos verdadeiros, entre 1000 e 5000 g.mol<sup>-1</sup> (EVANS, 2002).

O ácido clorogênico possui fórmula molecular C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub> e massa molar 354,31 g.mol<sup>-1</sup>. Torna-se anidro em 110 °C e tem ponto de fusão de 208 °C, índice de refração  $[\alpha]_D^{26} - 35,2^\circ$  (c = 2,8) e pKa (27 °C) 2,66 em 110 °C. A solubilidade em água a 25 °C é de 4%, sendo muito mais solúvel em água quente e levemente solúvel em acetato de etila (MERCK INDEX, 1996).

A Figura 13 apresenta a estrutura química do ácido clorogênico, onde é possível observar a estrutura geral desses compostos, constituída por dois anéis com 6 carbonos conectados por uma cadeia com 3 carbonos.

---

<sup>7</sup> BASTOS, D. H. M.; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y. S.; MANOLIO, R. S.; TORRES, E. A. F. S. The chlorogenic acid and caffeine contento yerba mate (*Ilex paraguariensis*) beverage. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, n.1, p. 91-95, 2005.



**FIGURA 13 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO CLOROGÊNICO**

FONTE: MERCK INDEX (1996).

Os estudos de Schinella *et al.* (2000), com um extrato aquoso preparado a partir da infusão de *I. paraguariensis*, evidenciaram várias classes de constituintes químicos, entre eles os polifenóis (ácidos clorogênicos e flavonóides). Filip *et al.* (2001) encontraram um conteúdo de  $10,71 \pm 0,40$  g de cafeoil-derivados em ácido clorogênico.100 g<sup>-1</sup> do material vegetal e uma relação positiva entre a atividade antioxidante e esse conteúdo. Hecke e Mejha (2007) verificaram que a concentração de polifenóis no mate tem apresentado forte correlação com a sua capacidade antioxidante.

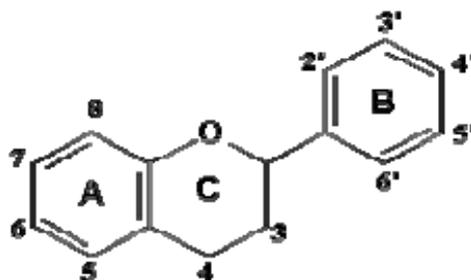
#### 2.5.4.2 Flavonóides

Coelho, Athayde e Schenkel (2001) relatam a presença de flavonóides entre outros constituintes químicos da erva-mate.

Os flavonóides são os mais importantes polifenóis da dieta humana. Estão entre os compostos naturais mais disseminados nas plantas e podem ser divididos em várias sub-classes, de acordo com o grau de oxidação do oxigênio heterocíclico, flavonas, flavonóis, isoflavonas, antocianinas, flavanóis, proantocianidinas e flavanonas (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

Sua estrutura química baseia-se num esqueleto de carbono C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (difetilpropano), derivado do ácido chiquímico e do acetato, com um anel heterocíclico de cromano e ainda um segundo anel aromático na posição 2, 3, ou 4 (FIGURA 14).

Em alguns casos, o anel heterocíclico com seis membros pode ser substituído por um anel de cinco membros (auronas), ou estar na forma de uma cadeia aberta (chalconas) (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997).



**FIGURA 14 - ESTRUTURA QUÍMICA DO FLAVONÓIDE**

FONTE: RIBEIRO E SERAVALLI (2004).

A literatura destaca a presença de 13 subclasses de flavonóides, com um total de mais de 5000 compostos, com propriedades antioxidantes (de maior interesse biológico), antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorais, antiasmáticas e inibidoras de enzimas (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996). Podem apresentar uma estrutura fenólica simples ou como compostos polimerizados com massas molares superiores a  $30000 \text{ g mol}^{-1}$  (TRUEBA, 2003).

Com relação às propriedades antioxidantes, os flavonóides interferem nas reações de formação e de propagação de radicais livres. Os numerosos estudos sobre a atividade antioxidante de flavonóides mostram que os compostos com substituintes nas posições 3 e 4 no anel B apresentam-se mais ativos como antioxidante, com o efeito potencializado pela presença de uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 e um grupo carbonila na posição 4, como verificado na quercetina (TRUEBA, 2003).

Além de seqüestrar radicais livres e quelar íons metálicos e inibir oxidases, os flavonóides podem aumentar a disponibilidade de antioxidantes endógenos, assim como a atividade de enzimas antioxidantes. Além disso, são capazes de inibir as enzimas envolvidas com a geração de espécies reativas de oxigênio (TRUEBA, 2003).

Os diversos flavonóides podem ser obtidos por meio de uma modificação do composto intermediário, mediante reações de desidrogenação e hidroxilação. Esses compostos são classificados em função do nível de oxidação, sendo as catequinas as formas menos oxidadas e mais freqüentes; as antocianinas são os glicosídeos de flavonol mais oxidados (ROBINSON, 1991).

As agliconas que compõem os glicosídeos de flavonóis mais comuns são o canferol, a quercetina, a rutina e a miricetina, encontrados principalmente nas folhas e flores (ROBINSON, 1991), e ainda a naringenina citada por Bianchi e Antunes (1999). Esses compostos fazem parte de bebidas contendo vegetais clorofilados do chá preto, do vinho tinto (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996), da erva-mate em concentrações menores, além de estarem em chimarrão (RIBANI e RODRIGUEZ-AMAYA, 2006).

Para Matsubara e Rodriguez-Amaya (2006) o chá-mate pode ser considerado a infusão mais consumida especialmente na região Sul do no Brasil. Na análise da composição em termos de flavonóis, os autores verificaram que o produto resultante da erva-mate apresentou, para as diferentes marcas estudadas, teores variando de 2,0 a 3,3 mg.g<sup>-1</sup> de folhas secas e para o canferol teores de 0,3 a 0,6 mg.g<sup>-1</sup> de folhas secas, comparáveis ao do chá verde e preto. Particularmente para a erva-mate, Ribani e Rodriguez-Amaya (2006) encontraram concentrações de 1,09 a 3,94 mg.g<sup>-1</sup> para a quercetina e 0,44 a 1,00 mg.g<sup>-1</sup> de canferol. No entanto, no chimarrão, os teores foram de 19 a 65 µg.mL<sup>-1</sup> de quercetina e 8 a 18 µg.mL<sup>-1</sup> para o canferol, o que corresponde em valores médios a uma eficiência de extração desses flavonóides a partir da erva-mate de 86,7% e 85%, respectivamente.

Silva (2005) postulou que a ingestão de erva-mate é um hábito saudável, capaz de prevenir doenças relacionadas às altas taxas de colesterol, uma vez que apresenta propriedades antioxidantes. O autor afirmou ainda que isso decorre de a erva-mate ser rica em compostos fenólicos, que são excelentes antioxidantes e podem inibir as reações de oxidação de lipídios, reações de degradação de proteínas, de carboidratos e do DNA (AMBIENTE..., 2005).

### 2.5.5 Clorofila

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes nas espécies vegetais, presentes nos cloroplastos das folhas e de outros tecidos vegetais (STREIT *et al.*, 2005).

Stokes (1868) demonstrou que a clorofila é efetivamente constituída por uma mistura de dois compostos químicos, cerca de 50 anos depois de sua descoberta. Em

1873, Sorby obteve a clorofila na forma pura, empregando o método de partição entre o metanol e o dissulfeto de carbono (BOBBIO e BOBBIO, 1989).

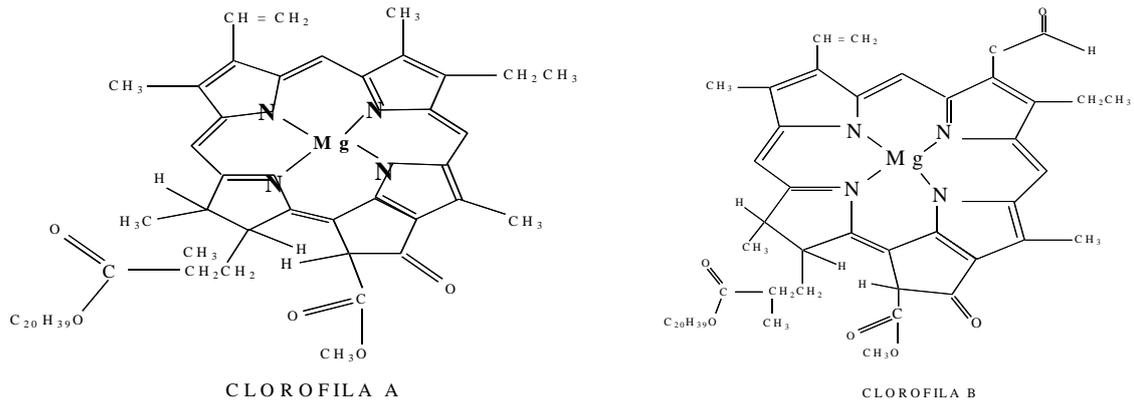
Estruturalmente, todas as clorofilas são porfirinas, formadas por uma estrutura isocíclica tetrapirrólica quelada com magnésio, contendo em geral os radicais metila, etila, um grupo ácido propiônico esterificado com álcool fitílico na posição 7, uma cetona na posição 9 e radical carboximetoxila na posição 10 (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

Um átomo de magnésio está no centro da estrutura do anel. As cadeias laterais variam entre as diferentes formas de clorofila, em diferentes organismos (WONG, 1995).

Várias clorofilas são encontradas na natureza, cujas estruturas diferem em relação aos substituintes em torno do núcleo porfina; as mais importantes são a clorofila *a* e a clorofila *b*, e estão na proporção de três clorofilas *a* para cada clorofila *b* nos tecidos vegetais verdes. A clorofila *a* está presente nos organismos que realizam fotossíntese oxigênica, mas também ocorrem clorofilas *b* e *c* em outros grupos de organismos (DEY e HARBORNE, 1997).

Nos tecidos vegetais, a clorofila está presente como suspensão coloidal nas estruturas dos cloroplastos, associada aos carotenóides (carotenos e xantofilas), aos lipídeos e às proteínas. As ligações entre essas moléculas são fracas e podem ser facilmente rompidas, tornando possível a extração das clorofilas dos tecidos vegetais verdes pelo seu contato com solventes orgânicos (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

Comparando as estruturas químicas da clorofila *a* e *b* (FIGURA 15), o aumento da polaridade da clorofila *b* em relação à clorofila *a* pode ser justificado pela presença do substituinte aldeído. O feoforbídeo *a* e a feofitina *a*, produtos de degradação da clorofila, podem interferir na quantificação da clorofila *a*, pois são capazes de absorver a luz e gerar fluorescência na mesma região do espectro visível. Assim, se os pigmentos estiverem presentes na amostra podem ocorrer erros significativos na determinação quantitativa de clorofila *a* da amostra (STREIT *et al.*, 2005).



**FIGURA 15 – ESTRUTURA QUÍMICA DA CLOROFILA a E DA CLOROFILA b**

FONTE: MERCK INDEX (1996).

As clorofilas são quimicamente alteradas por fatores como pH, presença de metais divalentes, aquecimento e enzimas (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004). A degradação dessas moléculas ocorre quando da exposição à luz, às radiações ionizantes e ao aquecimento, além de sofrerem modificações na presença de oxigênio e quando da existência de altos níveis de atividade de água. Portanto, a degradação é retardada com a redução do teor de umidade e atividade de água, assim como o congelamento (STREIT *et al.*, 2005).

No processamento de alimentos vegetais, a reação mais importante está associada à facilidade com que o magnésio é substituído por prótons na estrutura da clorofila, pela adição de ácidos diluídos, com a formação de feofitinas, que apresentam cor verde oliva, prejudicando os alimentos ricos nesse pigmento. O átomo de magnésio da clorofila pode ser deslocado facilmente por ácidos orgânicos ou pelos íons  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$ . A clorofila, na forma de base livre, obtida em meio fracamente ácido, é a feofitina, cujo espectro visível apresenta quatro bandas de absorção (ELBE e SCHWARTZ, 2000).

Os pigmentos clorofilianos são de grande importância comercial, podendo ser utilizados como aditivos (corantes) ou como antioxidantes (para restabelecer o teor natural da molécula em produtos alimentares. Apesar de sua instabilidade às transformações químicas, a clorofila utilizada de forma esporádica no Brasil é importada de empresas européias, onde é extraída da alfafa (STREIT *et al.*, 2005).

A polaridade de uma substância influi diretamente na escolha do melhor solvente para a sua extração. Dessa forma, para a extração completa das clorofilas, os solventes polares como a acetona, o metanol, o etanol, o acetato de etila, o dimetilsulfóxido, a piridina e a dimetilformamida são os mais eficientes, enquanto que o hexano e o éter de petróleo são menos eficientes (STREIT *et al.*, 2005).

A cor verde na erva-mate é atribuída à presença de clorofila, sendo que a sua intensidade tem uma relação direta com a sua concentração. Assim, durante o processamento, cada estágio pode acarretar uma diminuição do nível de cor da clorofila, que é mais acentuada durante a última etapa – o estacionamento (MORAWICKI, SCHMALKO e KÄNZIG, 1999; SCHMALKO *et al.*, 2004). Esses autores relacionaram os fatores de temperatura, tempo de aquecimento, atividade de água e embalagem/atmosfera de armazenamento, como alguns dos aspectos responsáveis pela degradação do pigmento. Também sugeriram o aprofundamento dos estudos em relação a essas variáveis, com vistas à adequação da coloração do produto ao mercado brasileiro (coloração verde clara). Observaram ainda que o conteúdo de clorofila diminuiu 30,5% em 58 dias, resultado menor do que os valores descritos anteriormente por outros pesquisadosres.

Galeano, Barrionuevo e Arguelo (2004) avaliaram diferentes métodos alternativos para preservar a cor de folhas sapecadas de erva-mate, com o propósito de minimizar a degradação da clorofila. O experimento consistiu em submeter o material ao sapeco, combinando temperaturas de 90 ou 100 °C, em quatro tempos de residência no leito, para experiência com vapor de água fluente. Os resultados obtidos revelaram menores perdas em relação ao processo tradicional. No entanto, é necessário avaliar as dificuldades na implementação do método.

As alterações de coloração são atribuídas principalmente a conversão da clorofila a feofitinas (do verde para o castanho) que ocorrem durante o processamento térmico da erva-mate (SCHMALKO e ALZAMORA, 2001). Esses estudos foram confirmados por Maiocchi e Avanza (2004), quando obtiveram para o período de 30 dias, em temperaturas de 35, 50 e 70 °C, concentrações variáveis de 30 a 2800 mg.L<sup>-1</sup>. Mais recentemente, Malheiros (2007) também evidenciou as alterações da cor e degradação da clorofila na erva-mate durante a armazenagem.

Várias condições patológicas produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), e podem ter aplicações potenciais. Assim, a clorofilina, análogo solúvel em água da clorofila, tem sido examinada pela habilidade em inibir danos de membrana induzida por radiação  $\gamma$  e fotossensibilização, envolvendo o uso do azul de metileno e da luz

visível. A substituição dos pigmentos sintéticos por pigmentos naturais pode ser também um dos importantes passos para produzir alimentos mais saudáveis (STREIT *et al.*, 2005).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A erva-mate chega à indústria em fardos que são abertos no pátio de recebimento, onde se realiza a primeira classificação com a retirada de impurezas grosseiras e folhas escuras. Em seguida, pelo uso de um trator, a erva-mate é transportada para uma esteira e conduzida a um triturador-separador, gerando folhas e ramos que são conduzidos ao sapecador. O material obtido dessa separação (serragem) é utilizado como combustível no processamento. Do sapecador, a erva-mate é levada por meio de uma esteira a um outro picador-triturador (chipiadeira) onde circula. Em seguida é picada e triturada e depois submetida à pré-secagem e peneiramento, encerrando com a secagem final, enfardamento e consequente encaminhamento para maturação.

