

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIANA LEMOS GOULARTE DUTRA

**COMPOSTOS FENÓLICOS E METILXANTINAS EM ERVA-MATE ARMAZENADA
EM SISTEMAS DE ESTACIONAMENTO NATURAL E ACELERADO**

CURITIBA

2009

FABIANA LEMOS GOULARTE DUTRA

**COMPOSTOS FENÓLICOS E METILXANTINAS EM ERVA-MATE ARMAZENADA
EM SISTEMAS DE ESTACIONAMENTO NATURAL E ACELERADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de
Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre em
Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosemary Hoffmann Ribani
Co-orientador: Dr. Marcelo Ribani

CURITIBA

2009

Dutra, Fabiana Lemos Goularte

Compostos fenólicos e metilxantinas em erva-mate armazenada em sistemas de estacionamento natural e acelerado / Fabiana Lemos Goularte Dutra – Curitiba, 2009.

73 f.

Orientadora: Rosemary Hoffmann Ribani

Co-orientador: Marcelo Ribani

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

1. Erva-mate. 2. Cromatografia líquida. I. Ribani, Rosemary Hoffmann. II. Ribani, Marcelo. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDD 663.96

TERMO DE APROVAÇÃO

FABIANA LEMOS GOULARTE DUTRA

**COMPOSTOS FENÓLICOS E METILXANTINAS DE ERVA-MATE
ARMAZENADA EM SISTEMAS DE ESTACIONAMENTO
NATURAL E ACELERADO**

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



Orientadora: Prof^a. Dr^a. ROSEMARY HOFFMANN RIBANI
Setor de Tecnologia, UFPR



Prof^a. Dr^a. EDNA REGINA AMANTE
Centro de Ciências Agrárias, UFSC



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

Curitiba, 30 de março de 2009

Dedico este trabalho ao meu
esposo Leonardo, à minha família e a
todos meus amigos que torceram
por mim ao longo do curso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho, especialmente pela força e serenidade nos momentos de dificuldade, proporcionando a aprendizagem.

Ao meu esposo, Leonardo, por todo amor, confiança, além do apoio e incentivo desde o início ao fim deste trabalho.

À minha família, que mesmo longe tiveram papel importante para execução desta etapa, em especial meus pais Julieta e Ubirajara que proporcionaram a base para que eu chegasse até aqui.

À minha orientadora, Rosemary, pela excelente orientação, confiança e tranquilidade transmitida, entre uma cuia e outra de chimarrão.

Ao meu co-orientador, que se mostrou incansável e paciente nos esclarecimentos. Obrigada por toda a ajuda prestada.

À Ervateira Baldo S.A. Comércio, Indústria e Exportação, da Unidade de São Mateus do Sul/PR, na pessoa do Sr. Leandro B. Gheno, pelo fornecimento da matéria-prima para realização do meu experimento e pelo auxílio prestado.

Ao pesquisador da Embrapa Florestas, José Alfredo Sturion e ao pesquisador, Chefe de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Florestas e amigo Ivar Wendling pelo incentivo à pesquisa com Erva-mate.

Ao Sr. Adeí Louzada de Moura, por ter aberto as portas de sua casa, proporcionando melhor qualidade na conclusão deste trabalho.

Aos mais que colegas, amigos Maria de Fátima, Ângela, Camila, Fernanda, Vitor, Fabiane, Marli, Silvana obrigado pela amizade e incentivo ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos à Sônia Stertz (UFPR), ao Fabrício Hansel (Embrapa/PR) e à Neusa Gomes de Almeida Rucker (SEAB/PR), pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À Fernanda e Karlla, pela colaboração voluntária, a qual foi muito importante para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao professor Paulo Fontoura, pelos materiais cedidos e agradáveis conversas no laboratório.

A todos os alunos do PPGTA que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desta pesquisa.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Renato João Sossela de Freitas e a Prof^a. Dr^a. Edna Regina Amante, por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

Ao Professor Dr. Henrique Soares Köehler, pelo auxílio na parte estatística.

Ao CEPPA, pelo fornecimento da água Mili-Q, indispensável para a realização das análises químicas.

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

RESUMO

Vários efeitos benéficos à saúde humana têm sido atribuídos ao consumo da infusão de erva-mate, protegendo os sistemas biológicos do estresse oxidativo, além de ações anticancerígenas e cardioprotetoras. Esses benefícios estão relacionados aos compostos fenólicos, que atuam como antioxidantes, como a rutina e os ácidos 5-cafeoilquínico e caféico. Além dos compostos fenólicos, têm-se a cafeína, teobromina e teofilina, metilxantinas presentes na erva-mate que estimulam o sistema nervoso central. As etapas do processamento da erva-mate têm influência direta na sua composição físico-química e, conseqüentemente, nos teores desses compostos. O trabalho teve como objetivo verificar a influência dos sistemas de estacionamento sobre os compostos fenólicos e metilxantinas em amostras de erva-mate. Seis amostras de erva-mate cancheada foram divididas em dois lotes e submetidas aos processos de estacionamento natural (180 dias) e acelerado (60 dias), de onde foram coletadas amostras periódicas para análise por cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE, com freqüência de 30 e 10 dias, respectivamente. Foi desenvolvido e validado um método isocrático por CLAE para análise das diferentes classes de compostos fenólicos, rutina, ácido caféico, ácido 5-cafeoilquínico. No estacionamento natural, os teores de RU, AC, 5-CQA, Cf e Tb das amostras de erva-mate variaram de 3,19 a 12,62 mg g⁻¹; 0,09 a 0,31 mg g⁻¹; 18,69 a 44,91 mg g⁻¹; 2,97 a 11,30 mg g⁻¹ e 0,24 a 2,86 mg g⁻¹, respectivamente, enquanto no estacionamento acelerado, os teores variaram de 3,67 a 12,10 mg g⁻¹; 0,09 a 0,3 mg g⁻¹; 18,58 a 48,11 mg g⁻¹; 3,12 a 11,36 mg g⁻¹ e 0,51 a 3,52 mg g⁻¹, respectivamente. Não foi detectada teofilina em nenhuma das amostras de erva-mate analisadas. O estudo estabeleceu que a rutina, ácido 5-cafeoilquínico, cafeína e teobromina, presentes na erva-mate, não sofrem influência dos sistemas de estacionamento. Os resultados obtidos sugerem que apenas o estacionamento acelerado proporciona condições para aumento do teor de ácido caféico, possivelmente a partir da degradação de outros derivados cafeoilquínicos presentes na erva-mate.

Palavras-chave: Cromatografia Líquida. Metilxantinas. Compostos Fenólicos. *Ilex paraguariensis*. Antioxidantes. Armazenagem.

ABSTRACT

Several beneficial effects to human health have been attributed to the consumption of yerba-mate infusion, protecting the biological systems from stress oxidation, beyond having anti-carcinogenic and cardiovascular protective actions. These benefits are related to the phenolic compounds, that act as antioxidants, such as rutin (Ru), 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) and caffeic acid (AC). Beyond phenolic compounds yerba-mate has caffeine (Cf), theobromine (Tb) and theophylline (Tf), methylxanthines which stimulate the central nervous system. The yerba-mate processing stages have direct influence in its physical-chemistry composition and so in the contents of these compounds. The work had as objective verify the influence of the storage systems on phenolic compounds and methylxanthines in samples of yerba-mate. Six samples of ground yerba-mate had been divided in two lots and submitted to the natural (180 days) and accelerated (60 days) storage processes, of where periodic samples had been collected for High Performance Liquid Chromatography -HPLC analysis, in a frequency of 30 and 10 days, respectively. An isocratic method for HPLC analysis of the different yerba-mate phenolic compounds, rutin, 5-caffeoylquinic acid and caffeic acid was developed and validated. In the natural storage samples, the contents of Ru, AC, 5-CQA, Cf and Tb had varied from 3.19 to 12.62 mg g⁻¹; 0.09 to 0.31 mg g⁻¹; 18.69 to 44.91 mg g⁻¹; 2.97 to 11.30 mg g⁻¹ and 0.24 to 2.86 mg g⁻¹, respectively, while in the accelerated storage the contents had varied from 3.67 to 12.10 mg g⁻¹; 0.09 to 0.3 mg g⁻¹; 18.58 to 48.11 mg g⁻¹; 3.12 to 11.36 mg g⁻¹ and 0.51 to 3.52 mg g⁻¹, respectively. It was not detected theophylline in none of the yerba-mate samples analyzed. The study established that rutin, 5-caffeoylquinic acid, caffeic acid, caffeine and theobromine yerba-mate content does not suffer influence from the storage systems. The gotten results suggest that only the accelerated storage provides conditions for increase the caffeic acid content, possibly from the degradation of other caffeoylquinic derivatives presents in yerba-mate.

Key-words: Liquid chromatography. Methylxanthines. Phenolic compounds. *Ilex paraguariensis*. Antioxidant. Storage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	EVOLUÇÃO DAS EXPORTAÇÕES BRASILEIRAS DE ERVA-MATE 1992 A 2005.....	18
FIGURA 2 -	ESTRUTURA GENÉRICA DOS FLAVONÓIDES.....	22
FIGURA 3 -	ESTRUTURA GENÉRICA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONÓIDES.....	22
FIGURA 4 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA RUTINA.....	23
FIGURA 5 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO 5-CAFEOILQUÍNICO.....	23
FIGURA 6 -	ESTRUTURA QUÍMICA DAS METILXANTINAS.....	25
FIGURA 7 -	PRINCIPAIS VIAS DA BIOSÍNTESE DA CAFEÍNA EM PLANTAS.....	26
FIGURA 8 -	FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO ADOTADO NO ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS SISTEMAS DE ESTACIONAMENTO DE ERVA-MATE NO TEOR DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E DAS METILXANTINAS.....	30
FIGURA 9 -	PARTE INTERNA DA CÂMARA DE MATURAÇÃO DE ERVA-MATE.....	31
FIGURA 10 -	ESTRUTURA DO GALPÃO DE MATURAÇÃO DE ERVA-MATE.....	32
FIGURA 11 -	CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS ADICIONADOS A AMOSTRA DE ERVA-MATE E RESPECTIVOS ESPECTROS (250 A 500 nm) OBTIDOS COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS.....	40
FIGURA 12	CONTEÚDO DE ÁCIDO CAFÉICO EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE ARMAZENADA NO ESTACIONAMENTO ACELERADO E NATURAL EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	43
FIGURA 13 -	CROMATOGRAMA A) PADRÕES: TEOBROMINA, TEOFILINA E CAFEÍNA E RESPECTIVOS ESPECTROS (250 A 400nm) OBTIDOS DO DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS; B) AMOSTRA DE ERVA-MATE.....	45
FIGURA 14 -	CONTEÚDO DE CAFEÍNA E TEOBROMINA EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE ARMAZENADAS NO ESTACIONAMENTO ACELERADO E NATURAL EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- TEOR DE UMIDADE EM ERVA-MATE ARMAZENADA POR DIFERENTES TEMPOS NOS SISTEMAS ACELERADO E NATURAL.....	39
TABELA 2	- CARACTERÍSTICAS DAS CURVAS-PADRÃO DO ÁCIDO CAFEICO, 5-CQA E RUTINA.....	41
TABELA 3	- LD e LQ OBTIDOS PELOS PARÂMETROS DAS CURVAS ANALÍTICAS.....	41
TABELA 4	- COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE... 41	41
TABELA 5	- RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS DETERMINAÇÕES DE ÁCIDO CAFÉICO, 5-CQA E RUTINA EM ERVA-MATE ESTACIONADA.....	42
TABELA 6	- MÉDIAS DOS TEORES DE RUTINA, ÁCIDO CAFÉICO (AC) E ÁCIDO 5-CAFEOILQUÍNICO (5-CQA) PARA OS ESTACIONAMENTOS NATURAL E ACELERADO.....	42
TABELA 7	- MÉDIAS DOS TEORES DE AC EM ERVA-MATE ARMAZENADA EM ESTACIONAMENTO ACELERADO ANALISADA A CADA 10 DIAS.....	43
TABELA 8	- NÍVEIS DE 5-CQA, AC e Ru EM AMOSTRAS PREPARADAS DE ERVA-MATE (mg g^{-1}) EM BASE SECA.....	44
TABELA 9	- CARACTERÍSTICAS DAS CURVAS ANALÍTICAS DOS PADRÕES CAFEÍNA, TEOBROMINA E TEOFILINA.....	46
TABELA 10	- LD e LQ OBTIDOS PELO MÉTODO DAS CURVAS ANALÍTICAS.....	46
TABELA 11	- RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS DETERMINAÇÕES DE CAFEÍNA E TEOBROMINA EM ERVA-MATE ESTACIONADA.....	47
TABELA 12	- MÉDIA DOS TEORES DE CAFEÍNA E TEOBROMINA PARA O ESTACIONAMENTO NATURAL E ACELERADO.....	47
TABELA 13	- COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE XANTINAS EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE PESQUISADAS POR DIVERSOS AUTORES... 48	48

LISTA DE SIGLAS

AC	Ácido cafeico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CGA	Ácidos clorogênicos
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
5-CQA	Ácido 5-cafeoilquínico
Cf	Cafeína
CV	Coeficiente de variação
EA	Estacionamento acelerado
EN	Estacionamento natural
g	Gramas
$\mu\text{g mL}^{-1}$	Micrograma por mililitro
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IAL	Instituto Adolfo Lutz
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LQ	Limite de quantificação
mg g^{-1}	Miligrama por grama
Min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
μm	Micrômetro
nm	Nanômetro
PPGTA	Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos
Ru	Rutina
S	Inclinação da curva
SD	Erro do coeficiente angular
Tb	Teobromina
Tf	Teofilina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVO GERAL	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA ERVA-MATE.....	17
2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS EM ERVA-MATE.....	18
2.2.1 Importância dos compostos fenólicos e metilxantinas da erva-mate.....	19
2.2.2 Compostos fenólicos	21
2.2.3 Metilxantinas	25
2.3 PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 AMOSTRAS	30
3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	32
3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS	32
3.3.1 Reagentes	32
3.3.2 Preparo dos extratos dos compostos fenólicos.....	33
3.3.3 Preparo dos padrões rotina, ácido cafeico e ácido 5-cafeoilquínico.....	33
3.3.3 Estabelecimento das condições cromatográficas para análise dos compostos fenólicos.....	33
3.3.4 Validação do método de CLAE isocrática para compostos fenólicos em amostras de erva-mate	34
3.4 METILXANTINAS.....	35
3.4.1 Reagentes	35
3.4.2 Preparo dos extratos das metilxantinas.....	36
3.4.1 Preparo dos padrões cafeína, teobromina e teofilina.....	36
3.4.3 Análise por CLAE de metilxantinas em amostras de erva-mate.....	36
3.5 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE	37
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 UMIDADE.....	39
4.2 COMPOSTOS FENÓLICOS	39
4.2.1 Validação do método cromatográfico	39

4.2.2 Compostos fenólicos em erva-mate	41
4.3 METILXANTINAS	44
4.3.1 Parâmetros validados para o método cromatográfico	44
4.3.2 Metilxantinas em erva-mate	46
5 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICES	62

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) é uma espécie nativa, destacando-se como fonte econômica, social e ecológica para a região Sul do Brasil, Norte e Leste da Argentina e Paraguai. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de erva-mate, sendo o Estado do Paraná o principal produtor (SIDRA, 2009), atendendo empresas ervateiras para consumo nacional além de fornecer matéria-prima ao segmento industrial ervateiro exportador.

A erva-mate foi plenamente incorporada aos hábitos alimentares dos brasileiros, em particular no Sul do Brasil, onde se destaca o consumo na forma de chimarrão. Contém em sua composição alto teor de metilxantinas e compostos fenólicos. Estes são fontes potenciais de antioxidantes naturais, protegendo os sistemas biológicos do estresse oxidativo (GUGLIUCCI, 1996), além de apresentarem ações anticancerígenas (GONZALEZ DE MEJIA, 2004) e cardioprotetoras (MENINI et al., 2007). A atividade antioxidante da infusão de erva-mate está correlacionada com o conteúdo do flavonóide rutina e dos derivados cafeoilquínicos como os ácidos caféico e 5-cafeoilquínico, entre outros compostos (FILIP et al., 2000). As metilxantinas, cafeína, teobromina e teofilina atuam no organismo estimulando o sistema nervoso central e a diurese (SIMÕES et al., 2004).

A composição química da erva-mate pode variar em função de diversos fatores, como o tipo de cultivo, clima, condições agrônômicas, idade da planta, metodologia de análise e processamento industrial (MAZZAFERA, 1994; REGINATO et al., 1999; DA CROCE, 2002; ESMELINDRO, et al., 2002; GNOATTO et al., 2007), que envolve diferentes etapas que podem modificar sua composição qualitativa e quantitativa e, conseqüentemente, a atividade dos compostos bioativos.

Quando a erva-mate para chimarrão é destinada ao mercado interno brasileiro, normalmente, esta é embalada e comercializada logo após o beneficiamento. Entretanto, quando o produto é para exportação, na maioria dos casos, é submetido a um processo de estacionamento, onde a erva-mate cancheada é embalada em sacos e mantida em depósitos. Existem dois tipos de estacionamento, que podem ser natural (6 meses a 2 anos) e acelerado (30 a 60 dias) (ANDRADE, 1999; DE BERNARDI; PRAT KRICUN, 2001).

O armazenamento ou estacionamento é uma etapa da industrialização que visa levar à formação de componentes aromáticos e a transformação da cor (Nietsche, 2002) verde da erva-mate para amarela, não apreciada pelo consumidor brasileiro, mas uma exigência do principal mercado importador do Brasil, o Uruguai (ALMEIDA, 2007).

Adicionalmente aos fatores naturais, os sistemas de processamento como a industrialização e o beneficiamento interferem diretamente nos componentes físico-químicos da erva-mate, além de determinarem a qualidade do produto e suas características organolépticas que afetam as características do produto comercial (PARANÁ, 2000; CARDOSO JÚNIOR, 2006; ZANOELO; CARDOSO FILHO; CARDOSO JÚNIOR, 2006). É de fundamental importância a caracterização dos compostos bioativos em função das etapas do processamento industrial, o que pode levar a um aumento no valor agregado do produto e, conseqüentemente, ao crescimento na demanda pela erva-mate.

1.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a influência dos sistemas de estacionamento sobre amostras de erva-mate pela avaliação do teor dos compostos fenólicos rutina (Ru), ácido caféico (AC), ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) e das metilxantinas cafeína (Cf), teobromina (Tb) e teofilina (Tf).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver método isocrático por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de compostos fenólicos;
- Determinar o conteúdo de compostos fenólicos (ácido caféico, ác. 5-cafeoilquínico, rutina) e metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina) de seis amostras de erva-mate cancheada;

- Realizar análise dos compostos fenólicos (ácido caféico, ác. 5-cafeoilquínico, rutina) e metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina) em um período de 60 dias, com uma frequência de 10 dias, das amostras submetidas ao sistema de estacionamento acelerado;
- Realizar análise dos compostos fenólicos (ácido caféico, ác. 5-cafeoilquínico, rutina) e metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina) num período de 180 dias, com uma frequência de 30 dias, das amostras submetidas ao sistema de estacionamento natural.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA ERVA-MATE

A produção mundial de erva-mate é estimada em aproximadamente 500 mil toneladas anuais, sendo 260, 180 e 30 mil toneladas na Argentina, no Brasil e no Paraguai, respectivamente. A erva-mate cancheada destaca-se entre os produtos de extração vegetal no Brasil, apresentando, em 2007, uma produção nacional de 225.757 toneladas, sendo o Paraná responsável por aproximadamente 70%, relativos a 156.444 toneladas. Esse resultado representou um aumento de 2% na produção em relação ao ano anterior, que foram 152.971 toneladas (SIDRA, 2009).

