

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NESSANA DARTORA

**AVALIAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS E METABOLITOS SECUNDÁRIOS DAS
FOLHAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) EM DIFERENTES ESTADOS
FISIOLÓGICOS E DE PROCESSAMENTO**

CURITIBA

2010

NESSANA DARTORA

**AVALIAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS E METABOLITOS SECUNDÁRIOS DAS
FOLHAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) EM DIFERENTES ESTADOS
FISIOLÓGICOS E DE PROCESSAMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki

Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

CURITIBA
2010

Orientador: Prof. Dr Guilherme L. Sasaki
Co-Orientador : Prof. Dr. Marcello Iacomini
Colaborador: Dr. Lauro M. de Souza

TERMO DE APROVAÇÃO

NESSANA DARTORA

**Avaliação dos polissacarídeos e metabólitos secundários de folhas de erva-
mate (*Ilex paraguariensis*) em diferentes estados fisiológicos e de
processamento**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá (Coordenador da Pós-Graduação)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Prof. Dr. Andersson Barison

Departamento de Química – UFPR

Curitiba, 09 de dezembro de 2010.

Dedico esse trabalho a meus amados pais, Lídia Z. Dartora e Ricardo Dartora (in memoriam) e aos meus queridos irmãos Ane, André e Rafa. Com vocês dividi aflições, orações, intenções e sonhos. Alguns destes sonhos com o tempo se vão, outros, porém tornam-se reais. A vocês toda a minha conquista, por vocês toda fé na vida, para vocês todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos, que de uma forma ou de outra estiveram envolvidos nessa tarefa difícil de construir a dissertação, é o mínimo que se pode fazer para demonstrar minha gratidão e expressar também o quanto essa ajuda contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional. No entanto a lista é muito grande e o espaço pequeno demais...

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, Autor e Orientador do projeto da minha vida. Te agradeço por tudo, Senhor, especialmente pela paz nos momentos de dificuldade e por sempre abrir novas janelas em minha vida.

Ao Prof. Guilherme L. Sasaki, com quem eu tive o prazer de compartilhar este trabalho. Obrigada pela orientação, confiança e liberdade que me foi concedida nesses dois anos.

Ao Prof. Marcello Iacomini pelos ensinamentos, por sua pronta disponibilidade e por dizer sim quando mais precisei.

Ao Lauro, não somente pelo auxílio com as análises e paciência nas explicações, mas pelas conversas sobre ciência e por me ensinar que ter um objetivo é o passo mais importante para se cumprir uma tarefa. Com certeza, aprendi muito com você. Obrigada por tudo!

À Prof^a Alice Teresa Valduga, simplesmente por me inspirar nos trabalhos com a erva-mate, pelo auxílio na coleta e processamento das folhas e por mesmo longe, estar sempre na torcida.

Ao Prof. Gorin, pelos conselhos, sugestões e correções, principalmente em meu artigo.

Ao Luciano, pelo empréstimo dos padrões.

À minha mãe, pessoa maravilhosa, que compartilhou, vibrou e comemorou comigo todas as minhas vitórias, pela paciência quando me fiz ausente em prol deste trabalho e pela certeza de que mesmo distante nunca estarei sozinha.

Ao meu pai, *in memoriam*, por sua presença constante e ensinamentos de vida. Certamente de onde estiver vai se orgulhar deste título de Mestre.

À minha irmã querida, Anne por ser um pouquinho minha “mãe”, pelas conversas, conselhos, risadas e confidências. Sei o quanto deve estar alegre por essa conquista.

Aos meus irmãos Dé e Rafa e minha cunhada Lilian por todo incentivo e carinho. Sei que estão orgulhosos!

Ao meu sobrinho único e predileto Du, com quem divido muitos segredos e que conquistou minha admiração pela pessoa que se tornou.

A toda minha família pela torcida e ótimas reuniões, principalmente no Natal e Ano Novo. Não vou citar todos, pois a família é grande.

À Fer Simas, não somente pelo auxílio nas análises dos urônicos (e cá entre nós, ainda bem que você ajudou né amiga!!!), mas principalmente, pelas conversas, confidências, pelo ombro amigo e aquele conselho do “bem” que você sempre dá. Além disso, amiga, te devo uma coisa muito importante, afinal você me fez reencontrar a pessoa mais importante da minha vida (Deus). Que Ele te ilumine sempre, porque você merece!!!

À pessoas muito especiais que conheci na Bioquímica e que se destacam por suas infinitas qualidades. À Aline, com quem dividi não somente as contas do apartamento, mas momentos de muita alegria e companheirismo. À Tati, pessoa incrível, de enorme coração, que abriu as portas de sua casa pra mim inúmeras vezes e também a sua família (em especial a Tia Helena) que me acolheu da forma mais bonita que se pode acolher alguém, considerando esse alguém parte da família. À Fran, pela sua meiguice ao aconselhar, pelos momentos de descontração, principalmente aqueles nos “dormidões” na sua casa, regados com muito bom humor. À Elaine, pela parceria nos trabalhos, paciência, carinho e amizade.

Ao Arqui e ao Dani pelo auxílio com a PCA e também por serem pessoas maravilhosas, as quais eu tenho o prazer de dizer que sou amiga. Adoro a convivência com vocês e a presença de vocês lá no Lab deixa tudo mais alegre.

Às meninas mais “xuxus” que conheci, Camila, Carina e Normanda, pelo carinho, torcida e pelos momentos de apoio e alegria que passei com vocês. Camila, obrigada pela parceria e ajuda nos experimentos, mas ainda bem que não costumam nos deixar sozinhas no Lab, não é mesmo?

À Simone, pessoa admirável que tive o prazer de conhecer este ano, mas que com certeza tem seu espaço no meu coração. Obrigada por seu apoio constante amiga!

Aos colegas do laboratório E1, 247, 250 cada um com suas características que não serão esquecidas, pelos momentos de experimentos, conversas, risadas,

cafezinhos e almoços no “RU”, Fer, Lauro, Thales, Arqui, Dani, Elaine, Camila, Yanna, Arildo, Ana Helena, Andrea, Rosane, Eliz, Flavio, Cínthia, Fran, Nadi, Stephanie e Vanessa.

À “turma do bar” (Ane, Arqui, Gui, Lauro, Tuca, Danilo, Brunis, Kimura), pelas risadas e momentos de descontração, os quais, tanto me faziam bem.

À galera lá de Gaurama (em especial Paula, Mércia e Cacá) pela torcida e apoio sempre, além das maravilhosas festas quando estamos todas reunidas.

Aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação, Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá e Prof^a Dr^a Sílvia M. Cadena pelo empenho e dedicação prestados e ao crescimento e reconhecimento deste curso.

Ao Prof. Guilherme L. Sasaki pela disponibilidade para a realização das análises de RMN.

Ao Lauro pelas análises de ESI-MS e UPLC.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, pela colaboração e amizade.

À CAPES, ao PRONEX-Carboidratos, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que, de uma forma ou de outra, foram importantes para a realização desta dissertação e para meu amadurecimento científico, o meu muito obrigada!



Chimarrão

*Amargo e doce que eu sorvo
num beijo em lábios de prata
tens o perfume da mata
molhada pelo sereno.*

*E a cuia, seio moreno,
que passa de mão em mão
traduz no meu chimarrão
em sua simplicidade
a velha hospitalidade
da gente do meu rincão.*

Glaucus Saraiva

RESUMO

Ilex paraguariensis (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate, é uma espécie nativa da América do Sul, da qual são obtidas diversas bebidas. Esta planta tem ganhado rápida introdução no mercado industrial, na obtenção de chás ou como ingrediente de alimentos formulados e suplementos dietéticos, devido às suas várias propriedades (antioxidante, estimulante do sistema central, hepatoprotetora, etc). No presente trabalho foram avaliados os efeitos da maturação das folhas (jovens ou maduras), do local de cultivo (sol ou sombreado) e de processamentos pós-colheita (*in natura*, cancheamento ou oxidação) sobre os polissacarídeos e componentes do seu metabolismo secundário. Extrações aquosas foram realizadas, e o extrato bruto precipitado com etanol, resultando em duas frações. Os polissacarídeos, presentes no precipitado, apresentaram como componentes monossacarídicos majoritários Ara, Gal, GalA e Glc em todas as amostras. Análises por espectroscopia de RMN-HSQC indicaram a presença de três polissacarídeos: arabinogalactana tipo II, ácido poligalacturônico e amido. Algumas diferenças na intensidade de sinais foram observadas quando os espectros de HSQC foram comparados entre os diferentes tratamentos. As folhas oxidadas apresentaram uma diminuição na intensidade de sinais referentes ao amido e ao ácido galacturônico, indicando que este processo estaria provocando a degradação destes polissacarídeos. As frações solúveis após a adição de etanol foram analisadas por ESI-MS e UPLC, sendo que vários compostos foram identificados, entre estes, fenólicos, xantinas, saponinas e carboidratos. Posteriormente estes compostos foram quantificados e os resultados comparados. Além disso, as frações foram testadas com relação à sua atividade antioxidante. Em geral, as folhas cultivadas ao sol apresentaram concentrações mais altas dos compostos analisados, quando comparadas às cultivadas em sombra. O tratamento que as folhas foram submetidas após a colheita também teve influência sobre esta composição. Folhas cancheadas apresentaram um decréscimo na concentração de xantinas, enquanto que as oxidadas apresentaram uma menor concentração de compostos fenólicos, quando comparadas com folhas verdes (*in natura*). A redução na concentração de fenóis está diretamente relacionada com a diminuição da atividade antioxidante e, conseqüentemente, entre tratamentos testados, as folhas oxidadas apresentaram a menor atividade antioxidante.

ABSTRACT

Ilex paraguariensis (Aquifoliaceae), popularly known as yerba mate, is a native of South America, from its leaves several drinks is obtained. This plant has been rapid introduced into the industrial market, either as tea itself or as an ingredient in formulated foods and dietary supplements, mainly due to its properties (antioxidant, central system stimulant, hepatoprotective, etc.). The present study evaluated the effects of leaves maturation (young or mature), cultivation condition (sun or shade) and post-harvest processing (*in natura*, cancheamento or oxidation) on the polysaccharides and secondary metabolites. Aqueous extractions were performed, and the crude extract precipitated with ethanol, resulting in two fractions. The polysaccharides, in the precipitated, presented as major monosaccharides Ara, Gal, GalA and Glc in all samples. Analysis by HSQC-NMR spectroscopy indicated the presence of three polysaccharides: type II arabinogalactan, polygalacturonic acid and starch. Some differences in the intensity of signals were observed when the HSQC spectra were compared among different treatments. The oxidized leaves showed a decrease in the intensity of signals associated with starch and galacturonic acid, indicating that this process would degrade these polysaccharides. The soluble fractions after the addition of ethanol were analyzed by ESI-MS and UPLC, and several compounds were identified, among these, phenols, xanthines, saponins and carbohydrates. Subsequently these compounds were quantified and the results compared. Furthermore, the fractions were evaluated for their antioxidant activity. Generally, leaves grown under sunlight had higher concentrations of compounds, when compared those grown in shade. The treatment which the leaves were submitted after harvest also had an influence on this composition. Processed leaves showed a decrease in the concentration of xanthines, while the oxidized showed a lower concentration of phenolic compounds when compared with green leaves (*in natura*). The reduction in the concentration of phenols is directly related to decreased antioxidant activity, consequently among the treatments, the oxidized leaves had the lowest antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	(A) ÁREA DE DISTRIBUIÇÃO DA ERVA-MATE, (1) ARGENTINA; (2) BRASIL; (3) PARAGUAI E (4) URUGUAI. (B) <i>Ilex paraguariensis</i> (PLANTA).....	28
FIGURA 2 –	FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO DE ERVA-MATE TIPO CHIMARRÃO.....	33
FIGURA 3 –	(A) PROCESSAMENTO DAS FOLHAS DE <i>Ilex paraguariensis</i> NO CHIMARRÃO E CHÁ MATE (B) PROCESSAMENTO DAS FOLHAS DE <i>Camellia sinensis</i> NO CHÁ PRETO E NO CHÁ VERDE.....	40
FIGURA 4 –	ESTRUTURA DAS XANTINAS: CAFEÍNA (1,3,7-TRIMETILXANTINA), TEOBROMINA (3,7-DIMETILXANTINA) E TEOFILINA (1,3-DIMETILXANTINA).....	42
FIGURA 5 –	ESTRUTURA DOS ISÔMEROS DE ÁCIDOS CAFEOILQUÍNICOS E DICAFOILQUÍNICOS.....	44
FIGURA 6 –	ESTRUTURA GENÉRICA DAS SAPONINAS COM A LOCALIZAÇÃO COMUM DOS GRUPOS R.....	45
FIGURA 7 –	FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> ..	67
FIGURA 8 –	(A) TLC DAS AMOSTRAS OBTIDAS APÓS A HIDRÓLISE (TFA 2 M, 8 H A 100 °C). (B) PERFIL CROMATOGRÁFICO DA AMOSTRA SPJSIN E DO PADRÃO DE ÁCIDO GALACTURÔNICO.....	68
FIGURA 9 –	CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO DAS FRAÇÕES “SP” OBTIDAS DE FOLHAS DE ERVA-MATE EM DIFERENTES ESTADOS FISIOLÓGICOS E DE PROCESSAMENTO. (A) FOLHAS JOVENS DE SOL, (B) FOLHAS JOVENS DE SOMBRA, (C) FOLHAS MADURAS DE SOL E (C) FOLHAS MADURAS DE SOMBRA.....	70
FIGURA 10 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DA AMOSTRA SPMSBC . EM EVIDÊNCIA A REGIÃO ANOMÉRICA	71

FIGURA 11 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DA AMOSTRA SPMSBC . EM EVIDÊNCIA A REGIÃO DO CARBONO SUBSTITUÍDO. OS NÚMEROS EM PRETO SÃO SINAIS REFENTES AS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS DE ARABINOGLACTANAS, EM VERMELHO DE ÁCIDOS POLIGALACTURÔNICOS E EM AZUL DE AMIDO.....	72
FIGURA 12 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC), MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ A LONGA DISTÂNCIA (HMBC) DA AMOSTRA SPMSBC . O SINAL EM δ 171,0/3,74 CONFIRMA A PRESENÇA DE GRUPOS CARBOXILICOS ESTERIFICADOS. EM (C), A ESTRUTURA DE UM AÇÚCAR ÁCIDO METIL-ESTERIFICADO.....	74
FIGURA 13 –	REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE HSQC DAS AMOSTRAS SPJSIN (A), SPJSC (B) E SPJSO (C). AS TRÊS AMOSTRAS PROVENIENTES DO MESMO TIPO DE FOLHAS, MAS SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS.....	75
FIGURA 14 –	GRÁFICOS DE SCORES (A) E LOADINGS (B) PARA AS PCAs DOS ESPECTROS DE HSQC DAS FOLHAS DE ERVA-MATE EM DIFERENTES ESTADOS FISIOLÓGICOS E DE PROCESSAMENTO.....	76
FIGURA 15 –	ESPECTRO DE ESI-MS EM MODO <i>OFFLINE</i> NEGATIVO DAS AMOSTRAS SJSIN (A), SJSC (B) E SJSO (C).....	79
FIGURA 16 –	ESPECTRO DE ESI-MS EM MODO <i>OFFLINE</i> POSITIVO DAS AMOSTRAS SJSIN (A), SJSC (B), SJSO (C) E TLC (D): (1) FRUTOSE, (2) GLUCOSE, (3) SJSIN , (4) SJSBIN , (5) SMSIN , (6) SMSBIN , (7) SJSC , (8) SJSBC , (9) SMSO , (10) SMSBC , (11) SJSO , (12) SJSBO , (13) SMSO , (14) SMSBO , (15) SACAROSE.....	80
FIGURA 17 –	TLC DAS AMOSTRAS SJSIN (1), SJSBIN (2), SMSIN (3), SMSBIN (4), SJSC (5), SJSBC (6), SMSO (7), SMSBC (8), SJSO (9), SJSBO (10), SMSO (11) E SMSBO (12), JUNTAMENTE COM PADRÕES DE XANTINAS (CAFEÍNA, TEOBROMINA E TEOFILINA).....	81
FIGURA 18 –	CROMATOGRAMA DE UPLC-MS EM MODO TIC. ESPECTROS DE MASSA DO PICO 3 (B), PICO 8 (C), PICO 12 (D), PICO 18 (E), PICO 19 (F) E PICO 22 (G).....	84

FIGURA 19 –	UPLC-PDA DAS FRAÇÕES (SOBRENADANTES ETANÓLICOS): SJSIN (A) , SJSBIN (B) , SMSIN (C) , SMSBIN (D) , SJSC (E) , SJSBC (F) , SMSC (G) , SMSBC (H) , SJSO (I) , SJSBO (J) , SMSO (K) E SMSBO (L)	87
FIGURA 20 –	ANÁLISES DE PCA. GRÁFICOS DE SCORES PARA CADA COMPONENTE PRINCIPAL COM SUA PERCENTAGEM DE VARIÂNCIA. EM (A) PC1 VERSUS PC2 E EM (B) PC1 VERSUS PC3. (a) SJSIN , (b) SJSBIN , (c) SMSIN , (d) SMSBIN , (e) SJSC , (f) SJSBC , (g) SMSC , (h) SMSBC , (i) SJSO , (j) SJSBO , (k) SMSO E (l) SMSBO	91
FIGURA 21 –	ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE MAILLARD.....	93

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	APLICAÇÕES INDUSTRIAIS E USOS ALTERNATIVOS PARA A ERVA-MATE.....	31
TABELA 2 –	COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM FOLHAS DE ERVA-MATE E ALGUMAS DE SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	48
TABELA 3 –	AMOSTRAS OBTIDAS APÓS PROCESSAMENTO PÓS-COLHEITA.....	55
TABELA 4 –	RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS E DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS A PRECIPITAÇÃO COM ETANOL.....	65
TABELA 5 –	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE ERVA-MATE.....	69
TABELA 6 –	ANÁLISES <i>OFFLINE</i> DE ESI-MS EM MODO POSITIVO E NEGATIVO DOS COMPONENTES PRESENTES NOS SOBRENADANTE ETANÓLICOS DE FOLHAS DE ERVA-MATE.....	82
TABELA 7 –	UPLC-PDA-MS EM MODO NEGATIVO.....	85
TABELA 8 –	CONCENTRAÇÃO DE XANTINAS, FENÓLICOS E AÇÚCARES NOS SOBRENADANTES ETANÓLICOS DAS FOLHAS DE ERVA-MATE.....	89
TABELA 9 –	ATIVIDADE SEQUESTRANTE DE DPPH (%) E CE ₅₀ DOS SOBRENADANTES ETANÓLICOS DAS FOLHAS DE ERVA-MATE.....	92
TABELA 10 –	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) DOS SOBRENADANTES ETANÓLICOS DAS FOLHAS DE ERVA-MATE.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E TERMOS*

Compostos

AcOH	- Ácido acético
Ara	- Arabinose
BHT	- <i>n</i> -butil-hidroxitolueno
D ₂ O	- Óxido de deutério
EtOAc	- Acetato de etila
EtOH	- Etanol
FeCl ₃	- Cloreto férrico
CHCl ₃	- Clorofórmio
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrilhidrasil
Fru	- Frutose
Gal	- Galactose
GalA	- Ácido galacturônico
Glc	- Glucose
H ₂ SO ₄	- Ácido sulfúrico
HCOOH	- Ácido fórmico
LiCl	- Cloreto de lítio
Man	- Manose
MeOH-HCl	- Ácido clorídrico metanólico
Na ₂ SO ₄	- Sulfato de sódio anidro
NaBH ₄	- Boroidreto de sódio
NaN ₃	- Azida
NaNO ₂	- Nitrito de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
n-PrOH	- Propanol

PGA	- Ácidos poligalacturônicos
RGI	- Ramnogalacturonana
Rha	- Rhamnose
Rib	- Ribose
Sac	- Sacarose
TEA	- Trietilamina
TFA	- Ácido trifluoracético
TMS	- Tetrametilsilano

Extratos e Frações

IP+nome da amostra	- Frações insolúveis após o congelamento e degelo
JSBC	- Folhas jovens, cultivadas em sombra, canheadas
JSBIN	- Folhas jovens, cultivadas em sombra, <i>in natura</i>
JSBO	- Folhas jovens, cultivadas em sombra, oxidadas
JSC	- Folhas jovens, cultivadas em sol, canheadas
JSIN	- Folhas jovens, cultivadas em sol, <i>in natura</i>
JSO	- Folhas jovens, cultivadas em sol, oxidadas
MSBC	- Folhas maduras, cultivadas em sombra, canheadas
MSBIN	- Folhas maduras, cultivadas em sombra, <i>in natura</i>
MSBO	- Folhas maduras, cultivadas em sombra, oxidadas
MSC	- Folhas maduras, cultivadas em sol, canheadas
MSIN	- Folhas maduras, cultivadas em sol, <i>in natura</i>
MSO	- Folhas maduras, cultivadas em sol, oxidadas
P+nome da amostra	- Frações insolúveis após a precipitação com etanol
S+nome da amostra	- Frações solúveis após a precipitação com etanol
SP+nome da amostra	- Frações solúveis após o congelamento e degelo

Espectrometria de massas, cromatografia e ressonância magnética nuclear

API	- <i>Atmospheric Pressure Ionization</i> (ionização em pressão atmosférica)
CID	- <i>Collision Induced dissociation</i> (fragmentação induzida por colisão)
ELSD	- <i>Evaporative Light Scattering Detector</i> (espalhamento de luz)
ESI	- <i>Electrospray Ionization</i> (ionização por spray de elétrons)
GC-MS	- <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas)
HMBC	- <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	- <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
HSQC	- <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
MS	- <i>Mass Spectrometry</i> (espectrometria de massas)
m.u.	- <i>Mass units</i> (unidades de massa)
m/z	- Relação massa/carga
MS^2	- Espectro de fragmentação de massa (<i>tandem-MS</i>)
PDA	- <i>Photodiode Array</i> (arranjo de fotodiodos)
RID	- <i>Refractive Index Detector</i> (detector índice de refração)
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
R_f	- Fator de retenção relativo
R_t	- Tempo de retenção relativo
TIC	- <i>Total Ions Current</i> (análise de íons totais)
TLC	- <i>Thin Layer Chromatography</i> (cromatografia em camada delgada)
UPLC	- <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de ultra eficiência)

Análises estatísticas

ANOVA	- Análise de variância
PC1	- Componente principal 1
PC2	- Componente principal 2
PC3	- Componente principal 3
PCA	- <i>Principal Component Analysis</i> (análise por componentes principais)

Termos associados às técnicas de análise

Fragmentação <i>in-source</i>	- Quando ocorre fragmentação do analito direto na fonte de ionização, sem acionamento da CID
<i>Offline</i>	- Análise por espectrometria de massas com infusão direta.
<i>Online</i>	- Análise por espectrometria de massas combinada com a separação por cromatografia.