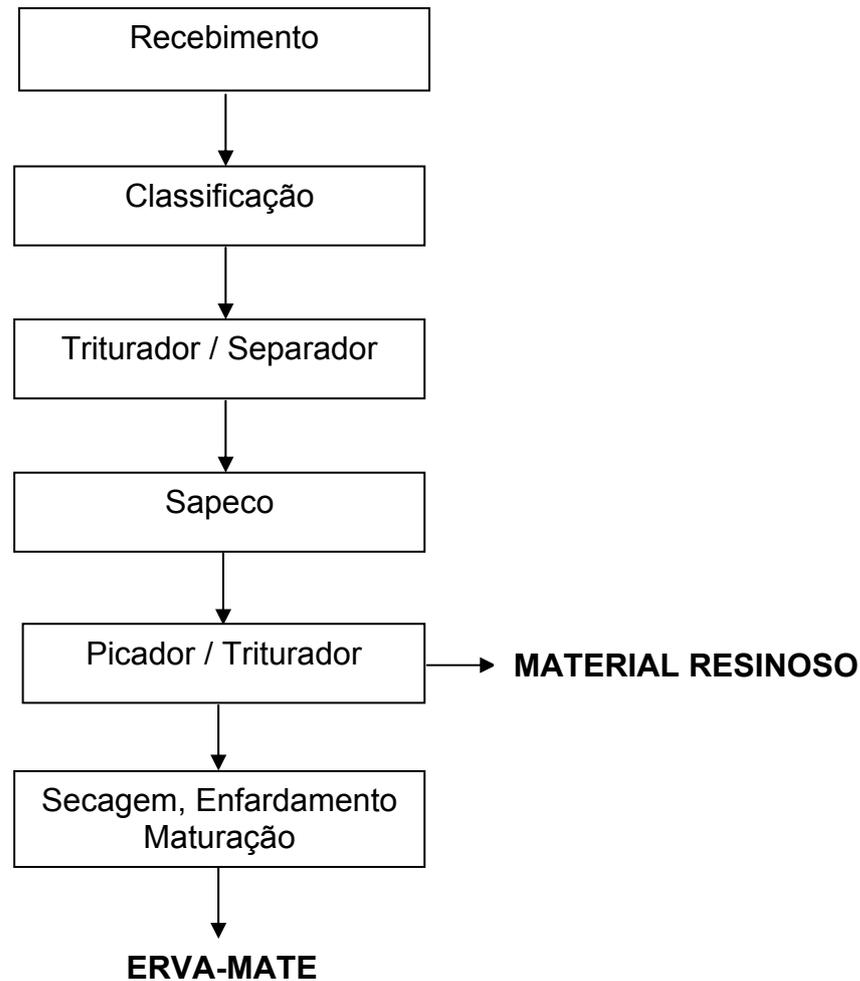
O material foi obtido na empresa Indústria Mate Laranjeiras Ltda., em sua unidade localizada no km 238, n. 1050, Rodovia BR 277, Irati-PR. Esta unidade processa a erva-mate de Irati e região, incluindo os municípios paranaenses de Ivaí, Guarinanga, Imbituva, Teixeira Soares, Fernandes Pinheiro, Paulo Freitas, Mallet, São João do Triunfo, Rebouças, Rio Azul, Inácio Martins, Guarapuava, Pinhão, Pitanga, Campina Grande, Goiochim e Laranjeiras do Sul.

#### 3.1 MATERIAL

O material utilizado neste estudo foi o produto resultante da ação mecânica de faca de aço sobre as folhas e ramos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.- Hil.) na chipiadeira, durante o processamento da erva-mate e denominado de “material resinoso”, submetido às análises alguns dias depois de sua retirada do equipamento.

Empiricamente o proprietário e administrador da empresa, verificou que a quantidade de material resinoso é maior nos meses de frutificação dos ervais.

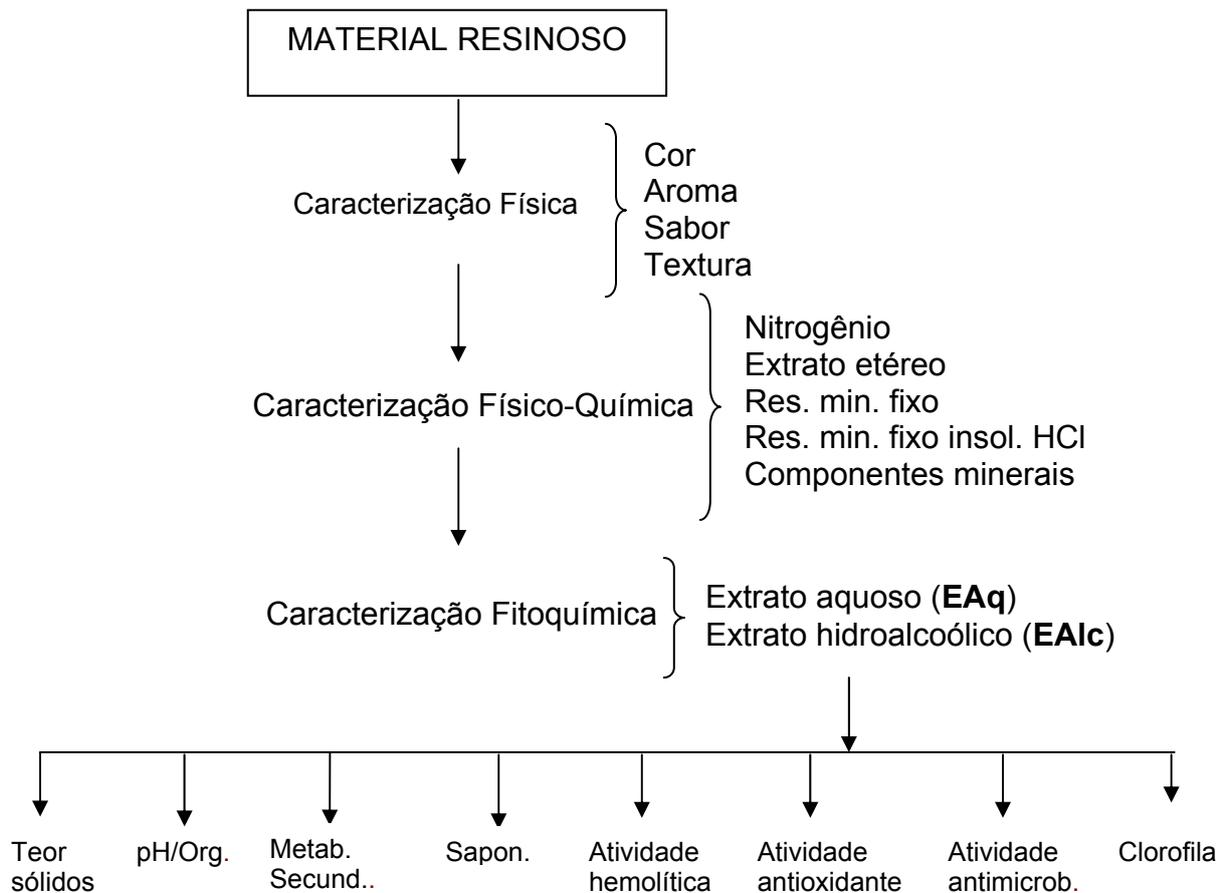
A Figura 16 ilustra as etapas do processamento da erva-mate na Indústria Mate Laranjeiras.



**FIGURA 16 - DIAGRAMA DO PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE NA INDÚSTRIA MATE LARANJEIRAS**

### 3.2 MÉTODOS

Os procedimentos metodológicos envolvendo o material resinoso referem-se ao estudo, realizado em triplicata, das características física, físico-química e fitoquímica na forma de extratos aquoso e hidroalcoólico, por meio de testes de determinação do pH, caracterização organoléptica, teor de sólidos, pesquisa de fitocompostos, cromatografia, atividades hemolítica, antioxidante e antimicrobiana e do conteúdo de clorofila, conforme apresentado na Figura 17, onde se pode visualizar a seqüência geral dos procedimentos relacionados ao material resinoso.



**FIGURA 17 - DIAGRAMA ANALÍTICO PARA O MATERIAL RESINOSO**

### 3.2.1 Caracterização física

A determinação das características físicas foi efetuada a partir das características organolépticas (sensoriais) do material resinoso, sendo avaliadas a cor, o aroma, o sabor e a textura.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná utilizando-se cerca de 5 kg de material resinoso proveniente do processamento da erva-mate, recebidos da Indústria Mate Laranjeiras três dias após a sua retirada do equipamento.

A caracterização da cor foi levada a efeito pela avaliação visual e o aroma e sabor foram determinados a partir da sensibilização olfativa e gustativa,

respectivamente utilizando uma porção do material, aleatoriamente retirada. Como critério para avaliação dos resultados, utilizou-se a comparação com as folhas de erva-mate recém colhidas. A textura foi avaliada por percepção tátil da amostra.

### 3.2.2 Caracterização físico-química

As características físico-químicas do material resinoso foram estudadas utilizando-se as análises para a determinação do resíduo mineral fixo e resíduo mineral fixo insolúvel em HCl 10 %, do nitrogênio e do extrato etéreo descritos em IAL (2005), sob nº 018/IV, 020/IV, 037/IV e 032/IV, respectivamente.

A determinação dos componentes minerais Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Zn, Mn, Al, Ca, K e Mg (STHANDARD..., 1998) foi desenvolvida no Laboratório de Análises Ambientais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), em espectrofotômetro de absorção atômica Varian mod. 250 Plus, com chama de  $C_2H_2$  e  $N_2O$ . O resíduo mineral fixo, anteriormente obtido e digerido com água régia, até dissolução total, foi conduzido ao equipamento utilizando as condições técnicas especificadas na Tabela 2 para a análise dos elementos minerais presentes no material resinoso da erva-mate.

**TABELA 2 - CONDIÇÕES TÉCNICAS PARA A ANÁLISE DE ELEMENTOS MINERAIS PRESENTES NO MATERIAL RESINOSO RESULTANTE DO PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE POR MEIO DO EQUIPAMENTO DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

Elemento	Comprimento de onda (nm)	Largura da fenda (nm)	Tipo de chama	Faixa de calibração (ppm)	Corrente da lâmpada (mA)	Supressor de ionização
Cd	228,8	0,5	$C_2H_2$	0,5 – 2,0	6	—
Cr	357,9	0,2	$C_2H_2$	0,5 – 2,0	7	—
Cu	324,7	0,5	$C_2H_2$	0,5 – 2,0	4	—
Fe	248,3	0,2	$C_2H_2$	1,0 – 1,0	5	—
Ni	232,0	0,2	$C_2H_2$	0,5 – 2,0	4	—
Zn	213,9	1,0	$C_2H_2$	0,5 – 2,0	5	—
Mn	279,5	0,5	$C_2H_2$	0,5 – 2,0	5	—
Al	309,3	10,5	$N_2O$	1-10	10	$KNO_3$
Ca	422,7	0,5	$N_2O$	1-10	10	SrCl
K	766,5	1,0	$C_2H_2$	1-10	5	SrCl
Mg	285,2	0,5	$N_2O$	1-10	4	$SrCl_2$

### 3.2.3 Caracterização de fitocompostos

As análises para a caracterização do material resinoso resultante do processamento da erva-mate também foram realizadas a partir da prospecção fitoquímica do extrato aquoso e do extrato hidroalcoólico visando a identificação dos grupos de metabólitos secundários presentes nesse subproduto. Foram feitas avaliações qualitativas para glicosídeos antociânicos, glicosídeos saponínicos e glicosídeos cianogenéticos, taninos, ácidos fixos, ácidos voláteis e aminogrupos no extrato aquoso. Os alcalóides, glicosídeos flavônicos, glicosídeos antraquinônicos, glicosídeos cumarínicos, saponinas, esteróides e/ou triterpenóides e aminogrupos foram pesquisados a partir do extrato hidroalcoólico.

A prospecção foi realizada segundo a marcha sistemática descrita por Mattos (1988) e Nakashima (1994), sendo que as frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) (STHAL, 1965; WAGNER *et al.*, 1984).

### 3.2.4 Extrato aquoso

O extrato aquoso foi preparado a partir de 20 g do material resinoso triturado e homogeneizado, no qual foram adicionados 100 mL de água destilada e o material foi conduzido à maceração, em banho-maria  $60 \pm 2$  °C durante duas horas, sendo em seguida realizada a filtração a vácuo para obtenção do extrato aquoso.

A partir desse extrato foram avaliados em triplicata os parâmetros de: pH, características organolépticas e teor de sólidos. A prospecção fitoquímica consistiu da pesquisa de glicosídeos antociânicos, glicosídes saponínicos, glicosídeo cianogenéticos, taninos hidrolisáveis e condensados, ácidos fixos, ácidos voláteis e aminogrupos, conforme descrita no item 3.2.3.

### 3.2.4.1 Determinação do pH e caracterização organoléptica

Na determinação do pH do extrato aquoso foram utilizadas fitas de papel indicador universal Merck, com escala de variação de 1 a 14.

A caracterização organoléptica (sensorial) do extrato aquoso foi realizada por meio da avaliação visual da cor; o aroma foi analisado por olfação e o sabor por gustação a partir de um volume do extrato aquoso.

As porções do extrato submetidas à avaliação foram retiradas aleatoriamente, depois de submeter as amostras à agitação e transferidas para recipiente coletor.

### 3.2.4.2 Determinação do teor de sólidos

A determinação do teor de sólidos do extrato aquoso foi realizada a partir de uma alíquota de 10 mL tomada com uma pipeta volumétrica, em cápsula de porcelana dessecada em estufa a 105 °C, até massa constante, conforme IAL (2005) sob nº 015/IV.

### 3.2.4.3 Pesquisa de metabólitos secundários

- glicosídeos antociânicos

Para a avaliação da presença de glicosídeos antociânicos foram separadas três porções do extrato aquoso, em tubos de ensaio, sendo que cada uma delas foi tratada de forma particular.

Porção 1: acidificada com ácido sulfúrico 0,5 mol.L<sup>-1</sup>;

Porção 2: alcalinizada com hidróxido de sódio 0,5 mol.L<sup>-1</sup>;

Porção 3: solução neutralizada até pH=7,0.

O teste é considerado positivo quando ocorre o desenvolvimento das colorações

Em meio ácido .....	tons avermelhados
Em meio alcalino .....	tons azulados
Em meio neutro .....	tons violáceos
Coloração verde .....	flavonóides

- glicosídeos saponínicos

Os três tubos anteriormente utilizados na pesquisa de glicosídeos antociânicos foram agitados energicamente, por 5 min, sendo medida a altura da espuma formada. Após manter o material em repouso por 30 min, foi realizada uma nova leitura do volume de espuma.

A prova é considerada positiva se ocorrer a manutenção da espuma, uma vez que os glicosídeos saponínicos são afrosigênicos.

- glicosídeos cianogenéticos

Uma alíquota do extrato aquoso foi transferida para tubo de ensaio (aproximadamente 5 mL), de modo a não umedecer as paredes. Foi adicionado 1 mL de solução de ácido sulfúrico  $0,5 \text{ mL.L}^{-1}$ , em seguida foi suspensa uma tira de papel micro-sódico, mantida na parte superior do tubo com o auxílio de uma rolha de cortiça, não permitindo que o papel tivesse contato com o extrato. Após, o tubo de ensaio foi levado ao banho-maria a  $60 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 30 min.

O teste é considerado positivo para glicosídeos cianogenéticos quando o papel micro-sódico adquire coloração avermelhada devido à formação de isopurpurato de sódio.

- taninos hidrolisáveis e condensados

A pesquisa de taninos foi realizada por meio da reação do extrato aquoso com sais de ferro, gelatina, formol-clorídrico e cloridrato de emetina.

**A) Reação com sais de ferro**

O extrato aquoso foi dividido em dois tubos de ensaio, sendo que ao tubo 1 foi adicionado de uma solução de  $\text{FeCl}_3$  a 1%. Ao tubo 2 foi acrescentada uma solução de  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  a 1% sobre o referido extrato.

Deve ser observado o desenvolvimento de coloração azul para taninos, verde para taninos condensados e flavonóides, cinza ou marrom para polifenóis ou o aparecimento de precipitado.