No Brasil, o setor ervateiro compreende cerca de 600 municípios da região sul e centro-oeste, com aproximadamente 750 indústrias e 180 mil propriedades rurais produtoras de erva-mate, gerando mais de 710 mil empregos diretos (RODIGHERI; DOSSA; VIELCAHUAMAN, 2009). Além de ser a principal atividade econômica de muitos municípios, rende diretamente aos produtores mais de R\$ 150 milhões, contribuindo fortemente com a agricultura familiar e, conseqüentemente, estimulando a manutenção do agricultor no campo (BRASUR, 2009).

A comercialização de erva-mate em folhas verdes do principal estado brasileiro produtor, o Paraná, atende empresas ervateiras tanto desse estado quanto do Rio Grande do Sul, além de fornecer matéria-prima ao segmento industrial ervateiro exportador, cuja participação está em torno de 25% (PASINATO, 2004; ALMEIDA, 2007).

As exportações da erva-mate brasileira cancheada e beneficiada destinam-se principalmente para o Uruguai e a Síria. Além disso, pode ser exportada nas formas solúvel e em extrato, essência ou concentrado. Em 2005, obteve-se receita de US\$ 25 milhões (Figura 1) oriundas da exportação de aproximadamente 31.000 toneladas de erva-mate, dos quais, 92% destinaram-se ao Uruguai (ALMEIDA, 2007; MUSEU PARANAENSE, 2009).

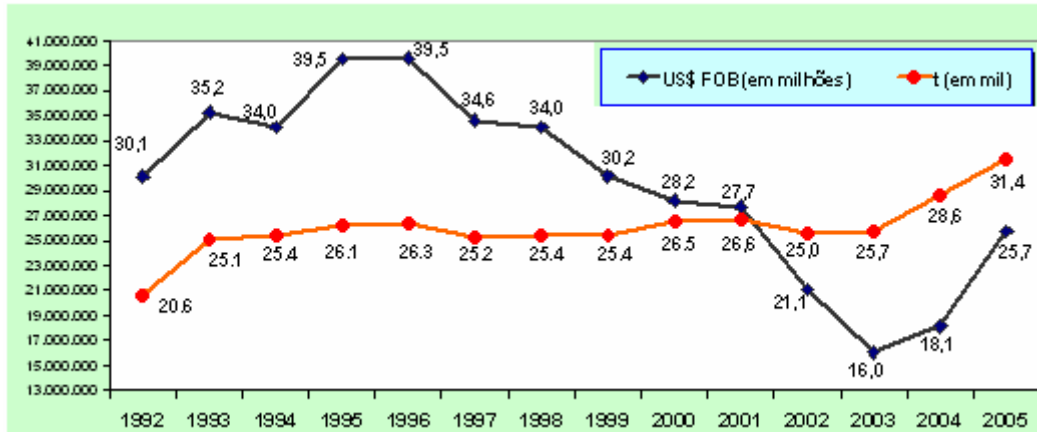


FIGURA 1 - EVOLUÇÃO DAS EXPORTAÇÕES BRASILEIRAS DE ERVA-MATE 1992 A 2005
 FONTE - ALMEIDA (2007)

A folha verde da erva-mate destina-se às agroindústrias cancheadoras para produção de chimarrão, tererê (mate gelado), chá mate e compostos diversos. Já os extratos, essências e concentrados de erva-mate são utilizados em indústrias de bebidas prontas, corantes naturais, cosméticos, higiene e limpeza. Os resíduos como goma e pó são componentes básicos de jóias e bijuterias femininas (ALMEIDA, 2007).

2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS EM ERVA-MATE

De acordo com Alikaridis (1987), o gênero *Ilex*, que inclui cerca de 400 espécies nativas principalmente da Ásia e América do Sul, tem na sua composição química os compostos fenólicos, metilxantinas, aminoácidos e outros compostos nitrogenados, ácidos graxos, compostos terpênicos, alcanos e álcoois, carboidratos, vitaminas e carotenóides.

Pesquisas com extrato de erva-mate identificaram substâncias polifenólicas que apresentam atividade antioxidante (SCHINELLA et al., 2000), inclusive no LDL (SILVA et al., 2008), substâncias com ações anticancerígenas (RAMIREZ-MARES; CHANDRA; GONZALEZ DE MEJIA, 2004) e presença de metilxantinas que estimulam o sistema nervoso central (GONZALES et al., 1993).

Em estudos *in vitro*, o extrato de erva-mate contribuiu na prevenção do câncer (GONZALES DE MEJIA et al., 2005). Já, estudos *in vivo* com infusão de erva-mate demonstraram a capacidade de inibição da auto-oxidação do LDL induzida pelo cobre (GUGLIUCCI, 1996) e a eficácia na redução do peso corporal (DICKEL; RATES; RITTER, 2007) e do colesterol, revertendo em ação tonificante para o coração (GUGLIUCCI, 1995).

Adicionalmente, foi demonstrada ação cardioprotetora da erva-mate em ratos (SCHINELLA; FANTINELLI; MOSCA, 2005) que preveniu a redução da função realizada pelo HDL na proteção contra cardiopatias em humanos (MENINI et al., 2007). No entanto, são necessários mais estudos *in vivo* para demonstrar a relação dos compostos bioativos da *Ilex paraguariensis*, com a inibição a doenças.

As metilxantinas foram, por muito tempo, consideradas os principais compostos de interesse encontrados na erva-mate, sob o ponto de vista farmacológico e terapêutico, sendo a cafeína um dos constituintes mais estudados (ESMELINDRO et al., 2002). Na atualidade, os compostos fenólicos têm se tornado os compostos de grande interesse, devido às propriedades benéficas à saúde, sendo alvo de muitos estudos.

Conhecer a composição de bioativos da erva-mate é fator importante para aumentar o apelo ao consumo do produto, entretanto, trabalhos mostram que existem variações nos teores de um mesmo componente em amostras estudadas (BORTOLUZZI et al., 2006; CARDOSO JÚNIOR et al., 2007). Dessa forma, é necessário estudar os fatores que podem causar alterações nesses compostos químicos, como diferenças nos sistemas de estacionamento ou parte do processamento industrial da erva-mate.

2.2.1 Importância dos compostos fenólicos e metilxantinas da erva-mate

Os compostos fenólicos e metilxantinas são produtos naturais, conhecidos como metabólitos secundários produzidos pelos vegetais, apresentando funções ecológicas importantes como proteção contra herbívoros e patógenos, ação alelopática, além de agir como atrativos para animais polinizadores (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Uma grande variedade de derivados fenólicos são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas, agem como antipatógenos e atuam na proteção contra predadores, como insetos (BUTLER, 1992). Além disso, os fenólicos como os flavonóides funcionam como antibióticos, pesticidas naturais, atraentes para polinizadores, agentes protetores contra a luz ultravioleta, constituem materiais para fazer parede celular impermeável ao gás e à água e como material estrutural para dar estabilidade a planta (SHAHIDI; NACZK, 2004).

Em alimentos, os fenólicos podem contribuir para o amargor, adstringência, pigmentação, sabor, odor e estabilidade oxidativa dos produtos (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Conforme Hoft, Verpoorte e Beck (1998), sob condições de estresse, algumas plantas têm capacidade de aumentar sua produção de alcalóides, como cafeína e teobromina atuando como substâncias de defesa contra insetos e fungos e contra a perda de folhas. Já Mazzafera, Yamaoka-Yano e Vitória (1996) consideram a cafeína como armazenadora de nitrogênio, pois contém quatro átomos de nitrogênio em sua molécula. Entretanto, segundo uma revisão realizada por Ashihara e Suzuki (2004), a função da cafeína em plantas ainda é indeterminada, existindo duas hipóteses: defesa química para proteger o tecido jovem de predadores como larva de insetos e função alelopática ou autotóxica, inibindo a germinação de outras sementes.

Além da composição química rica em metilxantinas e saponinas, os compostos cafeoilquínicos compõem até 12% do peso seco na erva-mate (SCHNEIDER et al., 2006), indicando sua importância na possível determinação do sabor do produto final. Esse também pode ser influenciado por fatores extrínsecos como o método de secagem e estacionamento. Adicionalmente, a percepção de adstringência da bebida de erva-mate tem sido correlacionada positivamente com o conteúdo de polifenóis totais (TAMASI et al., 2006), sendo que para os produtos brasileiros, atualmente, não existem dados publicados para os compostos fenólicos em erva-mate durante estacionamento/armazenagem.

Os benefícios atribuídos ao consumo da infusão de erva-mate estão relacionados aos compostos fenólicos, que atuam como antioxidantes (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007), sendo oxidados em preferência a outros constituintes do alimento ou componentes celulares e tecidos (OLIVEIRA et al, 2006; PELÚZIO; OLIVEIRA, 2006).

Filip et al. (2000) correlacionaram a atividade antioxidante da infusão de erva-mate com conteúdo de rutina, quercetina, kampferol e derivados cafeoilquínicos, os quais têm reconhecida ação antioxidante na saúde humana (GUGLIUCCI, 1996; MENINI et al., 2007; SILVA et al., 2008).

Além dos compostos fenólicos, tem-se a presença das metilxantinas que são responsáveis por alterações no organismo humano, agindo sobre os sistemas nervoso central, cardiovascular, renal e digestivo. Os efeitos são qualitativamente semelhantes, mas quantitativamente diferentes. Em função disso, são empregadas com diferentes finalidades terapêuticas (BRUNETON, 1991).

Estudos relacionados com algumas bebidas largamente consumidas, como café e chá, indicam a ação da cafeína sobre a musculatura estriada e como estimulante do sistema nervoso central. A teobromina e a teofilina aumentam o fluxo sanguíneo renal e a filtração glomerular, demonstrando a atividade diurética dessas (SIMÕES et al., 2004).

O conhecimento do conteúdo desses diferentes componentes químicos, sua correlação com a análise sensorial, os benefícios à saúde humana e o comportamento de acordo com diferentes processamentos são de fundamental importância para o desenvolvimento de novos mercados.

2.2.2 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são biossintetizados nas plantas por meio de diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. As duas rotas metabólicas básicas são: a rota do ácido malônico e a do ácido chiquímico, sendo esta última participante na biossíntese da maioria dos fenóis vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Geralmente, a estrutura compreende um anel aromático, com uma ou mais hidroxilas substituintes, variando desde moléculas fenólicas simples até compostos altamente polimerizados. A maioria dos compostos fenólicos ocorre complexado à carboidratos (mono e polissacarídeos), proteínas e outros componentes vegetais (ROBBINS, 2003), resultando em uma grande variedade de compostos fenólicos na natureza, os quais são categorizados em classes, sendo os ácidos fenólicos, os

flavonóides e os taninos considerados como os principais compostos fenólicos da dieta (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

O grupo de maior ocorrência dos fenólicos são os flavonóides, comumente encontrados em vegetais como legumes, cereais e frutas e seus produtos correlatos como a chá, cidra, óleo e vinho (MAIANI et al., 1997). Possuem o esqueleto difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$) como estrutura comum, que consiste de dois anéis aromáticos (A e B) unidos por um anel heterocíclico oxigenado (C) (Figura 2).

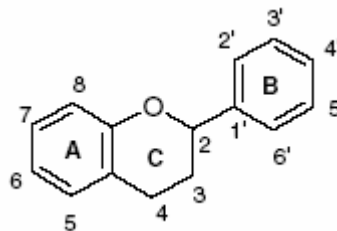


FIGURA 2 - ESTRUTURA GENÉRICA DOS FLAVONÓIDES
 FONTE: BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN (2006)

Os flavonóides apresentam diversidades estruturais, sendo subdivididos em classes (Figura 3) principalmente de acordo com o grau de insaturação e oxidação do anel C, que incluem flavanóis, flavanonas, antocianidinas, flavonas, isoflavonas e flavonóis (RICE-EVANS, 1996; ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997; AHERNE; O'BRIEN, 2002).

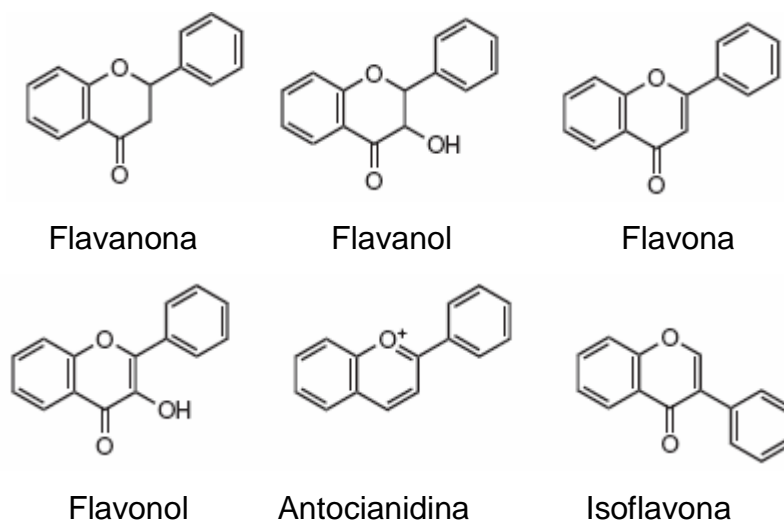


FIGURA 3 - ESTRUTURA GENÉRICA DAS PRINCIPAIS CLASSES DOS FLAVONÓIDES
 FONTE: SHAHIDI; NACZK (2004)

Os flavonóis são diferenciados dos demais flavonóides pela presença do grupo hidroxílico (na posição 3) e do grupo carbonílico (na posição 4), apresentando uma dupla ligação entre os carbonos do anel C.

Os flavonóis ocorrem em alimentos geralmente como O-glicosídeos, no qual um ou mais dos grupos hidroxila do flavonóide se ligam com mono, di ou trissacarídeos. O açúcar mais comumente encontrado é a glicose, seguido da galactose, ramnose, xilose e arabinose. A glicosilação tem um efeito na solubilização do flavonóide em água, permitindo armazenamento no vacúolo celular, onde são comumente encontrados (ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997). Na erva-mate está presente o flavonol glicosídico rutina (Figura 4), que é constituído pela quercetina associada a um dissacarídeo (6-O- α -L-ramnose-D-glucose).

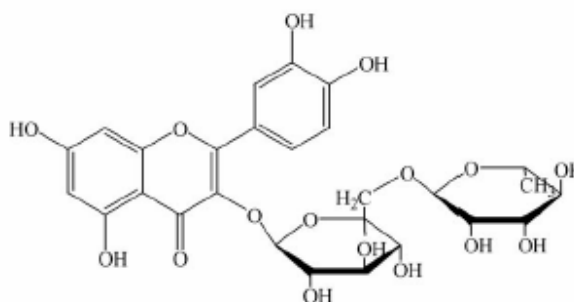


FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DA RUTINA
 FONTE: RIZZO et al. (2006)

Além dos flavonóides, a erva-mate contém ácidos hidroxicinâmicos. Dentro desse grupo classificam-se os ácidos clorogênicos (CGA), que são uma família de ésteres formados entre o ácido quínico e um ou mais resíduos de alguns ácidos trans-cinâmicos, sendo os mais comuns o p-cumárico, o ferúlico e o caféico (CLIFFORD, 2007). O ácido 5-cafeoilquínico é um dos CGA presente na erva-mate (Figura 5), formado pela esterificação do ácido quínico com o ácido caféico (CLIFFORD, 1985).

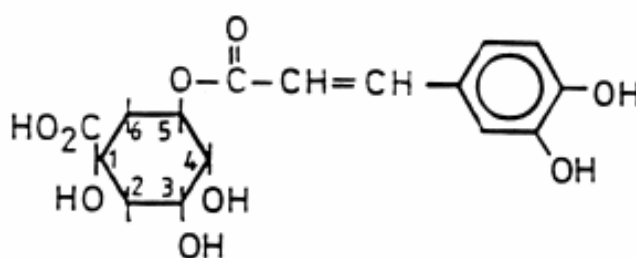


FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO 5-CAFEOILQUÍNICO
 FONTE: DE MARIA et al. (1998)

De acordo com a literatura, os teores analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em base seca de rutina, ácido caféico e ácido 5-cafeoilquínico encontrados na erva-mate variam de 0,60 a 13,00 mg g⁻¹; 0,14 a 0,55 mg g⁻¹ e 5,70 a 28,00 mg g⁻¹, respectivamente (CLIFFORD, 1990; FILIP et al., 2001; BORTOLUZZI et al., 2006; LÓPEZ et al., 2006; CARDOSO JÚNIOR et al., 2007). Além desses, outros ácidos cafeoilquínicos estão presentes na erva-mate, como o 3 e 4-cafeoilquínico e os isômeros 3,4; 3,5 e 4,5-dicafeoilquínicos, com conteúdo variando de 2,7 a 23,2 mg g⁻¹; 2,90 a 9,00 mg g⁻¹; 1,00 a 8,55 mg g⁻¹; 1,7 a 30,40 mg g⁻¹ e 2,10 a 28,90 mg g⁻¹, respectivamente (CLIFFORD, 1990; FILIP et al., 2001). O conteúdo desses compostos na erva-mate é fator importante para estimular o apelo ao consumo do produto sendo que os estudos mostram que existem variações nos teores para um mesmo componente, que podem ocorrer em função da localidade e modo de cultivo (DA CROCE, 2002) ou processamento empregado na industrialização (ZANOELO; CARDOSO FILHO; CARDOSO JÚNIOR, 2006).

Diferentes métodos analíticos são empregados para a extração dos compostos fenólicos em erva-mate, podendo ser por infusão aquosa (FILIP et al., 2001), hidrólise ácida (BASTOS et al., 2006), maceração da amostra (CARDOSO JÚNIOR et al., 2007) seguida de ebulição sob refluxo (CLIFFORD, 1990; RIBANI, 2006) com solução hidroalcoólica.

A CLAE tem sido a metodologia mais empregada na análise de compostos fenólicos em erva-mate, utilizando principalmente gradiente da fase móvel para separação de diferentes classes dos componentes (FILIP et al., 2001; HOFFMANN-RIBANI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006; MENINI et al., 2007) devido à heterogeneidade nas suas características químicas. Entretanto, como muitos laboratórios de instituições disponibilizam sistemas de CLAE equipados apenas com bomba simples de menor custo, então, outra possibilidade seria a utilização da CLAE empregando eluição isocrática, mantendo constante o fluxo da fase móvel na coluna, sistema de fácil operação e com boa reprodução entre diferentes marcas de equipamentos.

Apesar da importância da erva-mate e do avanço no conhecimento sobre os aspectos da produção agrícola e da composição química, não se tem bem estabelecido os fatores que interferem nos compostos fenólicos rutina, AC e 5-CQA e na atividade biológica da erva-mate (CARDOSO JÚNIOR, 2006). O estudo desses fatores poderia estabelecer condições de processo para manutenção dos compostos

bioativos na erva-mate e influenciar a cadeia produtiva com repercussões favoráveis para toda cadeia.

2.2.3 Metilxantinas

As metilxantinas (Figura 6) são metabólitos secundários, derivados do nucleotídeo purina e conhecidos como alcalóides purínicos. A mais abundante na natureza é a cafeína (1,3,7 trimetilxantina), seguida pela teobomina (3,7 dimetilxantina). A teofilina (1,3 dimetilxantina) e outros compostos se encontram em pequenas quantidades, podendo ser intermediários da biossíntese e/ou catabolismo da cafeína (ASHIHARA; SUZUKI, 2004).