*Para as nomenclaturas de alguns termos optou-se pelo uso da linguagem inglesa, devido esses termos serem mais comuns/conhecidos nessa língua.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 FITOQUÍMICA E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	26
2.2 ERVA-MATE	27
2.2.1 Descrição botânica	27
2.2.2 Formas de uso	29
2.2.3 Situação do setor ervateiro no Brasil	30
2.3 PROCESSAMENTO E PRODUTOS.....	32
2.3.1 O chimarrão	32
2.3.1.1 Colheita.....	33
2.3.1.2 Sapeco.....	34
2.3.1.3 Secagem.....	35
2.3.1.4 Cancheamento.....	35
2.3.1.5 Beneficiamento	36
2.3.2 Chá mate	36
2.3.3 O processo oxidativo (fermentativo) da <i>Camellia sinensis</i>	37
2.3.4 Modalidades de processamento	39
2.4 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA	41
2.4.1 Xantinas.....	41
2.4.2 Polifenóis	43
2.4.3 Ácidos clorogênicos e ácidos cafeoilquínicos	43
2.4.4 Saponinas.....	44
2.4.5 Minerais	45
2.5 CARBOIDRADOS DE PLANTAS.....	46
2.5.1 Parede celular e polissacarídeos	46
2.6 USOS E BENEFÍCIOS.....	48
2.7 ALTERAÇÃO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PLANTAS	49
3 JUSTIFICATIVA	51
4 OBJETIVOS	53
4.1 OBJETIVO GERAL	53
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53

5 METODOLOGIA	54
5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	54
5.2 PREPARO DAS AMOSTRAS	54
5.2.1 Cancheamento da erva-mate (tipo chimarrão)	54
5.2.2 Oxidação (tipo chá preto).....	55
5.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	55
5.4 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS.....	56
5.4.1 Precipitação por adição de etanol.....	56
5.4.2 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo.....	56
5.5 DERIVATIZAÇÕES QUÍMICAS	56
5.5.1 Análise de composição monossacarídica	57
5.5.2 Determinação de ácidos urônicos.....	57
5.6 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	58
5.6.1 Cromatografia em camada delgada (TLC).....	58
5.6.2 Cromatografia líquida de exclusão estérica	59
5.6.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) ...	59
5.6.4 Cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC).....	59
5.6.5 ESI-MS (<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>)	61
5.6.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	61
5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	62
5.7.1 Atividade sequestrante de radicais livres (DPPH).....	62
5.7.2 Inibição da oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	62
5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	63
5.8.1 Análise quimiométrica.....	63
5.8.2 Análises de variância (ANOVA)	64
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	65
6.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRACIONAMENTO	65
6.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE ERVA-MATE (FRAÇÕES “SP”)	67
6.3 ANÁLISE DO SOBRENADANTE ETANÓLICO DE FOLHAS DE ERVA-MATE (FRAÇÕES “S”).....	77
6.3.1 Identificação e caracterização de compostos nas frações “S”	77
6.3.2 Identificação de compostos por UPLC-PDA-ESI-MS.....	83

6.3.3 Otimização da análise de UPLC-PDA para a quantificação de xantinas e fenólicos.....	86
6.3.4 Quantificação dos açúcares por UPLC	88
6.3.5 Análises de PCA para as quantificações	90
6.3.6 Atividade antioxidante.....	91
6.3.6.1 Atividade sequestrante de radicais livres (DPPH).....	91
6.3.6.2 Inibição da oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	94
7 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
Anexo I.....	108

1 INTRODUÇÃO

Esta pesquisa aborda a identificação e caracterização de compostos fitoquímicos em extrato aquoso de folhas de erva-mate de diferentes idades (jovens – 1 mês e maduras – 6 meses), sob diferentes condições de cultivo (sol e sombra) e submetidas a processamentos diferenciados (*in natura*, cancheamento e oxidada).

A *Ilex paraguariensis* St. Hill (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate ou simplesmente mate, é uma espécie nativa da América do Sul e tem sua ocorrência natural restrita a três países: Brasil, Paraguai e Argentina. Cerca de 80% da área de ocorrência pertence ao Brasil, distribuindo-se entre os estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e São Paulo. A região Sul é a maior produtora, além de consumidora, devido à tradição do chimarrão (HECK; DEMEJIA, 2007).

O chimarrão é a forma mais difundida de consumo da erva-mate, sendo preparado como infusão a quente das folhas e ramos processados e bebido em cuia de porongo (NIETSCHE, 2000), o recipiente típico dessa cultura. Na América do Sul, aproximadamente 30% da população ingere mais de 1 litro por dia dessa bebida (FILIP, 2000). Outra forma de consumo do mate se dá na forma de chá, o qual é preparado pela adição simples de água quente ao extrato seco da planta (extrato aquoso liofilizado). Também pode ser ingerido na forma de tereré, o qual é semelhante ao chimarrão, no entanto, o mate é ligeiramente torrado e deixado em repouso por cerca de 8 meses em local seco para somente então ser consumido com água fria (BASTOS; TORRES, 2003).

A cultura de utilização da erva-mate, descoberta pelos índios e posteriormente adotada pelos colonizadores, representa uma expressão cultural forte nas regiões onde é nativo (PASINATO, 2004). Além da importância cultural, diversos estudos têm comprovado os benefícios à saúde proporcionados pelo consumo de bebidas a base de erva-mate e inúmeras investigações relacionadas à sua produção vêm sendo desenvolvidas. Este interesse se deve ao fato desta espécie vegetal apresentar propriedades alimentícias e medicinais (tônica, diurética, antiinflamatória, antioxidante, entre outras) (ALIKARIDIS, 1987; KIKATANI; WATANABE; SHIBUYA, 1993; MEYER; HEINONEN; FRANKEL, 1998; KRAEMER *et al.*, 1996).

Diversos compostos químicos foram identificados na erva-mate e acredita-se que eles são os responsáveis pelas propriedades da planta. Os principais compostos bioativos presentes são os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas. Nesta última classe de compostos encontram-se a cafeína, a teobromina e a teofilina (ALIKARIDIS, 1987), componentes de reconhecida ação sobre o sistema nervoso central, aos quais é atribuída a ação estimulante do mate. Dentre as classes de saponinas encontram-se triterpenóides glicosilados, os ácidos ursólicos e oleanóico (GNOATTO *et al.*, 2007). Tais substâncias são responsáveis pelo amargor e espuma do mate, além de outras propriedades biológicas. Entre os compostos fenólicos destaca-se o elevado conteúdo de derivados de cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico e seus isômeros, aos quais se atribui a ação adstringente e antioxidante do produto (CLIFFORD, 1990; CARDOZO-JÚNIOR *et al.*, 2007)

Nos últimos anos, as indústrias ervateiras têm buscado ampliar o mercado da erva-mate com o lançamento de novos produtos, como os compostos de erva-mate e o chá aromatizado. Recentemente iniciou-se a demanda da matéria-prima para indústrias químicas e farmacêuticas, com interesse na produção de produtos de higiene e beleza que utilizam a essência de erva-mate para a produção de sabonete líquido, xampus e cremes para pele (MOSELE, 2002).

Para Campos (1996), o desenvolvimento tecnológico da erva-mate e derivados requer investimentos em pesquisa, modernização e otimização dos processos de produção, bem como a busca de uma maior qualidade e diversificação de produtos. Por se tratar de uma planta de composição química elevada, além dos atributos já conhecidos, pode-se vislumbrar muitas aplicações potenciais, as quais poderiam vir a ampliar o consumo de erva-mate e, conseqüentemente, a prospecção de novos mercados, nacionais e internacionais (VALDUGA, 1994).

A grande maioria das pesquisas relatadas foi conduzida com a erva-mate beneficiada para o chimarrão, isto é, seca e cancheada. A torrefação pode promover mudanças na composição química dos vegetais, como a degradação de cafeína e ácidos fenólicos e a formação de melanoidinas, pirazinas e pirinas, assim como alterar a cinética de extração de compostos bioativos (BASTOS *et al.*, 2006b) o que pode levar a modificações na biodisponibilidade e em atividades biológicas, como a atividade antioxidante (MANZOCCO *et al.*, 2001). Dessa forma, o processamento da

erva-mate em chimarrão ou outros processos, como a oxidação, podem influenciar sua composição química, diminuindo ou alterando componentes ativos.

Devido à elevada importância econômica da erva-mate nas regiões de ocorrência desta espécie e pela quase inexistência, na literatura científica, de estudos relacionados às mudanças estruturais que ocorrem durante o amadurecimento das folhas, influenciadas ou não pelo modo de cultivo, ou ainda pela maneira como as folhas são processadas. Um melhor entendimento dessas alterações auxiliará no desenvolvimento de produtos com maior qualidade e aceitabilidade de mercado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FITOQUÍMICA E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais no tratamento de enfermidades é conhecido desde a mais remota antigüidade, sendo as obras mais antigas sobre medicina e plantas medicinais originárias da China e Egito (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1983). Diversas culturas se valeram das plantas medicinais, sendo esta a principal, ou mesmo a única matéria prima para elaboração de medicamentos (ODY, 1993). No início do século XX, a descoberta e o desenvolvimento de processos de síntese de compostos orgânicos, culminaram no desenvolvimento de diversos medicamentos. Entretanto, efeitos colaterais, causados por eles, somados aos altos valores dos medicamentos sintéticos promoveram a busca por novas drogas, e o interesse por compostos fitoterápicos, uma alternativa de tratamento (VOLAK; STODOLA, 1990).

Em 1915 Sydler propôs o termo Farmacognosia para o estudo de drogas e medicamentos de origem natural, sendo a maioria proveniente de vegetais. Essa área da farmacologia, como ciência, passou a ser subdividida em áreas mais específicas, como por exemplo, a farmacoergasia que estuda as melhores formas de cultivo para cada planta e a farmacoquímica (fitoquímica) que estuda a origem, a síntese e as formas de extração dos compostos.

O estudo fitoquímico de plantas medicinais constitui numa alternativa na procura de novos agentes terapêuticos, sendo que tanto o levantamento bibliográfico como o conhecimento popular são levados em consideração para a identificação da atividade farmacológica.

Dessa forma o estudo de plantas medicinais, é uma ciência complexa, dependendo de muitas formas de conhecimento, e conseqüentemente, de profissionais especializados em diferentes áreas do saber (Di STASI, 1995).

Os compostos produzidos pelos vegetais são agrupados em dois grupos: os metabólitos primários, tais como carboidratos, proteínas e lipídeos; e os metabólitos secundários que são compostos elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários, tais como compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais, alcalóides, entre outros. São esses compostos os responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos, das plantas, e eles apresentam grande importância ecológica, uma vez que

podem atuar na atração de polinizadores, ou representar uma defesa química contra estresse ambiental (BALADRIN *et al.*, 1985; Di STASI, 1995).

A utilização de espécies medicinais pela população brasileira é relativamente grande, e seu uso e conhecimento vem sendo transmitido de uma geração para outra. Entretanto, estudos científicos integrados em diferentes áreas do conhecimento, confirmando o emprego das plantas medicinais, só passaram a ser realizados a partir da década de 70 (CALIXTO, 2003).

O Brasil é proprietário da maior biodiversidade do planeta, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do mundo. Este patrimônio genético tem valor econômico estratégico inestimável em várias atividades, mas é no desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (LAPA *et al.*, 2003; CALIXTO, 2003). A razão desta afirmação é facilmente comprovada quando se analisa o número de fármacos obtidos direta e indiretamente a partir de produtos naturais, já que cerca de um terço dos medicamentos mais vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de plantas medicinais utilizadas na medicina popular para os mais diversos fins (CALIXTO, 2003; SKY, 2003).

Baseado nestes princípios e conhecendo-se também o valor cultural e econômico da *Ilex paraguariensis*, é que despertou-se o interesse em realizar investigações mais detalhadas com relação à composição química desta planta sob determinadas condições.

2.2 ERVA-MATE

2.2.1 Descrição botânica

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) é uma árvore dióica, subtropical, perene, nativa da América do Sul, pertencente a família Aquifoliaceae (SANTOS, 2004). Sua área de ocorrência natural compreende o nordeste Argentino, Leste do Paraguai e região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Em menor quantidade, aparece no Mato Grosso do Sul e em reduzidos nichos de ocorrência de *Araucaria angustifolia* em Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (PASINATO, 2004). A Figura 1A mostra as principais regiões onde o mate é cultivado.

De altura variável, a erva-mate quando cultivada atinge cerca de 3-5 m, porém, na floresta pode alcançar 25 m de altura. As folhas apresentam limbo obovado e, comumente, têm de 5 cm a 10 cm de comprimento por 3 cm a 4 cm de largura (CARVALHO,1994) (Figura 1B). O mate é uma espécie produtora de flores e frutos, florescendo no período de outubro à novembro e frutificando de março a junho. A planta requer um regime anual rigoroso de chuvas, mas é pouco sensível à temperatura, sendo capaz de resistir à temperaturas de -6 °C, assim como períodos de neve, os quais acontecem em algumas das regiões onde é cultivada (HECK; DEMEJIA, 2007).

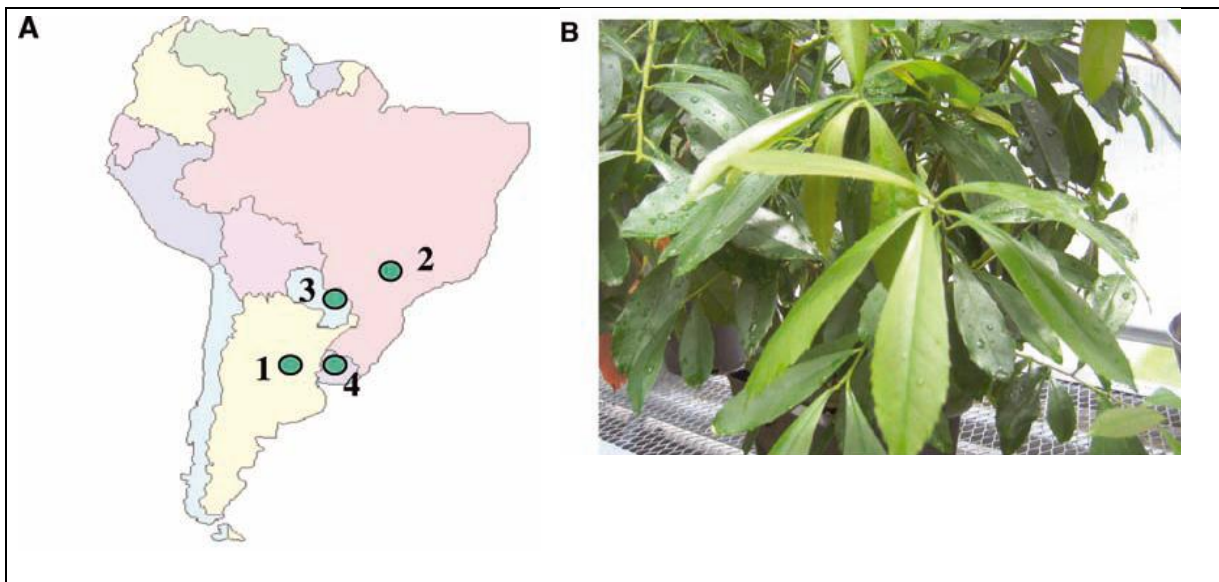


FIGURA 1 – (A) ÁREA DE DISTRIBUIÇÃO DA ERVA-MATE, (1) ARGENTINA; (2) BRASIL; (3) PARAGUAI E (4) URUGUAI. (B) *Ilex paraguariensis* (PLANTA).

FONTE: Adaptado de Heck e De Mejia (2007).

O cultivo e colheita do mate não são procedimentos uniformes, sendo realizados por vários métodos, dependendo da região. As três maneiras principais para o cultivo e colheita são a exploração extrativista da floresta natural (ervais nativos), sistema misto, e plantações cultivadas (monocultivo). O consorciamento com outras espécies (sistema misto) e a exploração dos ervais nativos são bastante populares no Brasil e pouco utilizados no Paraguai, enquanto que os monocultivos são a principal forma de produção na Argentina (HECK, SCHAMALK; DEMEJIA, 2008).

A exploração da erva-mate consiste em uma atividade agrícola importante e representa um auxílio no equilíbrio dos ecossistemas locais, pois aceita o sistema de consorciação com outras espécies e ajuda a conservar a diversidade biológica local (PASINATO, 2004). No entanto, estudos têm considerado que o microclima, em especial a luminosidade, é um fator determinante de alteração das características como área foliar e fitomassa nos cultivos de erva-mate (VIEIRA *et al.*, 2003). Além disso, acredita-se que o microclima poderia influenciar no sabor das infusões do mate, por haver diferenças na composição química de plantas cultivadas em diferentes ambientes.

As melhores condições de desenvolvimento, longevidade e produtividade da erva-mate estão intimamente ligadas à fertilidade do solo e sua exploração racional. Quanto à longevidade, calcula-se que a planta seja capaz de viver, em estado selvagem, algumas dezenas de anos, permitindo colheitas periódicas e sucessivas, desde que sua exploração seja realizada com cuidado, pois existem indicações que a produção aumenta gradativamente apenas até os 30 anos de idade (VALDUGA, 2002).

2.2.2 Formas de uso

A cultura da utilização da erva-mate é antiga no Sul do Brasil, tendo sido iniciada pelos índios nos primórdios de sua civilização e inicialmente utilizada por pajés e caciques, por atribuírem a ela poderes sobrenaturais. Com o passar dos anos, passou a ser utilizada também pelos colonizadores, representando uma expressão cultural forte na região (BERKAI; BRAGA, 2000).

O consumo do produto está atrelado à tradição de se tomar chimarrão, chá ou derivados, sendo os estados do Paraná e Rio Grande do Sul os tradicionais consumidores de chimarrão, de forma que cerca de 80% do consumo de erva-mate é sob a forma dessa bebida. Já no Mato Grosso do Sul demanda-se e aprecia-se mais o chá mate e o tereré (PARANÁ, 2000).

O chimarrão constitui-se na principal infusão feita à base de erva-mate triturada, com ampla difusão na Argentina, Paraguai, Uruguai e Sul do Brasil. Para o consumo tradicional, utiliza-se um recipiente de volume variável, denominado cuia, em que são acomodadas a erva-mate e a bomba, sendo esta um cilindro metálico

que filtra a infusão no seu extremo inferior. “Tomar chimarrão” constitui-se na sucção (pelo outro extremo da bomba) do extrato obtido pela sucessiva adição de água quente (70 °C a 90 °C) à erva-mate (SABBATELLA *et al.*, 2006).

Diferente do chimarrão e do chá mate, que são infusões à quente, o tereré é uma bebida fria preparada a partir de um produto diferenciado de folhas de erva-mate, as quais são trituradas de forma mais grosseira (ANDRADE *et al.*, 1999 *apud* PASINATO, 2004). As infusões quentes permitem a extração quase completa dos componentes solúveis em água, porém na infusão a frio (tereré) a extração dos componentes solúveis é razoavelmente menor (PARANÁ, 2000).

A importância da cultura do chimarrão para o Rio Grande do Sul foi formalizada pela promulgação da Lei nº 11.929, de 20 de Junho de 2003, a qual institui o chimarrão como “bebida símbolo” do Estado do Rio Grande do Sul (RIO GRANDE DO SUL, 2003). Além do mais, por ter sido esteio econômico da Revolução Farroupilha, a erva-mate passou a ser, desde então, representada na bandeira do Rio Grande do Sul (LINHARES, 1969 *apud* PASINATO, 2004)

2.2.3 Situação do setor ervateiro no Brasil

O Rio Grande do Sul no início da década de 70 consistia no principal produtor de erva-mate, respondendo por cerca de 50% da produção do País. Sua produção foi reduzida e em 1989 sua participação caiu para 25%. No mesmo período, o Paraná aumentou em 10% sua participação na produção nacional, tornando-se o principal produtor, produzindo 55.000 toneladas de erva por ano, correspondendo à cerca de 37% do total do país (MOSELE, 1998).

O Estado de Santa Catarina, segundo produtor nacional, participando com cerca de 36% sempre teve uma produção próxima à paranaense. Enquanto ocorreu uma redução da oferta de erva-mate no Rio Grande do Sul, da ordem de 65% no período de 1970/89, verificou-se em contrapartida, que o Mato Grosso do Sul apresentou um incremento de 270% (MOSELE, 1998). Em 2005 o principal produtor foi o Paraná, com uma produção de 139.657 toneladas (58,5% do total nacional), Santa Catarina o segundo, com 25,8%, seguidos pelo Rio Grande do Sul e o Mato Grosso do Sul, os quais foram responsáveis por 15,6% e 0,2% da produção nacional, respectivamente (IBGE, 2005).

No Brasil o setor ervateiro compreende cerca de 450 municípios dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, englobando cerca de 750 indústrias, gerando um total de aproximadamente 700.000 empregos diretos e indiretos, para uma produção anual aproximada de 650.000 toneladas.

Atualmente, o setor ervateiro ainda depende quase que exclusivamente da comercialização da erva-mate na forma de chimarrão (RUCKER; MACARI; ROCHA, 2003), o que limita o mercado às regiões onde é produzida. Estudos têm sido conduzidos com o intuito de identificar rotas alternativas para aplicação da erva-mate, visando agregar valor a essa importante matéria prima regional (VALDUGA, 1994). Segundo o Anuário Brasileiro de Erva-mate (1999), há um campo enorme para o crescimento do consumo da erva-mate, tanto no Brasil, como no exterior.

Além de serem utilizadas no preparo de bebidas, as folhas de erva-mate constituem matéria-prima para: corantes naturais, antioxidantes, cosméticos, medicamentos (PASINATO, 2004), entre outros descritos na Tabela 1.

TABELA 1 – APLICAÇÕES INDUSTRIAIS E USOS ALTERNATIVOS PARA A ERVA-MATE.

<i>Aplicação Industrial</i>	<i>Sub-produtos comerciais</i>	<i>Forma de utilização</i>
Bebidas	Chimarrão, tereré e chá mate Refrigerantes, sucos, cerveja e vinho	Infusão quente e fria Extrato de folhas
Insumos de alimentos	Corante natural, conservante alimentar sorvete; balas, bombons, caramelos; chicletes e gomas	Clorofila e óleo essencial
Medicamentos	Estimulante do sistema nervoso central, compostos para o tratamento de hipertensão, pneumonia e bronquite	Extrato de cafeína e teobromina
Higiene geral	Bactericida e antioxidante hospitalar e doméstico; esterilizante, emulsificante, tratamento de esgoto, reciclagem do lixo urbano	Extrato de saponinas e óleos essenciais
Produtos de uso pessoal	Perfumes, desodorantes, cosméticos, sabonetes	Extrato de folhas e clorofila

FONTE: Anuário Brasileiro da Erva-mate (1999).

Devido a uma série de fatores – tecnológicos, econômicos e legais – a atividade ervateira nas diversas regiões produtoras tem passado por um momento de transição preocupante. Maiores investimentos em pesquisas, em avaliação de custos dos diferentes sistemas produtivos e em capacitação de mão de obra são algumas das soluções apontadas para as dificuldades vividas atualmente pelo setor ervateiro (RUCKER; MACARI; ROCHA, 2003).

A erva-mate, em se tratando de desenvolvimento de novos produtos, apresenta um futuro muito promissor. Tanto na utilização de seu extrato solúvel, como na linha de chás, seus benefícios nutricionais e terapêuticos dariam suporte a esta finalidade. As pesquisas nesta linha deverão ser implementadas e intensificadas e as indústrias alertadas para a importância desta demanda, estimulando-as a serem parceiras para as inovações.

2.3 PROCESSAMENTO E PRODUTOS

A erva-mate será classificada como chimarrão, quando for cancheada (triturada e peneirada), padronizada, moída e preparada para o consumo com água quente e será classificada como chá mate quando for cancheada e tostada para o consumo como infusão (BRASIL, 1998).

2.3.1 O chimarrão

A indústria da erva-mate evoluiu consideravelmente nos últimos anos. Nos dias atuais utiliza modernos soques ervateiros e máquinas movidas a energia elétrica. Entretanto, ainda hoje são encontradas unidades que empregam tecnologia tradicional, com o predomínio de equipamentos manuais e o fogo continua sendo a única metodologia empregada nos processos de sapeco e secagem (BERKAI; BRAGA, 2000).

O processo agroindustrial da erva-mate para chimarrão no Brasil esta estruturado sobre dois ciclos: cancheamento e beneficiamento. O ciclo do cancheamento se constitui por três etapas: sapeco (branqueamento), secagem e cancheamento (trituração), resultando na erva cancheada. O ciclo do beneficiamento se resume em três operações fundamentais: retificação da umidade (por secagem),

separação (folhas e palitos) e mistura (formação de tipos especiais de erva-mate para comercialização) (PARANÁ, 2000).

As condições para o processamento são variadas, dependendo do produtor e do objetivo final para o estilo de infusão desejada. Processadores podem variar o tempo e a temperatura de sapeco e secagem. Nem todos os produtores envelhecem a erva, enquanto outros variam o tempo de envelhecimento (BASTOS *et al.*, 2006a). As principais etapas do processamento da erva-mate tipo chimarrão estão resumidas no fluxograma da Figura 2.

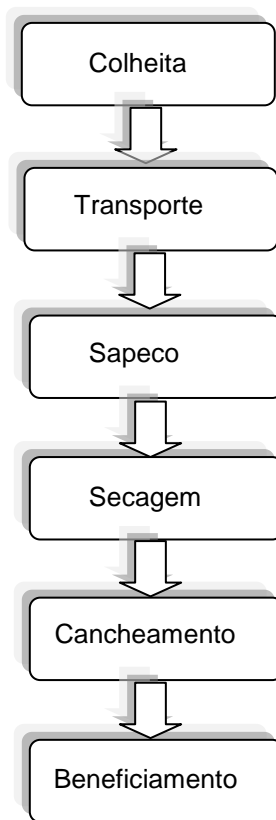


FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO DE ERVA-MATE TIPO CHIMARRÃO.