**B) Reação com gelatina**

Para a avaliação da presença de taninos utilizando como reativo a gelatina, foram separadas três porções, contendo 0,5, 1,0 e 1,5 mL do extrato aquoso em tubos

de ensaio adicionadas de solução de gelatina 2,5% em cloreto de sódio 0,9%, em quantidade suficiente para completar 2,0 mL.

O aparecimento de precipitado é indicativo da presença de taninos, sendo considerado mais intensa quanto menor o volume de extrato aquoso utilizado no teste.

#### C) Reação com formol-clorídrico

A pesquisa de taninos utilizando o reativo formol-clorídrico foi realizada a partir de 6 mL de formaldeído mais 4 mL de HCl concentrado, somados a 30 mL do extrato aquoso em balão de refluxo de 100 mL de capacidade, mantidos sob refluxo durante uma hora, resfriado e filtrado.

Ao resíduo (isento de formol-clorídrico depois da lavagem do papel de filtro com EtOH a 70% (v/v)) foi adicionado de gotas de solução aquosa de NaOH a 5%. O desenvolvimento de coloração é indicativa da presença de taninos condensados.

Ao filtrado foi adicionada solução de acetato de sódio em excesso (sem agitação) e gotas de solução aquosa de  $\text{FeCl}_3$  a 1%. O surgimento de coloração azul indica reação positiva para taninos hidrolisáveis.

#### D) Reação com cloridrato de emetina

Foi acrescentado a um volume de 1 mL do extrato aquoso, 4 mL de água destilada e 2 gotas da solução aquosa de cloridrato de emetina a 1%.

O desenvolvimento de precipitado indica reação positiva.

- ácidos fixos

Foram adicionados 2 mL de  $\text{NaOH}$   $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  a 20 mL do extrato aquoso, levou-se ao refluxo durante 30 min, resfriou-se e acidificou-se com ácido sulfúrico. Procedeu-se a extração com três porções de 10 mL de éter etílico, que foram reunidos e tratados com carvão ativo e os filtrados obtidos foram evaporados em banho-maria. O resíduo foi aquecido por 10 min em estufa a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , resfriado e adicionado de solução aquosa de  $\text{NH}_4\text{OH}$   $\text{mol.L}^{-1}$ . Filtrou-se e transferiu-se gotas do extrato amoniacal para papel de filtro de modo a obter uma mancha com 1 cm de diâmetro, que foi seca em estufa a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 min que em seguida foi tratada com reagente de Nessler.

O desenvolvimento de coloração marrom indica a presença de ácidos fixos.

- ácidos voláteis

Cinco mL do extrato aquoso foram transferidos para tubo de ensaio, aos quais foram acrescentados 1 mL de ácido sulfúrico mol.L<sup>-1</sup>, sem umedecer as paredes do tubo de ensaio em cuja porção superior suspendeu-se uma tira de papel pH; levou-se ao banho-maria 60 °C durante 15 min.

Após este período, a alteração de pH indica a presença de ácidos voláteis.

- aminogrupos

Dez mL do extrato aquoso foram concentrados à temperatura de 50 °C e depositados em cromatoplaca em pontos previamente determinados. Em seguida, acrescentou-se sobre a mancha anteriormente formada uma gota do reativo de Ninhidrina e aqueceu-se em estufa à temperatura de 120 °C durante 10 min.

O desenvolvimento de coloração azul-violácea no ponto contendo o extrato e o reativo de Ninhidrina indica presença de aminogrupos, com exceção de prolina e hidroxiprolina que desenvolvem cor amarela.

### 3.2.5 Extrato hidroalcoólico

Para a obtenção do extrato hidroalcoólico, foram pesados 40 g do material resinoso triturado e homogeneizado. Após, foi adicionado 200 mL de etanol 70% (v/v). O material foi submetido à maceração, durante 10 dias, na temperatura ambiente, com agitação eventual.

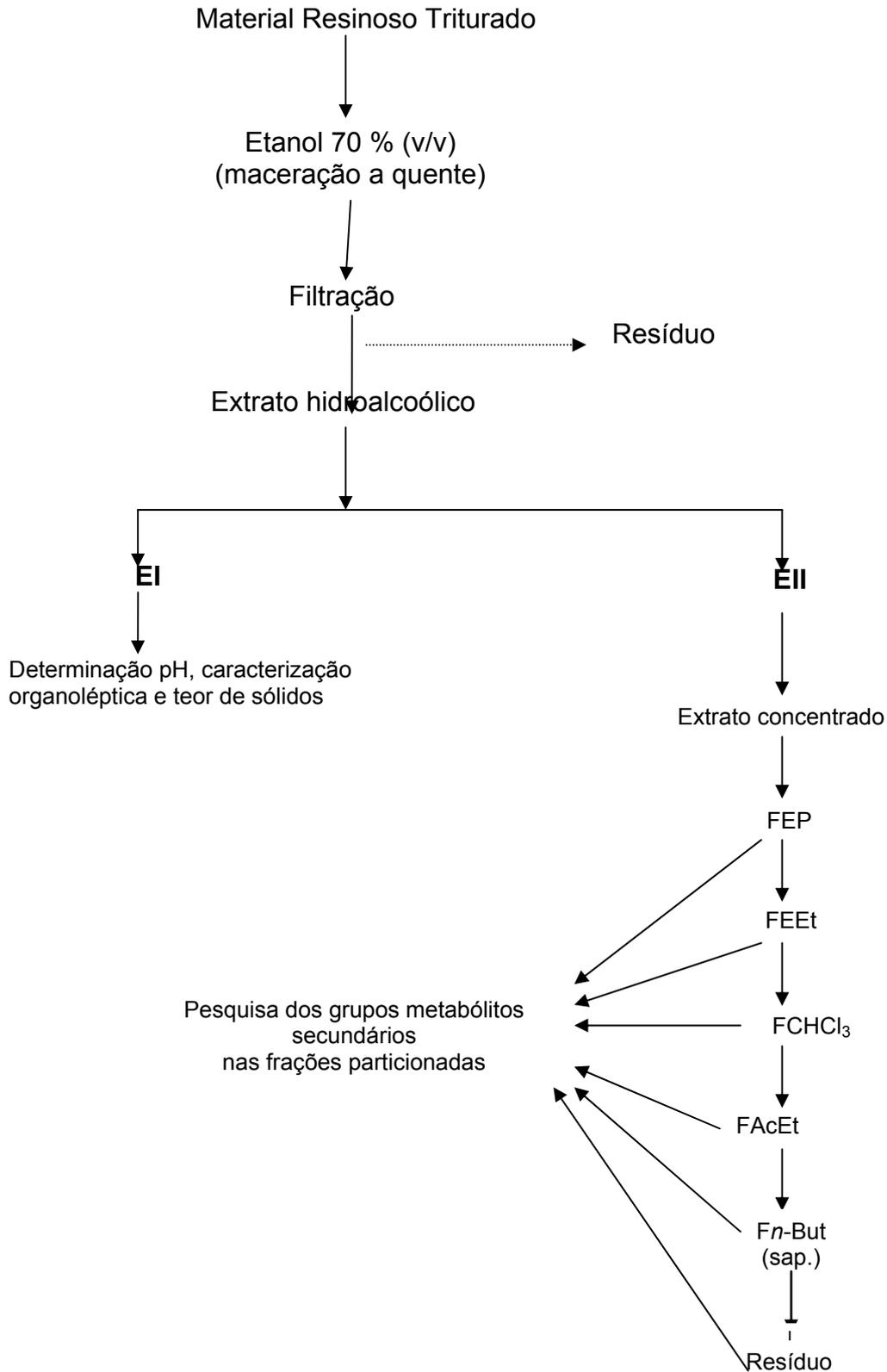
Decorrido esse período, o material foi conduzido à filtração e o filtrado teve o seu volume completado para 200 mL. Em seguida, foi dividido em duas partes: uma de 30 mL (Extrato I – EI) e a outra de 170 mL (Extrato II – EII).

O extrato EI foi utilizado para a determinação do pH e características organolépticas, conforme previamente descrito no item 3.2.4.1 e para a determinação do teor de sólidos, conforme descrito no item 3.2.4.2.

O extrato EII foi submetido à concentração até um terço do volume inicial em rotavapor. O concentrado obtido, cerca de 50 mL, foi transferido para funil de separação e submetido a extrações líquido-líquido consecutivas com solventes orgânicos, em ordem crescente de polaridade, iniciando-se com 5 porções de 40 mL

de éter de petróleo. O extrato EII foi transferido para uma cápsula de porcelana, levado à evaporação do excesso do solvente extrator. Uma vez isento de éter de petróleo formou-se a fração éter de petróleo (FEP), que foi transferida para o funil de separação e submetida à extração líquido-líquido (L/L) com éter etílico (FEEt), clorofórmio (FCHCl<sub>3</sub>), acetato de etila (FAcEt), *n*-butanol (*n*-But). O resíduo final foi ressuscitado em etanol 70% (NAKASHIMA, 1994; YUNES e CALIXTO, 2001), até completar o volume para 200 mL.

A Figura 18 resume a obtenção e fracionamento do extrato hidroalcoólico do material resinoso.



**FIGURA 18 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO, A PARTIR DO MATERIAL RESINOSO TRITURADO DE *I. paraguariensis***

### 3.2.5.1 Pesquisa de metabólitos secundários das frações

- Alcalóides e metilxantinas

Uma alíquota das frações FEP, FCHCl<sub>3</sub>, FAcEt e FEtOH foi evaporada à secura e os resíduos dissolvidos com etanol e adicionados de HCl solução aquosa 1%. Transferiu-se para 5 tubos de ensaio - um dos tubos foi utilizado como referência - e pesquisou-se alcalóides com os reativos gerais de Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Bertrand.

A formação de precipitados com os reativos gerais - precipitado branco ou leve turvação para os Reativos de Mayer e Bertrand; precipitado de coloração tijolo com Reativo de Dragendorff; precipitado de coloração alaranjado com o Reativo de Bouchardat, que desfazem pela adição de 2 mL de solução etanólica de ácido tartárico a 5%, indicando a positividade da reação para alcalóides.

- Glicosídeos flavônicos

Alíquotas de 2 mL das frações FEP, FCHCl<sub>3</sub>, FAcEt e FEtOH foram transferidas para tubos de ensaio e submetidas às reações de Shinoda (Redução/ ou Cianidina), com pastilhas de Zn e oxalo-bórica.

**A)** Para a reação de Shinoda, foram adicionadas em cada tubo de ensaio 200 mg de limalha de magnésio e 0,5 mL de HCl fumegante. O aparecimento de coloração róseo a vermelho indica reação positiva.

**B)** No ensaio com Zinco em ácido clorídrico, em um bequer (em banho de gelo) com 5 mL da fração, foram adicionadas uma pastilha do metal e 0,5 mL de HCl fumegante, cuidadosamente. A produção de coloração violeta indica presença de dihidroflavonóis. Flavanonas e flavanol não produzem coloração.

**C)** Alíquotas de 2 mL das frações foram transferidas para tubos de ensaios e evaporadas à secura. Acrescentou-se ao resíduo 0,5 mL de acetona e 30 mg da mistura ácido bórico-ácido oxálico. Agitou-se para evaporação à secura e ao resíduo adicionou-se 2 mL de éter etílico. A solução etérea foi examinada sob luz ultravioleta. O aparecimento de fluorescência indica reação positiva.

- Glicosídeos antraquinônicos

Para esta pesquisa, uma porção de 20 mL da fração FetOH foi transferida para um balão de 250 mL com 5 mL de ácido sulfúrico 10% e levou-se a refluxo durante 30 min. Filtrou-se a mistura ainda quente, através de papel de filtro. Adicionou-se água destilada e extraiu-se duas vezes com 5 mL de éter etílico. A camada etérea foi transferida para um tubo de ensaio e efetuou-se a reação de Bornträeger, adicionando-se 5 mL de solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  6 mol.L<sup>-1</sup> e agitando lentamente.

O desenvolvimento de coloração rósea indica a presença de antraquinonas (formação de fenolatos hidrossolúveis).

- Saponinas

Cinco mL das frações *F<sub>n</sub>*-BuOH e FEtOH foram evaporados à secura e os resíduos redissolvidos em 5 ml de água destilada, transferidos para os tubos de ensaio agitados energicamente, por 5 min, sendo medida altura da espuma formada. Após manter o material em repouso por 30 min, foi realizada uma nova leitura do volume de espuma.

A prova é considerada positiva se ocorrer a manutenção da espuma, uma vez que os glicosídeos saponínicos são afrosigênicos.

- Esteróides e/ou triterpenóides

As frações FEP, FCHCl<sub>3</sub>, FAcEt e FEtOH foram transferidas para cápsulas de porcelana, onde foram evaporadas até secura e os resíduos foram dissolvidos com 5 mL de clorofórmio. Os extratos clorofórmicos foram distribuídos em tubos de ensaios: 0,1, 0,5 e 1,0 mL e completados a 2 mL com clorofórmio. Efetuou-se a reação de Liebermann-Buchard (adição de 1 mL de anidrido acético + 3 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado).

O desenvolvimento de coloração na zona de contato dos dois líquidos, coloração azul ou verde na fase de contato dos dois líquidos e a coloração azul ou verde na fase acética, indicam reação para dexosi-açúcares (azul: esteróide e verde: triterpeno).

- Cumarinas

Vinte mL da fração F<sub>EtOH</sub> foram reduzidos a 5 mL em banho-maria e acidificou-se com HCl 0,5 mol.L<sup>-1</sup>. Extraiu-se com três porções de 5 mL de éter etílico, reduziu-se o volume do extrato etéreo e depositou-se gotas em papel de filtro, em áreas previamente demarcadas com grafite como 1, 2 e 3. Sobre as manchas 1 e 2 secaS, adicionou-se uma gota de hidróxido de sódio 10% recentemente preparada. A mancha 3 manteve-se como referência. A mancha 2 foi protegida com uma moeda metálica, foi levada à câmara UV (luz ultravioleta de comprimento de onda 365 nm), deixando-a exposta por 3 min. O desenvolvimento de fluorescência azul ou amarela esverdeada na mancha exposta à luz UV indica presença de cumarina.

O restante do extrato etéreo foi transferido para um tubo de ensaio, ao qual foram acrescentados 2 mL de solução NaOH 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, recentemente preparada. Agitou-se e foi levado à câmara e observado sob luz ultravioleta (365nm).

Repetiu-se o procedimento para uma alíquota das frações F<sub>EP</sub>, F<sub>EEt</sub>, F<sub>CHCl<sub>3</sub></sub> e F<sub>AcEt</sub>, concentradas e depositadas sobre o papel de filtro previamente demarcado (1, 2 e 3). O desenvolvimento de fluorescência azul ou amarela indica reação positiva.

- Aminogrupos

Dez mL das frações F<sub>n-BuOH</sub> e F<sub>EtOH</sub> foram concentrados à temperatura de 50 °C e depositados em cromatoplaça em pontos previamente determinados. Em seguida, acrescentou-se sobre a mancha uma gota do reativo de Ninhidrina e aqueceu-se em estufa à temperatura de 120 °C durante 5 min.

O desenvolvimento de coloração azul-violácea no ponto contendo o extrato e o reativo de Ninhidrina indica presença de aminogrupos, com exceção de prolina e hidroxiprolina que desenvolvem cor amarela.

Após a caracterização fitoquímica das frações, as mesmas foram cromatografadas, bem como procedeu-se a avaliação das atividades hemolítica, antimicrobiana e antioxidante, e determinação do conteúdo de clorofila.

### 3.3 EXTRAÇÃO DE SAPOGENINAS

Uma massa de 10 g do material resinoso triturado foi submetido à extração com 50 mL de etanol 70%, durante 30 min a 100 °C sob refluxo. O material foi levado à filtração. O filtrado, recebido em cápsula de porcelana, foi submetido à evaporação do solvente em banho-maria (B.M.) e o resíduo foi ressuspensionado em 50 mL de água. Essa suspensão aquosa foi particionada com 50 mL de diclorometano, em funil de separação, para a remoção de clorofila.