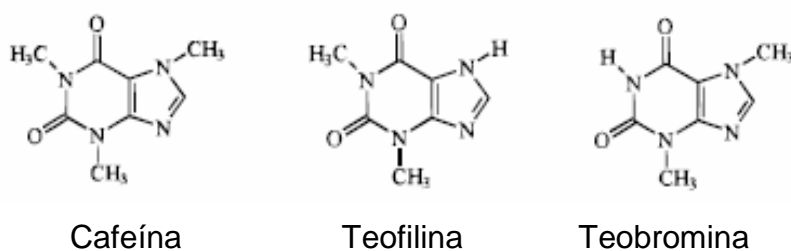


FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS METILXANTINAS

FONTE: SALDANÑA et al. (1999)

Muitos estudos modernos em relação à biossíntese da cafeína iniciaram na década de 1970. A rota original proposta por Suzuki e Takahashi (1975) foi confirmada por Ashihara et al. (1996). A principal rota que ocorre em plantas superiores tem como precursor a xantosina, um nucleosídeo purínico produzido pela degradação dos nucleotídeos adenina e guanina livres (ASHIHARA, 1993; KOSHIISHI, 2001). A rota de síntese (Figura 7) da cafeína é regulada pelas enzimas N-metiltransferases, principalmente pelas 7-Metilxantosina sintetase e cafeína sintetase ou em alguns casos pela teobromina sintetase. A cafeína é sintetizada nos tecidos jovens e a cafeína sintetase encontra-se nos cloroplastos das folhas em desenvolvimento (ASHIHARA, 1993; KOSHIISHI, 2001) sendo armazenada no vacúolo celular na forma de complexos com os CGA (BAUMANN; ROHING, 1989; MOSLI WALDHAUSER; BAUMANN, 1996).

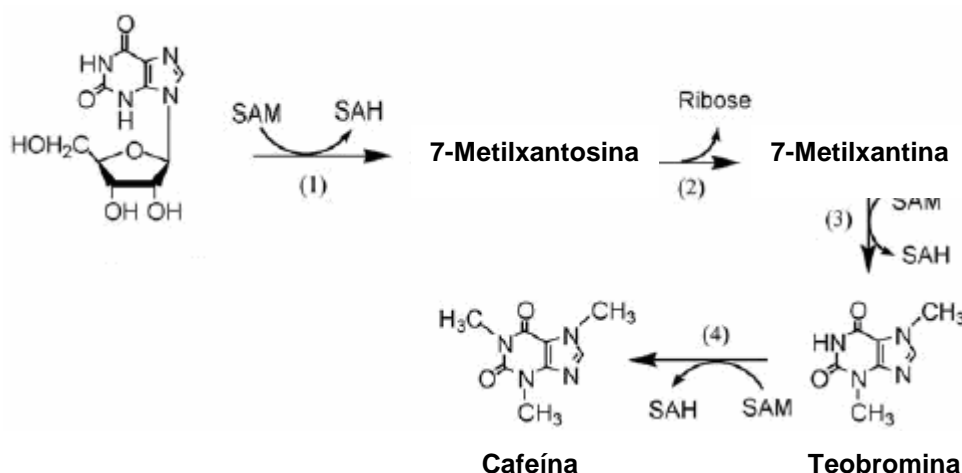


FIGURA 7 – PRINCIPAIS VIAS DA BIOSÍNTESE DA CAFEÍNA EM PLANTAS

NOTA: Enzimas: (1) 7-metilxantosina sintase (xantosina N-metiltransferase), (2) N-metilxantina nucleosidase, (3) teobromina sintetase (7-metilxantina N-metiltransferase) e/ou cafeína sintetase (7-metilxantina e teobromina N-metiltransferase), (4) cafeína sintetase (7-metilxantina e teobromina N-metiltransferase).

FONTE: ASHIHARA; SUZUKI, 2004

Esses compostos orgânicos nitrogenados estão presentes no cacau (SENANAYAKE; WIJESKERA, 1971), chás (FUJIMORI; ASHIHARA, 1990), café (FUJIMORI; ASHIHARA, 1994), guaraná (WECKERLE; STUTZ; BAUMANN, 2003), além da erva-mate (MAZZAFERA, 1994). Na erva-mate têm sido determinados altos conteúdos de cafeína e teobromina, enquanto que a presença de teofilina na maioria dos trabalhos não é detectada.

De acordo com a literatura, os teores analisados por CLAE em base seca de cafeína, teobromina e teofilina encontrados na erva-mate variam, respectivamente, de 0,20 a 21,46 mg g⁻¹; 0,47 a 8,80 mg g⁻¹ e 0,05 a 0,21 mg g⁻¹ (CLIFFORD, 1990; MAZZAFERA, 1994; COELHO et al., 2007), sendo observado a ocorrência de grande variação no conteúdo desses compostos, os quais dependem de uma série de fatores como os aspectos genéticos (REGINATO et al., 1999), método e condições de cultivo (DA CROCE, 2002), idade da planta (MAZZAFERA, 1994), época de colheita (DA CROCE, 2002), tipo de processamento (ESMELINDRO, et al., 2002; SANTOS, 2004) e metodologia de análise (GNOATTO et al., 2007; DUTRA; HOFFMANN-RIBANI, 2007).

O tipo de preparo da erva-mate vai depender da natureza do método analítico envolvido, sendo muitas vezes necessário uma preparação prévia, a fim de conseguir uma extração eficiente do componente em estudo (CECCHI, 2003). Em relação aos alcalóides purínicos, estes requerem um tratamento específico para

extraí-los eficientemente da matriz. São utilizadas diferentes metodologias como: infusão aquosa (BORTOLUZZI et al., 2006), extração com óxido de magnésio (MAZZAFERA, 1994; SANTOS, 2004), ácido sulfúrico seguido de solventes orgânicos (REGINATTO et al., 1999) por decocção e extração com solventes orgânicos (COELHO et al., 2007) ou extração por Soxhlet (BALTASSAT; DARBOUR; FERRY, 1984).

Dutra e Hoffmann-Ribani (2007), em trabalho com amostras de erva-mate, verificaram que a extração ácida por decocção é mais eficiente para liberação da cafeína e teobromina de sua forma complexada com os CGA, quando comparada à extração pelo óxido de magnésio. O resultado encontrado é semelhante ao observado por Gnoatto et al. (2007), que verificaram a influência dos métodos de extração nos teores das metilxantinas em amostras de erva-mate, variando diferentes etapas como alcalinização prévia, processo extrativo por Soxhlet ou decocção, acidificação e utilização de solvente isopropanol ou água para extração final com clorofórmio.

A determinação por CLAE para determinação das metilxantinas é largamente empregada, podendo ser por eluição isocrática (REGINATO, 1999; ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, 2000) ou por gradiente da fase móvel (BORTOLUZZI et al., 2006, CARDOSO JÚNIOR et al., 2007).

São necessários cuidados na adoção da cafeína como parâmetro para controle de qualidade da erva-mate para chimarrão, devido à grande variação não apenas nos seus teores, mas também no conteúdo de teobromina. Segundo a ANVISA, Portaria nº 234 (BRASIL, 1998), o teor da cafeína era um dos parâmetros utilizados como referência para qualidade em erva-mate, entretanto esse não é mais monitorado (BRASIL, 2005).

2.3 PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE

O processamento industrial da erva-mate compreende basicamente as seguintes etapas: colheita, inativação enzimática (sapeco), secagem, cancheamento (moagem), estacionamento e elaboração final (LÓPEZ et al., 2006).

A inativação enzimática tem por finalidade a inativação das polifenoloxidasas que promovem alteração da cor, sabor e aroma das folhas verdes, além da redução da umidade (VALDUGA, 1995), pois essa etapa consiste no contato rápido, em torno de 2 segundos, dos ramos e folhas da erva-mate com as chamas do fogo. O calor rompe as vesículas de água existentes no material vegetal perdendo em média 25% de umidade. O tratamento térmico é realizado em cilindro metálico rotativo, a temperaturas entre 400 - 600°C, podendo chegar a 120°C na superfície das folhas (PARANÁ, 2000; VALDUGA; FINZER; MOSELE, 2003).

Após a inativação enzimática é efetuada a desidratação da massa foliar, pois o excesso de água pode ocasionar deterioração microbiológica e a degradação enzimática dos constituintes nutricionais e químicos da erva-mate (PARANÁ, 2000). O material entra no secador com umidade média de 25% e a secagem é empregada até que o material fique crespo e quebradiço, saindo com aproximadamente 5% de umidade (VALDUGA, 1995; VALDUGA; FINZER; MOSELE, 2003).

Existem dois tipos de secadores mecânicos: rotativo e de esteira. No secador de esteira, o tempo médio é de 3 horas e a temperatura varia entre 90 e 110°C. No secador rotativo, o produto permanece em contato direto com a fumaça por aproximadamente 30 minutos. No entanto, na entrada do secador, a temperatura média é de 350 °C e na saída 110 °C, apresentando uma uniformidade menor na temperatura do processo (ESMELINDRO et al., 2002).

Portanto, as variáveis como a temperatura e o fluxo de ar influenciam diretamente no tempo da secagem, além do tratamento térmico contribuir para a melhoria das características organolépticas, fixação do aroma e sabor da erva-mate (PARANÁ, 2000).

Posteriormente, a massa foliar seca é submetida a um equipamento denominado “cancheador”, sofrendo fragmentação e redução no tamanho das partículas vegetais, originando a erva-mate cancheada. Esse processo visa a redução de volume do material e o aumento da superfície exposta, possibilitando sua interação com a atmosfera levando ao sabor requerido pelo consumidor durante a fase de estacionamento das folhas cancheadas (PRAT KRICUN, 1994).

Quando o objetivo é a produção de chás, a folha cancheada como matéria-prima deve ser utilizada imediatamente. Contudo, se o uso for para chimarrão, a folha deve passar pelo processo de armazenagem ou estacionamento, fundamental para a formação do sabor (CONTRERAS, 2007), visando principalmente melhorar a

formação de componentes aromáticos, ativados desde a fase da inativação enzimática (BERTONI et al., 1992). O estacionamento pode ser realizado utilizando-se dois métodos: natural e acelerado. No primeiro, a erva-mate cancheada é armazenada, ensacada ou a granel, em depósitos por tempos que variam entre 6 meses a 2 anos, que em geral não estão submetidos a nenhum controle ambiental, salvo a esporádica abertura em dias ensolarados e secos com o propósito de ventilá-los.

De acordo com Andrade (1999), o mercado consumidor brasileiro prefere a erva-mate de coloração verde, típica do produto não estacionado. Já o mercado externo, busca produtos de coloração amarela, característica do produto estacionado por maior período de tempo, o que se constitui em maior custo para as indústrias (MAZZA; SCHMALKO, 2006).

Nesse sentido, com o objetivo de reduzir o tempo de estacionamento e os custos decorrentes, foram desenvolvidas as câmaras de estacionamento, onde a erva-mate é mantida em câmaras por períodos que variam de 30 a 60 dias, com temperatura (60-65 °C) e umidade relativa (50%-60%) controladas (DE BERNARDI; PRAT KRICUN, 2001).

Na última etapa tem-se a elaboração final do produto, que consiste no beneficiamento e a embalagem da erva-mate. No beneficiamento, é realizado o soque para atingir a granulometria desejada, separação do material inerte e de pequenas impurezas. De acordo com a granulometria desejada pelas empresas, é feita a mistura dos palitos e folhas para confecção do *blend*. Após o beneficiamento da erva-mate, a mesma segue para ser embalada e comercializada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

A erva-mate utilizada no estudo foi fornecida pela Ervateira Baldo S. A. Comércio, Indústria e Exportação da Unidade de São Mateus do Sul, Paraná. Conforme explica a Figura 8, seis amostras de erva-mate cancheadas de diferentes produtores no estado do Paraná. Três da região de São Mateus do Sul, uma do município de Cruz Machado e outra de Boa Ventura do São Roque. As amostras foram selecionadas aleatoriamente, divididas em dois lotes, acondicionados em sacos de polipropileno de ± 45 kg (gramatura $0,062$ g m⁻²) e posteriormente submetidos aos processos de estacionamento, natural e acelerado.

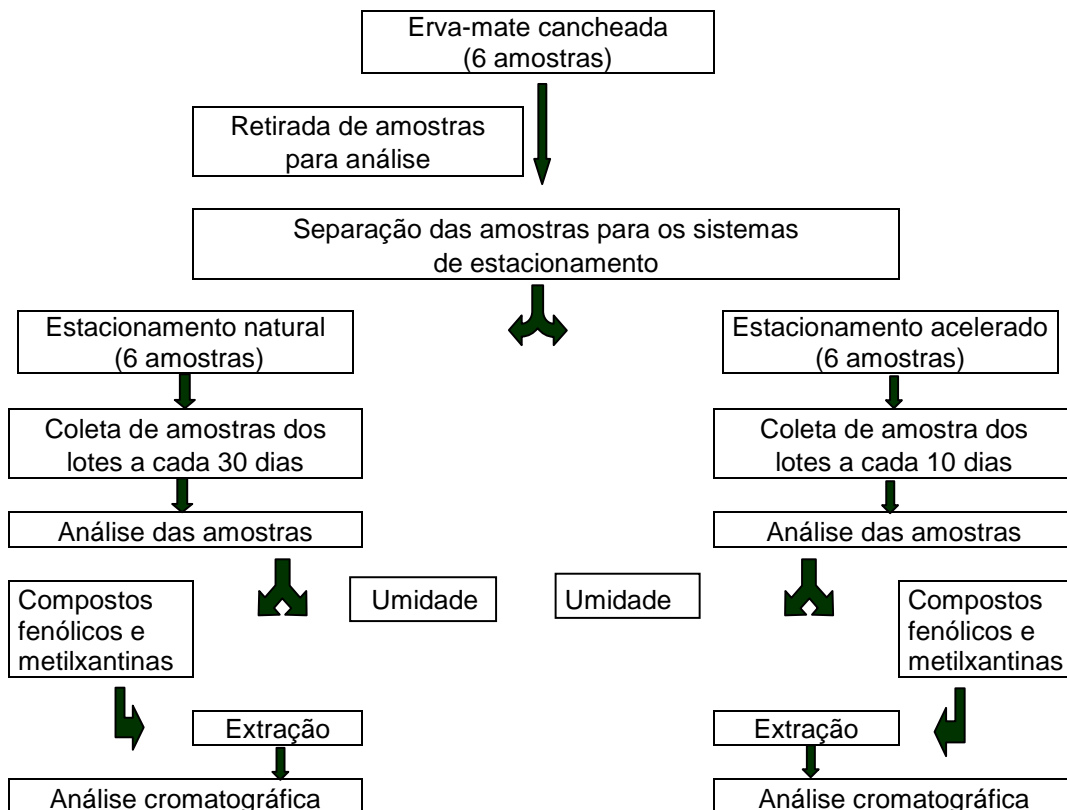


FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO ADOTADO NO ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS SISTEMAS DE ESTACIONAMENTO DE ERVA-MATE NO TEOR DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E DAS METILXANTINAS

As amostras permaneceram estacionadas na referida empresa, de onde foram coletadas periodicamente para análise.

No estacionamento acelerado (EA), amostras de erva-mate ficaram armazenadas em câmaras (Figura 9), sob condições controladas, com umidade relativa variando entre 31,4% – 34,5% e temperatura de 48,9 a 51,4 °C por um período de 60 dias. Durante esse período foram coletados 5 kg de cada amostra no tempo inicial (zero) e com frequência de dez dias para análise das mesmas.

As médias de temperatura e umidade relativa referentes aos sistemas de estacionamento acelerado e natural estão apresentadas nos Apêndices 1 e 2, respectivamente.



FIGURA 9 - PARTE INTERNA DA CÂMARA DE MATURAÇÃO DE ERVA-MATE
FONTE: A autora

As amostras de erva-mate cancheada submetidas ao estacionamento natural (EN) foram acondicionadas em galpão construído em alvenaria sob condições de temperatura e umidade ambiente (Figura 10). O armazenamento foi realizado por um período de seis meses, sendo retirados 5 kg de cada amostra no tempo inicial (zero) e após numa frequência de trinta dias para análise.



FIGURA 10 - ESTRUTURA DO GALPÃO DE MATURAÇÃO DE ERVA-MATE
FONTE: A autora

3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Antes de cada análise, as amostras coletadas foram homogeneizadas e reduzidas por quarteamento. As sub-amostras retiradas, 100 g em média, foram trituradas utilizando um moinho de bancada da IKA, modelo A11 basic, acondicionadas em sacos de polipropileno e armazenadas em freezer ($\pm 8\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o momento da análise.

3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

3.3.1 Reagentes

Os padrões de Ru, AC e 5-CQA foram adquiridos da Sigma Chemicals Co.[®] (St. Louis, EUA). O metanol grau cromatográfico e o ácido acético de grau analítico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Utilizou-se um sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, USA) para purificar a água utilizada no preparo das soluções

padrão e fase móvel. Foi utilizada membrana filtrante com poros de 0,45 µm da Millipore.

3.3.2 Preparo dos extratos dos compostos fenólicos

A extração dos compostos da erva-mate foi realizada de acordo com Ribani (2006), adaptada conforme segue. Maceraram-se 2 g de erva-mate com 100 mL de solução água:etanol 1:1 (v/v) deixando overnight a temperatura ambiente. Seguiu-se com três extrações com 25 mL da solução hidro-etanólica a 50% sob refluxo por 30 minutos. Recolheu-se todos os extratos em balão volumétrico de 250 mL completando-se o volume. Cada hidrolisado foi filtrado em filtro de membrana filtrante com poros de 0,45 µm da Millipore antes da análise cromatográfica.

3.3.3 Preparo dos padrões rotina, ácido caféico e ácido 5-cafeoilquínico

Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela diluição de cada composto fenólico em metanol com concentrações de aproximadamente 1000 µg mL⁻¹, 2000 µg mL⁻¹ e 1000 µg mL⁻¹, para AC, 5-CQA e Ru, respectivamente.

3.3.4 Estabelecimento das condições cromatográficas para análise dos compostos fenólicos

Para definir a condição cromatográfica para separação dos compostos fenólicos, utilizou-se uma solução contendo a mistura de padrões de trabalho com RU, AC e 5-CQA. Primeiramente, empregou-se o cromatógrafo a líquido da Shimadzu, controlado pelo Software Class-VP, equipado com injetor manual Rheodyne, com volume de injeção de 20 µL, bomba (LC-10AD) e detector UV-Vis (SPD-10A) operando em 325 nm e 370 nm. A análise foi conduzida utilizando-se

uma coluna Nova Pak[®] C-18 (3,9 X 150 mm, 4 μm) da Waters com vazão de 1 mL min^{-1} .

Testaram-se diferentes proporções de fase móvel aquosa com metanol contendo 0,5% de ácido acético até estabelecer a melhor separação que foi utilizada como base para definir a separação para a erva-mate, com e sem adição de padrões. Após definir a melhor condição cromatográfica, o procedimento foi repetido utilizando outro sistema de cromatografia líquida, equipado com detector com arranjo de diodos, apresentando o mesmo resultado em relação às condições cromatográficas previamente estabelecidas.

O trabalho foi conduzido em cromatógrafo a líquido Merck Hitachi LaChrom, equipado com injetor automático L-7250. O sistema de detecção utilizado foi UV-vis L-7455 com varredura espectral de 200 a 500 nm, monitorado em 325 nm para detecção do AC e 5-CQA e 370 nm para a Ru. A análise foi desenvolvida utilizando-se uma coluna Bondclone[®] C-18 10 μm (3,9 x 300 mm) da Phenomenex, com volume de injeção de 10 μL e como fase móvel metanol e água, acidificados com 0,5% de ácido acético. A temperatura da coluna foi mantida a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante o período da análise e a vazão da fase móvel foi mantida constante a 1 mL min^{-1} . O Software Merck HSM, versão 4.1, foi utilizado para o tratamento dos dados.

A quantificação dos extratos das amostras foi realizada por padronização externa e as determinações de cada amostra conduzidas em duplicata.