2.3.1.1 Colheita

Na colheita retira-se em torno de 70% de galhos e folhas de cada erva, permanecendo 30% para manter a estrutura e acelerar a recuperação da árvore. O período ideal para a colheita (safra) é de maio a setembro, concentrando-se nos

meses de julho e agosto (ANDRADE, 1999). Porém, visando o abastecimento do mercado o ano inteiro, uma parte dos produtores de erva-mate efetua a colheita durante os meses de verão, período em que a planta está em pleno desenvolvimento. Os impactos da safrinha, como é chamada, sobre a planta, ainda são discutidos (RUCKER; MACARI; ROCHA, 2003).

2.3.1.2 Sapeco

O sapeco consiste do contato rápido dos ramos e das folhas de erva-mate com chamas de fogo. Na sua forma rudimentar, é realizado manualmente, junto ao fogo e consiste na passagem rápida dos ramos com folhas sobre as chamas de uma fogueira de lenha, específica para este fim. O sapeco mecânico é um tratamento térmico realizado em cilindro metálico rotativo, onde a temperatura média da erva na entrada do sapecador é de 400 °C e na saída é de 65 °C. O tempo de residência oscila em torno de 8 minutos (PARANÁ, 2000; MENDES, 2005).

O sapeco tem por finalidade reduzir a umidade e evitar o escurecimento das folhas da erva-mate. O escurecimento ocorre pela presença das enzimas polifenoloxidase e peroxidase que, em 1928, foram identificadas por Senglet como as responsáveis pela oxidação dos compostos fenólicos quando as folhas frescas são tiradas do pé e deixadas ao ar (PANEK, 1955). Em virtude disso, esse processo deve ser realizado logo após a colheita, a fim de evitar a perda de qualidade dos ramos e folhas da erva-mate, se o produto desejado for a erva do tipo chimarrão. Um tratamento térmico ineficiente ou excessivo nessa etapa prejudicaria a qualidade do produto, pois por um lado permitiria a ação residual das enzimas (principalmente as peroxidases) e por outro produziria a queima do produto (XANDER *et al*, 2000).

Este processo de sapeco está em contraste com a produção de chá preto (proveniente das folhas da *Camellia sinensis*). As folhas do chá preto são expostas a um envelhecimento e oxidação e não são sapecadas antes de secar. Nesta bebida, a oxidação pela polifenoloxidase é permitida para dar forma a dímeros compostos (HARA, 2001).

2.3.1.3 Secagem

A operação de secagem de erva-mate é feita no carijó ou barbaquá ou ainda em secadores mecânicos. No carijó, processo primitivo, as chamas atuam diretamente sobre a erva, enquanto que no barbaquá, o material recebe o calor por um canal subterrâneo, na entrada do qual é colocada uma fornalha (MENDES, 2005). Existem dois tipos de secadores mecânicos: rotativo e de esteira. O tempo de residência e a temperatura média da erva variam entre eles. 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 por aproximadamente 30 minutos. No entanto na entrada do secador a temperatura média é de 350 °C e na saída de 110 °C (VALDUGA; FINZER; MOSELE, 2003).

O material entra no secador com uma umidade média de 25% e sai com aproximadamente 5% de umidade (VALDUGA; FINZER; MOSELE, 2003). O excesso de água pode ocasionar deterioração microbiológica e degradação enzimática dos constituintes nutricionais e químicos do produto (PARANÁ, 2000), além de acelerar outros processos de deterioração.

2.3.1.4 Cancheamento

O cancheamento consiste na trituração da erva após o processo de secagem. Este pode ser feito por meio de um triturador de madeira dura (pequena escala), ou um cancheador metálico (escala industrial). Em seguida, a erva é peneirada e o material coletado passa a denominar-se erva cancheada. Esse termo é utilizado devido à produção da erva-mate cancheada ser realizada em local assoalhado denominado de cancha, onde a massa foliar é submetida à trituração ou fragmentação (COSTA, 1989). Esta pode ser usada diretamente como matéria prima para chás ou como matéria prima para engenhos ou beneficiamento, especialmente para a preparação de produtos comerciais, como a erva-mate para o chimarrão.

2.3.1.5 Beneficiamento

A erva-mate cancheada é peneirada e misturada em proporções de folhas e hastes de acordo com o produto desejado. A erva cancheada é armazenada em sacos, tulhas, ou a granel, quando destinada ao mercado interno, tendo como tempo de armazenagem três a quinze dias. Se destinada a produção de erva-mate para o chimarrão, após a mistura, a erva é moída para reduzir a granulometria do material, utilizando moinho de facas ou soque (VALDUGA; FINZER; MOSELE, 2003).

2.3.2 Chá mate

O chá mate é obtido da erva-mate cancheada e tostada e deve seguir o Regulamento Técnico para Fixação da Identidade e Qualidade de Chás – plantas destinadas à preparação de infusões ou decocções - da Secretaria da Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde (Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998), que define chás como produtos constituídos por partes de vegetais (inteiras, fragmentadas ou moídas) obtidos por processos tecnológicos adequados a cada espécie, utilizados exclusivamente na preparação de bebidas por infusão ou decocção em água potável (BRASIL, 1998).

Quanto à designação, o produto, quando simplesmente produzido a partir da *Ilex paraguariensis*, deve conter a expressão: “chá mate” seguida dos termos “verde”, “tostado” ou “queimado” (BRASIL, 1998).

A erva-mate, após sofrer o processo de cancheamento e torrefação, ao contrário de algumas outras plantas usadas na obtenção de chás, não passa por processo de oxidação, podendo ser chamada de erva-mate tostada. Somados aos fatores naturais que interferem diretamente nos componentes físico-químicos da erva-mate, estão os sistemas de processamento, que além de interferir na sua composição química, ainda determinam a qualidade da erva, bem como suas características sensoriais (DONADUZZI *et al.*, 2000).

O processo de torrefação leva a modificações importantes em produtos de origem vegetal, como a formação de melanoidinas, assim como a possível diminuição do teor de polifenóis. Essas mudanças refletem-se nas atividades biológicas desses produtos, entre elas a atividade antioxidante, conforme já relatado

para o café e o cacau, por exemplo (FLAMENT, 1991; CHYAU *et al.*, 2002; SAKANARA; TACHIBANA; OKADA, 2005).

Há um vasto potencial a ser explorado com a inclusão da erva-mate na linha de bebidas quentes, no que se refere a bebidas direcionadas para o consumo em ocasiões especiais ou para obter solúveis, quando bem processada e padronizada, utilizando a tecnologia já disponível para o chá (VALDUGA; FINZER; MOSELE, 2003).

Dessa forma, o uso do processo oxidativo (fermentativo), similar ao que é realizado com a *Camellia sinensis*, pode tornar-se uma boa alternativa na obtenção de chás provenientes da erva-mate, sem que haja a influência da torrefação em suas características físico-químicas.

2.3.3 O processo oxidativo (fermentativo) da *Camellia sinensis*

O chá é uma das três bebidas mais populares do mundo, seguindo ao lado do café, com um consumo *per capita* de 120 ml/dia (MUKHTAR; AHMAD, 2000). Vários são os tipos de chás consumidos, mas quase todos eles são provenientes de uma mesma espécie de planta, a *Camellia sinensis*, a qual é nativa da Ásia, mas cultivada em mais de 30 países em todo o mundo (MUTHUMANI; KUMAR, 2007).

Muitos estudos sobre os processamentos do chá foram efetuados, permitindo classificá-lo em quatro grupos distintos, baseados na técnica de produção e no processo oxidativo: branco, verde, *oolong* e preto. A principal diferença entre os tipos está baseada no processo de auto-oxidação, catalisados pelas enzimas polifenoloxidasas e peroxidases. Basicamente, a oxidação é um processo onde as folhas do chá, após sofrerem algum processamento (ao serem picadas ou esmagadas, por exemplo) interagem com o oxigênio, ocorrendo assim o escurecimento enzimático (MUTHUMANI; KUMAR, 2007).

O chá branco é composto de folhas jovens da *Camellia sinensis* que não sofreram efeitos da oxidação, pois os botões estão protegidos da luz do sol para prevenir a formação de clorofila. No chá verde, a oxidação é interrompida pela aplicação de calor, que pode ocorrer pela vaporização, (método tradicional japonês) ou mergulho em bandejas quentes (o método tradicional chinês). Já no chá *oolong*

ocorre uma oxidação parcial, um pouco mais atenuada do que no chá preto, onde a oxidação é quase total (TAKEO, 1992).

Segundo Ranganath *et al.* (1994) o processamento do chá preto é realizado com folhas verdes e botões vegetativos, por meio de um processo fermentativo, enquanto que no chá verde ocorre somente uma infusão de folhas secas. A produção do chá preto ainda é conhecida como fermentação, pois antigamente, acreditava-se que ele era produzido por processo fermentativo. Na verdade este processo não pode ser considerado um processo fermentativo, pois não ocorre degradação por microrganismos e não há a produção de etanol ou outro produto de fermentação (MATSUBARA; AMAYA, 2006)

Os polifenóis do chá são amplamente estudados devido ao seu poder antioxidante e seus efeitos antimutagênicos. A grande maioria dos polifenóis do chá verde são os flavonóides, conhecidos como catequinas. As principais catequinas do chá verde são: (-) galato de epigalocatequina (EGCG), (-) epigalocatequina (EGC), (-) galato de epicatequina (ECG), (-) epicatequina (EC) e catequina(C). (SUGANUMA *et al.*, 1999; MUKHTAR; AHMAD, 2000; MORRE *et al.*, 2003; BUNKOVA; MAROVA; NEMEC, 2005; MUKAI; NAGAI; OHARA, 2005).

Já no chá preto, os principais polifenóis encontrados são as teoflavinas e tearubiginas (SUGANUMA *et al.*, 1999; MUKHTAR; AHMAD, 2000; MORRE *et al.*, 2003; BUNKOVA; MAROVA; NEMEC, 2005; MUKAI; NAGAI; OHARA, 2005).

Durante o processo de oxidação – processo este usado para a obtenção do chá preto – as catequinas são oxidadas para ortoquinonas, as quais se condensam na forma de teoflavinas. O ácido gálico também é oxidado, condensando-se com teoflavinas para produzir as tearubiginas (JAYARAMAN, 2002).

O conteúdo de teoflavinas presente no chá determina a refrescância, brilho e qualidade da bebida. Enquanto que a cor, a consistência e o sabor são determinados pelo conteúdo de tearubiginas (JAYARAMAN, 2002).

A oxidação é enzimática, e para que as enzimas sejam liberadas é necessário diminuir 30% o conteúdo de água das folhas. Posteriormente essas folhas são trituradas e deixadas expostas ao ar (TAKEO, 1992).

Acredita-se que devido à composição abundante de polifenóis, assim como a *Camellia sinensis*, a erva-mate pode consistir em um recurso viável para a elaboração de novos produtos, por meio de processos oxidativos.

2.3.4 Modalidades de processamento

A principal diferença entre a produção do chimarrão e do chá verde é o método de secagem. O chá verde é seco rapidamente, em altas temperaturas, o que retém as características de folhas secas, fonte de desenvolvimento do sabor e aroma. A erva mate é seca lentamente e freqüentemente usando-se a fumaça da madeira. Isto resulta em características diferentes de sabor e contribui com as mudanças na composição química e na aparência física (HECK; DE MEJIA, 2007).

Outra importante diferença entre a erva-mate e o chá verde é a presença de hastes no produto final. No chá verde todas as hastes grandes são removidas antes de moer, enquanto que no mate pode haver um alto índice de hastes (HECK; MEJIA, 2007). A Figura 3 mostra as principais diferenças entre os processamentos da erva-mate para chimarrão e chá mate e dos chás verde e preto.

O processo de sapeco não está presente na elaboração do chá preto, pois o objetivo é o escurecimento das folhas por ação das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas, as quais são inativadas durante o processo de sapeco. Por outro lado, por promover a oxidação de compostos fenólicos, as oxidases podem ser empregadas em processos biotecnológicos (CENI, 2005).

Molin (2008) padronizou o processo oxidativo em erva-mate, estudando suas características físico-químicas e relacionando-as com melhores condições de processamento (pH, temperatura e umidade) e tempo de oxidação, obtendo bons resultados com relação ao aroma e sabor da infusão proveniente das folhas oxidadas.

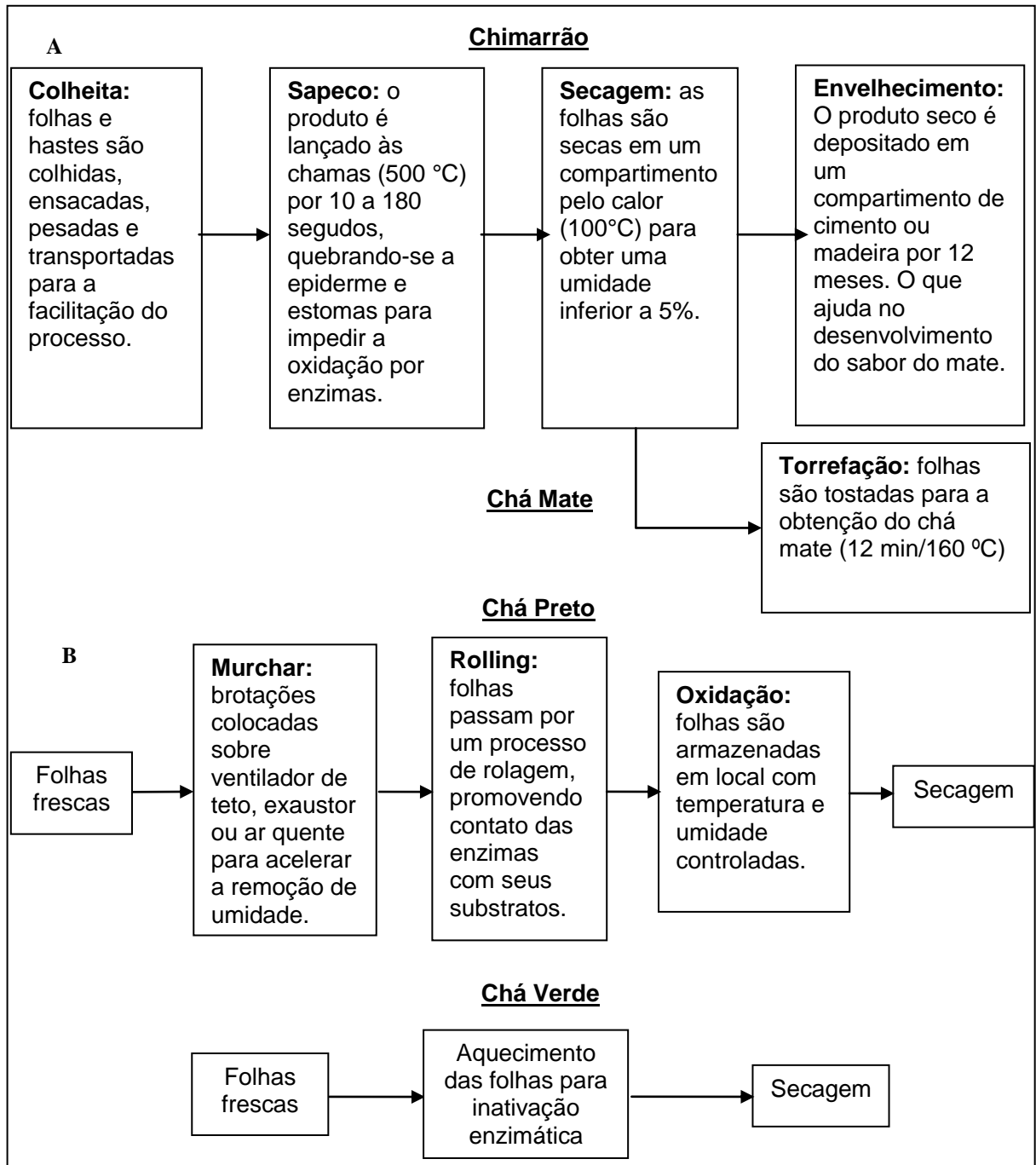


FIGURA 3 - (A) PROCESSAMENTO DAS FOLHAS DE *Ilex paraguariensis* NO CHIMARRÃO E CHÁ MATE (B) PROCESSAMENTO DAS FOLHAS DE *Camellia sinensis* NO CHÁ PRETO E NO CHÁ VERDE.

FONTE: Adaptado de Schmalko e Alzamora (2001); Heck e De Mejia (2007).

2.4 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA

As investigações químicas relativas à erva-mate iniciaram-se com Trommsdorff em 1836, que constatou a presença de diversas substâncias resinosas, matéria corante amarela, ácido tânico e outros. A identificação do principal alcalóide, a cafeína, ocorreu em 1843 por Stenhouse. Em 1848 Rochleder, estudando o mate do Paraguai, identificou o ácido do mate – o ácido cafeico, já conhecido das sementes de café (CENI, 2005).

Em 1944, Veronese identificou constituintes da erva-mate: celulose, gomas, dextrina, mucilagem, glucose, pentose, substâncias graxas, resina aromática (formada por uma mistura de oleína, palmitina e lauro-estearina), legumina, albumina, cafeína, teofilina, cafearina, cafamarina, ácido matêico, ácido fólico, ácido cafeico, ácido virídico, clorofila, colessterina e óleo essencial. Nas cinzas encontram-se grandes quantidades de potássio, lítio, ácido fosfórico, sulfúrico, carbônico, clorídrico e cítrico, além de magnésio, manganês, ferro, alumínio e traços de arsênico (CENI, 2005).

Numerosos compostos químicos ativos foram identificados na erva-mate, os quais acredita-se serem benéficos à saúde. Destes, dois compostos são mais elevados, os polifenóis (ácidos clorogênicos, ácido cafeico; ácido 3,4-dicafeoilquínico; ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico) e as xantinas (cafeína e teobromina), seguido pelos flavonóides (quercetina, caempferol e rutina); aminoácidos, minerais (P, Fe e Ca) e vitaminas (C, B1 e B2) (POMILIO; TRAJTEMBERG; VITALE, 2002; ZAPOROZHETS *et al.*, 2004).

2.4.1 Xantinas

As xantinas são uma classe de alcalóides de purina encontradas em muitas plantas, incluindo o chá, o café e o chocolate. As xantinas encontradas no mate incluem a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) e teofilina (1,3-dimetilxantina) (ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, 2000). As fórmulas estruturais destes compostos estão apresentadas na Figura 4.

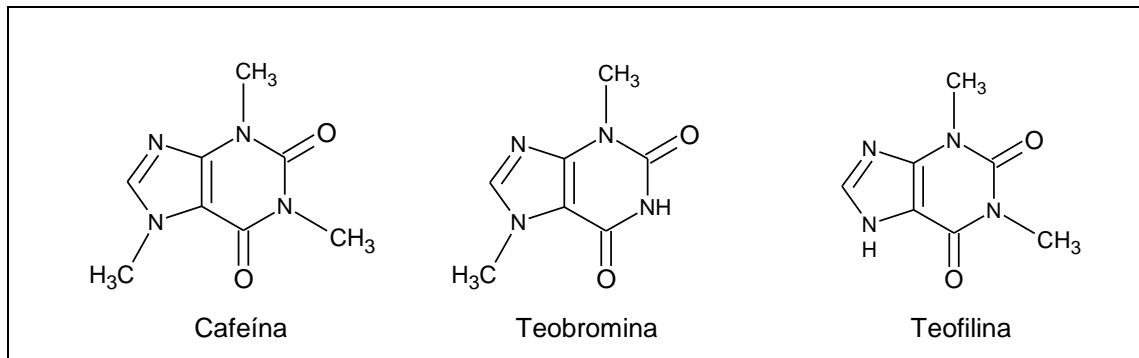


FIGURA 4 - ESTRUTURA DAS XANTINAS: CAFEÍNA (1,3,7-TRIMETILXANTINA), TEOBROMINA (3,7-DIMETILXANTINA) E TEOFILINA (1,3-DIMETILXANTINA).

FONTE: Adaptado de Heck e De Mejia (2007).

Dos três compostos, a cafeína é encontrada em concentrações mais elevadas, 1 a 2% do peso seco da planta, seguida pela teobromina, 0,3 a 0,9% do peso seco (ITO; CROZIER; ASHIHARA, 1997).

Estes dois compostos são encontrados primeiramente nas folhas da planta e freqüentemente em concentrações menores nas hastes presentes no chimarrão. Em contraste com a cafeína e a teobromina, a teofilina é encontrada em pequenas quantidades nas folhas da planta. Isto se deve ao fato da teofilina ser um intermediário no catabolismo da cafeína (ITO; CROZIER; ASHIHARA, 1997).

São atribuídas às metilxantinas várias propriedades farmacológicas, que incluem estimulação do sistema nervoso central, vasoconstrição periférica, relaxamento do músculo liso e estimulação do miocárdio (KIKATANI; WATANABE; SHIBUYA, 1993; LORISTI; TOPS, 2003).

O conteúdo de xantinas está associado a fatores genéticos e ambientais. Há evidências de que a época de colheita influencia a concentração das metilxantinas encontradas na espécie, variando entre 1 a 10 mg por grama de metilxantinas totais, dependendo da época do ano (SCHUBERT *et al.*, 2006).

O processo de secagem também pode afetar significativamente a concentração de cafeína, de modo que a sua concentração em folhas secas é mais baixa do que em folhas frescas (SCHMALKO; ALZAMORA, 2001). Entretanto, quando preparadas infusões provenientes de folhas secas em comparação com aquelas provenientes de folhas frescas, observa-se uma concentração mais elevada

na infusão oriunda do produto seco. Isso pode ser explicado pelo rompimento das células durante o processo de secagem (BASTOS *et al.*, 2006b).

2.4.2 Polifenóis

Os polifenóis são uma classe de compostos que contêm um anel de benzeno com um ou mais grupos de hidroxilas. A presença de fenólicos em folhas de erva-mate é conhecida desde 1935, quando Woodard e Cowland (*apud* ALIKARIDIS, 1987) relataram a presença de uma substância chamada "coffetannin" que, quando hidrolisada, resultava em ácido cafeico.

Esses compostos foram analisados por diferentes métodos, incluindo HPLC (CARINI *et al.*, 1998; CHANDRA; DEMEJIA, 2004), mostrando que suas concentrações na erva-mate variam de acordo com sua moagem, grau de pureza e também de acordo com o tipo de solvente orgânico usado para sua extração.

A concentração de polifenóis no mate tem uma forte correlação com a capacidade antioxidante deste produto (CHANDRA; DEMEJIA; 2004). A erva-mate mostra uma concentração ligeiramente mais elevada de ácido clorogênico do que o chá verde (BASTOS *et al.*, 2007b).

Compostos polifenólicos encontrados nas infusões de erva-mate diferem significativamente dos encontrados no chá verde, porque no mate não foi observada a presença de catequinas, mas sim grande concentração de ácido clorogênico.

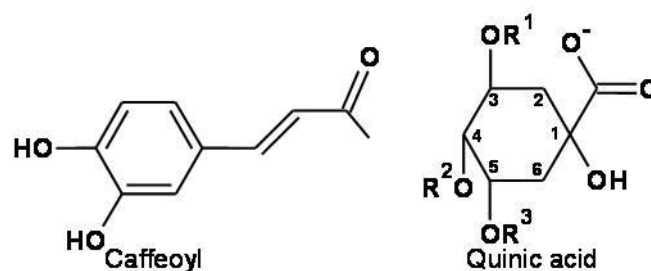
2.4.3 Ácidos clorogênicos e ácidos cafeoilquínicos

Os ácidos clorogênicos pertencem à família dos ácidos cinâmicos, que contém uma série de ácidos *trans*-fenil-3-propenóicos divergentes, em sua substituição do anel. Estes compostos estão amplamente distribuídos como conjugados na planta. Os mais comuns são os ácidos cafeico (3,4-dihydroxicinâmico), ferúlico (3-metoxi, 4-hydroxicinâmico), sinápico (3,5-dimetoxi, 4-hydroxicinâmico) e p-cumárico (4-hydroxicinâmico) (BASTOS *et al.*, 2007a).