A fração aquosa foi levada ao B.M. para eliminação do líquido extrator e em seguida submetida à extração L/L com duas vezes de 25 mL de *n*-butanol. A fração aquosa foi descartada e a fração butanólica foi evaporada até *secura* em B.M. e adicionada de 50 mL de ácido sulfúrico em etanol 5%, manteve-se em refluxo durante 30 min, seguido de centrifugação. Separou-se o precipitado do sobrenadante em funil de separação.

O sobrenadante foi extraído com duas porções de 25 mL de *n*-butanol em funil de separação. A fração butanólica foi lavada por duas vezes com 25 mL de água destilada e levada ao B.M., e o resíduo foi ressuspensionado em 2 mL de *n*-BuOH e cromatografado em camada delgada com fase móvel e revelador para sapogeninas.

### 3.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A análise cromatográfica foi realizada nas frações obtidas a partir do extrato hidroalcoólico em CCD utilizando-se como fase fixa cromatoplaca de Sílica Gel G e GF<sub>254</sub>, as fases móveis (a, b e c) e os reveladores UV 254 nm, UV 365 nm, anisaldeído sulfúrico, vanilina sulfúrica, reativo de Dragendorff e reativo de NEU. A CLAE foi utilizada particularmente para metilxantinas.

### 3.4.1 Taninos e compostos polifenólicos

O perfil cromatográfico dos compostos polifenólicos e dos taninos foi determinado em cuba retangular (semi-saturada) utilizando-se como fases móveis acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10), acetato de etila:ácido fórmico:água (95:5:5) e *n*-butanol:ácido acético:água (5:1:4) – fase superior e inferior, em cromatoplaça de Sílica GF<sub>254</sub> – Merck como fase fixa, em percurso de 10 cm. O tempo de desenvolvimento variou entre 8 a 20 min, tendo como reveladores luz ultravioleta em 254 nm e 365 nm, Reagente de NEU (ácido etilborilaminoéster 1% em etanol e propilenoglicol 4000 5% em metanol), anisaldeído sulfúrico, vanilina sulfúrica e aquecimento em estufa 110 °C.

Foram utilizadas como substâncias de referência o ácido gálico, ácido elágico, ácido pirogálico, ácido tânico e ácido clorogênico 0,1 mg%.

### 3.4.2 Saponinas

Para a determinação cromatográfica das saponinas foram utilizadas como fases móveis butanol:ácido acético:água (5:1:4); acetato de etila:ácido fórmico:água (95:5:5) e clorofórmio:metanol (95:5), tendo como reveladores luz ultravioleta 254 e 365 nm; anisaldeído sulfúrico e vanilina sulfúrica.

Foi utilizada como substância referência Saponina branca pura Quillay SAP 5 (IndusFlorestal Quim. Ind. Y Florestal S.A.; Santiago de Chile).

Cromatoplaça de Sílica GF<sub>254</sub> – Merck foi utilizada como fase fixa em cuba retangular (semi-saturada), com tempo de desenvolvimento de 8 a 20 min, para um percurso de 10 cm.

Considera-se a possibilidade de existirem contaminantes de *I. paraguariensis* que podem ser identificados em estudos cromatográficos, uma vez que *I. dumosa* Reiss (contaminante da *I. paraguariensis*), apresenta seis saponinas do ácido oleanólico e a sétima do ácido ursólico (KOCHOL *et al.*, 2007).

### 3.4.3 Xantinas

#### 3.4.3.1 CCD

O perfil cromatográfico das xantinas na fração clorofórmica foi determinado utilizando-se fase fixa cromatoplaca de Sílica Gel G e GF<sub>254</sub> – Merck em cuba retangular (saturada com vapores de amônia), para um tempo de desenvolvimento variável entre 8 a 20 min, em percurso de 10 cm.

Como fases móveis foram utilizados o clorofórmio:metanol (95:5) e CHCl<sub>3</sub> – metanol 70% (9:1) e reveladores luz ultravioleta 254 e 365 nm; iodo iodeto de potássio e posterior nebulização com ácido sulfúrico 5% em etanol. As substâncias de referência utilizadas foram cafeína, teobromina e teofilina (padrões autênticos).

#### 3.4.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para as análises das xantinas por cromatografia líquida em alta eficiência foram preparadas amostras nas concentrações 1% das folhas (amostra referência) e do material resinoso. Uma alíquota foi evaporado à secura e o resíduo em metanol grau HPLC foi filtrado e injetado no cromatógrafo VARIAN ProStar, Auto Sampler model 410, com detector de arranjo de fotodiodos (PROSTAB 335), coluna de Microsorb – MV 100-5 C18, tamanho da coluna 250x4,6 mm, Absorbância  $\lambda = 273$  e tempo de corrida de 20 min. A fase móvel utilizada foi a mistura de metanol:acetonitrila (1:1) e como substância referência foram empregados cafeína, teobromina e teofilina, todos padrões autênticos MERCK, solução 1%.

### 3.5 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A avaliação da atividade hemolítica dos extratos do material resinoso foi realizada segundo a metodologia de difusão em ágar utilizando as técnicas de cilindros de aço inox e de antibiograma em discos.

Para a técnica do teste de difusão em ágar utilizando cilindros, foram aplicados 50 µL de cada uma das frações obtidas aos cilindros em meio de ágar sangue (Laborclin®).

No teste de difusão em ágar utilizando a técnica de antibiograma em discos, papéis Whatmann nº 1 (7 mm de diâmetro, esterilizado) foram distribuídos sobre as placas de ágar sangue e em seguida impregnados com alíquotas de 50 µL das frações anteriormente preparadas. Como controle foram utilizados 50 µL dos respectivos solventes puros, aplicados aos cilindros e aos discos.

Após a aplicação, os meios foram incubados a 30 °C durante 24 horas. Decorrido este período, as placas foram inspecionadas quanto à presença de halos de hemólise (medidos em mm).

A presença de saponinas pode gerar ação hemolítica (SIMÕES *et al.*, 2001).

Os experimentos para determinação da atividade hemolítica foram realizados no Laboratório de Microbiologia I, das Usinas Piloto da PUCPR.

### 3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os experimentos para a determinação da atividade antioxidante foram realizados no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

Para o preparo da amostra, foi pesada uma massa de 10,0015 g do material resinoso triturado e tamisado a 2,8 mm, submetido à extração com EtOH por maceração em B.M. 60 °C, durante 24 horas seguido de filtração em papel de filtro. O resíduo foi levado a novas extrações com EtOH 70% (v/v em água) e com água destilada. Os filtrados foram concentrados e submetidos à extração L/L com AcOEt, *n*-BuOH. Como substância referência foram empregadas folhas de erva-mate (10,0026 g) submetidas ao mesmo procedimento para a obtenção dos extratos do material resinoso, AcOEt, *n*-BuOH e aquoso.

### 3.6.1 Método do fosfomolibdênio

O método é baseado na redução de Mo (VI) a Mo (V) e na formação de um complexo verde fosfato/Mo (V) em pH ácido (PRIETTO, PINEDA e AGUILAR, 1999).

A uma fração de 0,3 mL da amostra em solução aquosa a 200 µg/mL acrescentou-se 3 mL do reativo fosfomolibdico (molibdato de amônio 4 mM, fosfato de sódio 28 mM, ácido sulfúrico 0,6 M). Os tubos foram fechados hermeticamente e levados ao banho-maria 95 °C por 90 min. Resfriou-se e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro UV marca Shimadzu modelo 1601, a 695 nm, zerando-se o aparelho com água. Como branco foram utilizados 0,3 mL água e 3 mL do reativo, e como padrões o ácido ascórbico (MERCK®) e rutina (MERCK®) 200 µg/mL. Para efeito de cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como 100% de atividade antioxidante.

A equação 1 apresenta a fórmula para o cálculo da atividade antioxidante, a partir dos resultados obtidos no método do fosfomolibdênio.

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = \frac{\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}}{\text{Abs. ácido ascórbico} - \text{Abs. branco}} \times 100 \quad (1)$$

### 3.6.2 Método do DPPH (2,2-difenil-1- picrato-hidrazila)

O método utiliza o radical estável DPPH• que sofre redução pelos antioxidantes com mudança de coloração violeta para amarela, proporcional à concentração da substância redutora da amostra (BLOIS, 1958, modificado por BRAND-WILLIAMS, CUVELLIER e BERSSET, 1995).

- Cinética de reação

Determinada visando verificar o tempo necessário para a máxima redução do DPPH. A uma fração de 3 mL da amostra a 50 µg/mL em etanol p.a. adicionou-se 0,1 mL de DPPH 1 mM, em temperatura ambiente e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro UV marca Shimadzu modelo 1601, em 517 nm, zerando-se o

aparelho com etanol. A amostra foi homogeneizada rapidamente e a leitura feita a cada 5 minutos até estabilização do resultado.

- Determinação do IC<sub>50</sub>

A determinação do IC<sub>50</sub> visa estabelecer a concentração da amostra ou do padrão que causa 50% da inibição da concentração inicial de DPPH.

**a)** Amostra - utilizando-se solução etanólica nas concentrações de 0,625 a 10 µg/mL. Adicionou-se 0,1 mL de DPPH 1 mM a 3 mL da solução. Após 30 minutos, efetuou-se a leitura em espectrofotômetro UV marca Shimadzu modelo 1601, em 517 nm, zerando-se o aparelho com etanol p.a. Como branco foi utilizada a própria amostra.

**b)** Substância de referência - ácido ascórbico (AA) e rutina MERCK® nas concentrações de 0,078 (5 µg/mL) e 0,625 (10 µg/mL), respectivamente.

- Atividade antioxidante nas amostras a 5 µg/mL

A uma fração de 0,1 mL da solução estoque da amostra a 150 µg/mL foi adicionado etanol p.a. em quantidade suficiente para completar 3 mL, homogeneizou-se e acrescentou-se 0,1 mL de DPPH 1 mM. Efetuou-se a leitura, após 30 min, em espectrofotômetro UV marca Shimadzu modelo 1601, em 517 nm, tendo como controle 0,1 mL de DPPH em 3 mL de etanol. O aparelho foi zerado com etanol p.a. e como branco foi utilizada a própria amostra (5 µg/mL).

Para os cálculos das porcentagens de atividade antioxidante das substâncias de referência e da amostra utilizou-se a equação 2 que apresenta a fórmula para o cálculo da atividade antioxidante, a partir dos resultados obtidos no método do DPPH.

Cálculo da atividade antioxidante a partir dos resultados obtidos no método do DPPH.

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = \frac{100 - (\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco})}{\text{Abs controle (DPPH + EtOH)}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos do material resinoso foi realizada segundo a metodologia de difusão em ágar utilizando as técnicas de cilindros de aço inox e de antibiograma em discos (ISENBERG, 1992).

Para os testes, foram utilizados como meio de cultura o Ágar Mueller-Hinton (DIFCO®), preparado a partir do meio desidratado de acordo com a recomendação do fabricante e placas de Agar Sabouraud (DIFCO®) prontos para o uso.

As cepas relacionadas foram reconstituídas de acordo com a indicação do fornecedor (NEWPROV®), sendo que as culturas microbianas foram padronizadas em  $10^8$  células, estimadas por comparação ao tubo 0,5 da Escala de MacFarland (0,05 mL de cloreto de bário dihidratado a 1,175% em 9,95 mL de ácido sulfúrico 1%). Como inóculos foram utilizados os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8.739, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12.228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9.027 e *Candida albicans* ATCC 10.231.

As suspensões bacterianas e de leveduras foram inoculadas em placas contendo Ágar Mueller-Hinton e Ágar Sabouraud (0,2 µL de inóculo para 20 mL de meio de cultura), respectivamente.

As amostras testadas consistiram de material resinoso na forma dos extratos hidroalcoólico e frações éter de petróleo, éter etílico, clorofórmio, acetato de etila, butanol e resíduo (etanol pós fracionamento) em concentrações de 1000 µg de cada fração (evaporada a 60°C) em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo em seguida depositadas em membrana de 0,22 µm (MILLEX®).

Na técnica de difusão em ágar utilizando cilindros, foram depositadas 100 µL de cada uma das amostras em cada cilindro e para o teste de difusão em ágar utilizando a técnica de antibiograma, alíquotas de 50 µL das frações anteriormente preparadas foram impregnadas em discos de papel Whatmann nº 1 (7 mm de diâmetro) e distribuídos sobre as placas contendo o meio de cultura.

Como controle foram utilizados 50 µL dos respectivos solventes puros, aplicados aos cilindros e aos discos. As placas foram incubadas a 35 °C ± 1 durante 24 horas para bactérias e 24°C ± 1 durante 5 dias para leveduras. Passado esse período, foram inspecionadas quanto à presença de halos de inibição (medidos em mm). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e tiveram como controle positivo o antibiótico

gentamicina 10 µg/disco (NEWPROV®) para bactérias e como controle negativo o solvente DMSO.

Para Simões *et al.* (2001), a presença de saponinas pode gerar ação hemolítica e ictiotóxica, complexar esteróides, exercendo ação antifúngica e hipocolesterolêmica, sendo importante o conhecimento de suas ações presentes na amostra estudada e a sua detecção no reino vegetal, que pode ser efetuada por meio da avaliação da atividade hemolítica.

Schenkel *et al.* (1997) afirmaram que a presença de saponinas nas folhas de *Ilex paraguariensis* constituem fato importante, considerando seu alto conteúdo, a influência no grau de amargor do mate e os possíveis significados fisiológicos, reiterados por Mosimann, Wilhem-Filho e Silva (2006), que atribuíram a esses metabólitos o efeito hipocolesterolêmico do extrato de erva-mate.

### 3.8 ANÁLISE DA CLOROFILA *a* E DA CLOROFILA *b*

Para a análise da clorofila, foi utilizado o método descrito por BARNES *et al.* (1992), a partir da adição de 5 mL de DMSO aos extratos do material resinoso (10 mg) triturado e dissolvido em acetato de etila, etanol, clorofórmio, éter etílico, éter de petróleo e água. Para a leitura da absorvância foi utilizado espectrofotômetro Micronal mod. B 582, nos comprimentos de onda 648 e 665 nm, e os valores obtidos foram introduzidos nas seguintes fórmulas, expressas nas equações 3 e 4:

$$C_a = 14,85 (A_{665}) - 5,14(A_{648}) \quad (3)$$

$$C_b = 25,48 (A_{648}) - 7,36 (A_{665}) \quad (4)$$

Onde:  $C_a$  = quantidade de clorofila *a* em µg/mL.;

$C_b$  = quantidade de clorofila *b* em µg/mL

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MATERIAL RESINOSO

#### 4.1.1 Caracterização física

A partir da caracterização física, o material resinoso revelou forma irregular, áspera, rugosa, com grande resistência ao processo de moagem (moinho de facas) e aspecto brilhante sob a incidência da luz natural (FIGURA 19). Coloração verde oliva acinzentada, aroma e sabor intenso de mate, amargo.



**FIGURA 19 – ASPECTO MACROSCÓPICO DO MATERIAL RESINOSO DE ERVA-MATE**

FONTE: NAKASHIMA (2005).

A Tabela 3 apresenta as características sensoriais e pH do material resinoso.

**TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL E pH DO MATERIAL RESINOSO RESULTANTE DO PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE**

Propriedade sensorial	Extrato aquoso	Extrato hidroalcoólico
Cor	Verde escuro	Castanho escuro
Odor	Aomático intenso de erva-mate	Aromático intenso de erva-mate
Sabor	Amargo característico	Característico
pH	7,0	5,0

#### 4.1.2 Caracterização físico-química

Na Tabela 4 são apresentados os resultados obtidos a partir da caracterização físico-química do material resinoso, que incluiu a determinação do resíduo mineral fixo (cinzas), resíduo mineral fixo insolúvel em HCl 10%, nitrogênio e extrato etéreo.