3.3.5 Validação do método de CLAE isocrática para compostos fenólicos em amostras de erva-mate

A seletividade foi avaliada pela comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos na separação frente aos dos padrões e dos espectros no início, meio e fim de cada pico, com o dos respectivos padrões em um banco de dados, utilizando-se isto como uma indicação da presença do composto puro.

A linearidade do método por cromatografia foi verificada para Ru, AC e 5-CQA na faixa de 0,4 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 10,6 a 170,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 20,9 a 628,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. As curvas analíticas foram construídas pela injeção em triplicata

das soluções padrões de trabalho em cinco concentrações diferentes, baseadas nas faixas esperadas dos seus teores na erva-mate.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram definidos pelos parâmetros das curvas analíticas, calculados como a mínima concentração correspondente a $3,3 \times (SD/S)$ e $10 \times (SD/S)$, sendo SD o erro do coeficiente linear e S a inclinação da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

Para verificar a precisão do método, valores de seis repetições da mesma amostra foram analisados quanto à sua repetibilidade, e expressa através do coeficiente de variação (CV) (BRASIL, 2003).

A avaliação da exatidão do método foi realizada segundo o processo de fortificação com padrões e o número de ensaios conforme recomendação da ANVISA (BRASIL, 2003). A exatidão foi verificada em triplicata para três níveis de concentração dos padrões. Prepararam-se nove repetições de 2,0 g da mesma amostra de erva-mate, conforme descrito no item 3.3.2, adicionadas dos padrões antes da extração. Foi adicionado em cada nível 250,0 μL ; 500,0 μL e 1000,0 μL da solução padrão de 1886,0 $\mu\text{g/mL}$ do 5-CQA. A partir da solução padrão do AC com 20,5 $\mu\text{g/mL}$, foi adicionada a cada nível 105,0 μL ; 210,0 μL e 1000,0 μL . Para a Ru foi adicionado 200,0 μL ; 400,0 μL e 1000,0 μL da solução estoque de 1063,0 $\mu\text{g/mL}$. Assim as quantidades de cada padrão adicionadas em cada nível foram, respectivamente, de 472,0; 943,0 e 1886,0 μg para 5-CQA; 2,2; 4,3 e 20,5 μg para AC e 212,6; 425,0 e 1063,0 μg para Ru.

3.4 METILXANTINAS

3.4.1 Reagentes

Os padrões de cafeína, teobromina e teofilina foram adquiridos da Sigma Chemicals Co.[®] (St. Louis, EUA). O metanol grau cromatográfico e o ácido sulfúrico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Utilizou-se um sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, USA) para purificar a água utilizada no preparo das soluções

padrão e fase móvel. Foi utilizada membrana filtrante com poros de 0,45 μm da Millipore.

3.4.2 Preparação dos extratos das metilxantinas

A extração foi obtida conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005), adaptada conforme segue. Amostras de 2 g de erva mate foram pesadas em copos de Becker (100 mL), adicionou-se 4,0 mL de ácido sulfúrico, homogeneizou-se e manteve-se em banho-maria por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se 50 mL de água quente, mantendo-se em banho-maria por mais 15 minutos com subsequente filtração em papel filtro qualitativo. Após resfriamento até a temperatura ambiente, os extratos foram neutralizados com hidróxido de sódio a 40%, transferidos para um balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água destilada (BRASIL, 2005). Cada extrato foi filtrado em filtro de membrana filtrante com poros de 0,45 μm da Millipore antes da análise cromatográfica.

3.4.3 Preparo dos padrões cafeína, teobromina e teofilina

Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela diluição de cada metilxantina em solução aquosa com metanol 50:50 (v/v) com concentrações de aproximadamente 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para teofilina, teobromina e cafeína, respectivamente.

3.4.4 Análise por CLAE de metilxantinas em amostras de erva-mate

Empregou-se um cromatógrafo a líquido da Shimadzu, controlado pelo Software Class-VP, equipado com injetor manual Rheodyne, com volume de injeção de 20 μL , bomba (LC-10AD) e detector UV-Vis (SPD-10A) operando em 272 nm e

254 nm. A análise foi conduzida utilizando-se uma coluna Sinergi[®] Hidro-RP 80A (3,9 X 150 mm, 4 µm) da Phenomenex.

A condição cromatográfica seguida foi conforme Reginatto (1999), com modificação. Utilizou-se como fase móvel metanol-água (25:75, v/v) e um fluxo de 1,0 mL min⁻¹.

A quantificação dos extratos das amostras foi realizada por padronização externa e as determinações de cada amostra conduzidas em duplicata.

A linearidade do método por cromatografia foi verificada para teobromina, teofilina e cafeína na faixa de 1,6 a 480,1 µg mL⁻¹. As curvas analíticas foram construídas pela injeção em triplicata das soluções padrões de trabalho em cinco concentrações diferentes, baseadas nas faixas esperadas dos seus teores na erva-mate.

Os LD foram definidos pelo parâmetro da curva analítica, calculados como a mínima concentração $3,3 \times (SD/S)$, sendo SD o erro do coeficiente linear e S a inclinação da curva analítica (SHABIR, 2003).

Avaliou-se a seletividade pela comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos na separação frente aos dos padrões, e pela comparação dos espectros com o dos respectivos padrões em um banco de dados. Para isso, utilizou-se um cromatógrafo a líquido Merck Hitachi LaChrom. O sistema de detecção utilizado foi UV-vis L-7455 com varredura espectral de 200 a 500 nm, monitorado em 254 nm e 272 nm para detecção da teobromina, teofilina e da cafeína. A análise foi desenvolvida utilizando-se as mesmas coluna e constituição da fase móvel utilizadas para a determinação dos compostos nas amostras de erva-mate.

3.5 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE

Paralelamente às análises cromatográficas, conduziu-se a determinação da umidade em cada uma das amostras coletadas. A metodologia adotada foi conforme Brasil (2005), que consistiu na secagem direta em estufa a 105 °C até peso constante.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey. O programa utilizado para análise estatística foi o Statistix 8.0 (2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 UMIDADE

O teor de umidade média nas seis amostras de erva-mate analisadas para cada estacionamento estão apresentados na Tabela 1. Observa-se que ocorreu diferença significativa nos teores de umidade durante os estacionamentos. Em função desse resultado, o conteúdo dos compostos analisados foi calculado em base seca.

TABELA 1 - TEOR DE UMIDADE EM ERVA-MATE ARMAZENADA POR DIFERENTES TEMPOS (T0 A T180) NOS SISTEMAS ACELERADO E NATURAL

Estacionamento	Umidade (%)										
	T0	T10	T20	T30	T40	T50	T60	T90	T120	T150	T180
Acelerado	9,3 a	7,2 b	9,4 a	8,9 a	9,2 a	7,9 b	8,0 b	*	*	*	*
Natural	9,3 b	*	*	10,7a	*	*	8,9 b	8,8 b	10,1 a	8,9 b	10,6 a

NOTA: Médias seguidas por letras iguais, na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; * = não ocorreu coleta de amostras nesses tempos; T = Tempo (dias).

4.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

4.2.1 Validação do método cromatográfico

A separação do extrato de erva-mate, com e sem adição de padrões, foi conduzida sob a melhor condição obtida para mistura dos padrões, em sistema de cromatografia a líquido da Shimadzu.

A proporção da fase móvel aplicada variou de 15:85 (metanol:água) até 42:58 (metanol:água), sempre com 0,5% de ácido acético. Observou-se que na proporção de metanol menor que 30%, a rutina ficou retida na coluna. Para a proporção de até 34% de metanol a separação do ácido caféico e 5-CQA foi eficiente, entretanto, nessas condições, na análise da amostra, o pico da Ru apresentou-se sobreposto a um outro componente da erva-mate. A separação do

AC, 5-CQA e Ru na amostra foi otimizada utilizando-se fase móvel metanol e água (35:65, v/v) acidificados com 0,5% de ácido acético.

A separação do extrato de erva-mate, com e sem adição de padrões, foi então reproduzida em cromatógrafo a líquido da Merck Hitachi LaChrom, utilizando-se uma coluna Bondclone® C-18 (3,9 X 300 mm, 10 µm) da Phenomenex, sob a melhor condição conseguida para o sistema da Shimadzu.

Por meio da comparação dos tempos de retenção e espectros dos picos obtidos na separação com os correspondentes tempos de retenção e espectros dos padrões, confirmou-se a separação eficiente do flavonol Ru, e dos derivados hidroxicínâmicos, 5-CQA e AC, dos demais componentes presentes na erva-mate estudada (Figura 11), comprovando a seletividade da separação (Apêndice 4).

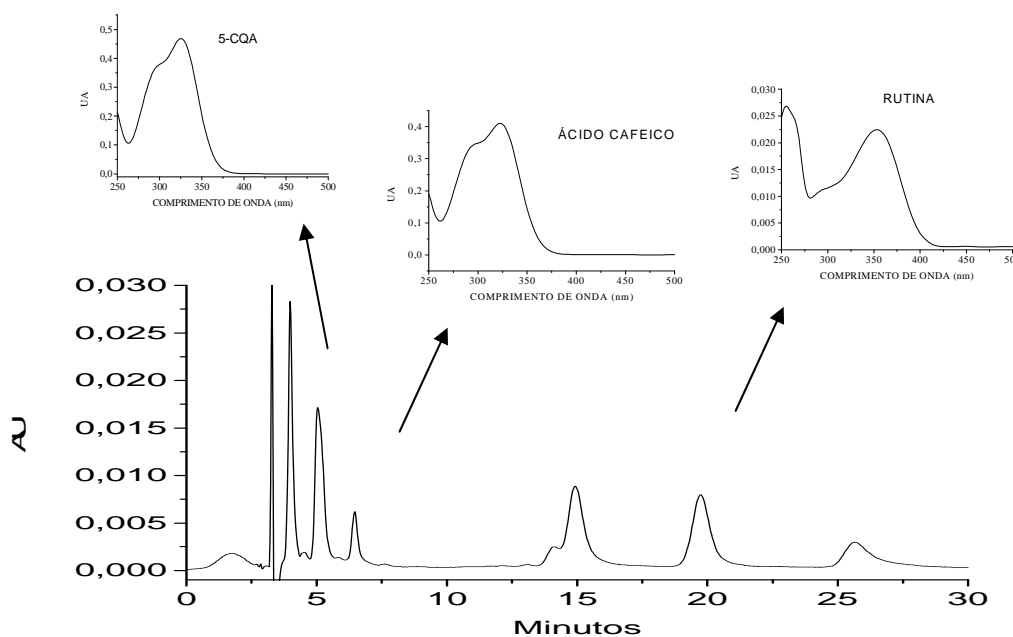


FIGURA 11 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE ERVA-MATE ADICIONADA DOS PADRÕES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E RESPECTIVOS ESPECTROS (250 A 500 nm) OBTIDOS COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS.

NOTA: Condições da análise cromatográfica: coluna Bondclone® C-18 (3,9 X 300 mm, 10 µm) da Phenomenex, utilizando como fase móvel água e metanol (65:35, v/v) acidificado com 0,5% de ácido acético e vazão constante de 1,0 mL min⁻¹, detecção a 370 nm.

Em relação à linearidade do método, as curvas analíticas apresentaram-se lineares nas faixas de concentrações estudadas (Apêndice 5), com coeficientes de determinação de 0,9990 a 0,9997 (Tabela 2).

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DAS CURVAS-PADRÃO DO ÁCIDO CAFÉICO, 5-CQA E RUTINA

Compostos	Faixa de concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Coefficiente de determinação (r^2)
Rutina	10,63 a 170,08	0,9984
Ac. caféico	0,412 a 5,00	0,9998
5 – CQA	20,96 a 628,74	0,9980

Os LD e LQ do método obtidos pelos parâmetros das curvas analíticas para a rutina, ácido caféico e 5-CQA são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 - LD e LQ OBTIDOS PELOS PARÂMETROS DAS CURVAS ANALÍTICAS

Compostos	LD (mg g^{-1})	LQ (mg g^{-1})
Rutina	0,29	0,88
Ac. caféico	0,01	0,03
5 – CQA	0,30	0,90

A exatidão do método foi demonstrada pela média dos valores obtidos na recuperação de 95,6%; 97,3% e 95,7%, respectivamente, para Ru, AC e 5-CQA. A precisão (repetitividade) foi demonstrada pelos coeficientes de variação das determinações das amostras de erva-mate (Tabela 4).

TABELA 4 - COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE

Amostras (n=6)	Rutina (mg g^{-1})	Ac. caféico (mg g^{-1})	5-CQA (mg g^{-1})
X	9,00	0,17	34,10
S	0,20	0,01	0,60
CV (%)	2,07	2,96	1,79

NOTA: X = teor médio das amostras de erva-mate; S = desvio padrão das amostras de erva-mate.

4.2.2 Compostos fenólicos em erva-mate

As seis amostras quando analisadas por localidade de cultivo apresentaram variações significativas para as médias nos teores dos compostos ao longo dos estacionamentos, porém sem uma tendência definida para a variação por Tukey conforme Apêndice 6. Como cada amostra foi proveniente de misturas de distintas progênies e partes da árvore, sob diferente incidência solar e solos, considerou-se que esses fatores, conforme estabelecido por Edreva (2005), para os metabólitos secundários de plantas, podem ter influenciado na variação dos resultados.

Quanto ao tipo de estacionamento, de acordo com os resultados da análise de variância para Ru, 5-CQA e AC (Tabela 5), obtidos da média geral das seis amostras, houve influência significativa apenas na variável ácido caféico.

TABELA 5 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS DETERMINAÇÕES DE ÁCIDO CAFÉICO (AC), ÁCIDO 5-CAFEOILQUÍNICO (5-CQA) E RUTINA (Ru) EM ERVA-MATE ESTACIONADA

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio		
		AC (mg g ⁻¹)	5-CQA (mg g ⁻¹)	Ru (mg g ⁻¹)
Tipo de estacionamento	1	9,633E-04*	0,4272ns	0,0009ns
Erro experimental	10	1,066E-04	1,0241	0,6516
Total	11	-	-	-
Coeficiente de variação		15,932	9,02	35,69

NOTA: ns – não significativo; * - significativo ao nível de 5% de probabilidade.

O teste de Tukey para comparação de médias (Tabela 6) não detectou diferenças significativas entre as médias da determinação de 5-CQA e rutina para os tipos de estacionamentos testados. De acordo com De Maria et al. (1998), o composto 5-CQA apresenta estabilidade quando submetido a 40°C por até 60 minutos, perdendo apenas quantidades traços. Com temperatura de 100°C, ocorre uma perda de 6% em 5 minutos, chegando a 24% após 60 minutos de exposição, diminuindo sua estabilidade com o aumento do tempo e da temperatura. O mesmo comportamento foi observado por Benincá (2009) que não observou redução deste componente a 90 °C, percebendo alguma alteração somente a partir de 125 °C.

Para a variável AC (Tabela 6), o teor foi maior no estacionamento acelerado (0,23 mg g⁻¹) quando comparado ao estacionamento natural (0,18 mg g⁻¹).

TABELA 6 – MÉDIAS DOS TEORES DE RUTINA (Ru), ÁCIDO CAFÉICO (AC) E ÁCIDO 5-CAFEOILQUÍNICO (5-CQA) PARA OS ESTACIONAMENTOS NATURAL E ACELERADO²

Tratamentos	AC (mg g ⁻¹)	5-CQA (mg g ⁻¹)	Ru (mg g ⁻¹)
Estacionamento natural	0,18 ± 0,05 b	34,88 ± 6,39 a	7,12 ± 2,78 a
Estacionamento acelerado	0,23 ± 0,07 a	36,08 ± 4,78 a	7,18 ± 2,27 a

NOTA: Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade; ² Média de seis repetições ± desvio padrão.

De acordo com a Figura 12, observa-se que o conteúdo de AC durante o EA aumenta significativamente, confirmado pela análise de variância e demonstrado pelo teste de Tukey para as médias (Tabela 7).

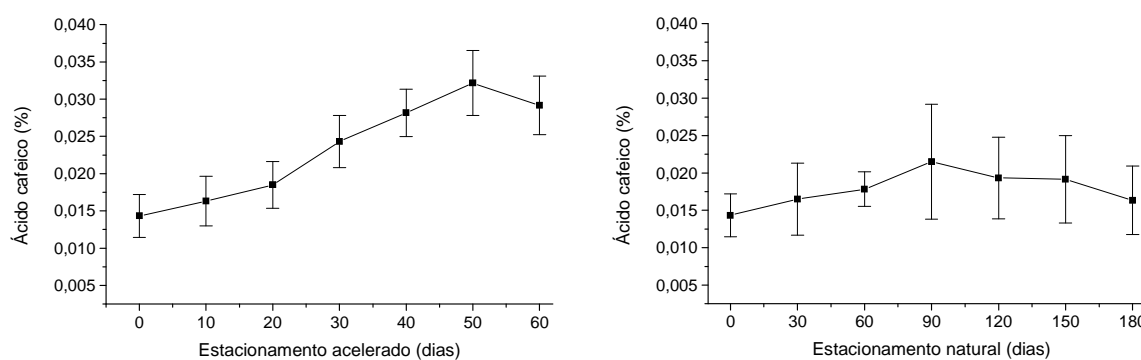


FIGURA 12 - CONTEÚDO DE ÁCIDO CAFÉICO EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE ARMAZENADA NO ESTACIONAMENTO ACELERADO E NATURAL EM FUNÇÃO DO TEMPO

TABELA 7 – MÉDIAS DOS TEORES DE ACIDO CAFÉICO, EM ERVA-MATE ARMAZENADA EM ESTACIONAMENTO ACELERADO ANALISADA A CADA 10 DIAS

Amostras ¹	Estacionamento acelerado – Ácido caféico (mg g ⁻¹ em base seca)						
	T 0	T 10	T 20	T 30	T 40	T 50	T 60
AC	0,14 d	0,16 d	0,19 cd	0,24 bc	0,28 ab	0,32 a	0,29 ab

NOTA: Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; T = Tempo (dias); ¹- Média de seis repetições ± desvio padrão.

Por hidrólise, o AC pode ser liberado dos outros derivados cafeoilquínicos (3 e 4-cafeoilquínico e 3,4; 3,5 e 4,5-dicafeoilquínicos) também presentes na erva-mate (CLIFFORD, 1990) e que não foram monitorados neste experimento. López et al. (2006) observaram uma redução no teor do 3,5-dicafeoilquínico para amostra de erva-mate analisada antes e após um estacionamento acelerado.

Os valores obtidos de AC e RU no presente trabalho variaram de 0,09 a 0,38 mg g⁻¹ e 3,20 a 12,70 mg g⁻¹ (Apêndices 7 e 8), respectivamente, sendo concordantes aos relatados pela literatura (Tabela 8), mesmo para amostras preparadas por infusão aquosa. A grande variabilidade nos resultados para amostras pode ser explicada em função da influência da variabilidade genética e localidade de cultivo (CARDOSO JÚNIOR, 2006) no acúmulo desses compostos, bem como pela diferença nas metodologias de análise adotadas.

TABELA 8 – NÍVEIS DE ÁCIDO 5-CAFEOILQUÍNICO (5-CQA), ÁCIDO CAFÉICO (AC) E RUTINA (Ru) EM AMOSTRAS PREPARADAS DE ERVA-MATE (mg g^{-1}) EM BASE SECA

Referência	Amostras	Preparo das amostras*	5-CQA	AC	Ru
Presente trabalho	n = 6	1	18,50 a 48,11	0,09 a 0,38	3,19 a 12,62
Clifford (1990)	n= 5	1	5,70 a 20,20	-	-
Filip et al. (2001)	n= 3	2	$28,0 \pm 3,0$	$0,23 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,05$
López et al. (2006)	n=1	2	$20,3 \pm 0,5$	$0,35 \pm 0,02$	$13,0 \pm 0,3$
Ribani (2006) *	n= 6	1	13 a 24,3	-	2,50 a 7,50
Bortoluzzi et al. (2006)*	n= 7	2	2,93 a 19,18	0,42 a 0,55	-
Cardoso Júnior et al. (2007)	n=16	1	7,86 a 9,32	0,14 a 0,20	-
Marques; Farah (2009)	n=3	1	$17,99 \pm 0,77$	$0,15 \pm 0,007$	-

NOTA: * base úmida; 1= Extração alcoólica; 2= Infusão aquosa.