Os ácidos clorogênicos são ésteres formados entre estes ácidos *trans*-cinâmicos e o ácido quínico e o mais comum é o ácido 5-O-cafeoilquínico. Segundo Clifford (2000) estes ésteres podem ser subdivididos pela identidade, número e

posição dos resíduos acila. Mono e di-ésteres de ácido cafeico (ácidos cafeoilquínicos), ácido p-cumárico, ácidos p-cumaroilquínicos e ácido ferúlico (feruloilquínicos) são os principais ácidos fenólicos em erva-mate.

Os derivados de cafeoil (ácidos cafeoilquínicos) encontrados no mate incluem o ácido cafeico, ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico), ácido *neo*-clorogênico, ácido *crypto*-clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico (FILIP *et al.*, 2000). Esses compostos derivados de cafeoil são constituintes preliminares que esclarecem a capacidade antioxidante do mate e suas estruturas são mostradas na Figura 5.



Caffeoylquinic acid series

$R^1, R^2 = H; R^3 = \text{caffeoyl}$ – chlorogenic acid

$R^1, R^3 = H; R^2 = \text{caffeoyl}$ – crypto-chlorogenic acid

$R^2, R^3 = H; R^1 = \text{caffeoyl}$ – neo-chlorogenic acid

Dicafeoylquinic acid series

$R^3 = H; R^1, R^2 = \text{caffeoyl}$ – 3,4-dicafeoylquinic acid

$R^2 = H; R^1, R^3 = \text{caffeoyl}$ – 3,5-dicafeoylquinic acid

$R^1 = H; R^2, R^3 = \text{caffeoyl}$ – 4,5-dicafeoylquinic acid

FIGURA 5 - ESTRUTURA DOS ISÔMEROS DE ÁCIDOS CAFEOILQUÍNICOS E DICAFEOILQUÍNICOS.

As altas concentrações desses derivados encontrados na espécie *Ilex paraguariensis*, a diferencia das demais espécies de *Ilex* que podem ser usadas como adulterantes na composição do mate (*I. brevicuspis*, *I. argentina* e *I. dumosa*), as quais possuem concentrações muito baixas desses compostos (FILIP *et al.*, 2001).

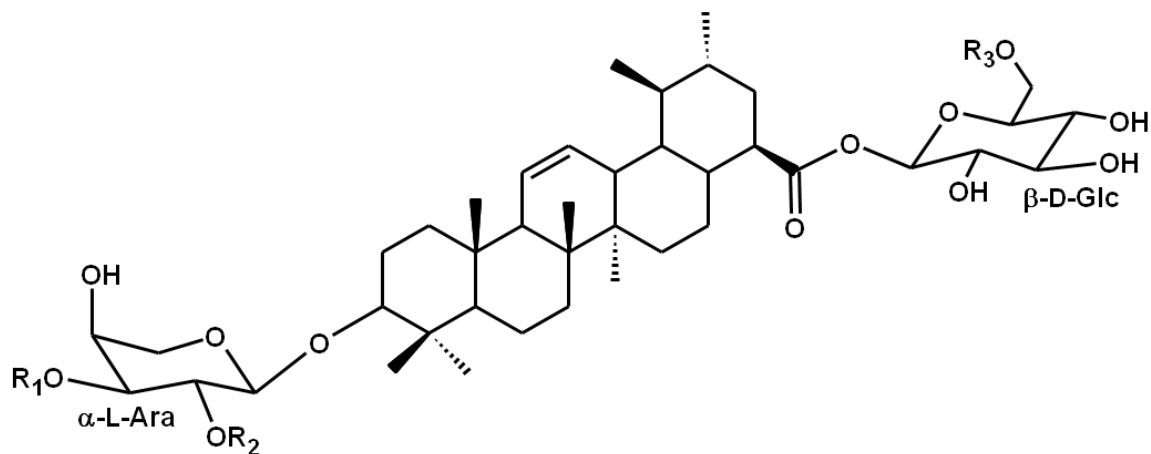
2.4.4 Saponinas

Saponinas são compostos amargos, solúveis em água, encontrados em muitos tipos de plantas e acredita-se que são fatores distintos das infusões de erva-

mate. Tem papel fundamental, não somente no sabor, mas também são atribuídos a elas, propriedades anti-inflamatórias e hipocolesterolêmicas (GNOATTO *et al.*, 2005).

Diversos desses compostos triterpenóides contendo ou ácido ursólico ou oleanólico foram isolados do mate. As primeiras saponinas identificadas, contendo ácido ursólico e oleanólico foram chamadas de: metasaponinas 1, 2, 3, 4 e 5 (GOSMANN *et al.*, 1995) (Figura 6).

Muitas das saponinas encontradas em *Ilex paraguariensis* mostram possuir propriedades antiparasitas, incluindo as metasaponinas 1, 3 e 4. Também confirmou-se que os triterpenóides encontrados em *Ilex* são antitripanossomais (TAKETA, 2004).



Matesaponina 1 = $R_1 = \beta\text{-D-Glc}$; $R_2 = R_3 = \text{H}$

Matesaponina 2 = $R_1 = \beta\text{-D-Glc}$; $R_2 = \alpha\text{-L-Rha}$; $R_3 = \text{H}$

Matesaponina 3 = $R_1 = R_3 = \beta\text{-D-Glc}$; $R_2 = \text{H}$

Matesaponina 4 = $R_1 = R_3 = \beta\text{-D-Glc}$; $R_2 = \alpha\text{-L-Rha}$

Matesaponina 5 = $R_1 = \beta\text{-D-Glc}$; $R_2 = \alpha\text{-L-Rha}$; $R_3 = \beta\text{-D-Glc (1}\rightarrow\text{4) } \beta\text{-D-Glc}$

FIGURA 6 – ESTRUTURA GENÉRICA DAS SAPONINAS COM A LOCALIZAÇÃO COMUM DOS GRUPOS R.

2.4.5 Minerais

O mate contém altas concentrações de compostos inorgânicos. Os minerais, alumínio, cromo, cobre, ferro, manganês, níquel, potássio e zinco são

particularmente interessantes devido a sua importância no metabolismo e no desenvolvimento humano (HECK; DE MEJIA, 2007).

Carducci *et al.* (2000) e Tenório; Torija (1991) em seus estudos identificaram a presença desses minerais em concentrações variadas na erva-mate, podendo ser afetadas pelo tipo de solo onde a planta é encontrada e por fatores sazonais.

2.5 CARBOIDRADOS DE PLANTAS

Nas plantas, os carboidratos existem como monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados, tais como: glicosídeos cianogênicos e fenólicos, flavonóides glicosilados e glicoproteínas (AVIGAD; DEY, 1997). Depois da água, eles são os principais constituintes químicos da maioria dos tecidos e células das plantas, isto porque formam a parede celular, que é o suporte estrutural para as células vegetais, entre outras estruturas. Conseqüentemente, os carboidratos estruturais das plantas formam a mais abundante reserva de compostos naturais disponível na Terra e são certamente nosso mais importante recurso natural renovável (REID, 1997).

2.5.1 Parede celular e polissacarídeos

Com muito poucas exceções, as células das plantas são envolvidas pela parede celular (REID, 1997). Ela confere resistência e forma para a célula, rigidez para a planta toda, controla o crescimento celular, participa na comunicação célula-célula e protege a célula contra o ataque de patógenos e predadores (BRETT; WALDRON, 1990).

A parede celular vegetal é uma estrutura dinâmica, cuja forma, composição e propriedades são constantemente alteradas ao longo da vida celular em resposta ao crescimento, diferenciação, ambiente e atividades da célula. Nas células vivas, a parede celular influencia a taxa e a direção do crescimento celular, exercendo uma profunda influência no desenvolvimento e morfologia vegetal. Assim, determina a forma da célula, a textura do tecido e a forma final do órgão vegetal (CARPITA; McCANN, 2000; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

A parede celular das plantas é altamente organizada, apresentando muitos polissacarídeos diferentes, proteínas e substâncias aromáticas. Destes, os polissacarídeos são os principais componentes da parede celular e de suas armações estruturais, e são divididos em pectinas, hemiceluloses e celulose (CARPITA; McCANN, 2000). A composição da parede celular primária das dicotiledôneas é, tipicamente, 25-40% celulose, 15-25% hemicelulose, 15-40% material péctico e 5-10% proteínas e proporções muito pequenas de compostos fenólicos. Já a parede celular secundária, muito mais espessa que a parede primária, consiste de 40-45% de celulose, 15-35% de hemicelulose, 15-30% de lignina e quantidade negligenciável de pectina (DEY, BROWNLEADER; HARBONE, 1997).

As pectinas são polissacarídeos ricos em ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. Os constituintes fundamentais das pectinas são o ácido poligalacturônico (PGA) e as ramnogalacturonanas I (RGI). As ramnogalacturonanas II constituem a terceira classe de polissacarídeos pécticos ricos em ácido galacturônico. Arabinanas, galactanas e arabinogalactanas são freqüentemente encontradas em frações pécticas, constituindo cadeias laterais das RGI (ASPINALL, 1980; BRETT; WALDRON, 1990; CARPITA; GIBEAUT, 1993).

As hemiceluloses são polissacarídeos que ocorrem em íntima associação com a celulose, especialmente em tecidos lignificados (ASPINALL, 1959). São hemiceluloses: xilanas, glucomananas, mananas, galactomananas, glucuronomananas, xiloglucanas, calose (β -glucanas com ligações 1 \rightarrow 3), β -glucanas 1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4 ligadas e arabinogalactanas tipo II (ASPINALL, 1980; BRETT; WALDRON, 1990). Este último tipo de polissacarídeo também pode estar presente em frações pécticas, associado a moléculas de RGI (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Observa-se na literatura a inexistência de estudos relacionados aos polissacarídeos encontrados em folhas de erva-mate. Dessa forma, torna-se interessante caracterizar estruturalmente esses polissacarídeos e verificar como diferentes processamentos poderiam influenciar a composição destes nas folhas.

2.6 USOS E BENEFÍCIOS

O mate é uma bebida estimulante: elimina a fadiga, estimula a atividade física e mental, atuando benéficamente sobre os nervos e músculos e favorecendo o trabalho intelectual. Por possuir vitaminas do complexo B, o mate participa do aproveitamento do açúcar nos músculos, nervos e atividade cerebral. Com a presença de vitaminas C e E, age como defesa antioxidante e apresenta benefícios sobre tecidos do organismo. A presença de sais minerais, juntamente com a cafeína, estimula o trabalho cardíaco, ajudando na circulação do sangue e diminuindo a pressão arterial, devido à cafeína, a qual atua como vasodilatador. Em tais situações também pode ser suprida a sensação de fome (BASSANI; CAMPOS, 1997).

O mate favorece a diurese e atua também sobre o tubo digestivo, ativa os movimentos peristálticos, facilita a digestão, suaviza os embargos gástricos, favorecendo a evacuação e a micção. Pesquisas do Instituto Pasteur de Paris atribuem também ao mate um papel importantíssimo no processo de regeneração celular (ANDRADE, 1999; VALDUGA, 1994). A Tabela 2 mostra uma lista de alguns compostos identificados em erva-mate, bem como suas atividades biológicas.

TABELA 2 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM FOLHAS DE ERVA-MATE E ALGUMAS DE SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.

Compostos	Atividades biológicas
Cafeína	Anticarcinogênica, antiobesidade, antioxidante, diurética, vasodilatadora.
Ácido clorogênico	Antioxidante, analgésico, antiaterosclerose, bactericida, antidiabético, antitumoral.
Clorofila	Bactericida, anticâncer.
Colina	Antidiabética, lipotrópica.
Ácido nicotínico	Hipocolesterolêmica.
Ácido pantotênico	Antialérgico.
Rutina	Antioxidante, antitumoral, antiúlcera e vasodilatadora.
Taninos	Antioxidante, antitumoral.
Teobromina	Diurética, estimulante, miorelaxante.
Teofilina	Diurética, estimulante, vasodilatadora.
Ácido ursólico	Analgésico, antioxidante, antitumoral, antialzaimer.

FONTE: Adaptado de Heck e De Mejia (2007).

Muitos dos efeitos positivos do mate em seres humanos estão relacionados com a presença de metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina) e dos compostos fenólicos (BRAVO; GOY; LECUMBERRI, 2007; CHANDRA; DEMEJIA, 2004; MARQUES; FARAH, 2009). De fato, vários estudos com plantas têm demonstrado uma relação entre o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade de limpeza de radicais livres, incluindo estudos com erva-mate (BIXBY *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2008).

Às metilxantinas são atribuídas inúmeras propriedades farmacológicas, que incluem a estimulação do sistema nervoso central, vasoconstrição periférica, o relaxamento do músculo liso e estimulação do miocárdio (KIKATANI, WATANABE; SHIBUYA, 1993; LORIST; TOPS, 2003).

O mate tem também considerável conteúdo de saponinas, as quais são conhecidas por suas propriedades antiinflamatórias, diuréticas e hipocolesterolêmicas (TAKETA, 2004).

2.7 ALTERAÇÃO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PLANTAS

A composição química das plantas é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente.

Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Dentre estes fatores, podem-se ressaltar as interações planta/microrganismos, planta/insetos e planta/planta; idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos, como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós-colheita. É válido ressaltar que estes fatores podem apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário (MORAES, 2009).

Nas espécies utilizadas na medicina popular ou no preparo de fitoterápicos, variações nos metabólitos secundários podem determinar e/ou influenciar a eficácia do produto.

Com relação à erva-mate, inúmeros fatores podem levar a modificações metabólicas e, conseqüentemente, influenciar suas propriedades terapêuticas. Entre estes fatores podem-se citar o local de cultivo, a época da colheita, a maturação das folhas, além dos processos empregados após a colheita (sapeco, secagem e oxidação).

3 JUSTIFICATIVA

O uso de produtos naturais como modelo para síntese de fármacos ou a simples utilização pela população é uma tendência crescente, sendo que muitas pesquisas avaliando esses produtos têm sido realizadas. Com relação à *Ilex paraguariensis*, a maioria das pesquisas relatadas foi conduzida com a erva beneficiada para o chimarrão, visto que constitui-se na principal forma de consumo da erva-mate.

A revisão na literatura mostra haver pouca informação sobre como o modo de cultivo da erva-mate, a maturação das folhas, bem como a forma como elas são processadas, pode influenciar ou até mesmo alterar sua composição fitoquímica. Assim, alguns pontos merecem ser investigados com mais profundidade, os quais resultarão no desenvolvimento de processos que diminuam a perda de compostos bioativos em produtos já conhecidos, assim como em novos produtos provenientes da erva-mate:

1. *Maturação das folhas*: No preparo de produtos de erva-mate as partes utilizadas geralmente são as folhas, as quais demonstram claras diferenças morfológicas. Enquanto as folhas jovens possuem tamanho menor, cor mais clara e brilho mais intenso, as folhas adultas apresentam características opostas.

A partir destes dados é importante avaliar as diferenças na composição fitoquímica de folhas em diferentes idades, uma vez que diferenças entre rotas biossintéticas de plantas adultas e jovens é bem estabelecida na literatura (VAN DEN DRIESSCHE, 1974).

2. *Modos de cultivo*: A diferenciação nos valores da erva-mate pagos aos produtores tem sido observada, consoante ao sistema de cultivo utilizado, isto é, a pleno sol ou em ambiente sombreado. Esta situação decorre da alegação de que a fitomassa oriunda de cultivos em ambientes sombreados apresenta “sabor mais suave” em relação a erva cultivada a pleno sol e, por isso, alcança maior preço no mercado (DA CROCE, 1996).

Os fatores que contribuem para a diferenciação no sabor da erva-mate têm sido objeto de especulações, sendo os fatores promotores dessas diferenças pouco conhecidos.

3. *Processamento*: As técnicas utilizadas para coleta, secagem e armazenamento do material vegetal podem alterar os teores dos compostos bioativos (MARTINS *et al.*, 1998; BÖTTCHER; GÜENTHER; KABELITZ, 2003). A temperatura utilizada no processo de secagem do material vegetal pode agir alterando os teores dos metabólitos de interesse (CALIXTO, 2000), sendo preferível utilizar altas temperaturas de secagem a fim de inibir a ação de enzimas e a atividade microbiana, se o produto de interesse for a erva-mate do tipo chimarrão (MING, 1994). Tanto o processo de secagem quanto o de armazenamento podem promover rearranjos, oxidações e reduções das moléculas bioativas, levando à perda de qualidade do produto final.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo geral identificar os polissacarídeos e quantificar os metabólitos secundários em extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, bem como avaliar o efeito de diferentes modos de cultivo (sol e sombra), da maturação das folhas (jovens e maduras) e de processamentos diferenciados (cancheamento e oxidação) sobre a concentração desses compostos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o cumprimento do objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Coletar folhas de erva-mate em diferentes idades e locais de cultivo e submetê-las a processos diferenciados (tipo chimarrão e oxidação).
- Determinar a composição de polissacarídeos presentes em folhas de erva-mate.
- Identificar metabólitos secundários nas diferentes amostras analisadas, comparando-se os resultados obtidos.
- Caracterizar a estrutura química fina das moléculas encontradas e quantificá-las, empregando técnicas químicas, espectrométricas (GC-MS, HPLC, UPLC e ESI-MS) e espectroscópicas (RMN).
- Otimizar separação simultânea de fenóis e xantinas por UPLC.

5 METODOLOGIA

5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A erva-mate utilizada neste estudo foi proveniente de duas plantações, localizadas no interior do município de Barão de Cotegipe-RS, a 27° 37' 15" de latitude Sul e 52° 22' 47" Oeste, aos 765 m de altitude.

Ambos os povoamentos foram construídos com plantas de mesma procedência, tendo hoje 11 anos de idade. O primeiro, um cultivo homogêneo de produção a pleno sol com adensamento, contendo espaçamento (2,5 m x 1,5 m) e o outro, em enriquecimento de ervais nativos (em floresta primária antropizada – cultivo de sombra), distanciando em 100 m, da área do primeiro cultivo.

Folhas e pequenos ramos, com idades conhecidas (jovens – aproximadamente 1 mês; maduras – aproximadamente 6 meses) oriundos dos cultivos de sol e sombra foram coletados no mês de julho de 2009, no período da manhã, sendo acondicionados em redes de tecido e conduzidos ao laboratório, onde foram submetidos a diferentes processamentos.

5.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

O material vegetal coletado foi separado em 4 grandes grupos (folhas maduras de sol, folhas maduras de sombra, folhas jovens de sol e folhas jovens de sombra) e submetido a dois procedimentos diferenciados. Além disso, parte deste material foi conservado em freezer para estudo *in natura*.

5.2.1 Cancheamento da erva-mate (tipo chimarrão)

Folhas pertencentes a cada um dos grupos foram submetidas ao sapeco na temperatura de 180 °C por 5 minutos em um protótipo de sapecador de laboratório descrito por Valduga (2002) e secagem a 65 °C durante 90 minutos em um mini-secador de bancada de leito fixo. Posteriormente as folhas foram selecionadas e moídas em um triturador de facas Master mixer da marca Walita™.

5.2.2 Oxidação (tipo chá preto)

As folhas foram submetidas à desidratação utilizando uma estufa com renovação e circulação de ar da marca Marconi, com temperatura de 30 °C durante 2 horas para a retirada de 10% de umidade. Em seguida, submetidas ao processo de rolamento, onde as folhas foram espalhadas sobre um tecido de algodão branco, passando então várias vezes por um cilindro, com o objetivo de ativar as enzimas polifenoloxidase e peroxidase. Após o rolamento as folhas com idades conhecidas e de cultivos diferentes foram acondicionadas em uma câmara com temperatura e umidade relativa controladas, 26 °C e 90 %, respectivamente, permanecendo por 3 horas (MOLIN, 2008).

Após este período as folhas foram submetidas a secagem em minisecador de bancada de leito fixo (65 °C por 90 minutos).

Somando-se os tratamentos, foram obtidas um total de 12 amostras, as quais estão listadas na Tabela 3.

TABELA 3 – AMOSTRAS OBTIDAS APÓS PROCESSAMENTO PÓS-COLHEITA.

<i>In natura</i>	Cancheada (tipo chimarrão)	Oxidada (tipo chá preto)
Folhas jovens de sol (JSIN)	Folhas jovens de sol (JSC)	Folhas jovens de sol (JSO)
Folhas jovens de sombra (JSBIN)	Folhas jovens de sombra (JSBC)	Folhas jovens de sombra (JSBO)
Folhas maduras de sol (MSIN)	Folhas maduras de sol (MSC)	Folhas maduras de sol (MSO)
Folhas maduras de sombra (MSBIN)	Folhas maduras de sombra (MSBC)	Folhas maduras de sombra (MSBO)

5.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Cerca de 100 g de cada uma das amostras foi submetida a extração aquosa (500 mL), sob refluxo por 2 horas, sendo este processo repetido por 3 vezes. Após o tempo de extração, o material foi filtrado e os extratos combinados e concentrados, em evaporador rotatório com pressão reduzida, até pequeno volume, sendo em seguida liofilizados. Obtendo-se assim, os extratos brutos.

5.4 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

5.4.1 Precipitação por adição de etanol

Com a finalidade de separar compostos de alta massa molecular (polissacarídeos e proteínas, principalmente) daqueles de baixa massa, cerca de 1 g do extrato bruto de cada amostra foi solubilizado em água destilada, ao qual foi adicionado álcool etílico (3:1, v/v). Estas soluções foram deixadas em repouso em freezer por 6 horas, para promover a formação de um material insolúvel (precipitados etanólicos, denominados “P”, seguido do nome da amostra) os quais foram separados por centrifugação (8.500 r.p.m., 20 min, 4 °C). As frações solúveis (denominadas de sobrenadante etanólico, iniciadas por “S”, seguidos do nome da amostra) foram concentradas a pequeno volume e liofilizadas. As frações precipitadas foram ressuspensas em água e dialisadas em água corrente em membranas de 12-14 kDa de limites de exclusão (Spectra/Por®), por 24 horas. Após a diálise, as amostras foram liofilizadas.

5.4.2 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo

As frações precipitadas em etanol foram fracionadas, pelo processo de purificação por congelamento e degelo. Cada amostra (400 mg) foi solubilizada em água destilada e a seguir submetida ao processo de congelamento e posterior degelo na temperatura ambiente. Os componentes insolúveis em água fria (denominados “IP”, seguido do nome da amostra) foram separados dos demais componentes solúveis (denominados “SP”, seguido do nome da amostra) por centrifugação (9000 r.p.m., 15 min, 25 °C) (GORIN; IACOMINI, 1984).

5.5 DERIVATIZAÇÕES QUÍMICAS

As derivatizações químicas foram realizadas com principal intuito de analisar os polissacarídeos presentes nas amostras provenientes do processo de precipitação como etanol.

5.5.1 Análise de composição monossacarídica

Uma alíquota (2 mg) de cada uma das frações “SP” (frações solúveis após congelamento e descongelamento) foi tratada com 500 μL de ácido trifluoracético (TFA) 2 M por 8 horas em estufa a 100 $^{\circ}\text{C}$. Decorrido o tempo de hidrólise, o ácido foi eliminado por evaporação sob fluxo de N_2 a temperatura ambiente. Os produtos das hidrólises foram dissolvidos em H_2O (300 μL) e reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH_4 , 1 mg) a 100 $^{\circ}\text{C}$, pH 9-10, por 4 horas. Após este período, as soluções reduzidas foram tratadas com 100 mL de TFA 1 M e levadas à secura sob fluxo de N_2 . Em seguida, o boro foi co-evaporado com metanol (3x). Os alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido acético e piridina (1:1, v/v, 400 μL) (SASSAKI *et al.*, 2008) a temperatura ambiente por cerca de 12 horas, formando os acetatos de alditóis, os quais foram extraídos com clorofórmio. Os reagentes residuais foram removidos com solução aquosa de sulfato de cobre 5%, sendo então adicionado sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para remoção de água residual. As amostras foram filtradas e o clorofórmio evaporado em temperatura ambiente. Os acetatos de alditóis produzidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

5.5.2 Determinação de ácidos urônicos

Uma fração das amostras hidrolisadas e reduzidas (1 mg), assim como ambos, ácido galacturônico e glucurônico previamente reduzidos foram submetidos ao processo de estefiricação utilizando MeOH-HCl 1 M, por 30 minutos a 100 $^{\circ}\text{C}$ (SASSAKI *et al.*, 2008). As soluções foram evaporadas sob fluxo de N_2 a temperatura ambiente e, então, acetiladas conforme descrito acima. Os ésteres metílicos de acetatos de alditóis produzidos foram analisados por GC-MS e a identificação do ácido urônico foi determinada por seu tempo de retenção e perfil de fragmentação.