**TABELA 4 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MATERIAL RESINOSO PROVENIENTE DA ERVA-MATE**

Componentes	Material resinoso %
Resíduo mineral fixo (cinzas)	11,62 ±0,531
Resíduo mineral fixo insolúvel em HCl 10%	2,23 ± 0,032
Nitrogênio	1,26 ±0,022
Extrato etéreo	7,36 ±0,073

Segundo a literatura, o resíduo mineral fixo consiste do material obtido após a incineração (queima) do material à temperatura de 550 °C e estabelece a qualidade de substância residual no processo de incineração. O resíduo mineral fixo insolúvel em HCl 10% está relacionado ao teor de sílica na amostra, como areia, terra e argila, constituintes que dependem do grau de contaminação do produto por componentes minerais provenientes do próprio solo (DA CROCE, 2002).

No material resinoso analisado, o valor de resíduo mineral fixo obtido foi de 11,62%, aproximado ao valor médio de 9,15% encontrado por Lopez Velazquez *et al.* (2006) para os pós dos secadores e moinhos ervateiros estudados e que diferem dos resultados obtidos para os pós das folhas canheadas (PFC) e ramos desidratados e moídos (RDM), respectivamente 3,03% e 7,3%, descritos por Contreras (2007).

Os resultados apresentados para os resíduos analisados diferenciam-se do valor médio de 6% determinados para as folhas de erva-mate comerciais por Gutkoski *et al.* (2001) ou os resultados descritos para as folhas por Da Croce (2002); Esmelindro *et al.* (2002) na análise das folhas em diferentes etapas de processamento; Bordenave *et al.* (2005) e por Reffatti, Lorenzetti e Rodrigues (2006).

Os valores obtidos no presente trabalho são, portanto, concordantes com Lopez Velazquez (2006) na afirmação de que o aumento observado na análise das cinzas indica que nos subprodutos, provavelmente, existem componentes diferentes ao produto. Para os autores, os maiores valores obtidos correspondem a pós muito finos, com restos de contaminantes.

Com relação ao resíduo mineral fixo insolúvel em HCl 10%, o valor encontrado para o material resinoso foi de 2,23%, superior ao resultado de 0,43% para as folhas obtido por Gutkoski *et al.* (2001) e de 0,12% a 0,91% registrados por Da Croce (2002), o que pode ser atribuído à presença de sílica no material analisado e que lhe fornece rigidez.

O nitrogênio é o macronutriente aniônico mais abundante nas plantas, o mais exigido pela maioria das culturas e faz parte da molécula de clorofila (LOURENÇO *et al.*, 1997). Na pesquisa com o resíduo, foi obtido na determinação desse nutriente o valor de 1,26%, resultado inferior ao verificado para as folhas por Borille, Reissmann e Freitas (2005), que relataram valores entre 2,71% e 3,15%, assim como para Pandolfo *et al.* (2003), em experimentos que avaliaram a resposta da erva-mate à adubação mineral e orgânica em latossolo aluminoférrico, que obtiveram 2,4% para as folhas originadas de cultivo sem adubo nitrogenado e 2,9% para as folhas cultivadas com adubo nitrogenado.

Na determinação do extrato etéreo do material resinoso, foram encontrados valores de 7,36%, atribuído à extração das substâncias solúveis no solvente oriundas de folhas, caules e gravetos presentes no material resinoso. Esse valor é superior aos valores médios registrados por Esmelindro *et al.* (2002) para folhas secas e cancheadas nos secadores rotativo e esteira estudados, assim como para os restos de ramos e pós originados em secadores e moinhos ervateiros (gravetos, folhas e pós) descritos por Lopez Velazquez *et al.* (2006) correspondente a 3,18% e de Contreras (2007) que obteve para os estudos com o pó das folhas cancheadas (PFC) 3,38% e para os ramos desidratados e moídos (que ficam nas peneiras de cancheamento) RDM obteve 0,38%.

Vale ressaltar que o material resinoso é um produto da concentração de componentes, diferindo das folhas, gravetos, ramos e pós que foram analisados pelos outros autores que foram separados de sua matriz.

Os resultados descritos, por outros autores pesquisados, podem ser considerados como produtos de processo de separação, enquanto o material resinoso é originado na aglomeração de materiais, o que permite sugerir que provavelmente

ocorreu ganho decorrente da presença de algum componente originário de ramos folhas, e eventualmente frutos e sementes de erva-mate que estão concentrados no material resinoso e que podem apresentar componentes extraíveis pelo solvente orgânico utilizado na determinação.

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos na determinação dos elementos minerais do material resinoso.

**TABELA 5 - COMPONENTES MINERAIS DO MATERIAL RESINOSO PROVENIENTE DA ERVA-MATE**

Elementos minerais	Valores (ppm) / desvio padrão
Cd	0,03 ± 0,00
Cr	< 0,06 ± 0,00
Cu	0,48 ± 0,03
Fe	39,4 ± 0,01
Ni	< 0,10 ± 0,00
Pb	0,58 ± 0,00
Zn	0,69 ± 0,14
Mn	16,56 ± 0,04
Al	45,00 ± 0,00
Ca	172,00 ± 0,52
K	164,00 ± 0,58
Mg	68,00 ± 2,07

Maiocchi *et al.* (1989) relataram para o Cu, Zn, Fe, Mn, Ca, Mg e K em folhas de erva-mate resultados superiores somente para o elemento Mg, em relação aos descritos para material resinoso. Na análise da erva-mate tipo chimarrão, Henrichs e Malavolta (2001) referem-se a valores inferiores aos determinados nesse estudo, exceto para o Cd e Pb, empregando a digestão nitroperclórica e leitura em aparelho de emissão atômica com plasma de argônio, e ainda para o Mg, K, Ca concentrações de 4,9; 6,3 e 13 g/kg e para o Al, Mn, Zn, Ni, Fe, Cu, Cr e Cd concentrações de 40,3; 880; 40; 1,9; 185; 8,9; 1,5 e 0,01 mg/kg, respectivamente. Sanz e Isasa (1991) verificaram o destaque nas concentrações de Mg e Mn na matéria seca e na infusão, apresentando também elevadas concentrações de K, intermediária de S, Ca e P, baixa de Al e traços de Cd.

Analisando-se os resultados obtidos para a determinação dos componentes minerais, as diferenças encontradas podem ser atribuídas às características das amostras e do processamento ao qual foram submetidas. O material resinoso estudado forma-se sob ação das facas e mantém-se acumulado na chipiadeira, em contacto com elas por algum tempo, quando pode agregar os elementos de sua composição e elevar os níveis dos metais no material.

#### 4.1.3 Pesquisa de fitocompostos

Obteve-se na pesquisa do extrato aquoso resposta positiva para glicosídeos antociânicos, taninos, glicosídeos saponínicos e aminogrupos e para o extrato hidroalcoólico, os resultados foram positivos para alcalóides (exceto em relação ao reativo de Mayer), glicosídeos flavônicos, glicosídeos sapononínicos e para a presença de aminogrupos.

A indicação da presença de heterosídeos cianogenéticos foi negativa para o extrato aquoso da material resinoso; esta reação ocorre com o surgimento de coloração avermelhada no papel picro-sódico pela a formação de isopurpurato de sódio. A presença do grupo cianogenético não é comum na erva-mate.

A indicação da presença de taninos foi confirmada pela positividade nas reações com  $\text{FeCl}_3$  1% para os hidrolisáveis (cor com tonalidade azulada) e com o hidróxido de potássio 5 % (tonalidade verde) para os taninos condensados.

Os resultados obtidos na caracterização fitoquímica do extrato aquoso e do extrato hidroalcoólico do material resinoso são apresentados na Tabela 6.

**TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO E HIDROALCOÓLICO DO MATERIAL RESINOSO PROVENIENTE DA ERVA-MATE**

<b>Substâncias / Reação</b>	<b>Ext. aquoso</b>	<b>Ext. hidroalcoólico/Frações</b>
<b>GLICOSÍDEOS ANTOCIÂNICOS</b>		
pH 3	+	
	n.p.	
pH 7	+	
	n.p.	
pH 10	+	
	n.p.	
<b>GLICOSÍDEOS CIANOGENÉTICOS</b>		
Reação de picrato de sódio	–	n.p.
<b>TANINOS</b>		
NH <sub>4</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 1%	–	n.p.
Reação com solução de gelatina 2,5% em cloreto de sódio 0,9%	–	n.p.
Reação de formol-clorídrico		
• taninos hidrolisáveis	+	n.p.
• taninos condensados	+	n.p.
<b>ÁCIDOS FIXOS</b>		
Reativo de Nessler	–	n.p.
<b>ÁCIDOS VOLÁTEIS</b>		
Reação c/ ácido sulfúrico + papel pH	–	n.p.
<b>AMINOGRUPOS</b>		
Reação ninhidrina	+	++
<b>GLICOSÍDEOS SAPONÍNICOS</b>		
Espuma persistente	++	++
<b>ALCALÓIDES/METILXANTINAS</b>		
Reativo de Bertrand	n.p.	+
Reativo de Bouchardat	n.p.	+
Reativo de Dragendorff	n.p.	+
Reativo de Mayer	n.p.	–
<b>GLICOSÍDEOS FLAVÔNICOS</b>		
Reação de Shinoda	n.p.	+++
Pastilha de zinco	n.p.	+++
Reação oxalo-bórica	n.p.	+++
<b>GLICOSÍDEOS ANTRAQUINÔNICOS</b>		
Reação de Borntraeger	n.p.	–
<b>CUMARINAS</b>		
Fluorescência sob luz UV	n.p.	–
<b>ESTERÓIDE / TRITERPENÓIDE</b>		
Reação de Liebermann Bouchardt	n.p.	–

Obs: (–) = ausência de reação; (+) = intensidade de reação; +++ = máximo; ++ = médio; + = mínimo; n.p. = não pesquisado.

O reativo de Nessler identifica a amônia associada em forma de sal amoniacal, indicando a presença de ácidos fixos no extrato aquoso; ácidos que não fixam a amônia e dão reação negativa com o reativo: ácido fórmico, ácido propiônico e aminoacético. Para o extrato analisado foi negativo.

Na pesquisa de saponinas, verificou-se a presença de espuma persistente, mesmo após decorridos 30 minutos de repouso, com altura superior a 1 cm, indicando presença de glicosídeos saponínicos; as saponinas possuem propriedades emulsivas; suas soluções aquosas são coloidais e a formação de espuma decorre da tensão superficial elevada das soluções.

Para a pesquisa de aminogrupos, a indicação da presença deste metabólito é decorrente do desenvolvimento de coloração azulada/violácea/roxa ou amarela (prolina e hidroxiproлина) com o reativo de Ninhidrina, confirmada pela coloração violácea em placas de sílica gel, tanto para o extrato aquoso como para o hidroalcoólico.

Para alcalóides, a pesquisa realizada com os reativos gerais (Bertrand, Bouchardat, Dragendorff) resultou positiva com a formação de precipitados (branco, tijolo, alaranjado, respectivamente) que foram solubilizados pela adição de solução etanólica de ácido tartárico a 5%.

Os glicosídeos flavônicos foram caracterizados pela reação de Shinoda com o aparecimento de coloração rósea que indicou reação positiva e a reação oxalo-bórica evidencia fluorescência amarelo esverdeado, quando observado sob a luz ultravioleta 365 nm, indicativos da presença de rutina, quercetina e canferol (nos grupos dos flavonóides).

Valduga *et al.* (1997), em análise de folhas de erva-mate, obtiveram como neste estudo resultados positivos para alcalóides, flavonóides, saponinas, taninos, ácidos voláteis e aminogrupos, mas a presença de glicosídeos antociânicos, esteróides e/ou triterpenóides encontrados pelos autores não foi confirmada. Este fato pode ser atribuído às diferenças próprias das amostras analisadas e a fatores relacionados à época de plantio e colheita, ou devido à composição do solo.

#### 4.1.4 Teor de sólidos

A análise para determinação do teor de sólidos representa a quantidade de substâncias capazes de solubilização pelo aquecimento da água, sendo que outras substâncias podem ser responsáveis pela obtenção de valores mais elevados.

Para o material resinoso, a análise deste parâmetro, no extrato aquoso, resultou no valor de 43,89%. Este resultado é superior ao descrito por Valduga *et al.* (1997) para as folhas de erva-mate de amostras de União da Vitória e Paulo Freitas, no Paraná, que foram de 29,43% e 33,90%, respectivamente. Da Croce (2002) registrou a variação de 36,1% a 46,7% para as folhas analisadas do estado de Santa Catarina, verificando ainda que estes resultados apresentam tendência a aumentar à medida que a folha vai envelhecendo.

Pokolenko e Schmalko (2005) estudaram a variação do extrato aquoso proveniente da mesma plantação e processamento de erva-mate em diferentes épocas do ano e verificaram variações oscilando entre 32,51% a 40,27%, nas diferentes épocas de colheita, no entanto não foi observada alteração na velocidade da extração dos solúveis.

Gutkoski *et al.* (2001) encontraram resultados com variação de 29,26% a 31,08% de sólidos, em diferentes marcas de erva-mate analisadas.

Schmalko *et al.* (2000) registraram para a infusão de mate quente 27,09% e para o mate frio 15,60%, diferenciados provavelmente devido à forma preparo/consumo e Escalada, Schmalko e Kanzig (1998) obtiveram para o extrato aquoso das folhas de erva-mate 42,05 % e para os gravetos 21,11%.

Assim, o resultado obtido de 43,89% para a determinação dos sólidos do material resinoso se assemelha ao obtido para ramos e pós de moinhos ervateiros de Lopez Velazquez *et al.* (2006), que variou entre 30,82% e 44,1%, assim como o descrito para as folhas por Escalada, Schmalko e Kanzig (1998), mas difere do valor encontrado para os gravetos pelos mesmos autores e ainda por Gutkoski *et al.* (2001).

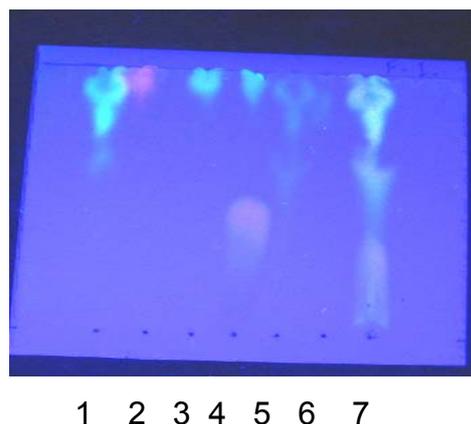
Na análise para determinação do teor de sólidos do extrato hidroalcoólico, o resultado obtido foi 33,84%.

## 4.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS E DAS FRAÇÕES

### 4.2.1 Determinação de taninos e compostos polifenólicos

O melhor resultado de separação cromatográfica dos extratos do material resinoso para a determinação dos compostos polifenólicos foi obtido através da mistura de solventes butanol:ácido acético:água (5:1:4), utilizando como fase fixa cromatoplas de Sílica GF<sub>254</sub> – Merck. Os reveladores utilizados foram exposição da cromatoplasa à luz UV e posterior nebulização com cloreto férrico 5% em etanol, desenvolvendo colorações esverdeadas, marrom e castanho para os taninos, tendo sido utilizados como substâncias de referência os flavonóides rutina, quercetina e canferol. Andrade (2003) obteve o melhor cromatograma para os compostos fenólicos das folhas de erva-mate cultivadas em diferentes condições de luminosidade, utilizando como fase móvel acetato de etila:ácido fórmico:água, diferente dos solventes empregados para o material resinoso em estudo.

A Figura 20 apresenta o cromatograma em CCD de compostos polifenólicos onde podem ser observados os pontos 1: extrato bruto dissolvido EtOH; 2: padrão quercetina; 3: extrato etanólico; 4: padrão rutina; 5: extrato butanólico; 6: padrão canferol; 7: extrato acetato de etila.



**FIGURA 20 - PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CCD PARA COMPOSTOS POLIFENÓLICOS**

Analisando-se a Figura 20, verifica-se a indicação da presença de compostos polifenólicos quercetina e canferol nos extratos etanólico bruto (1), etanólico - EtOH (3),

butanólico *n* - ButOH (5) e acetato de etila AcoEt (7) analisados, devido à semelhança nas indicações de Rf obtidos.