O comportamento observado para Ru e 5-CQA durante EA foi semelhante ao observado por López et al. (2006), que comparando os teores em uma amostra de erva-mate Argentina, antes e após o armazenamento num sistema de EA, não constataram diferenças significativas nas concentrações desses compostos.

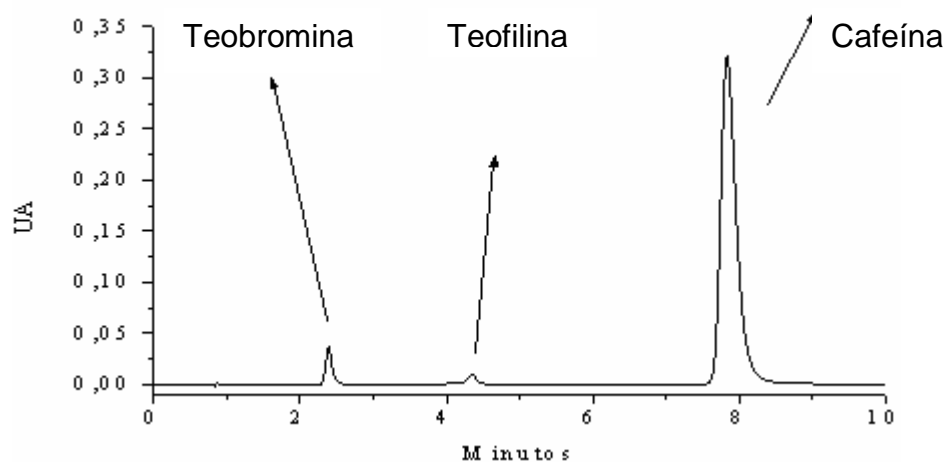
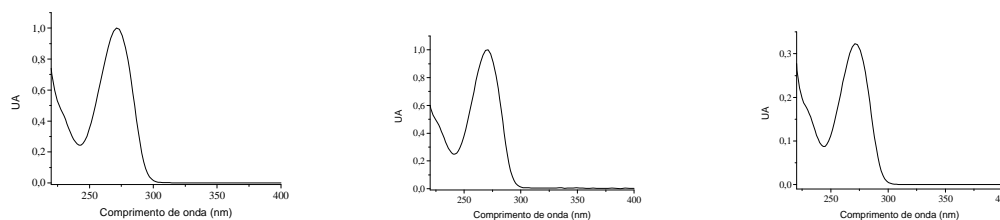
Os valores obtidos para 5-CQA variaram nas amostras de 8,60 a 48,50 mg g^{-1} (Apêndices 7 e 8), sendo a média geral $34,90 (\pm 6,4)$ e $36,10 (\pm 4,8)$ mg g^{-1} , respectivamente, para erva-mate estacionada nos sistemas natural e acelerado, superior aos valores reportados na literatura (Tabela 8).

4.3 METILXANTINAS

4.3.1 Parâmetros validados para o método cromatográfico

Para validar a seletividade, foi realizada uma corrida cromatográfica nas mesmas condições de análise conforme descrito em 3.4.4 em um sistema a líquido da Merck Hitachi LaChrom, utilizando-se uma coluna Sinergi[®] Hidro-RP 80A (3,9 X 150 mm, 4 μm) da Phenomenex, e sistema de detecção UV-VIS L-7455 com varredura espectral de 200 a 400 nm, monitorado em 272 nm. Por meio da comparação tempos de retenção dos picos obtidos na separação frente aos dos padrões e dos espectros obtidos na separação com os espectros dos padrões, confirmou-se a separação eficiente das metilxantinas, teobromina, teofilina e cafeína, dos demais componentes presentes na erva-mate estudada (Figura 13).

A)



B)

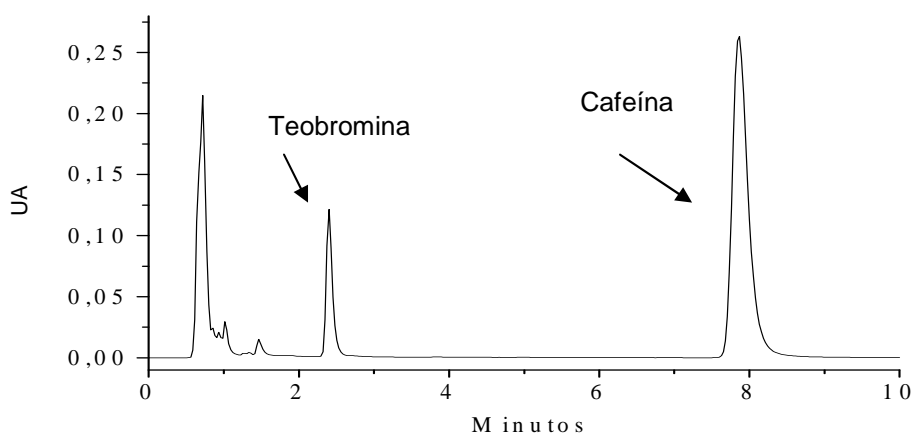


FIGURA 13 - CROMATOGRAMA A) PADRÕES: TEOBROMINA, TEOFILINA E CAFEÍNA E RESPECTIVOS ESPECTROS (250 A 400 nm) OBTIDOS COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS; B) AMOSTRA DE ERVA-MATE

NOTA: Condições da análise cromatográfica: coluna Sinergi[®] Hidro-RP 80A (3,9 X 150 mm, 4 μ m) da Phenomenex, utilizando como fase móvel metanol:água (25:75, v/v) e vazão constante de 1,0 mL min⁻¹; Detectados em 272 nm.

Em relação à linearidade do método, as curvas analíticas apresentaram-se lineares nas faixas de concentrações estudadas (Apêndice 9), com coeficientes de determinação de 0,9997 a 0,9999 (Tabela 9).

TABELA 9 - CARACTERÍSTICAS DAS CURVAS ANALÍTICAS DOS PADRÕES CAFEÍNA, TEOBROMINA E TEOFILINA

Compostos	Faixa de concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Coefficiente de determinação (r^2)
Cafeína	48,08 a 480,80	0,9997
Teobromina	2,02 a 20,16	0,9999
Teofilina	1,56 a 5,20	0,9998

Os LD e LQ do método obtidos pelos parâmetros das curvas analíticas para a cafeína, teobromina e teofilina estão expostos na Tabela 10.

TABELA 10 - LD e LQ OBTIDOS PELO MÉTODO DAS CURVAS ANALÍTICAS

Compostos	LD (mg kg^{-1})	LQ (mg kg^{-1})
Cafeína	323,04	978,90
Teobromina	17,64	53,45
Teofilina	14,06	42,60

4.3.2 Metilxantinas em erva-mate

Os teores de metilxantinas, considerando as seis amostras por localidade de cultivo, variaram significativamente ao longo dos estacionamentos, quando analisadas por Tukey conforme Apêndice 10. Esse comportamento provavelmente ocorreu em função das amostras serem compostas de misturas de distintas progênes, com plantas de diferentes idades, incidência solar e solo variáveis, que está de acordo com o observado por Edreva (2005), Mazzafera (1994), Reginatto et al. (1999), Da Croce (2002) e Cardoso Júnior (2006).

Não foi detectada a presença de teofilina nas amostras analisadas. Quanto ao tipo de estacionamento, de acordo com os resultados da análise de variância (Tabela 11), obtidos da média geral das seis amostras, não houve influência significativa para as variáveis Cf e Tb, confirmado pelo teste de Tukey para comparação de médias (Tabela 12) que estabelece não haver diferenças significativas entre as médias da determinação de Cf e Tb para os tipos de estacionamentos testados (Figura 14).

TABELA 11 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS DETERMINAÇÕES DE CAFEÍNA E TEOBROMINA EM ERVA-MATE ESTACIONADA

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	
		Cafeína (mg g^{-1})	Teobromina (mg g^{-1})
Tipo de estacionamento	1	0,0686 ns	0,0046 ns
Erro experimental	10	0,5370 ns	0,0464 ns
Total	11		
Coefficiente de variação	-	31,65%	39,94%

NOTA: ns – não significativo; * - significativo ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 12 – MÉDIA DOS TEORES DE CAFEÍNA E TEOBROMINA PARA O ESTACIONAMENTO NATURAL E ACELERADO*

Tratamentos	Cafeína (mg g^{-1})	Teobromina (mg g^{-1})
Estacionamento natural	$7,56 \pm 2,37$ a	$1,77 \pm 0,76$ a
Estacionamento acelerado	$7,08 \pm 2,26$ a	$1,64 \pm 0,60$ a

NOTA: Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade; * - Média de seis repetições \pm desvio padrão.

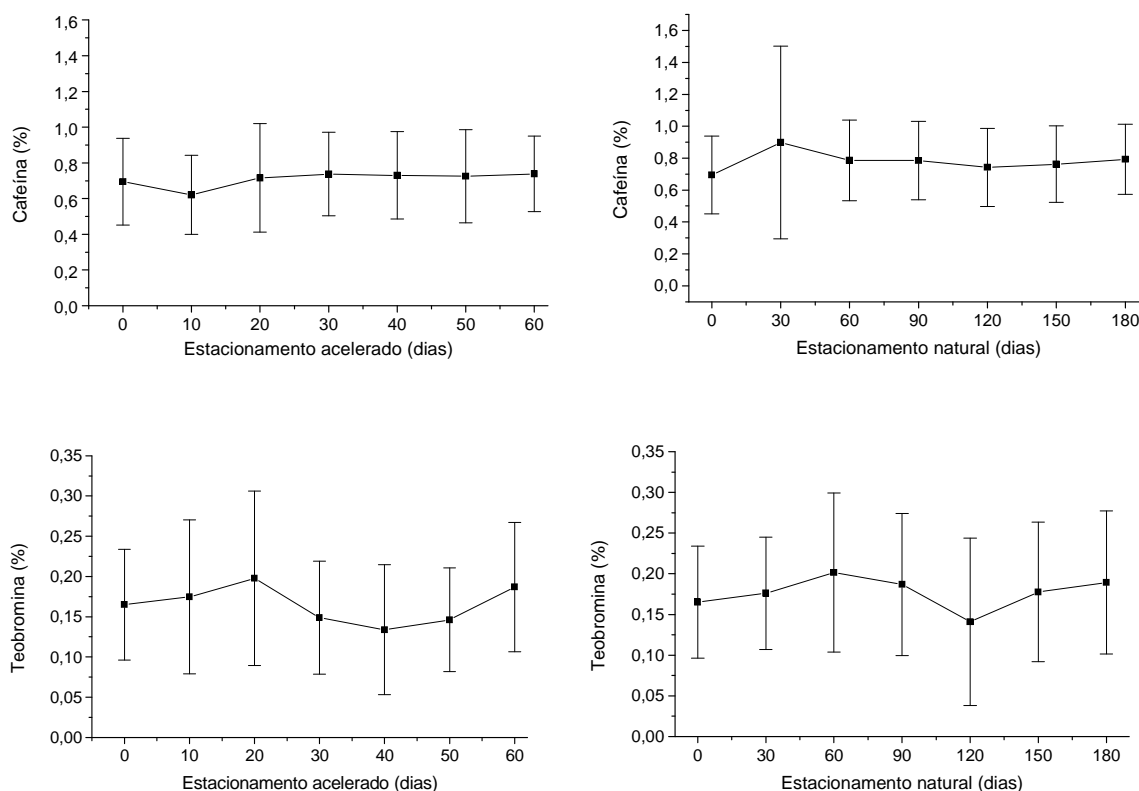


FIGURA 14 - CONTEÚDO DE CAFEÍNA E TEOBROMINA EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE ARMAZENADAS NO ESTACIONAMENTO ACELERADO E NATURAL EM FUNÇÃO DO TEMPO

Esmelindro (2002) não observou alteração significativa no conteúdo de cafeína em amostras de erva-mate cancheada armazenada por 21 dias em condições ambientais, de forma semelhante ao resultado encontrado no presente trabalho, para o EN.

Em relação ao EA, comparando os teores na erva-mate, antes e após o período de estacionamento, não foi constatado diferenças significativas para Cf e Tb. Esse resultado é semelhante ao encontrado por López et al. (2006).

Adicionalmente, sabe-se que a cafeína é armazenada na planta no vacúolo celular na forma de complexos com os CGA, como o 5-CQA (BAUMANN; ROHING, 1989; MOSLI WALDHAUSER; BAUMANN, 1996). De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que os conteúdos de Cf e 5-CQA se mantiveram constantes durante o armazenamento, podendo-se supor que as condições em que as amostras de erva-mate foram submetidas tanto no EN quanto no EA não são eficientes para causar alteração desses compostos.

Santos (2004) acompanhou a vida-de-prateleira da erva-mate em diferentes embalagens. A erva-mate foi mantida nas embalagens em estufa climática com temperatura de 25 °C e umidade relativa média de 50 %, sendo observado um aumento significativo no teor de cafeína no final dos 180 dias de armazenamento. Conforme o próprio autor, esse aumento pode ter ocorrido em função do óxido de magnésio empregado na extração não ser eficiente para, no preparo analítico da amostra, quebrar o complexo entre a cafeína e os CGA, sendo o aumento expressão apenas da fração de cafeína descomplexada ao longo do tempo.

Os valores em base seca obtidos de Cf e Tb no presente trabalho variaram de 2,97 a 11,4 mg g⁻¹ e, 0,24 a 3,52 mg g⁻¹ (Apêndice 7 e 8), respectivamente, estando incluídos na faixa de variação dos dados relatados pela literatura (Tabela 13), mesmo para diferentes procedimentos de preparo das amostras.

TABELA 13 - COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE XANTINAS EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE PESQUISADAS POR DIVERSOS AUTORES

Autores	Amostras	Preparo das amostras	Cafeína (mg g ⁻¹)	Teobromina (mg g ⁻¹)
Presente trabalho	n=84	Decocção/Acidificação	2,97 a 11,4	0,24 a 3,52
Clifford (1990)	n=5	Extração alcoólica	8,90 a 17,30	4,50 a 8,80
Mazzafera (1994)	n=2	MgO	0,60 - 9,15	0,90 - 4,32
Reginatto et al. (1999)	n=1	H ₂ SO ₄ e solvente	6,50	1,20
Bortoluzzi et al. (2006) *	n=7	Infusão aquosa	3,80 - 7,63	0,27 - 2,09
López et al. (2006)	n=1	Infusão aquosa	13,60 - 13,90	4,60 - 4,40
Coelho et al. (2007)	n=18	Decocção e solvente	0,20 a 21,46	0,47 a 8,45
Gnoatto et al., 2007*	n = 6	Decocção/Acidificação	7,10 e 7,90	1,60 e 5,10

NOTA: * base úmida.

A grande variabilidade nos resultados apresentados pelos diferentes estudos também pode ser considerada como influenciada pelas variáveis, como a idade da planta (MAZZAFERA, 1994), diferentes variedades (REGINATO et al., 1999), marcas comerciais (BORTOLUZZI et al., 2006), métodos e condições de cultivo (DA CROCE, 2002), época de colheita (DA CROCE, 2002) e metodologia de análise (GNOATTO et al., 2007).

CONCLUSÕES

As condições cromatográficas estabelecidas para separação no modo isocrático dos compostos fenólicos em erva-mate foram: fase móvel água e metanol, na proporção de 65:35 (v/v), acidificados com 0,5% ácido acético, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e coluna cromatográfica Phenomenex Bondclone® C-18 (3,9 X 300 mm) com partículas de 10 µ.

A metodologia isocrática desenvolvida permitiu separar e quantificar compostos fenólicos de diferentes classes (flavonóides de ácidos hidroxicinâmicos) em erva-mate.

Os teores de RU, AC e 5-CQA, obtidos para a média global das seis amostras, foram concordantes aos dados relatados em outros trabalhos sendo 0,18 mg g⁻¹ e 0,23 mg g⁻¹ para o AC e 7,12 e 7,18 mg g⁻¹ para Ru, respectivamente, para os sistemas de estacionamento natural e acelerado. As médias obtidas para o 5-CQA foram 34,90 e 36,10 mg g⁻¹, respectivamente, para EN e EA e superiores aos valores médios apresentados por outros autores.

O estudo observou que os conteúdos da Ru e 5-CQA, presentes na erva-mate não sofreram influência dos sistemas de estacionamento, enquanto que o teor do AC aumentou apenas no EA.

Os teores de Cf e Tb nas amostras de erva-mate para o estacionamento natural variaram de 2,97 a 11,30 mg g⁻¹ e 0,24 a 2,86 mg g⁻¹, respectivamente, e para o estacionamento acelerado de 3,12 a 11,36 mg g⁻¹ e 0,51 a 3,52 mg g⁻¹, respectivamente, para Cf e Tb. Não foi detectada teofilina em nenhuma das amostras de erva-mate analisadas.

O estudo observou que os conteúdos de Cf e Tb, presentes na erva-mate não sofreram influência dos sistemas de estacionamento.

5 REFERÊNCIAS

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1. p. 75-81, Jan. 2002.

ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, n. 2, p. 121-144, July 1987.

ALMEIDA, N. G. **Erva-mate: tendência de mercado – safra 2006**. Disponível em: [http://celepar7cta.pr.gov.br/SEAB/deral.nsf/fef9bc43c12d0fe8032566c1006ce9e5/34e4791728ece2be8325717000708913/\\$FILE/ERVA%20tendencia%20mercado%2006.pdf](http://celepar7cta.pr.gov.br/SEAB/deral.nsf/fef9bc43c12d0fe8032566c1006ce9e5/34e4791728ece2be8325717000708913/$FILE/ERVA%20tendencia%20mercado%2006.pdf). Acesso em: 06 de jul. 2007.

ANDRADE, F. M. **Diagnóstico da cadeia produtiva da *Ilex paraguariensis* St. Hill, erva-mate**. São Mateus do Sul: Fundo Brasileiro para a Biodiversidade/FUNBIO, 1999.

ASHIHARA, H.; MONTEIRO, A. M.; GILLIES, F. M.; CROZIER, A. Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. **Plant Physiology**, v. 111, n. 3, p. 747-753, 1996.

ASHIHARA, H. Purine metabolism and the biosynthesis of caffeine in maté leaves. **Phytochemistry**, v. 33, p. 1427-1430, 1993.

ASHIHARA, H.; SUZUKI, T. Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 1864-1876, 2004

ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 853-857, 2000.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p.191-203, 2006.

BALTASSAT, F.; DARBOUR, N.; FERRY, S. Étude du contenu purique de drogues a caffeine: Le mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill). **Plantes Médic. Phytothérapie**, v. 18, n. 4, p. 195-208, 1984.

BASTOS, D. H. M.; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y. S.; TORRES, E. A. F. S. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex Paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 399-404, 2006.

BAUMANN, T. W.; ROHING, L. Formation and intracellular accumulation of caffeine and chlorogenic acid in suspension cultures of *Coffea arabica*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2667-2669, 1989.

BENINCÁ, C. **Estabilidade do Ácido 5-O-cafeoilquínico: relação entre a cinética química e o processamento de erva-mate**. 67p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

BERTONI, M. H.; PRATKRICUN, S. D.; KANZIG, R. G.; CATTANEO, P. Effect of different stages of the tradicional process for yerba mate production on the composition of fresh leaves. **Anales de la Association Quimica Argentina**, v. 80, n. 6, p. 493-501, 1992.