A dosagem de ácidos urônicos totais foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Em 400 μL de amostra (0,100 mg/mL) foram adicionados 40 μL de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6), e 2,4 mL de solução de tetraborato de sódio 75 mM, em H_2SO_4

concentrado. Após aquecimento em banho-maria fervente por 20 min, esta mistura foi resfriada e foram adicionados 80 μ L da solução de *m*-hidroxi-bifenil (Sigma) a 0,15% em NaOH 0,5% para a produção do complexo colorido.

A coloração, estável até 1 hora após sua formação, foi imediatamente lida em espectrofotômetro (Biospectro SP-22) em 525 nm. A quantificação foi realizada com o auxílio de uma curva padrão de ácido galacturônico (Sigma) dentro da sensibilidade do método (0,97 a 38,8 μ g de ácido urônico).

5.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.6.1 Cromatografia em camada delgada (TLC)

Análises por cromatografia em camada delgada (TLC – *thin layer chromatography*) foram realizadas para verificar tanto a composição monossacarídica e detectar a presença de ácidos urônicos nos polissacarídeos das folhas de erva-mate, quanto para analisar a presença de oligossacarídeos e compostos do metabolismo secundário nas amostras provenientes do sobrenadante etanólico.

Estas análises foram realizadas em placas de sílica-gel 60G (Merck), com 8 cm de altura total (7 cm a partir da origem). Solventes diferentes foram utilizados como fase móvel de acordo com o tipo de composto a ser analisado, assim como diferentes reveladores:

Monossacarídeos e oligossacarídeos – o solvente utilizado foi EtOAc-n-PrOH-AcOH-H₂O (4:2:2:1, v/v) (SASSAKI *et al.*, 2008) e a visualização dos compostos foi obtida com orcinol-H₂SO₄ a 100 °C (SKIPSKI, 1975).

Saponinas – o solvente utilizado foi EtOAc:H₂O:HOAc:HCOOH (9:2,3:1:1, v/v) (MEDIC-SARIC *et al.*, 2008); e a visualização dos compostos foi obtida com orcinol-H₂SO₄ a 100 °C (SKIPSKI, 1975) .

Metilxantinas - o solvente utilizado foi CHCl₃-EtOH (95:5, v/v) e foram utilizadas placas fluorescentes para a visualização indireta (STAHL, 1969).

5.6.2 Cromatografia líquida de exclusão estérica

As amostras (frações contendo os polissacarídeos) foram solubilizadas em uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2 0,1 M) contendo azida (NaN_3 0,2 g/L), para uma concentração final de 1 mg/mL, e filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,22 μm (Millipore). As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC – *high performance liquid chromatography*) da marca Shimadzu, modelo LC-10A utilizando, 4 colunas de gel permeação com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 (WATERS). A detecção foi realizada por índice de refração (RID – *refractive index detector*) e ultravioleta (UV) a 280 nm.

5.6.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

Os monossacarídeos, já devidamente convertidos em seus respectivos derivados voláteis (acetatos de alditóis) foram analisados por GC-MS (*gas chromatography mass spectrometry*), da marca Varian (Palo Alto, USA), modelo Saturn 2000R. A detecção por massas foi feita por de ionização eletrônica (70 eV), com analisador do tipo *Ion Trap*. A coluna utilizada na separação dos componentes foi uma coluna capilar DB-225-MS (J & W) e hélio (5.0 analítico) foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min. Durante a injeção da amostra a temperatura do injetor foi de 250 °C e a da coluna de 50 °C, sendo programada para aumentar 40 °C/min, até atingir a temperatura de 230 °C, mantida constante por 25 min.

5.6.4 Cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC)

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC – *ultra performance liquid chromatography*) foi usada para quantificação de carboidratos, xantinas e compostos fenólicos nas frações solúveis após a precipitação com etanol. A cromatografia foi realizada em um sistema Acquity-UPLC™ (Waters, MA, USA), composto por uma bomba binária, amostrador automático e forno de coluna. A detecção foi realizada por detector evaporativo de espalhamento de luz (ELSD – *evaporative light scattering detector*), arranjo de fotodiodos (PDA - *photodiode array*) ou, nas

análises *online*, por espectrometria de massas do tipo *electrospray* (ESI-MS – *electrospray ionization mass spectrometry*).

As amostras foram mantidas em temperatura ambiente (~22 °C) e a temperatura da coluna foi de 35 °C. As separações foram desenvolvidas em colunas próprias para UPLC, BEH-C18 e BEH-Amida (Waters), ambas com 50 mm x 2.1 mm i.d. e 1.7 µm de tamanho da partícula.

As análises de xantinas e fenóis foi realizada por cromatografia de fase reversa (coluna C18), com H₂O (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos contendo HOAc 1% (v/v). Dois sistemas de gradiente linear foram desenvolvidos com um fluxo de 300 µL/min:

- 1)** Aumento da concentração do solvente B, de 0 a 40% em 8 min, mantido por mais 2 min e retornando para a condição inicial (100% A) em 10,2 min. A coluna foi reequilibrada por 3 min antes de cada injeção.
- 2)** Aumento da concentração do solvente B, de 5 a 40% em 3 min, voltando a condição inicial (5% B) em 3,2 min. A coluna foi reequilibrada por 3 min antes de cada injeção.

As amostras foram preparadas em MeOH-H₂O (1 mg/mL), sendo que 1 µL de cada amostra foi injetado. A detecção foi realizada por PDA (210 – 400 nm) e por ESI-MS. Para as análises quantitativas, curvas padrões foram preparadas com padrões de cafeína, teobromina, ácido clorogênico e rutina nas concentrações de 50, 100, 200, e 250 µg/mL.

Os carboidratos detectados por TLC foram quantificados por UPLC utilizando a coluna BEH-Amida (fase normal). Os solventes utilizados na separação foram acetonitrila (solvente A) e H₂O (solvente B), ambos com 0,2 % de trietilamina (TEA). Um gradiente linear foi desenvolvido, com aumento da concentração do solvente B, de 5 a 50 % em 3 min, mantido até 3,5 min e retornando a condição inicial e 4 min. O sistema foi reequilibrado por 3 min antes de cada injeção. As amostras foram preparadas em MeOH-H₂O (1:1, v/v), sendo injetado 10 µL. A detecção foi realizada por ELSD, e a curva de calibração para a quantificação foi preparada com frutose, glucose e sacarose nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

5.6.5 ESI-MS (*electrospray ionization mass spectrometry*)

As amostras (~100 µg/mL) foram solubilizadas em MeOH-H₂O (1:1, v/v), contendo LiCl 5 mM e submetidas a ionização positiva e negativa em pressão atmosférica (API – *atmospheric pressure ionization*). As análises foram realizadas em um espectrômetro de massas Quattro LC, triplo quadrupólo (Waters) com nitrogênio como gás de nebulização e dessolvatação. As análises *offline* foram conduzidas por injeção direta das amostras, utilizando uma bomba de infusão (KD-Scientific) a um fluxo de 10 µL/min e as análises *online* foram realizadas utilizando o UPLC como sistema de injeção. Espectros de MS² foram obtidos por fragmentação induzida por colisão (CID - *collision induced dissociation*), usando argônio como gás de colisão. A aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software MassLynx 3.5 e as análises foram obtidas em modo de *scan* contínuo.

5.6.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C{¹H} foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance 400 (Bruker; Karlsruhe, Alemanha) de campo magnético de 9,4 tesla, observando-se os núcleos de ¹H e ¹³C a 400,13 e 100,62 MHz, respectivamente, em D₂O (água deuterada) à temperatura ambiente de aproximadamente 22 °C em uma sonda multinuclear de observação inversa de 5 mm. Para isso, 40 mg de cada amostra, contendo os polissacarídeos foram solubilizadas em 400 µL de D₂O, contendo 2,2,3,3-tetradeutério-3-trimetilsililpropionato (TMSP-*d*₄ – referência interna). Os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos com a seqüência de pulsos *zg*, acumulando-se quatro varreduras, 64 K pontos (1 K = 1,024) e janela espectral de ~13ppm. Por sua vez os espectros de ¹³C{¹H} foram adquiridos com seqüência de pulsos *zgpg30*, acumulando-se 1,024 varreduras, 32 K pontos e janela espectral de ~255ppm. Ambos os espectros foram processados com o auxílio do programa TopSpin ((Bruker; Karlsruhe, Alemanha), aplicando-se multiplicações exponenciais dos *free induction decays* (FIDs) por fatores de 0,3 e 3,0 Hz para construção dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C com 64 K e 32 K pontos, respectivamente. Os deslocamentos químicos em ambos os espectros de RMN foram calibrados em relação ao sinal de TMSP-*d*₄ em δ 0.

5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.7.1 Atividade sequestrante de radicais livres (DPPH)

A capacidade de seqüestrar radicais livres dos extratos de erva-mate (sobrenadantes etanólicos) foi determinada utilizando-se o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH - Sigma) de acordo com Blois (2002). Os extratos foram preparados em diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200 µg/mL) e 10 µL de cada um foram adicionados a 190 µL de solução de DPPH (0,1 mM). A mistura foi vigorosamente agitada e a absorbância foi medida em 515 nm, a cada 1 minuto por uma hora, usando um leitor de placas (Tecan Infinite M200). O percentual de captação de DPPH foi calculado usando a fórmula: $[(A_0 - A_1/A_0) - 100]$, onde A_0 é a absorbância do controle de reação (solução de DPPH + solvente utilizado na solubilização da amostra) e A_1 a absorbância da amostra após uma hora. A concentração do extrato necessária para atingir 50% da captação (CE_{50}) foi calculada a partir de um gráfico obtido para o efeito de captação do DPPH versus concentração do extrato. O antioxidante BHT (*n*-butil-hidroxitolueno) foi usado como padrão comparativo.

5.7.2 Inibição da oxidação pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada utilizando o sistema β-caroteno/ácido linoléico (MILLER, 1971; SHON; KIM; SUNG, 2003). Inicialmente, o β-caroteno (2 mg) foi dissolvido em $CHCl_3$ (10 mL), sendo 2 mL dessa solução transferidos para um balão volumétrico (100 mL). O clorofórmio foi então evaporado sob fluxo de N_2 . Ao balão, foram adicionados 40 mg de ácido linoléico, 400 mg de Tween 40 e 100 mL de água destilada aerada. Alíquotas dessa solução (172.8 µL) foram adicionadas aos extratos (10 µL) em diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200 µg/mL) em placas de poliestireno de 96 poços. O BHT foi usado para comparação. A absorbância no tempo zero foi medida em 470 nm usando um leitor de placa (Tecan Infinite M200). As placas foram colocadas em uma estufa a 50 °C por 2 horas e então a absorbância foi medida novamente. Um branco, sem β-

caroteno foi preparado para posterior subtração, já que os extratos eram coloridos. A atividade antioxidante (AA) foi calculada usando a fórmula: $AA = [(absorbância \text{ após } 2 \text{ h de ensaio} / absorbância \text{ inicial}) \times 100]$.

5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

5.8.1 Análise quimiométrica

A análise quimiométrica, quimiometria ou ainda análise multivariada, denominada reconhecimento de padrões destina-se a agrupar as amostras com características semelhantes e distingui-las das demais, que por sua vez, poderão vir a formar outro grupo. Nas análises exploratórias multivariadas, todos os dados obtidos sobre as amostras em questão são organizados em uma única planilha, a qual é constituída por “n” amostras e “i” variáveis, resultando em uma matriz “n x i”. Desta forma, nos espectros de RMN, por exemplo, as amostras são os próprios espectros e as variáveis são as intensidades (áreas) dos sinais nos espectros (Manual Amix, 2008). O reconhecimento de padrão utilizado neste estudo foi a análise por componentes principais PCA (*principal component analysis*) que é baseada na suposição de que quanto mais semelhantes as amostras forem entre si mais próximas estarão em um espaço multidimensional.

A análise por componentes principais (PCA) descreve a variância de um conjunto de dados multivariados em termos de um conjunto de variáveis ortogonais subjacentes, denominadas componentes principais (PC). As variáveis originais, como os valores obtidos pelas áreas formadas no UPLC, por exemplo, formam a matriz X e podem ser expressas como uma combinação linear específica das componentes principais. A plotagem dos dados no espaço definido por duas ou três PCs que possuam os maiores valores de variância explicada propicia um meio rápido de visualizar as similaridades e diferenças entre o conjunto de dados, possivelmente permitindo a discriminação das amostras (Beebe *et al.*, 1998).

Os espectros de RMN obtidos para as frações contendo polissacarídeos foram analisados estatisticamente pelo PCA, sendo utilizado para esta análise o programa AMIX-Viewer™, versão 3.8 (BRUKER). Primeiramente, dividiu-se em grupos todos os espectros bidimensionais adquiridos, sendo os mesmos agrupados

de acordo com suas características quanto ao tratamento, idade e local de crescimento. Para a análise foi utilizada a região do espectro entre δ 1,0 - 7,6 ppm (para ^1H) a 50,0 – 100,0 ppm (para ^{13}C), com intervalos (*buckets*) de 0,01 ppm x 0,01 ppm, retalhando assim o espectro bidimensional em quadrados de 0,0001 ppm² de área. O método de integração utilizado foi o “*método especial de integração*”, desenvolvido pelo próprio fabricante do software, no qual são minimizadas as variâncias causadas pelo *S/N* (*signal-noise* - sinal-ruído) e pela linha de base dos espectros, no caso de experimentos 1D (Manual Amix, 2008).

5.8.2 Análises de variância (ANOVA)

Com relação a atividade antioxidante, todas as análises foram realizadas em triplicatas e os dados foram expressos como médias, com seus respectivos desvios padrões. Foram realizadas análises de variância (ANOVA), e o teste de Tukey foi efetuado pra avaliação de quaisquer diferenças significativas entre as médias. Os dados foram considerados diferentes para um nível de significância de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRACIONAMENTO

O chimarrão é uma bebida preparada como infusões sucessivas das folhas moídas de erva-mate cancheada. Para a obtenção dos extratos brutos, as folhas após passarem por processo de sapeco, secagem e moagem (cancheamento) sofreram extração aquosa sob refluxo simulando o que acontece quando a infusão é preparada para ser consumida.

Ainda assim, foram feitas extrações aquosas de folhas *in natura* e de folhas que passaram por um processo oxidativo, similar ao realizado na obtenção do chá preto (proveniente da *Camelia sinensis*), para posteriores comparações.

As extrações resultaram em 12 extratos brutos, cada um destes, pertencentes a uma determinada amostra, sendo denominados de acordo com o tipo de folha do qual resultou. As nomenclaturas, assim como os rendimentos dos extratos são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS E DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS A PRECIPITAÇÃO COM ETANOL.

Amostras (Tratamentos)	Extração aquosa (%) ^a	Precipitação com EtOH (%) ^a	
		Solúvel ("S")	Precipitado ("P")
Folhas jovens de sol <i>in natura</i> (JSIN)	11,47	9,63	1,84
Folhas jovens de sombra <i>in natura</i> (JSBIN)	13,44	11,91	1,53
Folhas maduras de sol <i>in natura</i> (MSIN)	15,87	13,70	2,17
Folhas maduras de sombra <i>in natura</i> (MSBIN)	15,36	13,56	1,80
Folhas jovens de sol cancheada (JSC)	23,44	20,22	3,22
Folhas jovens de sombra cancheada (JSBC)	19,22	17,53	1,69
Folhas maduras de sol cancheada (MSC)	25,10	23,13	1,97
Folhas maduras de sombra cancheada (MSBC)	24,25	20,94	3,31
Folhas jovens de sol oxidadas (JSO)	26,21	22,25	3,96
Folhas jovens de sombra oxidadas (JSBO)	19,77	16,40	3,37
Folhas maduras de sol oxidadas (MSO)	25,62	22,69	2,93
Folhas maduras de sombra oxidadas (MSBO)	26,72	24,13	2,59

^a Rendimento baseado em 100 g de erva-mate.

Os extratos brutos provenientes das amostras de folhas maduras, em sua maioria, apresentaram um rendimento maior quando comparados aos extratos oriundos de folhas jovens. A concentração de nutrientes nas folhas das árvores é

influenciada por diversos fatores, entre eles, a idade das folhas, as condições do local de cultivo, posição das folhas na copa e a época do ano. Um exemplo bastante ilustrativo é o fato de que folhas novas, apesar de fotossintetizantes, não sintetizam carboidratos em quantidades suficientes para manter as suas atividades biossintéticas, dependendo, por exemplo, da importação de sacarose produzida pelas folhas maduras, as quais, por sua vez, produzem fotoassimilados em quantidades superiores às suas necessidades, podendo então exportar via floema o excedente de sua produção (VAN DEN DRIESSCHE, 1974).

Com relação ao local de cultivo, observam-se diferenças nos rendimentos das amostras analisadas, mas estas diferenças não seguem um padrão. Dessa forma não pode-se afirmar que o cultivo em ambiente de sol ou sombra exerce influência sobre o rendimento.

Entre os processamentos adotados, observa-se que o maior rendimento é obtido nas folhas oxidadas, seguido pelas folhas cancheadas e por último nas folhas *in natura*. A explicação para isso é o fato de que tanto nas folhas oxidadas, como nas folhas cancheadas ocorre a retirada de umidade, tornando-as “mais leves” do que as folhas *in natura*. Assim, durante a pesagem inicial para a obtenção do extrato bruto, em que foram utilizadas 100 g de material, foram necessárias mais folhas oxidadas e processadas, do que folhas *in natura*, para se obter este peso.

Com a finalidade de separar compostos de alta massa molecular (polissacarídeos e proteínas, principalmente) daqueles de baixa massa, os extratos brutos de cada uma das amostras foram tratados com etanol (3 volumes). O fracionamento e as etapas de purificação dos polissacarídeos são resumidos na Figura 7 e o rendimento apresentado na Tabela 4.

Assim como no extrato bruto, o rendimento das frações contendo os polissacarídeos e também das frações com os componentes de baixa massa molecular, foi maior nas folhas oxidadas, seguido pelas processadas e por fim pelas *in natura*.

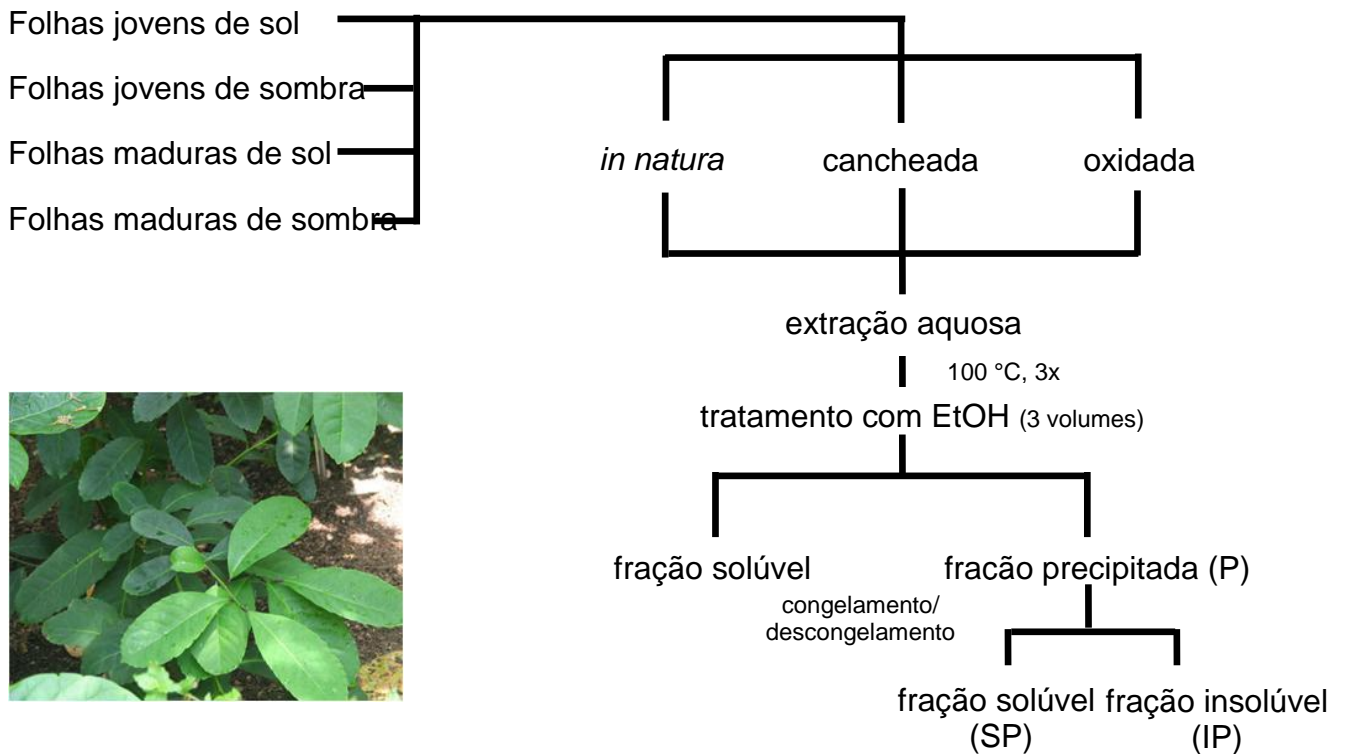


FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DE *Ilex paraguariensis*.

6.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE ERVA-MATE (FRAÇÕES “SP”)

As frações resultantes da extração aquosa, denominadas “P”, seguido do nome da amostra, após o congelamento e degelo, geraram frações solúveis (denominadas “SP” seguido do nome da amostra) e frações insolúveis em água fria (denominadas “IP”, seguido do nome da amostra). Estas últimas não foram analisadas no presente trabalho devido ao baixo rendimento (menor que 1%) e difícil solubilização.

As frações SP foram analisadas comparativamente quanto à composição monossacarídica, perfil cromatográfico em gel permeação e RMN. Com relação a composição monossacarídica, as amostras após a hidrólise foram analisadas por meio de TLC (Figura 8-A) e seus derivados ésteres metílicos de alditól acetatos analisados por meio de GC-MS (Figura 8-B), indicando a presença de ácido

galacturônico como único açúcar ácido nas amostras. No entanto, a quantificação deste monossacarídeo foi realizada por método colorimétrico, por se observar sua degradação durante o processo de derivatização.