Os resultados obtidos por Cardozo Júnior *et al.* (2007) para a análise cromatográfica ds folhas de erva-mate demonstraram como melhor fase móvel para as folhas analisadas a mistura clorofórmio:ácido acético:água, revelador anisaldeído sulfúrico, tendo nas frações aquosa e butanólica as maiores concentrações de compostos.

Para Heck e Mejia (2007), em média, a quantidade de polifenóis extraíveis do mate apresentam uma forte correlação com a capacidade antioxidante, no entanto verificaram que a quantidade de compostos extraídos é afetada pelo método de extração e o solvente água ou solvente orgânico, sendo equivalente a 92 mg/g de folha secas em ácido clorogênico.

Em relação à presença de flavonóides, obteve-se indicação da presença desse metabólito no material resinoso na forma da rutina, confirmando os estudos de Bastos e Torres (2003), Matsubara e Rodriguez-Amaya (2006) e Ribani e Rodriguez-Amaya (2006) ,em estudos realizados para bebidas à base de erva-mate.

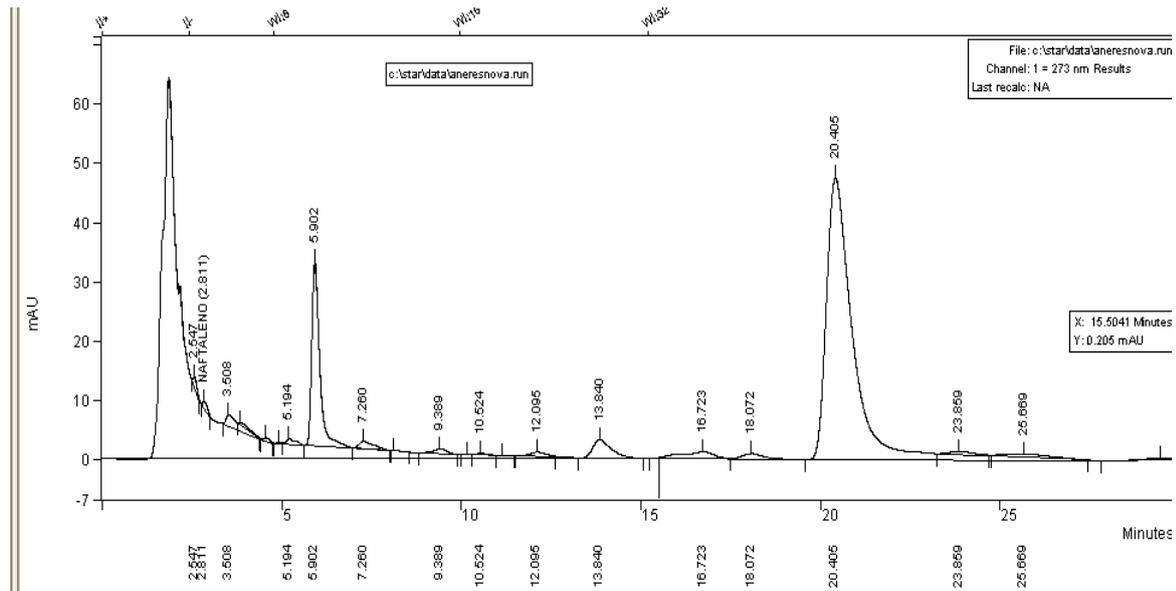
#### 4.2.2 Determinação de xantinas

Na determinação de xantinas por CCD, dentre as fases móveis testadas, os melhores resultados foram obtidos com a fase móvel clorofórmio:metanol (95:5), em cuba saturada com vapores de amônia. Para a revelação utilizando-se mistura de iodo-iodeto de potássio em cromatoplaça Sílica Gel G, observou-se a coloração castanha desenvolvida para as amostras das frações clorofórmio e etanol bruto, ambas fortemente positivas, e para as substâncias de referência cafeína, teobromina e teofilina, com Rf semelhantes, resultados que coincidiram com os obtidos por Andrade (2003).

Reginatto *et al.* (1999), utilizando o extrato clorofórmico das folhas de erva-mate em CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>:EOH (90:5) como eluente, obtiveram resultados positivos para a confirmação da cafeína e teobromina por comparação de Rf, no entanto o estudo com o extrato aquoso não é citado.

Na determinação das xantinas do material resinoso por CLAE (FIGURA 21), observou-se picos com tempos de retenção indicativos de cafeína e teobromina com

concentrações de 0,72,03  $\mu\text{g/mL}$  e 108,79  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente e não foi confirmada a teofilina. Os resultados confirmam as informações de Borille, Reissmann e Freitas (2005) com relação à presença das xantinas em folhas de erva-mate, mas as quantidades obtidas são inferiores aos identificados por outros autores, confirmando-se que os teores de cafeína na erva-mate podem apresentar decaimento em relação à folha (ESMELINDRO *et al.*, 2002).



**FIGURA 21 - PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CLAE PARA MATERIAL RESINOSO PROVENIENTE DO PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE**

Borille, Reissmann e Freitas (2005) registraram concentrações de 1,67% a 2,22% para, as xantinas. Esses componentes encontradas no mate por Heck e Mejia (2007) incluem a teofilina, teobromina e cafeína, sendo esta encontrada em maior concentração (1% a 2% do peso seco), seguida da teobromina (0,3% a 0,9%) e a teofilina em pequenas quantidades. Schubert *et al.* (2006) obtiveram teores de metilxantinas totais (cafeína + teobromina), expressos em cafeína, para amostras de Ijuí e Santa Maria (estado do Rio Grande do Sul) teores variáveis de 0,02% a 0,11% e Pokolenko e Schmalko (2005) encontraram conteúdo variável entre 0,95% e 1,24%. Gnoatto *et al.* (2007), avaliando a influência do método de extração nos teores de metilxantinas, encontraram concentrações variáveis de 0,22% a 0,79%, concluindo que a eficiência da extração depende da solubilidade no solvente utilizado, justificando os teores relativamente baixos obtidos por alguns autores para a teobromina.

#### 4.2.3 Determinação de saponinas (fração butanólica)

Na determinação de saponinas por CCD, dentre as fases móveis testadas, a que apresentou melhores resultados foi butanol:ácido acético:água (5:1:4) (fase superior) e revelador OC + anisaldeído:ácido sulfúrico em cromatoplaça de Sílica GF<sub>254</sub> – Merck., tendo como substância de referência: saponina branca pura Quilay SAP 5 (IndusFlorestal (Quim. Ind. Y Florestal S.A, Santiago de Chile). Os resultados diferem dos obtidos por Schenkel, Montanha e Gosmann (1996) que utilizaram como eluentes diclorometano:etanol:água (80:40:5), no entanto o resultado para a pesquisa foi positiva, frente à intensidade da reação que confirmou a formação de espuma persistente (NAKASHIMA, 1994).

#### 4.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

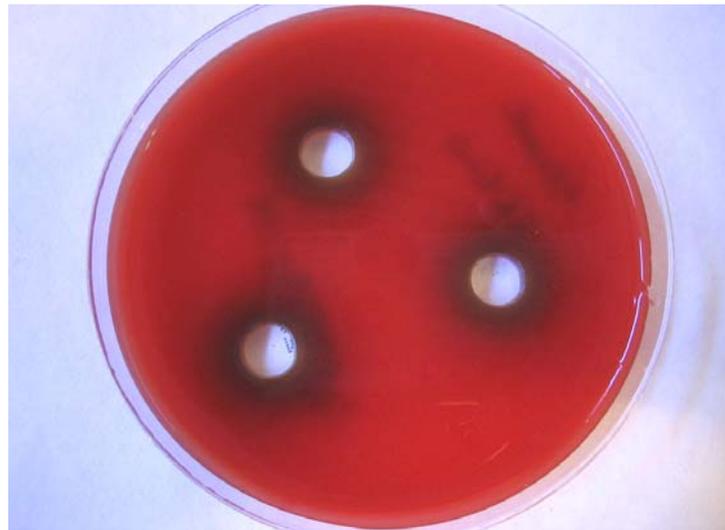
Os resultados da avaliação da atividade hemolítica dos extratos (EI) do material resinoso, aplicada com o objetivo de verificar a eventual hemólise produzida pelas frações da matéria resinosa, em meio de ágar sangue, confirmaram o resultado negativo na reação de Lieberman Bouchardt, indicando a ausência de saponina esteroidal (TABELA 7), mas diferentes dos resultados encontrados por Ferreira *et al.* (1997) que encontraram atividade hemolítica para extratos de saponinas e folhas de erva-mate testados.

Na avaliação da atividade hemolítica de extratos do material resinoso, observa-se que para o teste de difusão em discos não se formaram halos de hemólise para os padrões dos solventes utilizados e com relação às frações, os halos observados são provavelmente decorrentes da difusão do solvente no meio, não representando atividade hemolítica. Para o teste de difusão em cilindros não foram observados halos para as frações dos solventes butanol e éter de petróleo. Para o éter etílico (FIGURA 22), observou-se escurecimento (necrose) ao redor do orifício de aplicação do solvente, não caracterizado como halo de hemólise. Para os solventes etanol, acetato de etila e clorofórmio, observou-se difusão do solvente no ágar sangue em diferentes dimensões.

**TABELA 7 - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DAS FRAÇÕES DO MATERIAL RESINOSO PROVENIENTE DA ERVA-MATE**

Extrato	Padrões discos (cm)	Difusão em disco (mm)	Padrões cilindros (mm)	Difusão em cilindros (mm)
Butanol	-----	0,1	----	0,2
Etanol	-----	necrose	0,1	-----
Éter etílico	-----	----	necrose	-----
Éter de petróleo	-----	----	-----	-----
Acetato de etila	-----	0,1	0,1	0,1
Clorofórmio	-----	----	0,1	0,2

----- = ausência de halo.



**FIGURA 22 - HALOS DE NECROSE FORMADOS PELO SOLVENTE ÉTER ETÍLICO**

As frações etanólica, éter etílico, éter de petróleo e clorofórmica não se alteraram para o teste em discos. Para os dois tipos de testes, a fração acetato de etila apresentou um halo de 0,1 cm e a fração clorofórmica apresentou um halo de difusão 0,1 cm maior que o padrão.

Para Simões *et al.* (2001), a presença de saponinas pode gerar ação hemolítica e ictiotóxica, complexar esteróides, exercendo ação antifúngica e

hipocolesterolêmica, sendo importante o conhecimento de suas ações presentes na amostra estudada e a sua detecção no reino vegetal, que pode ser efetuada por meio da avaliação da atividade hemolítica.

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O complexo fosfomolibdênio em meio aquoso possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que é reduzido por substâncias antioxidantes. A coloração verde é tão mais intensa quando maior for a atividade antioxidante da amostra.

Na determinação da atividade antioxidante pelo método do fosfomolibdênio efetuado com as folhas (referência) e o material resinoso na concentração de 200 µg/mL, respectivamente, foram avaliadas as frações acetato de etila, butanólica e a aquosa, tendo como substâncias de referência o ácido ascórbico com 100% de atividade antioxidante e a quercetina com 28,44%. Os dados obtidos foram analisados através do teste “t” (Student) a partir do qual verificou-se atividade antioxidante nas folhas e no material resinoso de 29,0% e 68,28%, respectivamente, e em comparação com a quercetina mostraram-se superiores. Com relação ao ácido ascórbico, os dados obtidos nas folhas e no material resinoso foram superiores a 100%. Com relação às frações AcOEt e BuOH do material resinoso, esta última apresentou melhor resultado estatístico (0,5896). Confirma-se que a fração butanólica apresenta valores superiores aos da fração acetato de etila, no intervalo de uma hora, provavelmente devido a presença de metabólitos mais polares.

Em relação à avaliação da atividade antioxidante das frações acetato de etila, butanólica e a aquosa do material resinoso pelo método do DPPH, analisada estatisticamente pelo teste “t” (Student), pode-se afirmar que a atividade observada no extrato aquoso do material resinoso (0,5602) é superior aos valores obtidos nas frações acetato de etila e butanólica (0,2434) do material resinoso, em nível de 99% de probabilidade.

Na análise dos resultados obtidos no estudo realizado, concorda-se com a afirmação de Bastos e Torres (2003): a atividade antioxidante de infusão à base de erva-mate observada nos diferentes trabalhos mostra-se importante, independente da metodologia analítica empregada ou da origem da erva-mate. Conhecer a composição

quantitativa e qualitativa dos compostos bioativos presentes em bebidas à base de erva-mate e a educação para o seu consumo pode trazer benefícios à população.

#### 4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na prova de sensibilidade por difusão em ágar utilizando cilindros estéreis e discos não houve formação de halo de inibição nas amostras testadas e nos controle e negativo (DMSO) utilizado. O DMSO é substância permeabilizante de membranas celulares empregado há varias décadas em medicina humana e veterinária (JACOB, 1982), e permite potencializar drogas antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias (POOTZ<sup>8</sup> *et al.*, 1967; BRAYTON<sup>9</sup>, 1986, citados por RIBEIRO, CARVALHO FILHO e LISTONI, 2001).

Para Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005), a erva-mate está entre as diversas árvores nativas conhecidas pela etnofarmacologia por ter propriedades antimicrobianas que deve-se a um grupo de compostos que incluem terpenóides, alcalóides, substâncias fenólicas e polifenóis, flavonas, taninos e cumarinas, alguns dos quais fazem parte da composição química da erva-mate que também preenche critérios de preservação ambiental e manejo auto-sustentável. No estudo realizado, os autores verificaram que o extrato hidroalcoólico da erva-mate inibiu os microrganismos *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp coagulase (+) e salientaram que estas atividades não estão descritas nas referências consultadas.

Asolini *et al.* (2006) não encontraram formação de halo de inibição para o extrato aquoso de chá de erva-mate, mas obtiveram para o extrato etanólico halos de inibição com medidas de 1,0 mm para *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* e de 0,5 mm para *Staphylococcus aureus*. Observaram que o etanol utilizado nas extrações não teve nenhuma ação inibitória, no entanto verificaram que a atividade antibacteriana foi sensivelmente melhorada.

Mello, Câmara e Santos (2006) encontraram no estudo da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da erva-mate efeito antimicrobiano em seis bactérias gram positivas, incluindo o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, que também

---

<sup>8</sup> POOTZ, G.; RAMPEY, J. H.; BENJAMIN, F. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) in antibiotic sensitivity of a group of medically important microorganisms. A preliminary report. **Annales of New York Academic Press**, v.141, p. 261-272, 1967.

<sup>9</sup> BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Vet.**, v. 76, p. 61-90, 1986.

foi avaliado no estudo com o extrato hidroalcoólico do material resinoso. Para os autores, a atividade antimicrobiana pode ser atribuída a composição química da planta, confirmando os estudos de Andrade (2003), e permitindo sugerir que este extrato constitui-se uma perspectiva para obtenção de antibiótico natural.

Assim, os resultados negativos obtidos para o material resinoso são diferentes daqueles descritos para as folhas por Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005), Asolini *et al.* (2006) e Mello, Câmara e Santos (2006) para os extratos testados, quando verificou-se halos de inibição somente para o antibiótico gentamicina testado.

#### 4.6 CLOROFILA *a* E CLOROFILA *b*

O caráter hidrofílico/hidrofóbico de uma substância influi diretamente na escolha do melhor solvente para a sua extração, e para a extração completa das clorofilas, os solventes polares como a acetona, metanol, etanol, acetato de etila, piridina e dimetilformamida são os mais eficazes enquanto hexano e éter de petróleo são menos eficazes (STREIT *et al.*, 2005).

A Tabela 8 apresenta os valores obtidos para as concentrações de clorofila *a* e *b* no material resinoso, nas diferentes frações testadas, ordenadas em ordem crescente para a concentração da clorofila *a*.