BORTOLUZZI, A. L. M.; PASQUALATTO, R. P. R.; GUESSER, G.; CARDOSO JÚNIOR, E. L.; DONADUZI, C. M.; MITSUI, M. Quantificação de metilxantinas e compostos fenólicos em amostras comerciais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4., 2006, Posadas. **Anais...** Posadas: INYM, INTA, UNaM, EPAGRI, 2006. p. 143 - 147.

BRASIL, Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 4. ed. Série A. Normas e Manuais Técnicos - Instituto Adolfo Lutz, 2005. p. 1018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº899, de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº277, de 25 de setembro de 2005. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 23 set. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 234, de 25 de março de 1998. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade para erva-mate. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 26 mar. 1998.

BRASUR. **Erva-mate/Chá-mate**. Disponível em: http://www.brasur.com.br/portugues/produtos_ervamate.html. Acesso em 02 de janeiro de 2009.

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, p. 393-405, 2007.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia S. A, 1991.

BUTLER, L. G. Protein-polyphenol interactions: nutritional aspects. In: INTERNATIONAL CONFERENCE GROUP POLYPHENOLS, 16, 1992, Lisboa. **Proceedings ...** Lisboa: Group Polyphenols, 1992. p. 11–18.

CARDOSO JÚNIOR, E. L. **Teores de metilxantinas e compostos fenólicos em extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. 142p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Área de Concentração em Produção Vegetal, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2006.

CARDOSO JÚNIOR, E. L.; FERRARESE-FILHO, O.; CARDOSO FILHO, L.; FERRARE, M. L. L.; DONADUZZI, C. M.; STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 553-558, 2007.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: UNICAMP, 2003.

CHANDRA, S.; GONZALES DE MEJIA, E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CLIFFORD, M. N. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: Clifford, M. N.; Willson, K. C. (Ed.). **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**, New York: Croom Helm, 1985. p. 305-374.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, p. 13-21, 1990.

CLIFFORD, M. N. ; WU, W.; KIRKPATRICK, J.; KUHNERT, N. Profiling the Chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal chrysanthemum by LC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 929-936, 2007.

COELHO, G. C.; RACHWAL, M. F. G.; DEDECEK, R. A.; CURCIO, G. R.; NIETSCHKE, K.; SCHENKEL, E. P. Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 2, p. 75-80, 2007.

CONTRERAS, P. D. **Desenvolvimento de bebida à base de subprodutos da indústria da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e verificação de sua atividade antioxidante**. 69p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

DA CROCE, D. M. Características físico-químicas de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) no estado de Santa Catarina. **Ciência Florestal**, v. 12, n. 2, p.107-113, 2002.

DE BERNARDI, L. A., PRAT KRICUN, S. D. Cadena alimentaria de “yerba mate” “*Ilex paraguariensis*” – Diagnóstico de la región yerbatera. Buenos Aires: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, 2001.

DE MARIA, C. A. B.; TRUGO, L. C.; DE MARIZ e MIRANDA, L. S.; SALVADOR, E. Stability of 5-cafeoylquinic acid under different conditions of heating. **Food Research International**, v. 31, n. 6-7, p. 475-477, 1998.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, p. 60-71, 2007.

DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBANI, R. Influência da extração na determinação de metilxantinas por CLAE em erva-mate estacionada natural e acelerada. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 7, 2007, Campinas. **Anais...** CD-ROM, 2007.

EDREVA, A. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. **Agriculture Ecosystems & Environment**, v. 106, p. 135-146, 2005.

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.

FILIP, R.; LOTITO, S. B.; FERRARO, G.; FRAGA, C. G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, USA, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.

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

FUJIMORI, N.; ASHIHARA, H. Adenine metabolism and the synthesis of purine alkaloids in flowers *Camellia*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3513-3516, 1990.

FUJIMORI, N.; ASHIHARA, H. Biosynthesis of theobromine and caffeine in developing leaves of *Coffea arabica*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1359-1361, 1994.

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

GONZALES, A.; FERREIRA, F.; VÁZQUEZ, A.; MOYNA, P.; ALONSO, P. E. Biological screening of Uruguayan medicinal plants. **Journal Ethnopharmacology**, v. 39, p. 217-237, 1993.

GONZALES DE MEJIA, E.; SONG, Y. S.; RAMIREZ-MARES, M. V.; KOBAYASHI, H. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase Inhibition and oral carcinoma cell proliferation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1966-1973, 2005.

GUGLIUCCI, A. Low-density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry & Molecular Biology International**, v. 35, n. 1, p. 47-56, 1995.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL *in Vivo*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 224, p. 338-344, 1996.

HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Compostos fenólicos em chimarrão de erva-mate (*Ilex paraguariensis* L.) proveniente do Paraná, Brasil. In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4., 2006, Posadas. **Anais...** Posadas: INYM, INTA, UNaM, EPAGRI, 2006. p. 110-115.

HOFT, M.; VERPOORTE, R.; BECK, E. Growth and alkaloid patterns of roots of *Tabernaemontana pachysiphon* and *Rauvolfia mombasiana* as influenced by environmental factors. **Acta Botanica**, v. 111, p. 222–230, 1998.

KATO, M.; MIZUNO, K.; FUJIMURA, T.; IWAMA, M.; IRIE, M.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves. **Plant Physiology**, v. 120, p. 579-586, 1999.

KOHAN, K.; FANTI, O. D. Influencia de la temperatura en el estacionamiento de la yerba mate. **Biología y producción vegetal**. v. 7, n. 7, p. 327, 1970.

KOSHIISHI, C.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Profiles of purine and pyrimidine nucleotides in fresh and manufactured tea leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4378-4382, 2001.

LÓPEZ, P.; ISOLABELLA, S.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Estudio cuali-cuantitativo por HPLC de los principios activos presentes em los extractos de *Ilex paraguariensis* (yerba mate) em las diferentes etapas del procesamiento industrial. In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4., 2006, Posadas. **Anais...** Posadas: INYM, INTA, UNaM, EPAGRI, 2006. p. 116-121.

MAIANI, G., SERAFINO, M., SALUCCI, M., AZZINI, E., FERRO-LUZZI, A. Application of a new high-performance liquid chromatographic method for measuring selected polyphenols in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 692, p. 311-317, 1997.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370–1376, 2009.

MAZZA, A.; SCHMALKO, M. E. Variación de las isotermas de adsorción de la yerba mate durante el estacionamiento. In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4, 2006, Posadas. **Anais...** Posadas: INYM, INTA, UNaM, EPAGRI, 2006. p. 19 - 24.

MAZZAFERA, P. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 62, n. 2, p. 149 – 151, 1994.

MAZZAFERA, P., YAMAOKA-YANO, D. M., VITÓRIA, A. P. Para que serve a cafeína em plantas?. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n.1, p. 67-74, 1996.

MENINI, T.; HECK, C.; SCHULZE, J.; MEJIA, E.; GUGLIUCCI, A. Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of Paraoxonase-1 in High-Density Lipoprotein. **Planta Med.**, New York, v. 73, p. 1141-1147, 2007.

MOSELE, S. H. **A governança na cadeia agro-industrial da erva-mate na região do Alto Uruguai Rio-Grandense, sob a ótica da cadeia de suprimentos**. 231 f.. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

MOSLI WALDHAUSER, S. S.; BAUMANN, T. W. Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. **Phytochemistry**, v. 42, p. 985-996, 1996.

MUSEU PARANAENSE. **Consumo e exportação da erva-mate**. Disponível em: <http://www.museuparanaense.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=59>. Acesso em: 02 de jan. de 2009.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Review: Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95–111, 2004

NIETSCHE, K. **Caracterização da qualidade da erva-mate cancheada**. 89 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.

OLIVEIRA, T. T.; ROSA, C. O. B.; STRINGUETA, P. C.; VILELA, M. A. P. Ação antioxidante dos flavonóides. In: Costa, N. M. B; Rosa, C. O. B. (Ed.). **Alimentos Funcionais**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2006. p. 31-56.

PARANÁ. Câmara setorial da cadeia produtiva da erva-mate. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba, 2000. Série PADCT III, n. 1. 160 p.

PASINATO, R. **Aspectos etnoentomológicos, sócioeconômicos e ecológicos relacionados à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no município de Salto do Lontra, Paraná, Brasil.** 112 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agrossistemas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2003.

PELÚZIO, M. C. G.; OLIVEIRA, V. P. Vitaminas antioxidantes. In: Costa, N. M. B; Rosa, C. O. B. (Ed.). **Alimentos Funcionais.** Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2006. p. 1-30.

PERES, R. G. **Aplicações de CE-DAD e HPLC-DAD-ESI/MS na determinação de compostos fenólicos, metilxantinas e ácidos orgânicos em bebidas.** 201 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

PRAT KRICUN, S. D. Transformación primaria de la yerba mate. In: CURSO DE CAPACITACION EN PRODUCCIÓN DE YERBA MATE, 2. 1994, Cerro Azul. **Curso...** Cerro Azul: Instituto Nacional de Tecnologia Agrpecuaria, Centro Regional de Misiones, Estacion Experimental Agropecuaria Cerro Azul. 1994. p. 99-107.

RAMIREZ-MARES, M. V.; CHANDRA, S., GONZALEZ DE MEJIA, E. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research**, v. 554, p. 53-65, 2004.

REGINATTO, F. H.; ATHAYDE, M. L.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* Species - Caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 10, n. 6, p. 443-446, 1999.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBANI, R. H. **Compostos fenólicos em erva-mate e frutas.** 137 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

RIZZO, M.; VENTRICE, D.; VARONE, M. A.; SIDARI, R.; CARIDI, A. HPLC determination of phenolics adsorbed on yeasts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 46-55, 2006.

RICE-EVANS, C. A. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROBARDS, K.; ANTOLIVIC, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. **The Analyst**, v. 122, p. 11R-34R, 1997.

ROBBINS, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

RODIGHERI, H. R.; DOSSA, D.; VIELCAHUAMAN, L. J. M. **Cultivo da erva-mate**. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-mate/CultivodaErvaMate/01_importancia_socioec.htm. Acesso em: 02 de jan. de 2009.

SALDANÑA, M. D. A.; MOHAMED, R. S.; BAER, M. G.; MAZZAFERA, P. Extraction of purine alkaloids from maté (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO₂. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3804-3808, 1999.

SANTOS, K. A. **Estabilidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) em embalagens plásticas**. 102p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Ciñ. Nutr.**, v. 24, p. 360 -366. 2005.

SCHINELLA, 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 communications**, v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.

SCHNEIDER, E. SCHERER, R., URFER, P. JANSSENS, M. J. J. Analisis químico-sensorial de diferentes muestras de yerba-mate Argentina orientado al mercado alemán. In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4., 2006, Posadas. **Anais...** Posadas: INYM, INTA, UNaM, EPAGRI, 2006. p. 104-109.

SENANAYAKE, U. M.; WIJESEKERA, R. O. B. Theobromine and caffeine content of the cocoa bean during its growth. **J. Sci. Food Agric.**, v. 22, p. 262-263, 1971.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 576 p.

SIDRA, Sistema IBGE de Recuperação Automática. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. Disponível em:

<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp>. Acesso em : 02 de jan. de 2009.

SILVA, E. L.; NEIVA, T. J. C.; SHIRAI, M.; TERAQ, J.; ABDALLA, D. S. P. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, p. 973–979, 2008.

SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia** : da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. 1102 p.

STATISTIX[®]. **Statistix for Windows: Analytical software**, versão 8.0, Tallahassee, FL. 2003.

SUZUKI, T.; TAKAHASHI, E. Biosynthesis of Caffeine by Tea-Leaf Extracts: enzymic formation of theobromine from 7-methylxanthine and of caffeine from theobromine. **Biochem. J.**, Great Britain, v. 146, p. 87-96, 1975.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAMASI, O.; FILIP, R.; FERRARO, G.; CALVIÑO, A. Estudio comparativo de la astringencia de infusiones de yerba mate comercial y de *ilex paraguariensis* sin procesar. In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4., 2006, Posadas. **Anais...** Posadas: INYM, INTA, UNaM, EPAGRI, 2006. p. 122-125.

THABREW, M. HUGES, R.; McFARLANE, I. Antioxidant activity of *Osbeckia aspera*. **Phytotherapy Research**, v. 12. p. 288-290, 1998.

VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hill e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate.** 97 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

VALDUGA, A. T.; FINZER, J. R. D.; MOSELE, S. H. **Processamento de erva-mate.** Erechim: Edifapes, 2003. 184 p.

ZANOELO, E. F.; CARDOSO FILHO, L.; CARDOSO JÚNIOR, E. L.; Superheated steam-drying of mate leaves and effect of drying conditions on the phenol content. **Journal of Food Process Engineering**, v. 29, p. 253-268, 2006.

WECKERLE, C. S.; STUTZ, M. A.; BAUMANN, T. W. Purine alkaloids in *Paullinia*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 735-742, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 -	TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA MÉDIA DA CÂMARA DURANTE O ESTACIONAMENTO ACELERADO.....	62
APÊNDICE 2 -	TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA MÉDIA DO DEPÓSITO DURANTE O ESTACIONAMENTO NATURAL.....	63
APÊNDICE 3 -	CROMATOGRAMA DE AMOSTRAS ERVA-MATE E PADRÕES 5-CQA, AC E Ru, UTILIZANDO O CROMATÓGRAFO DA SHIMADZU.....	64
APÊNDICE 4 -	ESPECTRO EM TRÊS PONTOS DOS PICOS (INÍCIO, MEIO E FIM) DOS COMPOSTOS RU, 5-CQA E AC EM AMOSTRA DE ERVA-MATE.....	66
APÊNDICE 5 -	CURVAS ANALÍTICAS DOS PADRÕES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	67
APÊNDICE 6 -	COMPARAÇÃO DOS TEORES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NAS SEIS AMOSTRAS DE ERVA-MATE AO LONGO DOS ESTACIONAMENTOS NATURAL E ACELERADO.....	68
APÊNDICE 7 -	CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E METILXANTINAS E UMIDADE DAS AMOSTRAS.....	70
APÊNDICE 8 -	CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E METILXANTINAS E UMIDADE DAS AMOSTRAS DE ERVA-MATE ARMAZENADAS NO ESTACIONAMENTO ACELERADO.....	71
APÊNDICE 9 -	CURVAS ANALÍTICAS DOS PADRÕES DAS METILXANTINAS..	72
APÊNDICE 10 -	COMPARAÇÃO DOS TEORES DAS METILXANTINAS NAS SEIS AMOSTRAS DE ERVA-MATE AO LONGO DOS ESTACIONAMENTOS NATURAL E ACELERADO.....	73

APÊNDICE 1**TABELA 1 - TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA MÉDIA DA CÂMARA DURANTE O ESTACIONAMENTO ACELERADO**

Parâmetros	T10	T20	T30	T40	T50	T60	Média
Temperatura °C	51,39	50,82	48,98	49,79	51,45	50,47	50,48
UR (%)	32,20	34,51	31,44	31,88	33,77	33,99	32,97

NOTA: T = Tempo em dias.

APÊNDICE 2

TABELA 1 - TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA MÉDIA DO DEPÓSITO DURANTE O ESTACIONAMENTO NATURAL

Parâmetros	T30	T60	T90	T120	T150	T180	Média
Temperatura °C	26,00	24,15	25,01	25,95	24,62	25,41	25,19
UR (%)	31,40	31,71	33,97	54,91	57,69	53,62	43,88

NOTA: T = Tempo em dias.

APÊNDICE 3

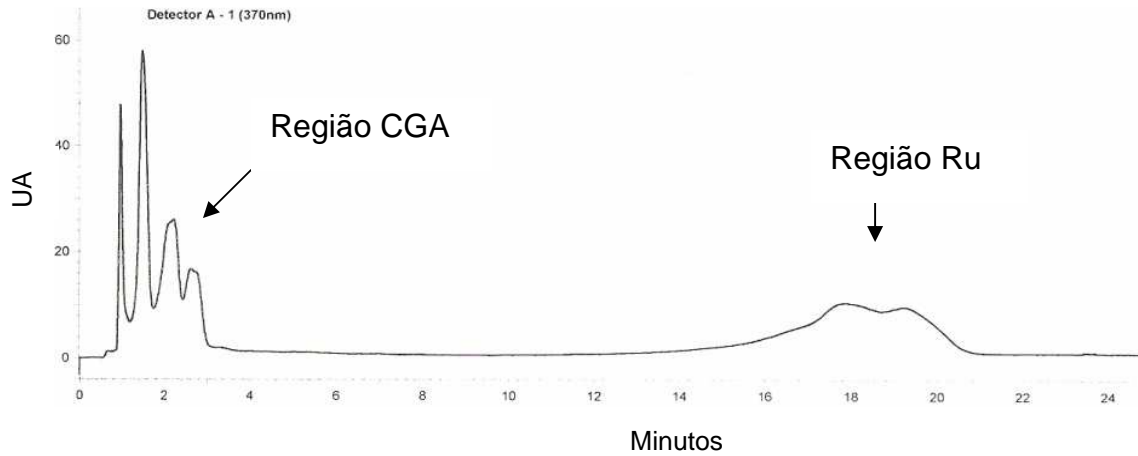


FIGURA 1 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE ERVA-MATE. CONDIÇÕES DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

NOTA: Condições da análise cromatográfica: Coluna Sinergi[®] Hidro-RP 80A (3,9 X 150 mm, 4 μ m) da Phenomenex,, utilizando como fase móvel metanol:água (30:70, v/v) e vazão constante de 1,0 mL min⁻¹; Detectados em 370 nm.

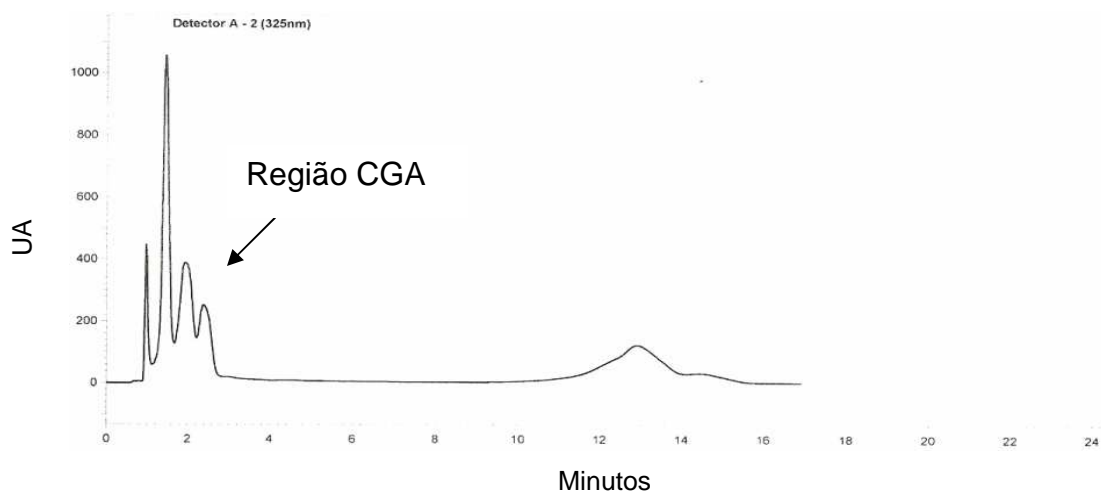


FIGURA 2 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE ERVA-MATE. CONDIÇÕES DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

NOTA: Condições da análise cromatográfica: Coluna Sinergi[®] Hidro-RP 80A (3,9 X 150 mm, 4 μ m) da Phenomenex,, utilizando como fase móvel metanol:água (32:68, v/v) e vazão constante de 1,0 mL min⁻¹; detectados em 325nm.