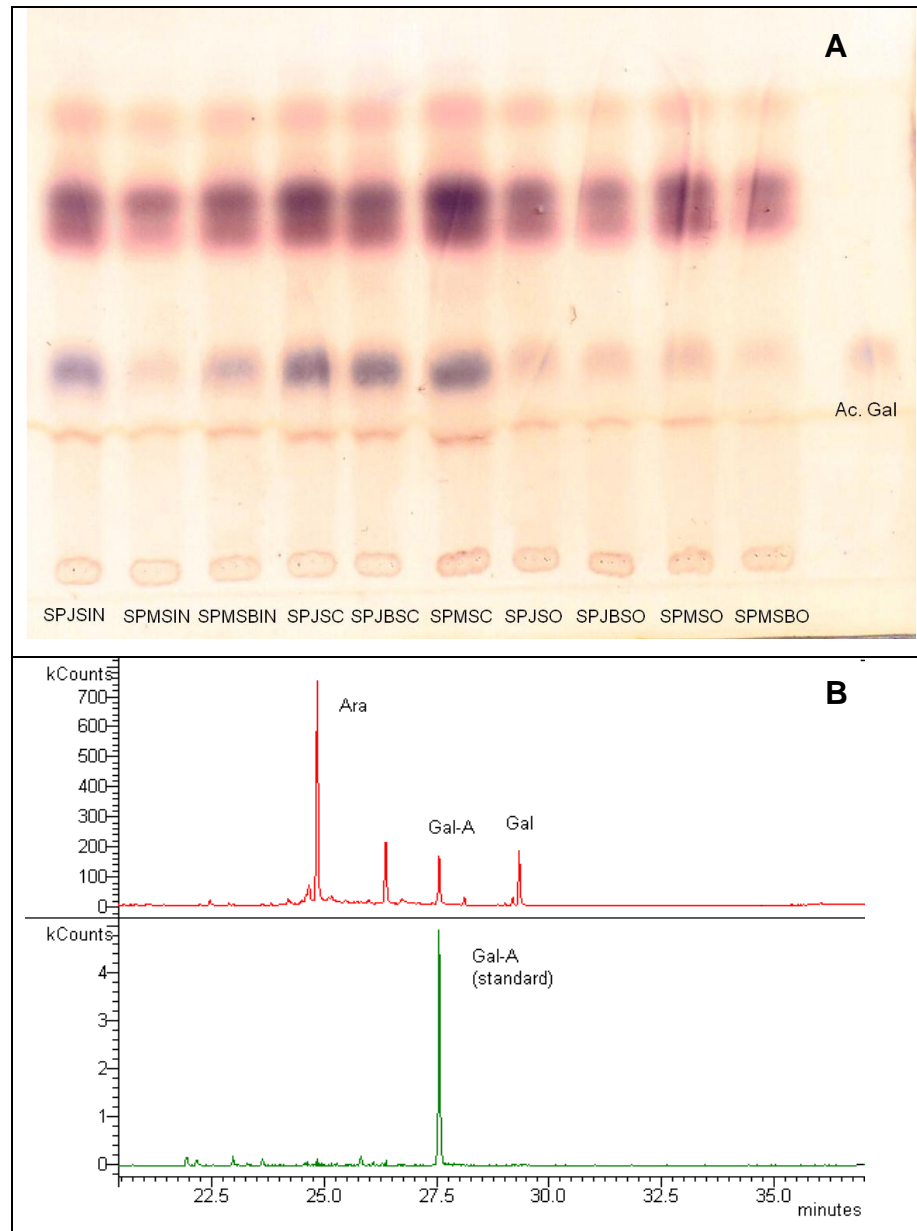


FIGURA 8 - (A) TLC DAS AMOSTRAS OBTIDAS APÓS A HIDRÓLISE (TFA 2 M, 8 H A 100 °C). (B) PERFIL CROMATOGRÁFICO DA AMOSTRA **SPJSIN** E DO PADRÃO DE ÁCIDO GALACTURÔNICO.

Os derivados acetatos de alditóis foram também analisados por meio de GC-MS, observando-se que em geral as amostras apresentaram como componentes monossacarídicos principais arabinose, galactose, glucose e ácido galacturônico. Observa-se também que as amostras provenientes de folhas de erva-mate cancheada apresentaram maior proporção de ácido galacturônico quando comparadas aos demais tratamentos e que nas folhas oxidadas ocorre uma redução na proporção de glucose (Tabela 5). A presença de arabinose, galactose e ácido galacturônico como constituintes majoritários sugere a presença de arabinogalactanas e ácidos poligalacturônicos nos polissacarídeos de folhas de erva-mate.

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO DE MONOSSACARÍDIOS PRESENTES NOS POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE ERVA-MATE.

	Composição monossacarídica						
	GalA ^a	Ara ^b	Gal ^b	Glc ^b	Man ^b	Rha ^b	Rib ^b
SPJSIN	20,0	26,8	13,0	31,4	2,3	2,5	4,0
SPJSBIN	16,0	16,5	25,5	31,2	2,5	5,6	2,7
SPMSIN	15,0	34,4	33,6	12,7	TR	0,9	3,4
SPMSBIN	19,0	18,0	36,1	14,7	4,7	5,1	2,4
SPJSC	36,0	27,6	11,7	12,7	0,9	6,7	4,4
SPJSBC	45,0	18,2	12,4	15,5	0,8	2,6	5,5
SPMSC	49,0	21,5	9,7	12,2	0,8	1,9	4,9
SPMSBC	43,0	16,5	18,2	11,7	1,9	5,4	3,3
SPJSO	21,0	35,8	31,7	6,9	2,5	2,1	tr
SPJSBO	17,0	29,6	21,8	9,3	13,5	2,9	5,9
SPMSO	18,0	37,7	31,3	7,7	2,9	2,4	tr
SPMSBO	17,0	35,0	29,0	10,9	4,1	3,1	0,9

^a Determinado por método colorimétrico de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

^b Determinado por GC-MS.

^{tr} Traços.

Os polissacarídeos obtidos foram analisados quanto a seu perfil de eluição em cromatografia de gel permeação, evidenciando a distribuição de massas molares de polímeros presentes nas amostras (Figura 9). Observam-se tanto diferenças entre os tratamentos aos quais as folhas foram submetidas (*in natura*, cancheada e oxidada), quanto ao local de cultivo (comparação entre **A** e **B** e entre **C** e **D**) e a idade das folhas (comparação entre **A** e **C** e entre **B** e **D**). Observa-se também que

as folhas oxidadas apresentaram um comportamento bastante diferenciado em comparação aos demais tratamentos pós-colheita, no entanto comparando-se local de cultivo e maturação das folhas não verificam-se grandes diferenças no perfil cromatográfico. Já as folhas *in natura* e cancheada apresentaram-se bastante diferentes em relação às demais variáveis de estudo.

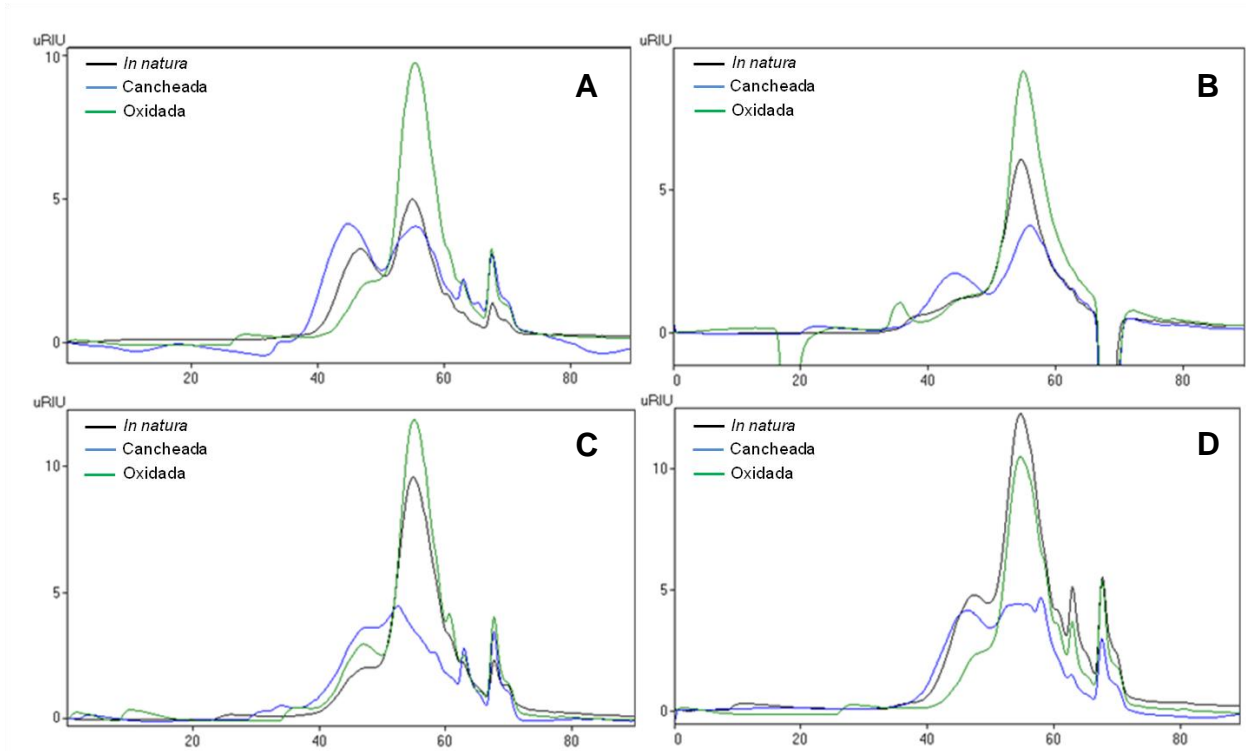


FIGURA 9 – CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO DAS FRAÇÕES “SP” OBTIDAS DE FOLHAS DE ERVA-MATE EM DIFERENTES ESTADOS FISIOLÓGICOS E DE PROCESSAMENTO. **(A)** FOLHAS JOVENS DE SOL, **(B)** FOLHAS JOVENS DE SOMBRA, **(C)** FOLHAS MADURAS DE SOL E **(D)** FOLHAS MADURAS DE SOMBRA.

A análise comparativa entre as frações também foi realizada por RMN (HSQC), observando-se bastante similaridade entre as amostras. Os mapas de correlação de HSQC apresentam aproximadamente 5 sinais na região anomérica (δ 110 – 95). Os sinais de acoplamento em δ 109,7/5,18 foram atribuídos ao C-1/H-1 de unidades de α -L-Araf (DELGOBO *et al.*, 1998; TISCHER; GORIN; IACOMINI, 2002; FRANSEN *et al.*, 2000), e aqueles em δ 103,7/4.44 ao C-1/H-1 das unidades de β -D-

Galp (DELGOBO *et al.*, 1998; TISCHER; GORIN; IACOMINI, 2002; FRANSEN *et al.*, 2000; GORIN e MAZUREK, 1975). Os sinais em δ 100,5/4,9 nesta região sugerem a presença de unidades de α -D-GalpA (RENARD *et al.*, 1998). Ainda observam-se sinais de acoplamento em δ 100,4/5,27, os quais foram atribuídos ao C-1/H-1 das unidades de α -D-Glcp (Figura 10) (FALK; STANEK, 1997).

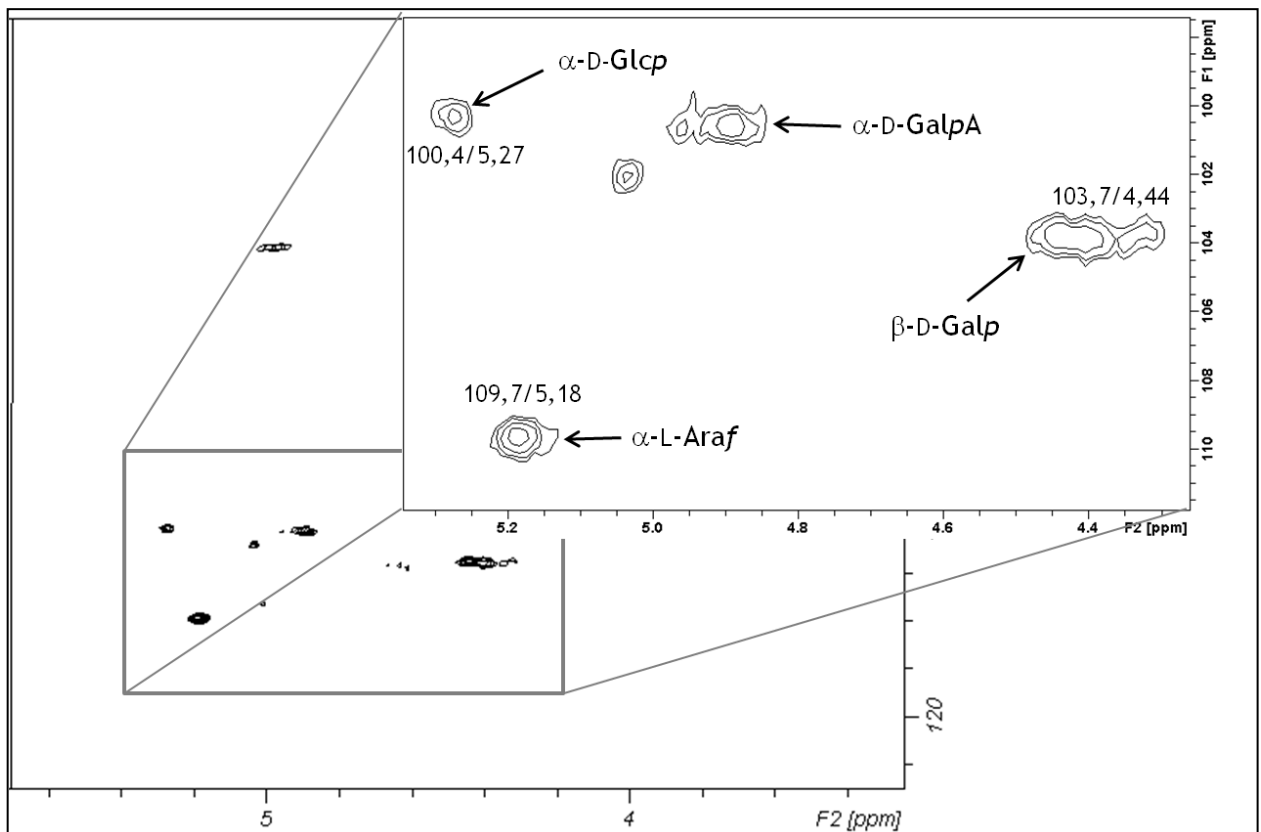


FIGURA 10 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DA AMOSTRA SPMSBC. EM EVIDÊNCIA A REGIÃO ANOMÉRICA.

Na região do carbono substituído, os sinais de acoplamento em δ 68,3/3,66 **(1)** e δ 82,5/3,83 **(2)** pertencem aos C-6/H-6 e C-3/H-3 ligados das unidades de β -D-Galp, respectivamente (CIPRIANI *et al.*, 2004, DELGOBO *et al.*, 1999). A partir dos dados da literatura os sinais de acoplamento em δ 77,4/3,88 **(3)** e δ 73,9/3,84 **(4)** puderam ser atribuídos ao C-5/H-5 e C-2/H-2 não substituídos, respectivamente das unidades de β -D-Galp (GORIN; MAZUREK, 1975; SIMAS, 2008). O sinal centrado em δ 61,5/3,72 **(5)** pode ser atribuído ao C-5/H-5 das unidades de α -L-Araf

(DELGOBO *et al.*, 1999) e C-6/H-6 livre das unidades de β -D-Galp (AGRAWAL, 1992). Dessa forma, sugerindo-se a presença de arabinogalactanas do tipo II como um dos polissacarídeos de erva-mate (Figura 11).

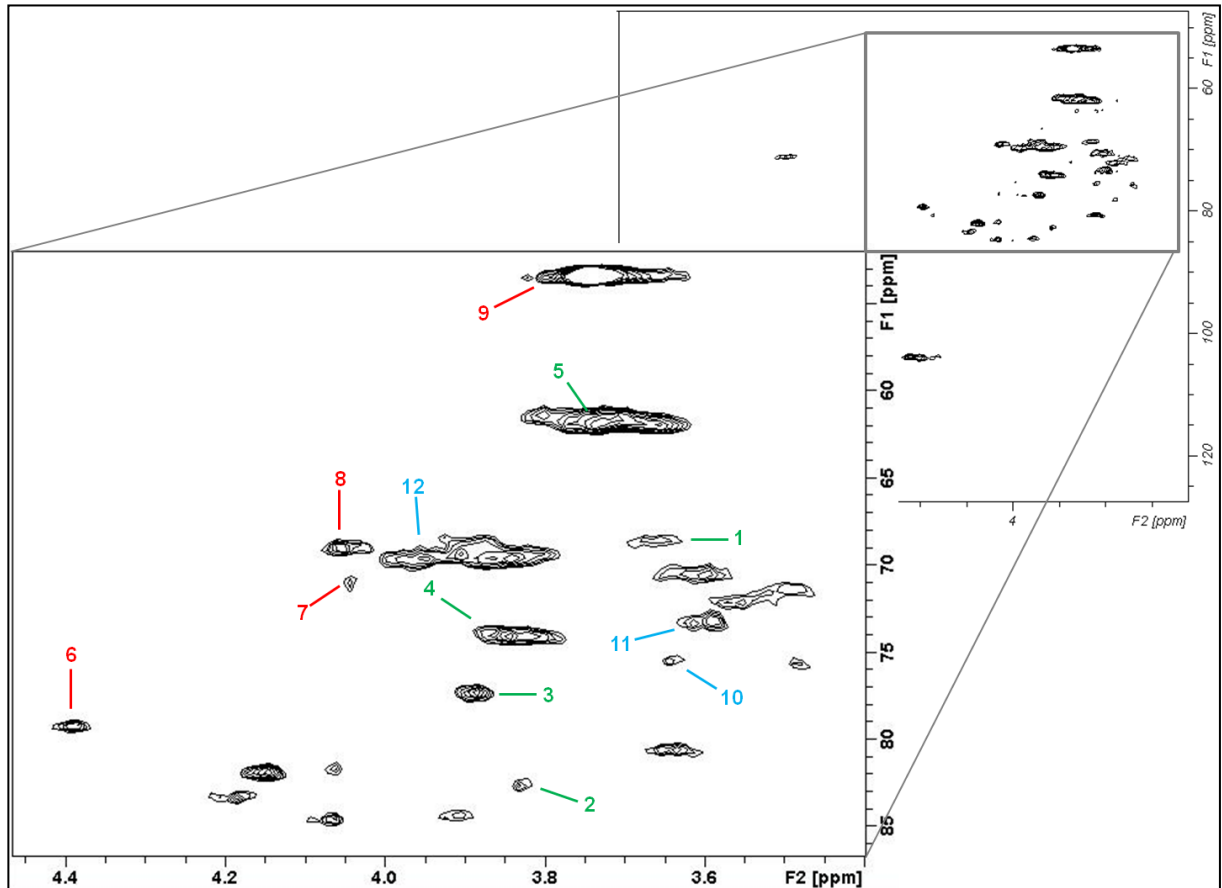


FIGURA 11 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DA AMOSTRA **SPMSBC**. EM EVIDÊNCIA A REGIÃO DO CARBONO SUBSTITUÍDO. OS NÚMEROS EM VERDE SÃO SINAIS REFENTES AS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS DE ARABINO GALACTANAS, EM VERMELHO DE ÁCIDOS POLIGALACTURÔNICOS E EM AZUL DE AMIDO.

(1) C-6/H-6 das unidades de β -D-Galp, (2) C-3/H-3 das unidades de β -D-Galp, (3) C-5/H-5 das unidades de β -D-Galp, (4) C-2/H-2 das unidades de β -D-Galp, (5) C-5/H-5 das unidades de α -L-Araf, (6) C-4/H-4 das unidades de α -D-GalpA, (7) C-5/H-5 das unidades de α -D-GalpA, (8) C-3/H-3 das unidades de α -D-GalpA, (9) COOCH_3 das unidades de α -D-GalpA, (10) C-4/H-4 das unidades de α -D-Glcp, (11) C-3/H-3 das unidades de α -D-Glcp e (12) C-6/H-6 das unidades de α -D-Glcp.

As arabinogalactanas tipo II constituem um amplo grupo de cadeias curtas de D-galactanas com ligações (β -1 \rightarrow 3) e (β -1 \rightarrow 6) conectadas umas às outras por pontos de ramificação em O-3 e O-6 e apresentam a maior parte das posições O-3 e O-6 restantes ocupadas por unidades de arabinose (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Apesar de apresentarem uma estrutura geral semelhante, a estrutura fina das arabinogalactanas tipo II varia muito de espécie para espécie (CARPITA; GIBEAUT, 1993; ALBERSHEIM *et al.*, 1996). São polímeros complexos encontrados nas mais diversas estruturas vegetais, tendo sido já isoladas a partir de folhas, caules, raízes, flores, sementes, gomas e exsudatos vegetais (FINCHER; STONE; CLARKE, 1983; MENESTRINA *et al.*, 1998; DELGOBO *et al.*, 1998; DELGOBO *et al.*, 1999; CIPRIANI *et al.* 2004; MELLINGER *et al.*, 2005).

Ainda na região de carbono substituído, foi possível verificar alguns sinais característicos de α -D-GalpA (1 \rightarrow 4) ligado, dentre os quais estão δ 79,2/4,38 (C-4/H-4, O-substituído) (**6**), δ 71,3/4,07 (C-5/H-5) (**7**) e δ 69,0/4,04 (C-3/H-3) (**8**) não substituídos (RENARD *et al.*, 1998; CIPRIANI *et al.*, 2006). Um nítido sinal de acoplamento em δ 53,4/3,74 (**9**) também é observado, sugerindo a presença de grupamentos $-\text{COOCH}_3$ ligados em C-6 nas unidades do ácido galacturônico. (MAURER-MENESTRINA *et al.*, 2003) (Figura 11). A presença desses grupos foi confirmada no experimento de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a longa distância (HMBC) pelo sinal de acoplamento em δ 171,0/3,74 (Figura 12). Pode-se então, sugerir a existência de ácidos poligalacturônicos como um segundo polissacarídeo encontrado nas folhas de erva-mate.

Os ácidos poligalacturônicos são homopolímeros helicoidais formados por unidades de ácido α -D-galacturônico (1 \rightarrow 4)-ligadas (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Estas unidades podem estar metil-esterificadas em C-6, bem como O-acetiladas em O-2 ou O-3 (CAFFALL; MOHNEN, 2008). A este tipo de polissacarídeo são atribuídas muitas funções, estas, relacionadas com crescimento, morfologia, desenvolvimento, adesão, expansão, porosidade, sinalização e respostas de defesa contra patógenos (MOHNEN, 2008). Além disso, estes polissacarídeos apresentam efeitos positivos sobre a saúde humana, incluindo a redução nos níveis de colesterol e estimulação a resposta imune (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

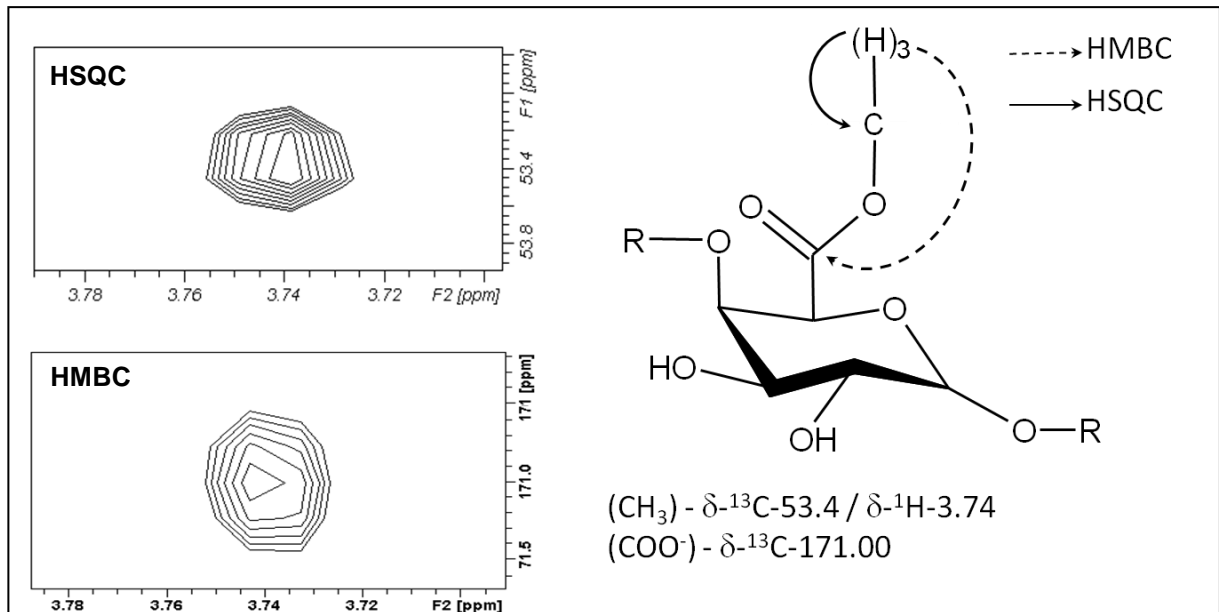


FIGURA 12 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (**HSQC**), MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ A LONGA DISTÂNCIA (**HMBC**) DA AMOSTRA **SPMSBC** E A ESTRUTURA DE UM AÇÚCAR ÁCIDO METIL-ESTERIFICADO, INDICANDO OS ACOPLAMENTOS OBSERVADOS PARA OS HIDROGÊNIOS DO GRUPO METIL.