**TABELA 8 - CONCENTRAÇÕES DE CLOROFILAS DOS TIPOS *a* (Ca) E *b* (Cb) NAS FRAÇÕES DO MATERIAL RESINOSO PROVENIENTE DA ERVA-MATE**

Fração	C <sub>a</sub> (µg/mL)	C <sub>b</sub> (µg/mL)
Éter petróleo	24,00	808,87
Extrato aquoso	6.473,6	5.969,35
Éter etílico	6.980,34	1.059,32
Extrato hidro-alcoólico 20%	7.959,71	3.535,49
Clorofórmio	8,334,34	80,62
Acetato de etila	16.473,64	3.060,86

Na determinação das clorofilas *a* e *b* no material resinoso, para a clorofila *a*, a maior concentração foi obtida para o solvente mais polar, confirmando o trabalho de Maiocchi e Avanza (2004). Para a clorofila *b*, a maior concentração foi obtida no extrato aquoso seguida pelo extrato hidro-álcoolico 20%, contrariando a informação com relação à sua solubilidade, que seria maior na fração éter de petróleo

A afinidade das clorofilas pelos solventes deve ser considerada na escolha dos meios de extração dos pigmentos em estudo, uma vez que a clorofila *a* é solúvel em éter, etanol, acetona, clorofórmio e benzeno e fracamente solúvel em metanol e praticamente insolúvel em éter de petróleo, enquanto a clorofila *b* é solúvel em éter de petróleo, ligroína e metanol a frio, e insolúvel em álcool absoluto (MERCK INDEX, 1996).

Considerando-se a solubilidade apresentada para as clorofilas *a* e *b* nos diferentes solvente, para diminuir o efeito da clorofila *b* no meio, para a extração da clorofila desse meio, o mais adequado seria a utilização do acetato de etila como solvente onde a quantidade de clorofila *a* é maior. Verificou-se a maior concentração da clorofila *b* no extrato aquoso.

## 5 CONCLUSÕES

O material resinoso apresentou como características físicas dureza acentuada, coloração verde escura e odor característico de erva-mate. Os extratos aquoso e hidroalcoólico apresentaram pH 7,0 e 5,0, respectivamente.

Como características físico-químicas, os resultados obtidos foram teores de cinzas de 11,62% e cinzas insolúveis em HCl de 2,23%; conteúdo de nitrogênio de 1,26% e extrato etéreo de 7,36%. Na pesquisa de componentes minerais, concentrações expressivas de Ca (172,00 ppm), K (164,00 ppm), Mg (68,00 ppm), Al (45,00 ppm) e Fe (39,4 ppm).

Na prospecção fitoquímica, a pesquisa foi positiva para os metabólitos secundários metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina), polifenóis, saponinas, flavonóides, alcalóides, taninos e aminogrupos, considerando-se os extratos aquoso e hidroalcoólico estudados.

Verificou-se ausência de atividade hemolítica e na avaliação da atividade antimicrobiana, os resultados foram negativos para as condições testadas – microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

A atividade antioxidante obtida para o material resinoso foi superior ao padrão quercetina.

Com relação à clorofila, a concentração obtida para a clorofila *a* foi superior em meio de acetato de etila e para a clorofila *b* em meio aquoso.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando-se os dados obtidos, sugere-se o aprofundamento dos estudos com o material resinoso, subproduto da indústria da erva-mate.

O produto material resinoso apresentou quantidade de polifenóis e clorofila maior que as folhas, provavelmente devido à concentração de componentes proporcionada por interferência do processamento, justificando ampliar os estudos e pesquisa desse material.

Frente aos efeitos inicial e “empiricamente” observados na agricultura, e analiticamente detectados, sugere-se aprofundar as possibilidades de aplicação do material resinoso na agricultura, como fonte de minerais para o solo.

Considerando-se os atuais estudos dos efeitos das saponinas em benefícios fisiológicos da saúde, o material resinoso pode ser uma fonte para obtenção desse componente.

## REFERÊNCIAS

ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **J. of Ethnopharmacology**, v. 20, p. 121-144, 1987.

ALMEIDA, M. M. B.; LOPES, M. F. G.; NOGUEIRA, C. M. D.; MAGALHÃES, C. E. C.; MORAIS, N. M. T. Determinação de minerais em plantas medicinais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 94-97, jan./abr. 2002.

ALTIMARI, L. R.; CYRINO, E. S.; ZUCAS, S. M.; OKANO, A. H. Cafeína: ergogênico nutricional no esporte. **Rev. Bras. Ciên. e Mov.**, Brasília, v. 9, n. 3, p. 57-64, 2001.

AMBIENTE Brasil. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br/noticias/index.php3?action=ler&id=20463>>. Acesso em 8 set. 2005.

ANDRADE, E. C. B.; BARROS, A. M.; TAKASEI, I. Avaliação da solubilidade de cobre e zinco em caldos de leguminosas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, set./dez. 2003.

ANDRADE, F. M. **Avaliação de biomassa, clorofila, cafeína e tanino em *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire, crescendo sob sombreamento e pleno sol**. Curitiba, 2003. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Departamento de Silvicultura, Universidade Federal do Paraná.

ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S.T.; FERRAZ, C.; ALENCAR, S. M. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como chás. **Braz. J. Food Technol.**, v. 9, n. 3, p. 209-215, jul./set. 2006.

BACILA, A. **O drama do mate**. Curitiba: Guaíra, [1940]. 27 p.

BARNES, J. D.; BALUGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA,, S.; DAVISON, A. W. A reappraisal of the use of DMSO. for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 32, n. 2, p. 85-100, 1992.

BASTOS, D. H. M.; TORRES, E. A. F. S. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Nutrire ver. Soc. Bras. Alim. Nutr. Brazilian Soc. Food. Nutri.**, São Paulo, v. 26, p. 77-89, 2003.

BASTOS, D.H.M.; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y. S.; TORRES, E.A.F.S. Bioactives compounds content of chimarrão infusions related of the moisture of yerba maté (*Ilex*

*paraguariensis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 399-404, 2006.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas. V. 2, n. 12, maio/ago., p. 123-130, 1999.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à Química de Alimentos**. 2 ed., São Paulo, Livraria Varela, 1989.

BORDENAVE, S.A.; DUCE, SCHMALKO, M., YBARRA, L.R. Incidência de palos en lãs cenizas totales de Yerba Mate elaborada. In: CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA Y TECNOLGIA DE ALIMENTOS: 18-20/05, 2005. **Anais ...**, 2005. Disponível em: <[http://www.unam.edu.ar/index.php?option=com\\_conent&taskview&id=175&itemid=..](http://www.unam.edu.ar/index.php?option=com_conent&taskview&id=175&itemid=..)> Acesso em 15/03/2006.

BORILLLE, A. M. W.. **Relação entre compostos fitoquímicos e o nitrogênio em morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Curitiba, 2004. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração Ciências do Solo), Setor de Ciências Agrárias, da UFPR.

BORILLE, A. M. W.; REISSMANN, C. B.; FREITAS, R. J. S. Relação entre compostos fitoquímicos e o nitrogênio em morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Boletim CEPPA**, v. 23, n. 1, p. 183-198, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELLIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens-Wiss.u.-Technol.*, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura. CONAB. **Balança exportação**. Disponível em: <[www.conab.gov.br/download/indicadores/0205-balanca-exportacao.pdf](http://www.conab.gov.br/download/indicadores/0205-balanca-exportacao.pdf)>. Acesso em 8 fev. 2005.

BRAVO, L., GOYA, L., LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis* St Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, n.3, p. 393-405, 2007.

BRENELLI, E.C.S. A extração de cafeína em bebidas estimulantes: uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Química Nova**, v.26, n.1, p. 136-138, 2003.

BRISOLARA, C. V.; GENRO, D.; CASTILHOS, D. D.; MORSELLI, T. R. G. A.; SANTOS, D. Alterações químicas do solo e macronutrientes no tecido vegetal do

sorgo adubado com diferentes vermicompostos. Disponível em:  
<[http://www.ufpel.edu.br/xiicic/arquivos/CA\\_00694.doc](http://www.ufpel.edu.br/xiicic/arquivos/CA_00694.doc)>. Acesso em 08 set. 2007

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza, España: Acribia, 1991. 394 p.

BURGDARDT, A. C. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba, PR: MCT/CNPq/PADCT, 2000. 160p.

CARDOZO JÚNIOR, E. L.; CARDOZO FILHO, L.; STURION, J.A.; DONADUZZI, C. M.; URIO, H.; ZANOELO, E. F. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em três municípios do Paraná. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., 2003, Chapecó. **Anais ...** Chapecó, SC: Organizadores, 2003.

CARINI, M.; FACINO, R. M.; ALDINI, G.; ALLONI, M.; COLOMBO, L. Characterization of phenolic antioxidants from mate (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, n. 22, p. 1813-1819, 1998.

CARNEIRO, C.; REISSMANN, C. B.; MARQUES, R. Comparação de métodos de análise química de K, Ca, Mg e Al, em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Cerne**, Lavras, v. 12, p.113-122, abr./jun. 2006.

CIRIO, G. M.; RUCKER, N. G. A. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba, PR: MCT/CNPq/PADCT, 2000. 160p

CLIFFORD, M.N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Chlorogenic acids and purine alkaloids content of maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, p. 13-21, 1991.

COELHO, G. C.; ATHAYDE, M. L.; SCHENKEL, E. P. Methylxanthines of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. var. *vestita* Loes, and var. *Paraguariensis*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n.2, p. 153-158, 2001.

ÇOKUĞRAŞ, A. N.; BODUR, E. Comparative effects of two plant growth regulators: indole-3-acetic acid and chlorogenic acid on human and horse serum butylcholinesterase. **Pesticide Biochemistry & Physiology**, v. 77, n 1, p.24-33, 2003.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. v.2.

DA CROCE, D. M. Características físico-químicas de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) no estado de Santa Catarina. **Ciência Florestal**, v. 2, n. 2, p. 107-113, 2002.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise do ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant biochemistry**. London: Academic Press, 1997. p. 387-416.

DONADUZZI, C. M.; CARDOZO Jr., E. L.; DONADUZZI, E.; STURION, J. A.; CORREA, G. Variação nos teores de polifenóis e taninos em dezesseis progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) cultivadas em todos três municípios do Paraná. **Arquivos Ciências Saúde**, Unipar, Toledo, v. 7, n. 2, p. 129-133, maio/ago. 2003.

EDWIN, G.; REITZ, R. **Aquifoliaceas**: flora ilustrada catarinense. Itajaí: Eleoterius, 1967. 47p.

ELBE, J. H.; SCWARTZ, S. J. Colorans. In: FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. p. 773-851.

EMATER. EMPRESA PARANAENSE DE ASSITÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Curitiba, 1991.

EMBRAPA FLORESTAS. **Cultivo da erva-mate**: distribuição geográfica. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-mate/CultivodaErvaMate/02\\_distrib\\_geografica.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-mate/CultivodaErvaMate/02_distrib_geografica.htm)>. Acesso em maio de 2007

ESCALADA, M. A.; SCHMALKO, M. E.; KÄNZIG, R. G. El extracto acuoso como una medida del contenido de palos de la Yerba Maté. **R. de Ci. y Tec. del Univ. Nac. de Misiones**, v. 1, n. 1, p.40-44, 1998.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 193-204, 2002.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' pharmacognosy**. 15<sup>th</sup> ed. China: Harcourt, 2002. 585 p.

FAGUNDES, G. **Cevando mate**. Porto Alegre: Habitasul, 1980. 135 p.

FERREIRA, F.; VAZQUEZ, A.; GUNTER, C.; MOYNA, P. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by the *Ilex paraguariensis* St. Hil. Saponins. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 79-81, 1997.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G. Phytochemical study of *Ilex dumosa*. **Acta Hort.**, n. 502, p. 405-408, 1999

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Mate substitutes or adulterants: study of xanthine content. **Phytotherapy Research**, v. 12, p.129-131, 1998.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p.774-778, 2001.

FILIP, R.; FERRARO, G. Researching on new species of "Mate": *Ilex brevicuspis*: phytochemical and pharmacology study. **European Journal Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 50-54, 2004.

FURLONG, E. B., COLLA, E., BORTOLATO, D. S., BAISCH, A. L. M., SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**, Rio Grande, 13: 105-114, 2003.

GALEANO, C.; BARRIONUEVO, M. R. E.; ARGÜELLO, B. Métodos alternativos de procesamiento para sapear hojas de yerba mate, tendientes a mantener el color y las clorofilas. In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4., 2006, Posadas, Argentina. **Anais...** Posadas: Organizadores, 2006. 1 CD-ROM.

GNOATTO, S. C.B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponin in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n.4, 723-726, 2005.

GNOATO, S. C. B.; BASSANI, V. L.; COELHO, G.; SCHENKEL, E. P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae). **Quim. Nova**, v. 30, n.2, 304-307, 2007.

GONÇALVES, A. I.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Biol.**, v. 72, n.3, p. 353-358, jul./set. 2005.

GOLÇANVES, M., GUEREIRO, M. C., BIANCHI, M. L., OLIVEIRA, L. C. A. O., PEREIRA, I., DALLAGO, R. M. Produção de Carvão a partir de resíduo de erva-mate

para a remoção de contaminantes orgânicos de meio aquoso. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 31, n.5, p. 1386-1391, set./out., 2007.

GOSMANN, G. **Saponinas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate)**. Porto Alegre, 1989. Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö.; MAZZA, G. Saponins: properties, applications and processing. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 3, 2007.

GUTKOSKI, L. C.; SCHULZ, J. G.; SAMPAIO, M.B.; SILVA, D. R. Avaliação de parâmetros físicos e químicos de marcas de erva-mate processadas em diferentes épocas. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 95-104, 2001.

HECK, C. I.; MEJHA, E. G. Yerba mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n.9, R138-R151, 2007. Disponível em: <[http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x?prevSearch=allfield%3A\(mate\)](http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x?prevSearch=allfield%3A(mate))>. Acesso em: 10 nov. 2007.

HEINRICH, R.; MALAVOLTA, E. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n.5, p.781-785, 2001.

HEINZMANN, B. M. **Saponinas de *Ilex dumosa* Reiss**. Porto Alegre, 1991. 78. f. Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Farmácia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

HOLOVATTY, S.; ARGUELLO, B.; MALEC, L. Variacion del contenido de polifenoles durante el,procesamiento de yerba mate (*Ilex paraguariensis*). In: CONG. SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4., 2006, Misiones, Argentina. **Anais...** Misiones, Argentina: Organizadores, 2006.

HUDSON, B.J.F. **Food antioxidants**. New York: Elsevier Science, 1990.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químico para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo: IAL, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2003/pevs2003.pdf>>. Acesso em 10 jan. 2007.

ISENBERG, H.D.. **Clinical microbiology procedures handbook**. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1992. v.1.

ITO, E.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Theophylline metabolism in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, p. 323-330, 1997.

JACOB, G. DMSO – mode of action and biologic effects. **Veterinary Medicine**, p. 365-376, 1982.

JULKUNEN-TIITO, R. Phenolic constituents in the Leaves of Northern Willows: methods for the analysis of certain phenolics. **J. Agric. Food Chem.**, v. 33, p. 213-217, 1985.

KOCHOL, R. A.; MALGOR, L. A.; VERGES, E. G.; MABEL E., V.; MENDOZA, L. A.; MAIOCCHI, M. **Estudio de efectos adversos de extractos de Saponina obtenidas de Ilex Paraguariensis y de una nueva especial de yerba mate: Ilex Dumosa Reís**. Disponível em: <[www.plantasmedicinales.org/archivos/ilex\\_estudio\\_toxicidad.pdf](http://www.plantasmedicinales.org/archivos/ilex_estudio_toxicidad.pdf)>. Acesso em 25 nov. 2007.

KRAEMER, K. H.; TAKETA, A.T. C.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1119-1122, 1996.

LAGOS, J. B.; MAZZA, M. C.; NAKASHIMA, T.; MEDRADO, M. S.; AMARAL, F. M. R. Determinação do teor de metilxantinas e análise da variabilidade genética de seis “variedades” populares de erva-mate. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Emater**, Colombo, p. 5-18, 2001.

LINHARES, T. **História econômica do mate**. Rio de Janeiro: José Olympio, 1969. 522 p. (Coleção Documentos Brasileiros).