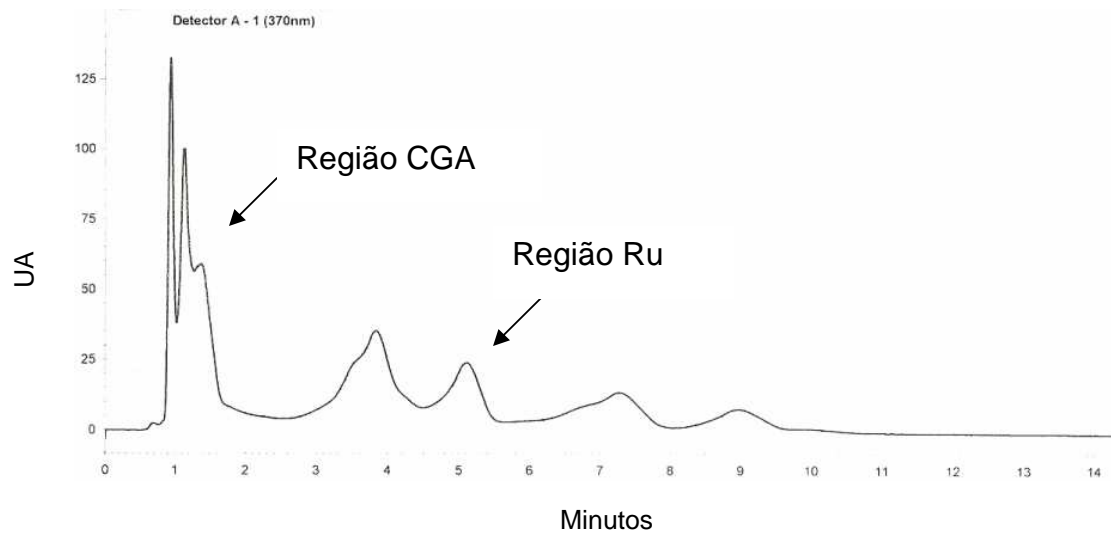


FIGURA 3 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE ERVA-MATE

NOTA: Condições da análise cromatográfica: Coluna Sinergi[®] Hidro-RP 80A (3,9 X 150 mm, 4 μ m) da Phenomenex, utilizando como fase móvel metanol:água (40:60, v/v) e vazão constante de 1,0 mL min⁻¹; Detectados em 370 nm.

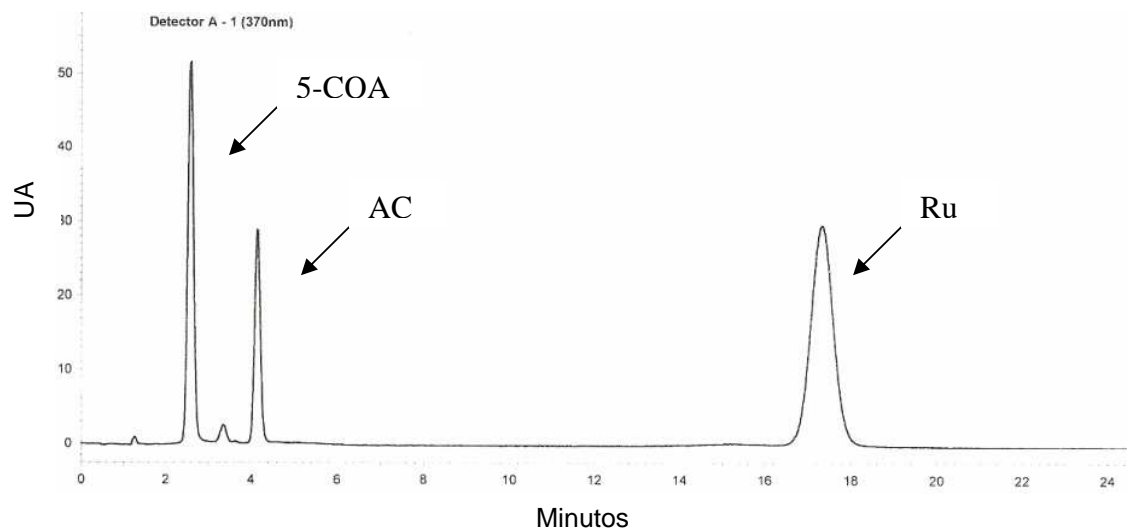


FIGURA 4 - CROMATOGRAMA DOS PADRÕES 5-CQA, AC E Ru

NOTA: Condições da análise cromatográfica: coluna Nova Pak[®] C-18 (3,9 X 150 mm, 4 μ m) da Waters, utilizando como fase móvel metanol:água (30:70, v/v) e vazão constante de 1,0 mL min⁻¹; Detectados em 370nm.

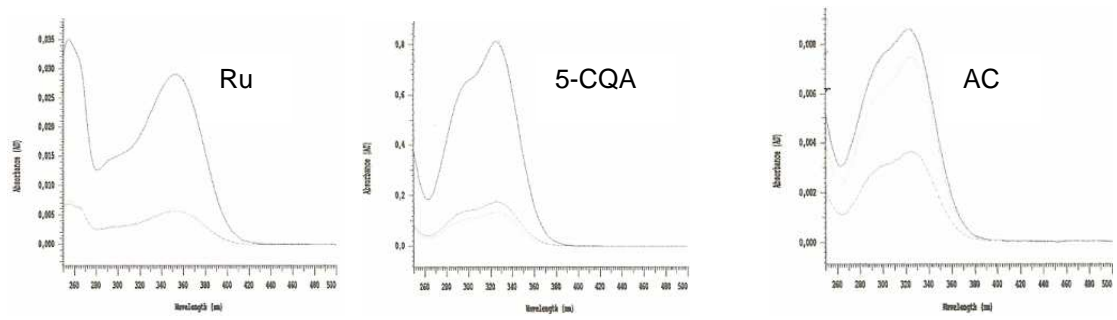
APÊNDICE 4

FIGURA 1 - ESPECTRO EM TRÊS PONTOS DOS PICOS (INÍCIO, MEIO E FIM) DOS COMPOSTOS RU, 5-CQA E AC EM AMOSTRA DE ERVA-MATE

APÊNDICE 5

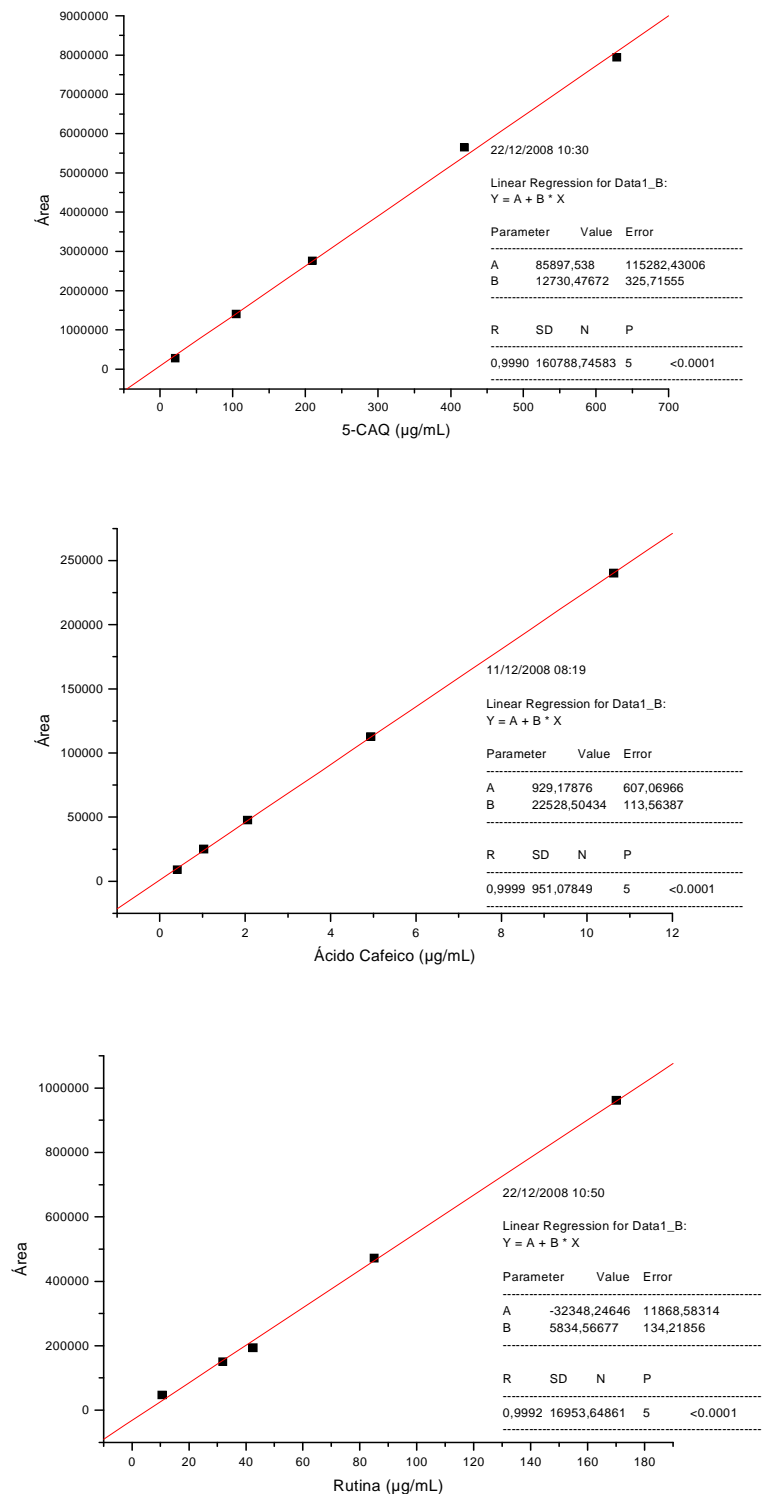


FIGURA 1 - CURVAS ANALÍTICAS DOS PADRÕES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS
 NOTA: (A) - 5-CQA na faixa de 20,96 a 628,74 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (B) - AC na faixa de 0,412 a 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (C)
 - Ru na faixa de 10,63 a 170,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$

APÊNDICE 6

TABELA 1 – MÉDIAS DOS TEORES DE 5-CQA (mg g^{-1}) EM ERVA-MATE ARMAZENADA EM ESTACIONAMENTO ACELERADO ANALISADAS A CADA 10 DIAS

Amostras ¹	Estacionamento acelerado – 5-CQA (base seca)						
	T 0	T 10	T 20	T 30	T 40	T 50	T 60
Amostra A*	37,61 ^b	40,41 ^a	41,77 ^a	41,15 ^a	40,76 ^a	34,70 ^c	29,89 ^d
Amostra B*	38,97 ^{bc}	36,91 ^c	39,47 ^b	48,11 ^a	31,16 ^d	32,26 ^d	37,17 ^c
Amostra C*	29,55 ^d	32,88 ^c	31,42 ^{cd}	31,58 ^{cd}	38,53 ^{ab}	40,44 ^a	37,88 ^b
Amostra D*	37,07 ^b	36,75 ^b	38,84 ^b	38,45 ^b	43,03 ^a	32,05 ^c	38,35 ^b
Amostra E	32,69 ^b	37,43 ^a	37,85 ^a	35,62 ^{ab}	36,11 ^{ab}	35,79 ^{ab}	18,58 ^c
Amostra F	34,14 ^{cd}	39,70 ^a	36,51 ^b	35,25 ^{bc}	32,80 ^d	30,21 ^e	35,66 ^{bc}
Média (n=6)	35,01 ^a	37,35 ^a	37,64 ^a	38,36 ^a	37,07 ^a	34,24 ^a	32,92 ^a
Desvio padrão	± 3,54	± 2,66	± 3,52	± 5,76	± 4,59	± 3,63	± 7,67

NOTA: Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; T = Tempo (dias); * mesma cidade (São Mateus do Sul); 1- Média de duas repetições (CV < 5%).

TABELA 2 – MÉDIAS DOS TEORES DE AC (mg g^{-1}) EM ERVA-MATE ARMAZENADA EM ESTACIONAMENTO ACELERADO ANALISADAS A CADA 10 DIAS

Amostras ¹	Estacionamento acelerado - AC (base seca)						
	T 0	T 10	T 20	T 30	T 40	T 50	T 60
Amostra A*	0,14 ^d	0,13 ^d	0,16 ^{cd}	0,18 ^c	0,28 ^a	0,31 ^a	0,24 ^b
Amostra B*	0,14 ^d	0,19 ^c	0,18 ^c	0,25 ^b	0,25 ^b	0,26 ^b	0,34 ^a
Amostra C*	0,09 ^e	0,20 ^d	0,24 ^c	0,26 ^c	0,29 ^b	0,38 ^a	0,30 ^b
Amostra D*	0,16 ^e	0,14 ^f	0,20 ^d	0,28 ^b	0,26 ^c	0,35 ^a	0,25 ^c
Amostra E	0,17 ^c	0,13 ^d	0,15 ^{cd}	0,26 ^b	0,27 ^b	0,29 ^a	0,30 ^a
Amostra F	0,16 ^d	0,19 ^c	0,19 ^c	0,23 ^b	0,34 ^a	0,34 ^a	0,32 ^a
Média (n=6)	0,14 ^d	0,16 ^d	0,19 ^{cd}	0,24 ^{bc}	0,28 ^{ab}	0,32 ^a	0,29 ^{ab}
Desvio padrão	± 0,03	± 0,03	± 0,03	± 0,04	± 0,03	± 0,04	± 0,04

NOTA: Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; T = Tempo (dias); * mesma cidade (São Mateus do Sul); 1- Média de duas repetições (CV < 5%).

TABELA 3 – MÉDIAS DOS TEORES DE RU (mg g^{-1}) EM ERVA-MATE ARMAZENADA EM ESTACIONAMENTO ACELERADO ANALISADAS A CADA 10 DIAS

Amostras ¹	Estacionamento acelerado - Ru (base seca)						
	T 0	T 10	T 20	T 30	T 40	T 50	T 60
Amostra A*	6,62 ^b	5,04 ^c	5,14 ^c	5,53 ^c	7,89 ^a	8,33 ^a	6,96 ^b
Amostra B*	11,18 ^{abc}	10,60 ^{bc}	10,01 ^c	12,10 ^a	11,35 ^{ab}	10,55 ^{bc}	8,78 ^d
Amostra C*	5,98 ^a	5,27 ^b	5,64 ^{ab}	5,95 ^a	5,47 ^{ab}	4,50 ^c	4,25 ^c
Amostra D*	8,57 ^b	8,24 ^{bc}	7,59 ^d	9,54 ^a	7,83 ^{cd}	6,45 ^e	7,64 ^d
Amostra E	3,87 ^d	3,67 ^d	3,88 ^d	4,44 ^c	4,93 ^b	5,44 ^a	4,61 ^{bc}
Amostra F	7,27 ^{bc}	9,18 ^a	9,29 ^a	7,88 ^b	8,73 ^a	8,73 ^a	6,76 ^c
Média (n=6)	7,25 ^a	7,00 ^a	6,93 ^a	7,57 ^a	7,70 ^a	7,33 ^a	6,50 ^a
Desvio padrão	± 2,48	± 2,73	± 2,44	± 2,87	± 2,33	± 2,27	± 1,76

NOTA: Médias seguidas por letras iguais na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; T = Tempo (dias); * mesma cidade (São Mateus do Sul); 1- Média de duas repetições (CV < 5%).

TABELA 4 – MÉDIAS DOS TEORES DE 5-CQA (mg g^{-1}), EM ERVA-MATE ARMAZENADA EM ESTACIONAMENTO NATURAL ANALISADAS A CADA 10 DIAS

Amostras ¹	Estacionamento natural – 5-CQA (base seca)						
	T 0	T 30	T 60	T 90	T 120	T 150	T 180
Amostra A*	37,61 ^b	42,75 ^{ab}	44,91 ^a	42,58 ^{ab}	36,14 ^b	43,06 ^{ab}	41,42 ^{ab}
Amostra B*	38,97 ^{ab}	39,70 ^a	39,10 ^a	29,98 ^b	30,85 ^b	38,94 ^a	38,62 ^a
Amostra C*	29,55 ^b	30,68 ^b	30,59 ^b	41,18 ^a	24,66 ^c	30,76 ^b	29,98 ^b
Amostra D*	37,07 ^b	35,45 ^b	31,13 ^c	42,80 ^a	36,44 ^b	36,10 ^b	40,01 ^a
Amostra E	32,69 ^c	35,50 ^b	30,17 ^d	37,88 ^a	29,01 ^d	18,69 ^e	34,53 ^{bc}
Amostra F	34,14 ^b	40,13 ^a	42,38 ^a	23,11 ^c	23,23 ^c	23,41 ^c	39,39 ^a
Média (n=6)	35,01 ^a	37,37 ^a	36,38 ^a	36,26 ^a	30,06 ^a	31,83 ^a	37,33 ^a
Desvio padrão	± 3,54	± 4,33	± 6,57	± 8,02	± 5,57	± 9,38	± 4,28

NOTA: Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; T = Tempo (dias); * mesma cidade (São Mateus do Sul); 1- Média de duas repetições (CV < 5%).

TABELA 5 – MÉDIAS DOS TEORES DE AC (mg g^{-1}) EM ERVA-MATE ARMAZENADA EM ESTACIONAMENTO NATURAL ANALISADAS A CADA 10 DIAS

Amostras ¹	Estacionamento natural - AC (base seca)						
	T 0	T 30	T 60	T 90	T 120	T 150	T 180
Amostra A*	0,14 ^b	0,12 ^c	0,15 ^{ab}	0,16 ^a	0,17 ^a	0,16 ^a	0,11 ^c
Amostra B*	0,14 ^d	0,20 ^c	0,21 ^c	0,31 ^a	0,24 ^b	0,19 ^c	0,20 ^c
Amostra C*	0,09 ^d	0,14 ^c	0,17 ^{ab}	0,15 ^{bc}	0,17 ^{ab}	0,17 ^a	0,16 ^b
Amostra D*	0,16 ^{ab}	0,12 ^c	0,17 ^a	0,15 ^b	0,11 ^c	0,12 ^c	0,12 ^c
Amostra E	0,17 ^e	0,24 ^d	0,18 ^e	0,31 ^a	0,26 ^c	0,29 ^b	0,23 ^d
Amostra F	0,16 ^c	0,17 ^c	0,20 ^b	0,21 ^{ab}	0,21 ^{ab}	0,22 ^a	0,16 ^c
Média (n=6)	0,14 ^a	0,17 ^a	0,18 ^a	0,22 ^a	0,19 ^a	0,19 ^a	0,16 ^a
Desvio padrão	± 0,03	± 0,05	± 0,02	± 0,08	± 0,05	± 0,06	± 0,05

NOTA: Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; T = Tempo (dias); * mesma cidade (São Mateus do Sul); 1- Média de duas repetições (CV < 5%).