Sinais referentes a presença de amido também foram identificados, estes em δ 75,4/3,64 (C-4/H-4, O-substituído, das unidades α -D-Glcp da amilose e amilopectina) (10), δ 73,2/3,60 (C-3/H-3) (11) e δ 69,7/3,96 (C-6/H-6, O-substituído, das unidades α -D-Glcp da amilopectina) (12) (Figura 11). O amido é o principal carboidrato de reserva das plantas superiores, e após a celulose é a substância mais abundante dentre os polissacarídeos. É encontrado nas folhas, sementes, frutas, raízes, rizomas, talos e tubérculos, acumulando-se na forma de grânulos no citoplasma da célula vegetal (BeMILLER, 2001).

Algumas diferenças na intensidade de sinais puderam ser observadas na região anômérica entre as frações obtidas de folhas *in natura* e aquelas submetidas a diferentes tratamentos pós-colheita (cancheamento e oxidação) em todos os tipos de folhas. Além disso, observa-se o desaparecimento do sinal de acoplamento em δ 100,4/5,27, referente às unidades de α -D-Glcp, nas amostras provenientes de folhas oxidadas, indicando que o processamento está influenciando na composição dos polissacarídeos (Figura 13).

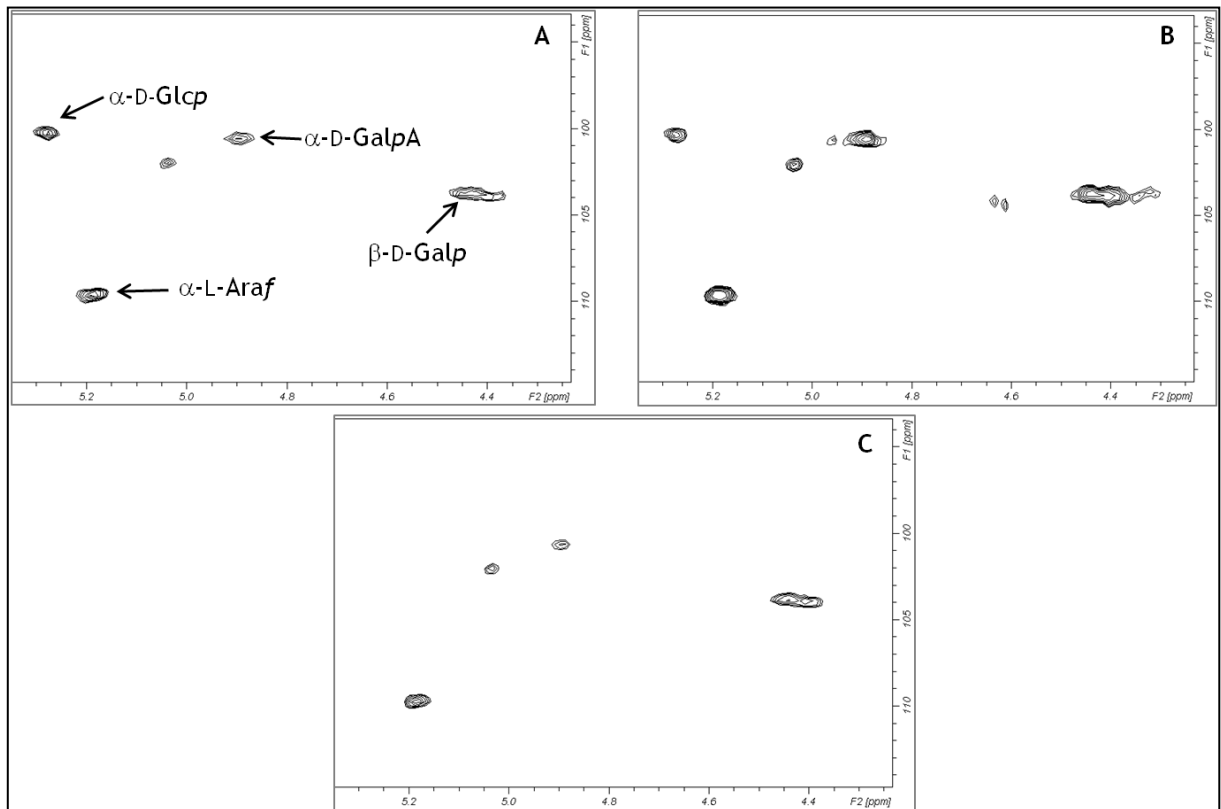


FIGURA 13 – REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE HSQC DAS AMOSTRAS **SPJSIN** (A), **SPJSC** (B) E **SPJSO** (C). AS TRÊS AMOSTRAS PROVENIENTES DO MESMO TIPO DE FOLHAS, MAS SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS.

Análises de PCA foram realizadas no intuito de reduzir a complexidade no conjunto de dados para uma pequena dimensão, facilitando a visualização de diferenças entre os espectros de HSQC bastante semelhantes das amostras. Na PCA para os espectros de HSQC foram necessários apenas 2 PC's para descrever o total de variância, sendo possível reduzir a dimensão original dos dados (inúmeras variáveis/dimensões – intensidade de sinais) para 2 (2 PC's). PC1 e PC2 explicaram 78,26 e 22,74 % (total de 100 %) da variância dos dados.

Os resultados aplicando a PCA são mostrados na Figura 14 [gráficos de scores (A) e loadings (B)].

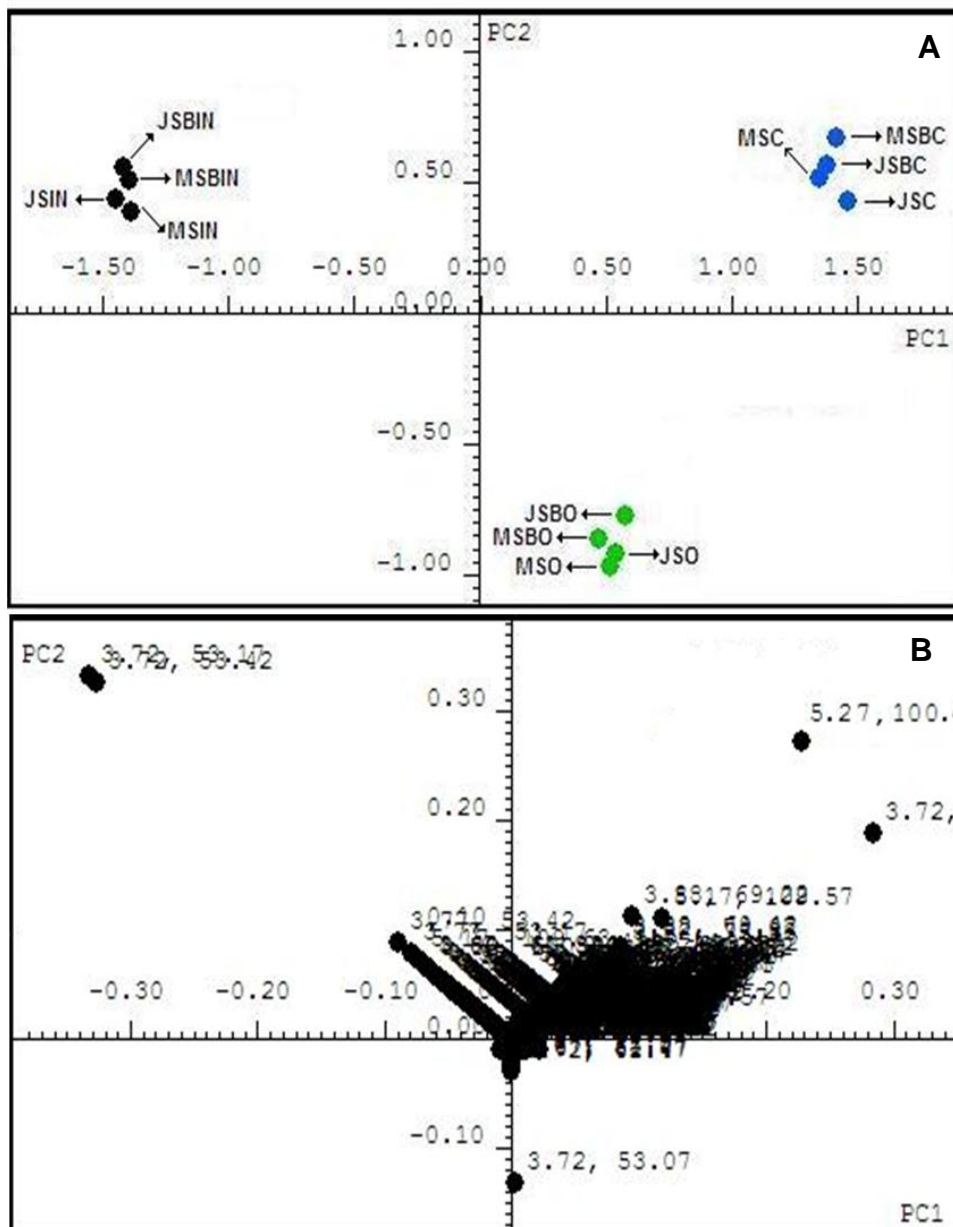


FIGURA 14 - GRÁFICOS DE SCORES (A) E LOADINGS (B) PARA AS PCAs DOS ESPECTROS DE HSQC DAS FOLHAS DE ERVA-MATE EM DIFERENTES ESTADOS FISIOLÓGICOS E DE PROCESSAMENTO.

Na Figura 14-A temos o gráfico dos scores para o PC1 e PC2, o qual traz informações sobre as amostras (cada um dos 12 tratamentos). Nesta figura é possível visualizar três diferentes grupos: o primeiro é formado pelas folhas *in natura* (bolas pretas), o segundo pelas folhas cancheadas (bolas azuis) e o terceiro, representado por bolas verdes, pelas folhas oxidadas. Dessa forma, PC1

possivelmente corresponde ao processamento pós-colheita e tem um grande efeito sobre as variáveis, já que explica grande percentagem da variância entre as amostras. PC2 que provavelmente corresponde do local de cultivo (sol ou sombra), também tem influência sobre os dados. A idade das folhas, por sua vez não exerceu influência nos deslocamentos químicos e intensidades de sinais dos espectros de RMN.

O gráfico de *loadings* é mostrado na Figura 14-B e traz informações sobre as variáveis (deslocamentos químicos e intensidade de sinais). Os gráficos de *scores* e *loadings* são analisados em conjunto. Desta forma, as plantas submetidas a diferentes tratamentos pós-colheita e provenientes de diferentes locais de cultivo diferenciam-se entre si principalmente com relação a intensidade do sinal de acoplamento em δ 53,4/3,74, correspondente ao grupamento $-\text{COOCH}_3$ das unidades de α -D-GalpA.

Verifica-se ainda, que as folhas oxidadas apresentam a menor intensidade deste sinal, o que está diretamente relacionado com a redução da metil-esterificação nessas folhas.

Observa-se também, diferenças no sinal em δ 100,4/5,27 correspondente as unidades de α -D-Glcp, o que já havia sido observado na comparação dos espectros de HSQC das amostras submetidas a diferentes tratamentos, onde ocorre o desaparecimento desse sinal nas folhas oxidadas.

6.3 ANÁLISE DO SOBRENADANTE ETANÓLICO DE FOLHAS DE ERVA-MATE (FRAÇÕES “S”)

6.3.1 Identificação e caracterização de compostos nas frações “S”

As frações provenientes das extrações aquosas denominadas “S”, seguido do nome das amostras, contém os compostos que ficaram solúveis após o tratamento com etanol. Estas foram analisadas por TLC, UPLC, ESI-MS e também quanto sua atividade antioxidante.

Os extratos foram submetidos a análises por ESI-MS em modo positivo e negativo, no intuito de se identificar compostos presentes e também de se fazer comparações entre as diferentes amostras. Os extratos provenientes de folhas

diferentes (diferentes idades e local de cultivo) e submetidas a processamentos diferentes mostraram-se qualitativamente semelhantes, como pode ser observado na análise de ESI-MS em modo negativo (Figura 15A-C). Os principais compostos identificados como íons desprotonados $[M-H]^-$ foram: ácido cafeico de m/z 179 (produto de fragmentação), ácido quínico de m/z 191, cafeoil glucose (ou ácido dicafeico) de m/z 341, ácidos cafeoilquínicos (clorogênicos) de m/z 353, ácidos dicafeoilquínicos de m/z 515, luteolina diglicosilada (ou campferol diglicosilado) de m/z 593 e rutina de m/z 609. Monossacarídeos e dissacarídeos apareceram como adutos de cloreto $[M+Cl]^-$, de m/z 215-217 (hexoses) e 377-379 (dímeros de hexoses). As análises *offline* por ESI-MS não foram suficientes para determinar quais isômeros de ácidos cafeoilquínicos (ácido *neo*-clorogênico, ácido clorogênico ou ácido *crypto*-clorogênico) e de ácidos dicafeoilquínicos (ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico, ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico ou ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico) estavam presentes nas amostras.

Embora as amostras tenham sido qualitativamente semelhantes, o MS mostrou algumas diferenças na abundância relativa de cada composto, principalmente quanto ao tipo de processo em que as folhas foram submetidas. Nos três tipos de processamentos (*in natura*, canheadas e oxidadas), os padrões de intensidade de íons de m/z 191, 215, 353, 371 e 377 foram substancialmente diferentes. Um aumento na intensidade dos íons de m/z 191 e 371 ocorreu principalmente nas folhas oxidadas, acompanhado pela diminuição do íon m/z 353. O íon de m/z 371 não foi identificado, no entanto, em *tandem*-MS, este íon deu origem a um fragmento de m/z 191, compatível com a razão massa/carga do ácido quínico. Embora seu substituinte não seja conhecido, este íon apresenta 18 unidades de massa (m.u) a mais do que o m/z 353, e poderia ser um produto de hidratação dos ácidos clorogênicos. Da mesma forma o íon de m/z 533 teve 18 m.u. a mais do que os ácidos dicafeoilquínicos, com m/z de 515 (Figura 15A-C)

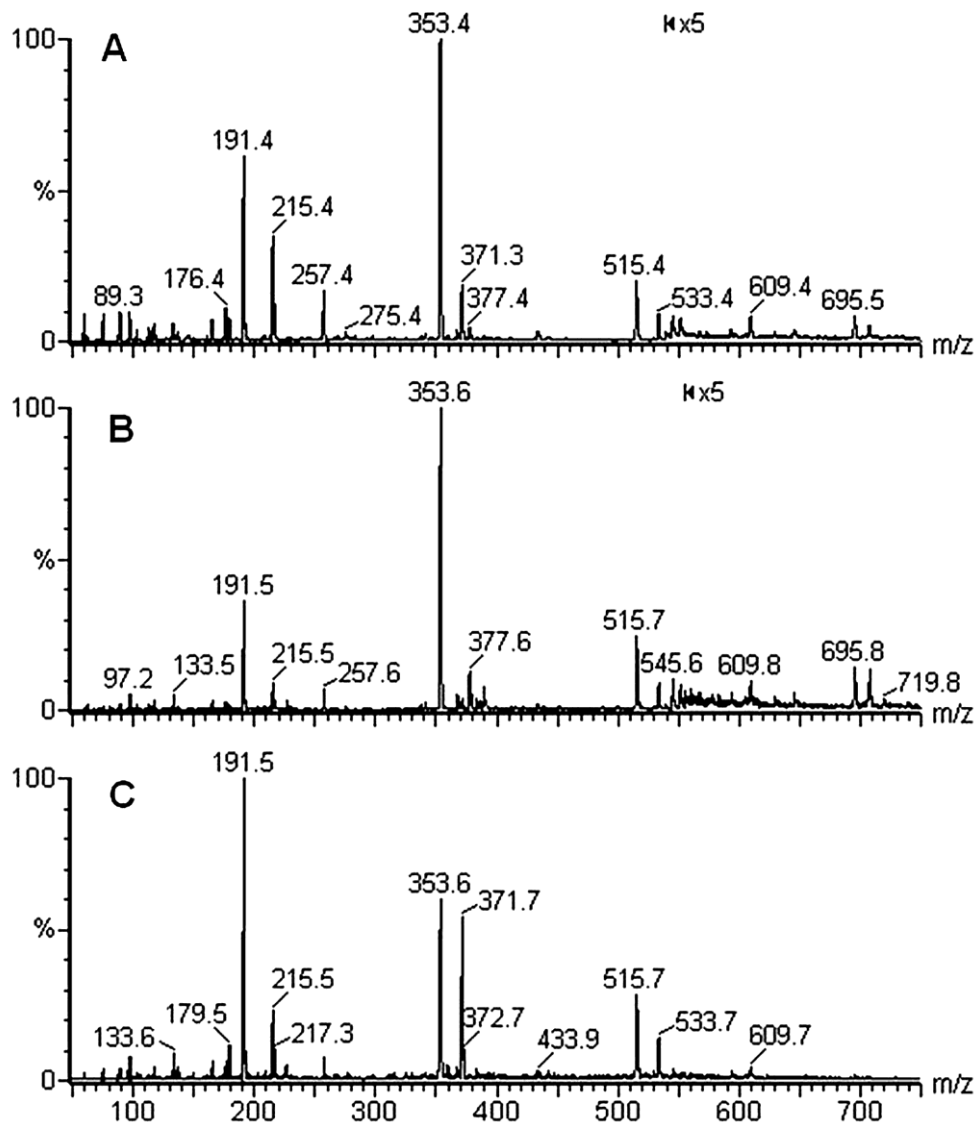


FIGURA 15 – ESPECTRO DE ESI-MS EM MODO OFFLINE NEGATIVO DAS AMOSTRAS **SJSIN** (A), **SJSC** (B) E **SJSO** (C).

ESI-MS em modo positivo foi desenvolvido como adutos de lítio $[M+Li]^+$, sendo que os espectros evidenciam compostos naturalmente neutros (sem carga efetiva na ausência do adutor), em relação àqueles contendo grupos ácidos. As amostras também apresentaram-se semelhantes, mas algumas diferenças foram observadas nas intensidades relativas de íons de carboidratos, em particular com uma diminuição do íon de m/z 349, com concomitante aumento do íon de m/z 187 nas folhas oxidadas (Figura 16A-C). Esses íons foram atribuídos a glucose/frutose (m/z 187) e sacarose (m/z 349), os quais também foram identificados por TLC,

confirmando uma redução nos níveis de sacarose em todas as folhas oxidadas (Figura 16D).

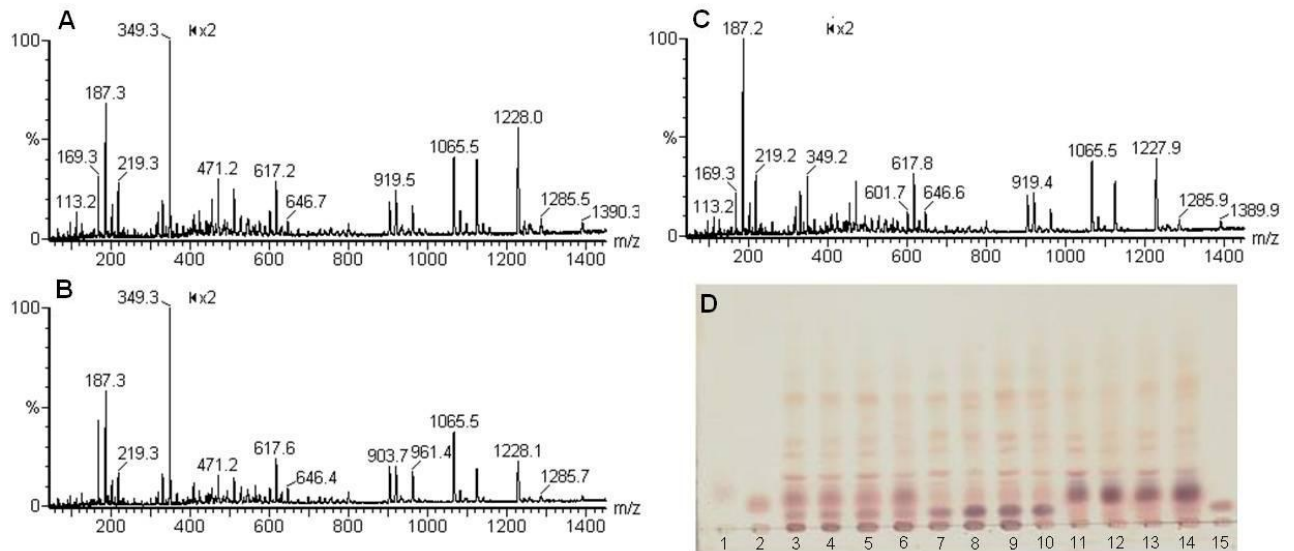


FIGURA 16 – ESPECTRO DE ESI-MS EM MODO *OFFLINE* POSITIVO DAS AMOSTRAS **SJSIN** (A), **SJSC** (B), **SJSO** (C) E TLC (D): (1) FRUTOSE, (2) GLUCOSE, (3) **SJSIN**, (4) **SJSBIN**, (5) **SMSIN**, (6) **SMSBIN**, (7) **SJSC**, (8) **SJSBC**, (9) **SMSC**, (10) **SMSBC**, (11) **SJSO**, (12) **SJSBO**, (13) **SMSO**, (14) **SMSBO**, (15) SACAROSE.

Um íon de baixa abundância de m/z 201 foi compatível com a razão massa/carga da cafeína $[M+Li]^+$, mas a teobromina (outra xantina comum encontrada na erva-mate), não pôde ser identificada por ESI-MS, considerando que apresenta a mesma massa molecular das hexoses (massa nominal de 180 Da), as quais poderiam dar origem ao mesmo íon, com m/z 187 $[M+Li]^+$. No entanto, em análise de TLC, duas bandas foram visualizadas (Figura 17), uma com o R_f compatível ao da cafeína e outra, de menor intensidade, compatível com o R_f da teobromina, a qual foi posteriormente confirmada por UPLC-PDA.

Flavonóides ligados a glicosídeos foram observados como íons de baixa intensidade, principalmente a rutina com m/z 617 $[M+Li]^+$ (Figura 16A-C). O íon de m/z 601 $[M+Li]^+$ não foi confirmado, uma vez que, pelo menos, dois flavonóides glicosilados isóbaricos apresentando essa razão massa/carga são relatados em erva-mate, luteolina ou caempferol diglicosilados (CARINI *et al.*, 1998, BRAVO;

GOYA, 2007). Outros flavonóides glicosilados foram encontrados (Tabela 6) e confirmados por *tandem*-MS. Estes tiveram um comportamento semelhante à fragmentação relatada em estudos anteriores. Entre estes, quercetina-pentosídeo, de m/z 433, quercetina-ramnosídeo, de m/z 447 e quercetina-hexosídeo, de m/z 463 (SOUZA *et al.* 2008, SOUZA *et al.*, 2009).

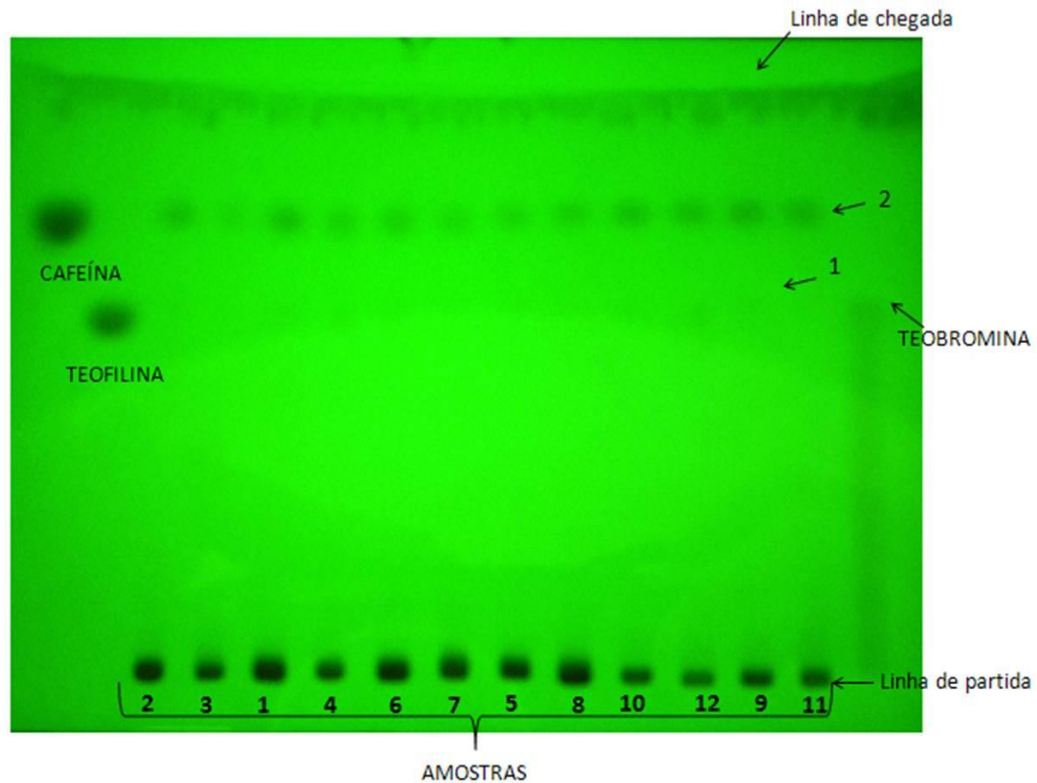


FIGURA 17 – TLC DAS AMOSTRAS **SJSIN** (1), **SJSBIN** (2), **SMSIN** (3), **SMSBIN** (4), **SJSC** (5), **SJSBC** (6), **SMSC** (7), **SMSBC** (8), **SJSO** (9), **SJSBO** (10), **SMSO** (11) E **SMSBO** (12), JUNTAMENTE COM PADRÕES DE XANTINAS (CAFEÍNA, TEOBROMINA E TEOFILINA).