LOBO, A. S.; TRAMONTE, V. L. C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre biodisponibilidade de minerais. **Rev. Nutri.**, Campinas, 17, v. 1, p. 107-113, jan./mar. 2004.

LOPEZ VELAZQUEZ, M. E.; SCIPIONE, G. P.; FERREYRA, J. D.; SCHMALKO, M. E. **Subproductos obtenidos em el procesamiento de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*): caracterización fisicoquímica**. Misiones, Argentina: [s.n.], 2006.

LOPEZ C., ADOLFO G., MALGOR, L.A., VERGES E.E.M., MENDOZA, L. **Acciones farmacológicas de infusiones de yerba mate *Ilex paraguariensis* em la rata**. Universidad Nacional Del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Argentina: [s.n.], 2000.

LOURENÇO, R. S.; CURCIO, G. R.; RACHWAL, M. G.; MEDRADO, M. J. S. Avaliação de níveis de nitrogênio sobre a produção de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em Fernandes Pinheiro, PR, em latossolo vermelho escuro. **Bol. Pesq. Florestal**, Colombo, PR, n. 34, p. 75-98, 1997.

MACCARI JÚNIOR, A.; SANTOS, A. P. R. **Aplicações potenciais da erva-mate em produtos de higiene e no tratamento de resíduos**. In: PRODUTOS alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. Curitiba, PR: MCT/CNPq/PADCT, 2000. 160 p.

MACCARI JÚNIOR, A.; PINTO JÚNIOR. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba, PR: MCT/CNPq/PADCT, 2000. 160 p.

MACHADO, C. C. B.; BASTOS, D. H. M. Determinação do perfil de compostos voláteis e avaliação do sabor e aroma de bebidas produzidas a partir da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Química Nova**, v.30, n. 3, p. 513-518, 2007.

MAIOCCHI, M.; MOYANO, S.; MARTINEZ, L.; AVANZA, J. Estudio comparativo del contenido de minerales en *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa*. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, p. 441-454, 1989. Disponível em: <<http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2002/08-Exactas/E-012.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2007.

MAIOCCHI, M. G.; AVANZA, J. R. **Degradación de clorofila y feofitinas a diferentes temperatura en *Ilex dumosa* e *Ilex paraguariensis***. Comunicaciones científicas y Tecnológicas, 2004. Laboratório de Tecnologia Química, Facultad de Ciencias Exactas Naturales y Agrimensura. Disponível em: <<http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2004/8-Exactas/E-085.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2007.

MALHEIROS, G. C. **Estudo da alteração da cor e degradação da clorofila durante a armazenagem de erva-mate tipo chimarrão**. Santa Maria RS, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

MANUAL MERCK. **Saúde para a família**. Disponível em: <[http://www.msd-brazil.com/msd43/m\\_manual/mm\\_sec12\\_133.htm](http://www.msd-brazil.com/msd43/m_manual/mm_sec12_133.htm)>. Acesso em: 12 jun. 2007.

MARTINET, A.; NDJOKO, K.; TERREAUX, C.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; SCHUTZ, Y. NMR and LC-MSn characterization of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemical Analysis**, v. 12, p. 48-52, 2001.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ AMAYA, D. Conteúdo de mirecitina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 380-385, abr./jun., 2006.

MATTOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 1998. 128 p.

MAZZAFERA, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acids intake. **Food Chemistry**, v. 60, n.1, p. 67-71, 1997.

MAZUCHOWSKI, J.Z. **Manual da erva-mate**. Curitiba: Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural - EMATER-PR, 1989. 104 p.

MAZUCHOWSKI, J.Z.; SILVA, E. T.; MACARI JÚNIOR, A. Efeito da luminosidade e da adição de nitrogênio no crescimento de plantas de *Ilex paraguariensis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, July/Aug. 2007.

MELLO, R.A.; CÂMARA, R.S.; SANTOS, A. B, F. **Estudo da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de erva-mate *Ilex paraguariensis* St Hil**. Disponível em: <[http://www.utp.br/proppe/X%20seminario\\_pesquisa/Artigos%20completos/FCBS/ESTUDO%20DA%20ATIVIDADE%20ANTIMICROBIANA%20DO%20EXTRADO%20....doc](http://www.utp.br/proppe/X%20seminario_pesquisa/Artigos%20completos/FCBS/ESTUDO%20DA%20ATIVIDADE%20ANTIMICROBIANA%20DO%20EXTRADO%20....doc)>. Acesso em: jun. 2006.

MENDES, R. M. O. **Caracterização e avaliação da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hill) beneficiada no Estado de Santa Catarina**. Florianópolis, 2005. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC.

MERCK INDEX. **An encyclopedia of chemicals and biologicals**. New Jersey: Merck Research Laboratories, Division of Merck & CO, Inc., 1996. p. 248, 359, 1583 e 1584.

MIRANDA, N.; URBAN, T. **Engenhos & barbaquas**. Curitiba: Posigraf, 1998. 120p.

MORAWICKI, R.; SCHMALKO, M. E.; KÄNZIG, R. G. Chlorophyll stability in yerba mate leaves in controlled atmospheres. **Brazilian archives of biology and Technology**, v. 42, n.1, p. 85-90, 1999.

MOSIMANN, A. L. P.; WILHEM-FILHO, D.; SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors**, v. 26, p. 59-70, 2006.

NAVARRO, A.; PINOTTI, A.; GARCIA MARIA, A.; MARTINO, M. Determinación de la capacidad antioxidante de extractos vegetales a distintos procesos de conservación. In: INTERAMERICAN CONFEDERATION OF CHEMICAL ENGINEERING (IACChE), 22., 2006, Buenos Aires, Argentina. **Anais...** Buenos Aires, Argentina, 2006.

NAKASHIMA, T. **Fitoquímica experimental**. Curitiba: UFPR, Departamento de Farmácia, 1993/1994. 25 p. (Apostila prática).

NAKASHIMA, T. **Álbum de fotos**: referente à tese de doutorado “Compostos bioativos do material resinoso do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)”. [Curitiba], 2005.

PANDOLFO, C. M.; FLOSS, P. A.; DA CROCE, D. M.; DITTRICH, R. C. Resposta da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) à adubação mineral e orgânica em um latossolo vermelho alumino-férrico. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 2, p. 37-45, 2003.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Cultura. Coordenadoria do Patrimônio Cultural. **A erva mate e o parque histórico do mate**. Disponível em: <<http://www.patrimoniocultural.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=244>>. Acesso em: 30 jun. 2007.

POKOLENKO, J. J.; SCHMALKO, M. E. Contenido de cafeína y extracto acuoso y su velocidad de extracción en la yerba mate en diferentes épocas de cosecha. **Revista de Ciencia y Tecnología**. 2005. Disponível em: <[http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/infusion/Trab\\_Interes/Cafeina\\_EA.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/infusion/Trab_Interes/Cafeina_EA.pdf)>. Acesso em dez. 2007.

POMÍLIO, A. B.; TRAJTENBERG, S.; VITALE, S. High-performance capillary analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. **Phytochem. Anal.**, v. 13, n.4, p. 235-241, 2002.

POR QUE amamos cafeína. **National Geographic Brasil**, São Paulo: Editora Abril, p.37-62, jan. 2005.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, May 1999.

RAMALLO, L. A.; SMORCEWSKI, M.; VALDEZ, E. C.; PAREDES, A. M.; SCHAMALKO, M. E. Contenido nutricional del extracto acuoso de la yerba mate en tres formas diferentes de consumo. **La Alimentacion Latinoamericana**, n. 225, p. 48-52, 1998.

RAMALLO, L. A.; POLOLENKO, J. J.; BALMACEDA, G. Z.; SCHMALKO, M. E. Moisture diffusivity, shrinkage, and apparent density variation during drying of leaves at high temperatures. **International Journal of Food Properties**, v. 4, n. 1, p. 163-170, 2001.

REFFATTI, P. F.; LORENZETTI, E.; RODRIGUES, M. B. Caracterização de resíduos de erva-mate - para produção axênica de cogumelos. **Synergynus scientifica**, UTFPR, Pato Branco, v. 1, n. 1,2,3,4, p. 1-778, 2006.

REGINATTO, F. H.; ATHAYDE, M. L.; GOSMANN, A.; SCHENKEL, E. P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other species. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 10, n. 6, p. 443-446, 1999.

REISSMANN, C. B.; RODOMSKI, M. I.; QUADROS, R. M. B. Chemical composition of *Ilex paraguariensis* St. Hil. under different management conditions in seven localities of Paraná State. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 42, n.2, p. 187-194, 1999.

RIBANI, R. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. **Compostos fenólicos em erva-mate e frutas**. Campinas, 2006. 137 f. Tese (Doutorado Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, SP.

RIBEIRO, M. G.; CARVALHO, FILHO, A. S.; LISTONI, F. J. P. Dimetilsulfóxido –DMSO – no teste de sensibilidade microbiana *in vitro* em cepas de *Rhodococcus* equi isoladas de afecções pulmonares em potros. **Ciência Rural**, v.31, n.5, p. 889-892, 2001.

RIBEIRO, M. M. **Influência da adubação nitrogenada na incidência de *Gyropsylla spegazziniana* (Hemiptera: Psyllidae) praga da erva-mate cultivada**. Curitiba, 2005. 109 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, UFPR.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia; Edgard Blücher, 2004. 184 p.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-056, 1996.

ROBASSA, J. C.; REISSMANN, B. C.; MACCARI JUNIOR, A. Teores de Fe, Mn, Cu e Zn em três morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hil). In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2003, Chapecó. **Anais...** Chapecó, SC: Organizadores, 2003.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. [São Paulo]: Editorial Premier, 1997. 372 p.

ROBINSON, D. S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alientos**. Zaragoza: Acribia, 1991. p. 499-505.

SALDANHA, L. A.; BASTOS, D. H. M. Extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada: sólidos solúveis, fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro*. In: CONGRESSO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4., 2006, Misiones, Argentina. **Anais...** Misiones, Argentina: Organizadores, 2006.

SALDAÑA, M. D. A.; ZETZI, C.; MOHMED, R.S.; BRUNNER, G. Extraction of methylanthines from guaraná seeds, maté leaves, and cocoa using supercritical carbon dioxide and ethanol. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 4820-4826, 2002.

SAMBIASSI, C.; ESCALADA, A. M.; SCHMALKO, M. E. Extration optimization of soluble compounds of yerba maté. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 45, n.2, p. 189-193, 2002.

SANZ, M. D. T.; ISASA, M. E. T. Elementos minerales en la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Archivos Latino Americanos de Nutricion**, v. 41, n.3, p. 441-453, Sept. 1991.

SANTOS, K. A. **Estabilidade da erva mate (*Ilex paraguariensis* St Hill) em embalagens plásticas**. Curitiba, 2004. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos.) – Setor de Tecnologia, UFPR.

SANTOS, K. A.; FREITAS, R. J. S. F.; RUCKER, N. G. A.; SANTOS, M. A.; RAPACCI, M. Determinação de cafeína por CLAE em erva-mate para chimarrão. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., 2003, Chapecó. **Anais...** Chapecó, SC: Organizadores, 2003.

SANTOS, K. A.; FREITAS, R. J. S. F.; SANTOS, M. A.; RAPACCI, M.; WINTER, C. M. G. Polifenóis em chá de erva-mate: revisão. **Nutrição Brasil**, v. 3, n. 1, p. 47-50, jan./fev. 2004.

SANZ, M. D. T.; ISASA, M. E. T. Elementos minerales en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. H.). **Archivos Latinamericanos de Nutricion**, v. 441, n.3, p. 441-454, 1991.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.**, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.

SCHENKEL, E. P.; ATHAYDE, M. L.; GIBERTI, G. C.; GUILLAUME, D. A new saponin from *Ilex argentina*. **Acta Farmaceutica Banaerense**, v. 14, n. 1, p. 5-10, 1995.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MONTANHA, J. A.; HEIZMANN, B. M.; ATHAYDE, M. L.; TAKETA, A. T. C.; PIRES, V.; GUILLAUME, D. Saponins from maté (*Ilex paraguariensis*) and other South American *Ilex* species: Ten years research on *Ilex* saponins. **Journal of Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 49, n. 5/6, p. 359-363, 1997.

SCHENKEL, E. P.; MONTANHA, J. A.; GOSMANN, G. Triterpene saponins from maté, *Ilex paraguariensis*. **Advances in Experimental Medicine & Biology**, v. 405, p. 47-56, 1996.

SCHINELA, G. R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P. M.; TOURNIER, H. A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 269, p. 357-360, 2000.

SCHMALKO, M. E.; RAMALLO, L. A.; SMORCZEWSKI, M.; VALDEZ, E. C.; PAREDES, A. M. Contenido de nutrientes em la yerba mate. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2., 2000, Encantado, RS. **Anais...** Encantado, RS: Organizadores, 2000. p. 74-75.

SCHMALKO, M. E.; ALZAMORA, S. M. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during yerba mate processing. **Drying technology**, v. 19, n. 3-4, p. 599-610, 2001.

SCHMALKO, M. E.; RAMALHO, L. A.; FERREIRA, D.; BERLINGHERI, R. D. Dimethoate degradation in plants during processing of yerba maté leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.45, n. 4, p. 419-422, Dec. 2002.

SCHMALKO, M. E.; SCIPIONI, P. G.; FERREYRA, D. J.; ALZAMORA, S. M. **Efecto de la actividad del agua y la temperatura en la degradación de la clorofila y el color en hojas de yerba mate**. Universidad Nacional del Nordeste, 2004. 9 p. Disponível em: <[www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/infusion/Trab\\_Interes/Clorofila.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/infusion/Trab_Interes/Clorofila.pdf)>. Acesso em 5 jul. 2007.

SCHUBERT, A.; ZANINA, F. F.; PEREIRA, D. F.; ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. Hill., (Erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Quim. Nova**, v. 29, n.6, p. 1233-1236, 2006.

SCUCATO, E. S. Erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hill.): situação sanitária no Paraná durante o período de 1991 a 1986. **Boletim do CEPPA**, v. 16, n. 2, p. 217-228, 1998.

SENAI. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. **A produção de chá**. Disponível em: <<http://www.sbrtv1.ibict.br/upload/sbrt5483.htm>>. Acesso em jan. 2006.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E, beta-caroteno and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p. 1215S-1321S, 1995.

SILVA, E. L. Chimarrão reduz risco de aterosclerose. **Folha ONLINE – Ciência**. Disponível em: <<http://www.l.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult30613162.shtml>>. Acesso em 8 set. 2005.

SIMÕES, C. A. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001. 833 p.

STANDHARD METHODS FOR THE WATER AND WASTEWATER. 20. ed. American Water Works Association, Washington, 1998. 1220 p.

STHAL, E. **Thin layer chromatography**. Berlin: Springer-Verlag, 1965.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n.3, p.748-755, 2005.

TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Saponins from *Ilex pseudobuxus*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 13, n. 3, p. 159-164, 1994.

TRUEBA, G. P. Los Flavonóides: antioxidantes o prooxidantes. **Rev. Cubana Invest. Biomed**, v. 1, n. 22, p. 48-57, 2003.

URBAN, T. **O livro do mate**. Rio de Janeiro: Salamandra, 1990. 93 p.

VAHER, M.; KOEL, M. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 990, p. 225-230, 2003.

VALDUGA, E.; FREITAS, R. J. S.; REISMANN, C. B.; NAKASHIMA, T. Caracterização química da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) e de outras espécies utilizadas na adulteração do mate. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 15, n.1, p. 25-36, jan./jun. 1997.

VALDUGA, A. T.; BATTESTIN, V.; FINZER, J. R. D. Secagem de extratos de erva-mate em secador por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 148-189, 2003.

WAGNER, H.; BIADT, S.; ZGAINSKI, G. M. **Plant drug analysis**. New York: Springer-Verlag, 1984.

WONG, D. W. S. **Química de los alimentos: mecanismos y teoría**. Zaragoza: Acribia, 1995. p. 209-216.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 523 p.