TABELA 6 – MÉDIAS DOS TEORES DE RU (mg g^{-1}) EM ERVA-MATE ARMAZENADA EM ESTACIONAMENTO NATURAL ANALISADAS A CADA 10 DIAS

Amostras ¹	Estacionamento natural - Ru (base seca)						
	T 0	T 30	T 60	T 90	T 120	T 150	T 180
Amostra A*	6,62 ^a	4,76 ^b	5,38 ^b	4,87 ^b	7,32 ^a	4,88 ^b	4,57 ^b
Amostra B*	11,18 ^{ab}	9,95 ^c	10,24 ^{abc}	11,33 ^a	10,12 ^{bc}	10,99 ^{abc}	10,80 ^{abc}
Amostra C*	5,98 ^a	5,43 ^{abc}	4,93 ^c	5,48 ^{abc}	5,16 ^{bc}	5,76 ^{ab}	5,57 ^{abc}
Amostra D*	8,57 ^{ab}	7,57 ^c	4,91 ^{bc}	8,17 ^{bc}	5,28 ^d	9,11 ^a	7,91 ^{bc}
Amostra E	3,87 ^a	3,19 ^b	3,93 ^a	3,57 ^{ab}	3,23 ^b	3,73 ^a	3,82 ^a
Amostra F	7,27 ^d	10,21 ^{bc}	12,62 ^a	10,68 ^{bc}	9,61 ^c	10,85 ^b	10,00 ^{bc}
Média (n=6)	7,25 ^a	6,85 ^a	7,00 ^a	7,35 ^a	6,79 ^a	7,56 ^a	7,11 ^a
Desvio padrão	± 2,48	± 2,87	± 3,54	± 3,21	± 2,72	± 3,17	± 2,91

NOTA: Médias seguidas por letras iguais na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; T = Tempo (dias); * mesma cidade (São Mateus do Sul); 1- Média de duas repetições (CV < 5%).

APÊNDICE 7

TABELA 1 - TEORES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS, METILXANTINAS E UMIDADE DAS AMOSTRAS DE ERVA-MATE ARMAZENADAS NO ESTACIONAMENTO NATURAL

		Estacionamento natural					
Tratamento*	Amostras**	Variáveis (mg g ⁻¹)					
		5 -CQA	AC	Ru	Umidade (%)	Cf	Tb
1	A	34,14	0,16	7,27	9,67	5,14	1,15
1	B	38,97	0,14	11,18	8,86	3,35	0,58
1	C	32,69	0,17	3,87	8,95	7,85	2,15
1	D	29,55	0,09	5,98	9,97	10,41	2,46
1	E	37,61	0,14	6,62	9,07	7,66	1,92
1	F	37,07	0,16	8,57	8,99	7,26	1,64
2	A	40,13	0,17	10,21	11,41	6,62	1,20
2	B	39,70	0,20	9,95	10,06	2,97	0,75
2	C	35,50	0,24	3,19	10,32	8,13	2,09
2	D	30,68	0,14	5,43	10,74	10,63	2,32
2	E	42,75	0,12	4,76	10,69	8,59	2,54
2	F	35,45	0,12	7,57	10,84	6,93	1,66
3	A	42,38	0,20	12,62	9,34	5,76	0,86
3	B	39,10	0,21	10,24	8,65	4,19	0,84
3	C	30,17	0,18	3,93	8,14	8,64	2,31
3	D	30,59	0,17	4,93	8,90	11,30	2,84
3	E	44,91	0,15	5,38	9,03	9,01	3,15
3	F	31,13	0,16	4,91	9,08	8,24	2,09
4	A	23,11	0,21	10,68	9,28	5,84	0,95
4	B	29,98	0,31	11,33	8,44	4,02	0,67
4	C	37,88	0,31	3,57	8,36	9,41	2,45
4	D	41,18	0,15	5,48	8,71	10,60	2,44
4	E	42,58	0,16	4,87	8,73	8,85	2,80
4	F	42,80	0,15	8,17	9,23	8,37	1,90
5	A	23,23	0,21	9,61	10,08	5,56	0,81
5	B	30,85	0,24	10,12	10,22	3,70	0,63
5	C	29,01	0,26	3,23	10,01	8,84	2,31
5	D	24,66	0,17	5,16	9,98	10,38	0,24
5	E	36,14	0,17	7,32	10,17	7,29	1,61
5	F	36,45	0,11	5,28	9,95	8,76	2,86
6	A	23,41	0,22	10,85	9,32	5,88	0,87
6	B	38,94	0,19	11,00	8,76	3,66	0,56
6	C	18,69	0,29	3,73	8,28	9,17	2,30
6	D	30,76	0,17	5,76	8,75	10,12	2,40
6	E	43,06	0,16	4,88	8,96	8,39	2,61
6	F	36,10	0,12	9,11	9,26	8,49	1,91
7	A	39,39	0,16	10,00	11,11	6,35	0,91
7	B	38,62	0,20	10,80	10,27	4,14	0,68
7	C	34,53	0,23	3,82	10,74	9,51	2,40
7	D	29,98	0,16	5,57	10,43	9,21	2,49
7	E	41,42	0,11	4,57	10,67	8,86	2,76
7	F	40,01	0,12	7,91	10,65	9,50	2,12
Mínimo		18,69	0,09	3,19	8,14	2,97	0,24
Máximo		44,91	0,31	12,62	11,11	11,30	2,96
Média ± desvio padrão		36,08 ±4,79	0,23 ±0,07	7,18 ±2,28	8,54 ±0,89	7,09 ±2,32	1,65 ±0,79

NOTA: * 1= tempo zero; 2= 30 dias; 3= 60 dias; 4= 90 dias; 5= 120 dias; 6= 150 dias; 7= 180 dias; ** A, B, C, D, E e F = 6 diferentes amostras;

APÊNDICE 8

TABELA 1 - TEORES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS, METILXANTINAS E UMIDADE DAS AMOSTRAS DE ERVA-MATE ARMAZENADAS NO ESTACIONAMENTO ACELERADO

		Estacionamento acelerado					
Tratamentos*	Amostras**	Variáveis (mg g ⁻¹)					
		5 -CQA	AC	Ru	Umidade (%)	Cf	Tb
1	A	34,14	0,16	7,27	9,67	5,14	1,15
1	B	38,97	0,14	11,18	8,86	3,35	0,58
1	C	32,69	0,17	3,87	8,95	7,85	2,15
1	D	29,55	0,09	5,98	9,97	10,41	2,46
1	E	37,61	0,14	6,62	9,07	7,66	1,92
1	F	37,07	0,16	8,57	8,99	7,26	1,64
2	A	39,70	0,19	9,18	7,02	3,12	0,87
2	B	36,91	0,19	10,60	6,38	3,76	0,75
2	C	37,43	0,13	3,67	7,43	7,96	3,29
2	D	32,88	0,20	5,27	6,83	6,83	1,54
2	E	40,41	0,13	5,04	7,46	8,33	2,36
2	F	36,75	0,14	8,24	8,06	7,21	1,67
3	A	36,51	0,19	9,29	8,66	3,26	0,72
3	B	39,47	0,18	10,01	9,14	3,25	0,76
3	C	37,85	0,15	3,88	9,33	8,57	3,52
3	D	31,42	0,24	5,64	9,44	9,58	2,33
3	E	41,77	0,16	5,14	9,38	9,27	2,52
3	F	38,84	0,19	7,59	10,40	9,03	2,01
4	A	35,25	0,23	7,88	8,92	4,87	1,20
4	B	48,11	0,25	12,10	9,44	4,27	0,84
4	C	35,62	0,26	4,44	8,21	7,17	1,09
4	D	31,58	0,26	5,95	9,23	9,73	1,04
4	E	41,15	0,18	5,53	8,31	9,12	2,40
4	F	38,45	0,28	9,54	9,14	9,06	2,36
5	A	32,80	0,34	8,73	9,00	7,05	0,84
5	B	31,16	0,25	11,35	8,94	3,65	0,51
5	C	36,11	0,27	4,93	9,52	8,12	1,18
5	D	38,53	0,29	5,47	9,49	11,23	2,85
5	E	40,76	0,28	7,89	8,99	6,70	1,43
5	F	43,03	0,26	7,83	9,26	7,03	1,22
6	A	30,21	0,34	8,73	8,08	6,34	2,25
6	B	32,26	0,26	10,55	7,88	3,32	0,54
6	C	35,79	0,29	5,44	7,74	7,93	1,93
6	D	40,44	0,38	4,50	8,37	11,36	1,78
6	E	34,70	0,31	8,33	7,92	7,74	1,31
6	F	32,05	0,35	6,45	7,51	6,82	0,96
7	A	35,66	0,32	6,76	7,99	6,84	2,03
7	B	37,17	0,34	8,78	7,57	3,78	0,61
7	C	18,58	0,30	4,61	8,11	8,15	2,79
7	D	37,88	0,30	4,25	7,91	10,26	2,60
7	E	29,89	0,24	6,96	8,02	7,67	1,39
7	F	38,35	0,25	7,64	8,23	7,60	1,79
	Mínimo	18,59	0,09	3,67	6,38	3,12	0,51
	Máximo	48,11	0,38	12,10	10,40	11,36	3,52
	Média ± desvio padrão	34,89 ±6,39	0,18 ±0,05	7,13 ±2,79	9,60 ±0,87	7,56 ±2,27	1,77 ±0,82

NOTA: * 1= tempo zero; 2= 10 dias; 3= 20 dias; 4= 30 dias; 5= 40 dias; 6= 50 dias; 7= 60 dias; ** A, B, C, D, E e F = 6 diferentes amostras;

APÊNDICE 9

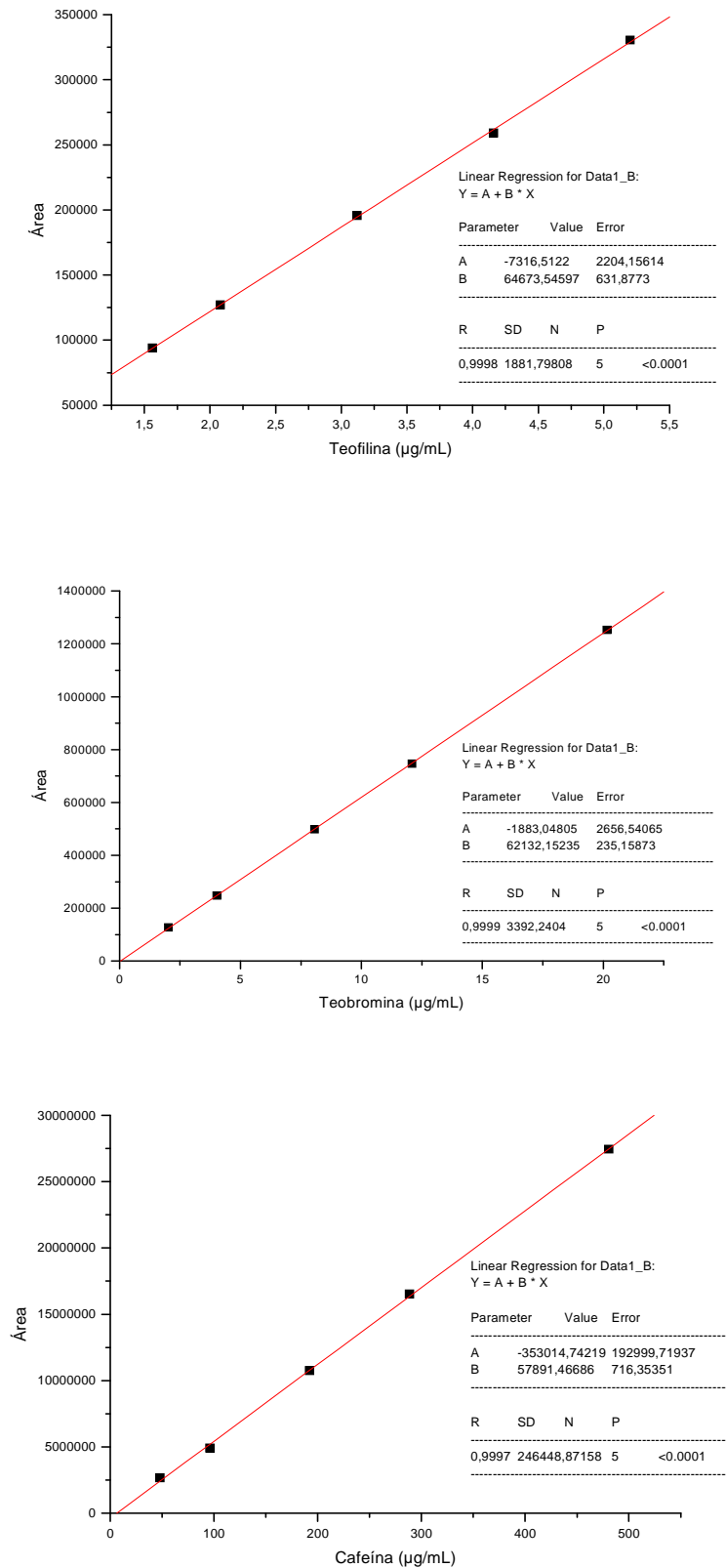


FIGURA 1 - CURVAS ANALÍTICAS DOS PADRÕES DAS METILXANTINAS

NOTA: (A) - Teofilina na faixa de 1,56 a 5,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (B) - Teobromina na faixa de 2,02 a 20,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (C) - Cafeína na faixa de 48,08 a 480,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

APÊNDICE 10

TABELA 1 – MÉDIAS DOS TEORES DE Cf (mg g⁻¹) EM ERVA-MATE ARMAZENADA EM ESTACIONAMENTO ACELERADO ANALISADAS A CADA 10 DIAS

Amostras ¹	Estacionamento acelerado – Cf (base seca)						
	T 0	T 10	T 20	T 30	T 40	T 50	T 60
Amostra A*	7,66 ^b	8,33 ^b	9,27 ^a	9,12 ^a	6,70 ^c	7,74 ^b	7,67 ^b
Amostra B*	3,35 ^{bc}	3,76 ^{bc}	3,25 ^c	4,27 ^a	3,65 ^{bc}	3,32 ^{bc}	3,78 ^{ab}
Amostra C*	10,41 ^{abc}	6,83 ^d	9,58 ^c	9,73 ^c	11,23 ^{ab}	11,36 ^a	10,26 ^{bc}
Amostra D*	7,26 ^{b,c}	7,21 ^{bc}	9,03 ^a	9,056 ^a	7,03 ^{bc}	6,82 ^c	7,60 ^b
Amostra E	7,85 ^b	7,96 ^b	8,57 ^a	7,17 ^c	8,12 ^{ab}	7,93 ^b	8,15 ^{ab}
Amostra F	5,14 ^c	3,12 ^d	3,26 ^d	4,87 ^c	7,05 ^a	6,34 ^b	6,84 ^a
Média (n=6)	6,95 ^a	6,20 ^a	7,16 ^a	7,37 ^a	7,30 ^a	7,25 ^a	7,38 ^a
Desvio padrão	± 2,43	± 2,21	± 3,04	± 2,34	± 2,45	± 2,61	± 2,11

NOTA: Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; T = Tempo (dias); * mesma cidade (São Mateus do Sul); 1- Média de duas repetições (CV < 5%).

TABELA 2 – MÉDIAS DOS TEORES DE Tb (mg g⁻¹) EM ERVA-MATE ARMAZENADA EM ESTACIONAMENTO ACELERADO ANALISADAS A CADA 10 DIAS

Amostras ¹	Estacionamento acelerado – Tb (base seca)						
	T 0	T 10	T 20	T 30	T 40	T 50	T 60
Amostra A*	1,92 ^b	2,36 ^a	2,52 ^a	2,40 ^a	1,43 ^c	1,31 ^c	1,39 ^c
Amostra B*	0,58 ^{bc}	0,75 ^a	0,76 ^a	0,84 ^a	0,51 ^c	0,54 ^{bc}	0,61 ^b
Amostra C*	2,46 ^{bc}	1,54 ^d	2,33 ^c	1,04 ^e	2,85 ^a	1,78 ^d	2,60 ^{ab}
Amostra D*	1,64 ^c	1,67 ^c	2,01 ^b	2,36 ^a	1,22 ^d	0,96 ^e	1,79 ^{bc}
Amostra E	2,15 ^d	3,29 ^b	3,52 ^a	1,09 ^f	1,18 ^f	1,93 ^e	2,79 ^c
Amostra F	1,15 ^c	0,87 ^d	0,72 ^d	1,20 ^c	0,84 ^d	2,25 ^a	2,03 ^b
Média (n=6)	1,65 ^a	1,75 ^a	1,98 ^a	1,49 ^a	1,34 ^a	1,46 ^a	1,87 ^a
Desvio padrão	± 0,69	± 0,96	± 1,08	± 0,70	± 0,81	± 0,64	± 0,80

NOTA: Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; T = Tempo (dias); * mesma cidade (São Mateus do Sul); 1- Média de duas repetições (CV < 5%).

TABELA 3 – MÉDIAS DOS TEORES DE CF (mg g⁻¹) EM ERVA-MATE ARMAZENADA EM ESTACIONAMENTO NATURAL ANALISADAS A CADA 10 DIAS

Amostras ¹	Estacionamento natural – Cf (base seca)						
	T 0	T 30	T 60	T 90	T 120	T 150	T 180
Amostra A*	7,66 ^{bc}	8,59 ^{ab}	9,01 ^a	8,85 ^{ab}	7,29 ^c	8,39 ^{abc}	8,86 ^{ab}
Amostra B*	3,35 ^c	2,97 ^d	4,19 ^a	4,02 ^{ab}	3,70 ^{bc}	3,66 ^{bc}	4,14 ^a
Amostra C*	10,41 ^{ab}	10,63 ^{ab}	11,30 ^a	10,60 ^{ab}	10,38 ^{ab}	10,12 ^{bc}	9,21 ^c
Amostra D*	7,26 ^c	6,93 ^c	8,24 ^b	8,37 ^b	8,76 ^{ab}	8,49 ^b	9,50 ^a
Amostra E	7,85 ^d	8,13 ^d	8,64 ^c	9,41 ^a	8,84 ^{bc}	9,17 ^{ab}	9,51 ^a
Amostra F	5,14 ^c	6,62 ^a	5,76 ^b	5,84 ^b	5,56 ^b	5,88 ^b	6,35 ^a
Média (n=6)	6,95 ^a	7,31 ^a	7,86 ^a	7,85 ^a	7,42 ^a	7,62 ^a	7,93 ^a
Desvio padrão	± 2,43	± 2,56	± 2,52	± 2,45	± 2,45	± 2,40	± 2,21

NOTA: Médias seguidas por letras iguais na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; T = Tempo (dias); * mesma cidade (São Mateus do Sul); 1- Média de duas repetições (CV < 5%).

TABELA 4 – MÉDIAS DOS TEORES DE Tb (mg g⁻¹) EM ERVA-MATE ARMAZENADA EM ESTACIONAMENTO NATURAL ANALISADAS A CADA 10 DIAS

Amostras ¹	Estacionamento natural - Tb (base seca)						
	T 0	T 30	T 60	T 90	T 120	T 150	T 180
Amostra A*	1,92 ^c	2,54 ^b	3,15 ^a	2,80 ^{ab}	1,61 ^c	2,61 ^b	2,76 ^{ab}
Amostra B*	0,58 ^{de}	0,75 ^b	0,84 ^a	0,67 ^c	0,63 ^{cd}	0,56 ^e	0,68 ^c
Amostra C*	2,46 ^b	2,32 ^b	2,84 ^a	2,44 ^b	0,24 ^c	2,40 ^b	2,49 ^b
Amostra D*	1,64 ^d	1,66 ^d	2,09 ^b	1,90 ^c	2,86 ^a	1,91 ^c	2,12 ^b
Amostra E	2,15 ^{bc}	2,09 ^c	2,31 ^{abc}	2,45 ^a	2,31 ^{abc}	2,30 ^{abc}	2,40 ^{ab}
Amostra F	1,15 ^a	1,20 ^a	0,86 ^{bc}	0,95 ^b	0,81 ^c	0,87 ^{bc}	0,91 ^{bc}
Média (n=6)	1,65 ^a	1,76 ^a	2,02 ^a	2,02 ^a	1,41 ^a	1,77 ^a	1,89 ^a
Desvio padrão	± 0,69	± 0,69	± 0,98	± 0,87	± 1,03	± 0,86	± 0,88

NOTA: Médias seguidas por letras iguais na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; T = Tempo (dias); * mesma cidade (São Mateus do Sul); 1- Média de duas repetições (CV < 5%).