Muitas saponinas são relatadas em erva-mate, sendo então chamadas de matesaponinas (GOSMANN; GUILAUME, 1995). Estas também foram observados em todos os sobrenadantes etanólicos das folhas como adutos de Li, identificadas da seguinte maneira: matesaponina 1 com m/z 919, matesaponina 2 com m/z 1065, matesaponina 3 com m/z 1081, matesaponina 4 com m/z 1228, e matesaponina 5 com m/z 1390 (Figura 16A-C), bem como por TLC (Figura 16-D, bandas superiores, acima dos monossacarídeos). Estas estruturas foram confirmadas através de *tandem*-MS, e os fragmento-íons são descritos na Tabela 6.

TABELA 6 – ANÁLISES *OFFLINE* DE ESI-MS EM MODO POSITIVO E NEGATIVO DOS COMPONENTES PRESENTES NOS SOBRENADANTE ETANÓLICOS DE FOLHAS DE ERVA-MATE.

Íons Negativos			
Ion	Adutor	Fragmentos principais	Compostos identificados
179	[M-H] ⁻	-	Ácido cafeico
191	[M-H] ⁻	93, 85	Ácido quínico
215	[M+Cl] ⁻	179, 35	Frutose/glucose
335	[M-H] ⁻	179, 173, 161, 133	Ácido cafeoilshiquínico
337	[M-H] ⁻	163	Ácido cumaroilquínico
341	[M-H] ⁻	179, 161	Ácido dicafeico/cafeoil-glucose
353	[M-H] ⁻	191, 179, 161	Ácidos clorogênicos
367	[M-H] ⁻	193, 191, 173	Ácidos feruloilquínicos
371	[M-H] ⁻	191, 62	n.i.
377	[M+Cl] ⁻	35	Sacarose
433	[M-H] ⁻	301	Quercetina-pentosídeo
447	[M-H] ⁻	301	Quercetina-ramnosídeo
463	[M-H] ⁻	301	Quercetina-hexosídeo
515	[M-H] ⁻	353, 191, 179	Ácidos dicafeoilquínicos
533	[M-H] ⁻	353, 191, 179	n.i.
529	[M-H] ⁻	367, 193, 191	Ácidos cafeoilferuloilquínicos
559	[M-H] ⁻	529, 397, 367	Ácidos cafeoilsinapilquínicos
593	[M-H] ⁻	285	Caempferol/luteolina diglicosídeos
609	[M-H] ⁻	301, 271, 255	Rutina
Íons Positivos			
187	[M+Li] ⁺	169, 127, 97, 91, 67	Frutose/glucose
219	[M+K] ⁺	39	Frutose/glucose
349	[M+Li] ⁺	187, 169	Sacarose
441	[M+Li] ⁺	423, 261, 187	Quercetina-pentosídeo
455	[M+Li] ⁺	187, 293, 319	Quercetina-ramnosídeo
471	[M+Li] ⁺	187, 259, 309, 319, 339	Quercetina-hexosídeo
511	[M+Li] ⁺	349, 331, 187, 169	Trissacarídeo
601	[M+Li] ⁺	153, 169, 293, 315	Caempferol/luteolina diglicosídeos
617	[M+Li] ⁺	471, 315, 309, 169, 153	Rutina
673	[M+Li] ⁺	511, 493, 349, 331, 187, 169	Tetrassacarídeo
919	[M+Li] ⁺	757, 463, 319, 301, 187, 169	Matesaponina 1
1065	[M+Li] ⁺	904, 465, 463, 447, 301, 187, 169	Matesaponina 2
1081	[M+Li] ⁺	919, 757, 463, 331, 301, 187, 169	Matesaponina 3
1227	[M+Li] ⁺	1065, 903, 465, 463, 331, 301, 187, 169	Matesaponina 4
1390	[M+Li] ⁺	1065, 904, 493, 465, 463, 331, 301, 187, 169	Matesaponina 5

6.3.2 Identificação de compostos por UPLC-PDA-ESI-MS

Os espectros de massas obtidos em modo *offline* não foram suficientes para distinguir entre importantes constituintes isoméricos presentes nas amostras, principalmente os ácidos clorogênicos e os ácidos dicafeoilquínicos. No entanto, Carini *et al.* (1998) descreveram diferenças importantes em comportamentos de fragmentação em modo negativo, obtidos por CID-MS. Foi observado que nas análises *online* (UPLC-MS), estes compostos sofreram fragmentação na fonte, e que estes perfis de fragmentação foram semelhantes aos descritos anteriormente (CARINI *et al.*, 1998), permitindo a sua precisa identificação.

A análise *online* foi desenvolvida inicialmente utilizando o sistema de gradiente 1 (descrito na metodologia). Os principais íons negativos, obtidos a partir da série de ácidos clorogênicos, com energias de 75 V no cone e 2,5 kV no capilar, foram m/z 353 $[MH]^-$, m/z 191 (ácido quínico), m/z ácido 179 (ácido cafeico) e m/z 173 (atribuído ao ácido quínico desidratado). As relações entre esses íons (m/z 353:191:179:173) foram diferentes para cada isômero (Figura 18), os quais foram identificados como: pico **3** (R_t 3.32) – o ácido *neo*-clorogênico com uma relação de íons de 1,0:0,69:0,51:0, pico **8** (R_t 4.04) - o ácido clorogênico, com relação de 1,0:2,27:0:0 e pico **12** (R_t 4.28) – o ácido *crypto*-clorogênico, com relação de 1,0:0,16:0,39:0,43.

Os ácidos dicafeoilquínicos também deram origem a fragmentação na fonte, sendo esta também diferente para cada isômero. Os principais íons foram os m/z 515, 353, 191, 179 e m/z 173. As estruturas isoméricas puderam ser inferidas com base em seu perfil de eluição em cromatografia de fase reversa (BRAVO; GOYA, 2007), bem como pela proporção de íons em m/z 515 e 353. O pico **18** (R_t 6.55) foi identificado como ácido 3,4-dicafeoilquínico, e praticamente não produziu nenhum fragmento na fonte (m/z 515 apenas). O pico **19** (R_t 6.66) atribuído ao ácido 3,5-dicafeoilquínico, mostrou uma relação de 1,0:0,97 entre os íons e o pico **22** (R_t 7.11) atribuído ao ácido 4,5-dicafeoilquínico, apresentou uma proporção de 1,0:0,18.

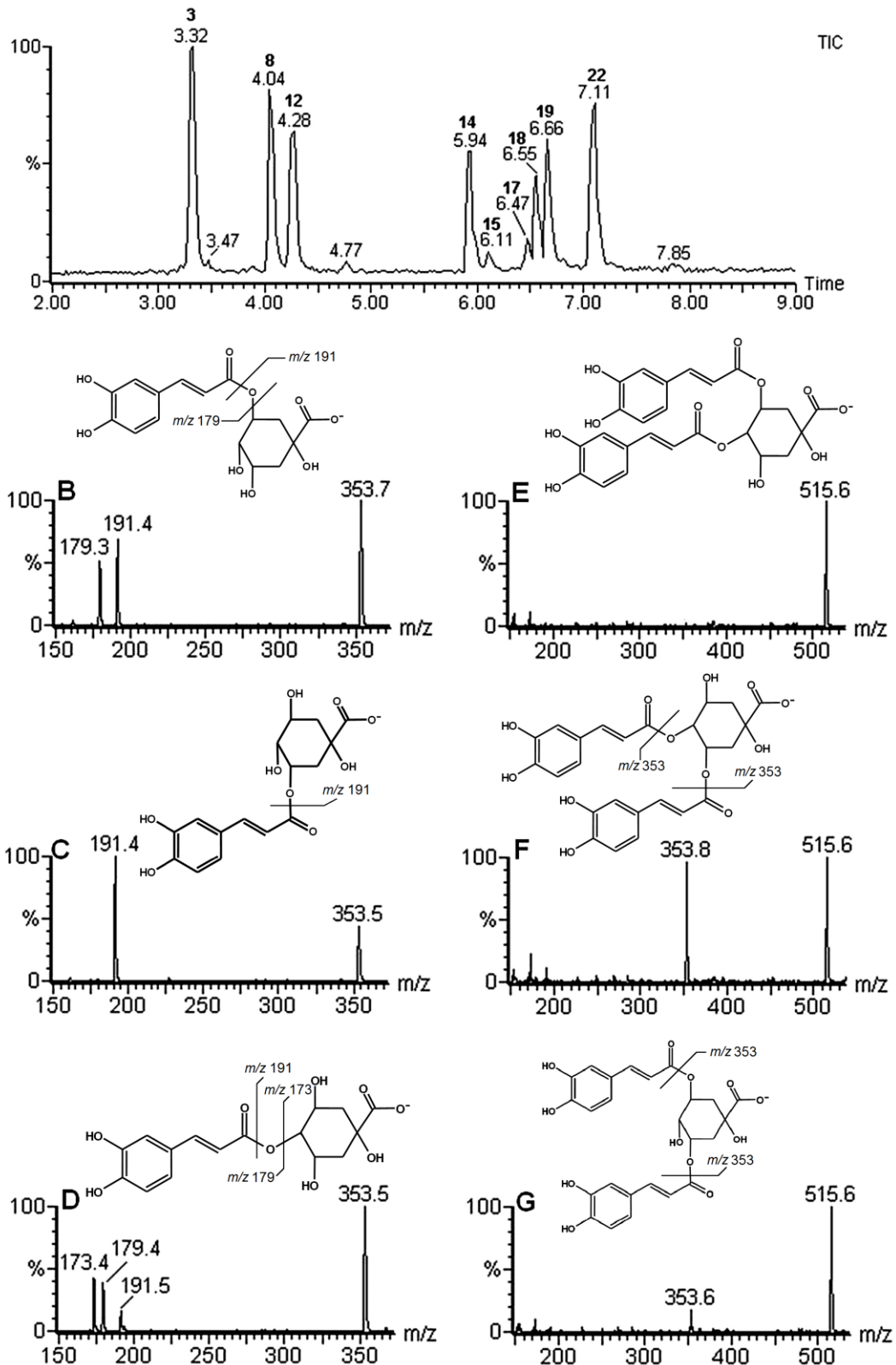


FIGURA 18 – CROMATOGRAMA DE UPLC-MS EM MODO TIC. ESPECTROS DE MASSA DO PICO 3 (B), PICO 8 (C), PICO 12 (D), PICO 18 (E), PICO 19 (F) E PICO 22 (G).

Flavonóides glicosilados também foram observados nas análises *online* em modo negativo, sendo rutina (R_t 5.94, m/z 609), quercetina-hexosídeo (R_t 6.11, m/z 463) e caempferol (ou luteolina) diglicosídeo (R_t 6.47, m/z 593). Este último teve um tempo de retenção menor do que o relatado para luteolina-diglicosídeo, sendo eluído após os ácidos dicafeoilquínicos (CARINI *et al.*, 1998) mas, mesmo assim, o íon de m/z 593 não pôde ser confirmado. Outros picos menores só apareceram após a extração dos íons de referência a partir do cromatograma, e são descritos na Tabela 7.

TABELA 7 – UPLC-PDA-MS EM MODO NEGATIVO.

Pico	R_t (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻	*Componente Identificado	^a referencia
1	1.05		191	Ácido quínico	[23]
2	2.97	272	n.d.	Teobromina	Padrão
3	3.32	325-296	353	Ácido <i>neo</i> -clorogênico	[27, 28]
4	3.47	325-296	341	Ácido dicafeico	[27]
5	3.64	325-296	341	Ácido dicafeico	[27]
6	3.87	314	337	Ácido cumaroilquínico	[27]
7	3.79	325-296	341	Ácido dicafeico	[27]
8	4.04	325-296	353	Ácido clorogênico	Padrão
9	4.17	273	n.d.	Cafeina	Padrão
10	4.11	325-296	367	Ácido feruloilquínico	[27]
11	4.23	325-296	367	Ácido feruloilquínico	[27, 28]
12	4.28	325-296	353	Ácido <i>crypto</i> -clorogênico	[28]
13	5.19	325-296	367	Ácido feruloilquínico	[28]
14	5.91	354-255	609	Rutina	Padrão
15	6.11	344-266	463	Quercetina-hexosídeo	[29]
16	6.32	344-266	433	Quercetina-pentosídeo	[29]
17	6.47	344-266	593	Caempferol/luteolina-diglicosídeo	[27, 28]
18	6.55	325-296	515	Ácido 3,4-dicafeoilquínico	[27, 28]
19	6.66	325-296	515	Ácido 3,5-dicafeoilquínico	[27, 28]
20	6.68	344-266	447	Quercetina-rhamnosídeo	[29]
21	6.96	325-296	529	Ácido cafeoilferuloilquínico	[27]
22	7.11	325-296	515	Ácido 3,5-dicafeoilquínico	[27, 28]
23	7.30	325-296	529	Ácido cafeoilferuloilquínico	[27]
24	7.55	325-296	529	Ácido cafeoilferuloilquínico	[27]
25	7.81	325-296	559	Ácido cafeoilsinpilquínico	[27]
26	7.91	325-296	529	Ácido cafeoilferuloilquínico	[27]
27	8.00	325-296	529	Ácido cafeoilferuloilquínico	[27]

6.3.3 Otimização da análise de UPLC-PDA para a quantificação de xantinas e fenólicos

Vários compostos bioativos foram identificados por meio dos espectros de MS obtidos em modo *offline* e *online* e alguns deles puderam ser quantificados utilizando padrões: teobromina, cafeína, ácido clorogênico e rutina. Os ácidos *neo*-clorogênico e *crypto*-clorogênico foram quantificados comparativamente com o ácido clorogênico.

UPLC-PDA foi otimizado utilizando o sistema de gradiente 2 (descrito na metodologia), para a quantificação desses compostos e uma boa separação e resolução dos picos foi possível em menos de 3 min de corrida. A detecção pelo PDA foi otimizada para cada um dos padrões, em 270 nm, para teobromina (pico **2**, 1.05 min) e cafeína (pico **9**, 1.59 min), em 325 nm para o ácido *neo*-clorogênico (pico **3**, 1.18 min), o ácido clorogênico (pico de **8**, 1.47 min) e o ácido *crypto*-clorogênico (pico **12**, 1.52 min) e em 255 nm para a rutina (pico de **14**, 2.10 min.) (Figura 19). A concentração dos compostos foi calculada utilizando-se suas respectivas curvas padrões: cafeína ($y=1,18 \times 10^4 \chi - 3,88 \times 10^5$, $R^2=0,999$); teobromina ($y=1,09 \times 10^4 \chi - 1,25 \times 10^5$, $R^2=0,999$); ácidos clorogênicos ($y=1,08 \times 10^4 \chi - 1,25 \times 10^5$, $R^2=0,999$) e rutina ($y=3,88 \times 10^4 \chi - 2,12 \times 10^5$, $R^2=0,987$).

Com relação às xantinas, a teobromina variou de 13,7 (SJSIN) a 20,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (SJSO) e cafeína de 39,3 (SJSBIN) a 84,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (SJSO). Ambas, folhas jovens e maduras cultivadas em ambiente ensolarado (monocultivo) apresentaram maior concentração de cafeína e teobromina, quando comparadas àquelas cultivadas na sombra (Figura 19 e Tabela 8). Sabe-se que as condições de crescimento desempenham um papel importante na produção de fitoquímicos e que o excesso de radiação ultravioleta pode aumentar a produção de compostos destinados a proteger a planta (MEYER *et al.*, 2006).

Houve uma diminuição relativa da concentração das metilxantinas em folhas submetidas ao cancheamento e um aumento na concentração nas folhas oxidadas (Tabela 8). A influência do processamento industrial na composição química de erva-mate tem sido relatada, incluindo a referente perda de cafeína após o sapeco e secagem, processos estes realizados nas folhas cancheadas (ESMELINDRO *et al.*,

2002). A maior perda de cafeína (~ 20%) ocorre durante o processo de secagem (SCHMALKO; ALZAMORA; 2001; ISOBELLA *et al.*, 2010).

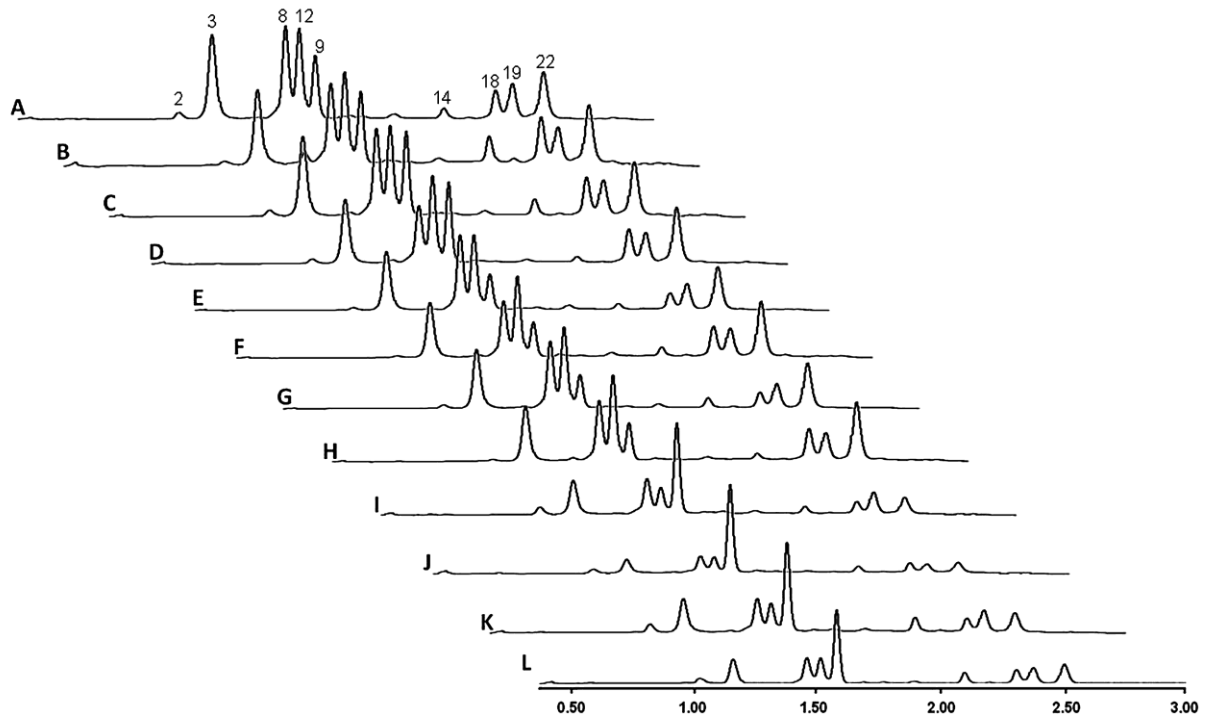


FIGURA 19 – UPLC-PDA DAS FRAÇÕES (SOBRENADANTES ETANÓLICOS): **SJSIN (A), SJSBIN (B), SMSIN (C), SMSBIN (D), SJSC (E), SJSBC (F), SMSC (G), SMSBC (H), SJSO (I), SJSBO (J), SMSO (K) E SMSBO (L).**

Os três isômeros dos ácidos clorogênicos apareceram em diferentes níveis, comparando-se os tratamentos. O ácido *neo*-clorogênico variou de 19,2 (SJSBO) a 65,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (SMSC), o ácido clorogênico de 18,5 (SJSBO) a 62,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (SMSC) e o ácido *crypto*-clorogênico de 19,0 (SJSBO) A 73,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (SMSC). Ácidos cafeico e ferúlico livres não foram encontrados, e o flavonóide glicosídeo mais abundante encontrado foi a rutina, variando de 8,9 (SMSBIN) a 24,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (SMSBC) (Tabela 8).

Em geral, as folhas provenientes do monocultivo (sol) apresentaram níveis mais elevados de quase todos os polifenóis. Vários compostos fenólicos são produzidos pelas plantas como uma resposta aos estímulos do ambiente, em geral, protegendo-as de fatores ambientais, como estresse, pragas e sol (MEYER *et al.*,

2006). Plantações expostas ao sol produzem níveis mais elevados destes compostos, em comparação com as cultivadas em ambiente sombreado de floresta. Em contato direto ao sol, elas são expostas a uma maior concentração de radiação UV. A luz absorvida produz energia, ao invés de outras ondas eletromagnéticas mais energéticas, podendo gerar radicais livres e induzir a danos celulares. Para se proteger, a planta produz compostos antioxidantes, de modo que as plantas expostas diretamente ao sol contêm um maior nível de ácidos clorogênicos (HECK; SCHMALKO; DEMEJIA, 2008)

Observa-se ainda que as folhas oxidadas apresentaram uma diminuição na concentração de compostos fenólicos comparadas com as folhas *in natura* (Figura 19, Tabela 8). Um fato que já era esperado visto que o processo oxidativo acontece por meio da oxidação de um variado grupo de compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo monofenóis, difenóis, polifenóis e aminofenóis provocando muitas vezes sua polimerização, com a consequente diminuição na concentração dos fenóis existentes anteriormente (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002).

6.3.4 Quantificação dos açúcares por UPLC

Frutose, glucose e sacarose presentes nos sobrenadantes etanólicos foram identificadas e quantificadas, utilizando suas respectivas curvas padrões: frutose ($y=1744,7x - 61107$, $R^2=0,998$), glucose ($y=1527,6x - 131571$, $R^2=0,999$) e sacarose ($y=1692,5x - 200509$, $R^2=0,999$).

Frutose variou de 36,4 (SJSBC) a 199,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (SMSBO), glucose variou de 26,9 (SMSBC) a 297,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (SMSO) e sacarose de 11,8 (SJSBO) a 198,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (SJSBC) (Figura 16-D, Tabela 8). As folhas oxidadas apresentaram as maiores concentrações de frutose e glucose e as menores concentrações de sacarose. As folhas canheadas por outro lado, mostraram altas concentrações de sacarose em comparação aos níveis de glucose e frutose. Apesar das folhas oxidadas apresentarem um baixo nível de sacarose, o somatório desses carboidratos (Σ Fru, Glc e Sac) foi relativamente alto (Tabela 8). Embora este fenômeno não tenha sido explicado, pode ser resultado de degradação de polissacarídeos estruturais ou de reserva.

TABELA 8 – CONCENTRAÇÃO DE XANTINAS, FENÓLICOS E AÇÚCARES NOS SOBRENADANTES ETANÓLICOS DAS FOLHAS DE ERVA-MATE.

Componente, tempo retenção	Frações (µg/mg de peso seco)											
	SJSIN	SJSBIN	SMSIN	SMSBIN	SJSC	SJSBC	SMSC	SMSBC	SJSO	SJSBO	SMSO	SMSBO
Teobromina (1.05 min)	19,68	13,70	18,60	16,29	16,62	14,75	19,90	15,02	20,27	16,33	19,13	16,58
Cafeína (1.59 min)	65,45	39,27	78,18	67,87	54,97	54,10	59,90	58,97	84,95	83,95	65,80	78,16
Ácido Clorogênico (1.47 min)	52,48	29,61	46,15	32,12	60,99	48,03	62,33	50,84	26,26	18,50	22,44	23,74
Ácido <i>neo</i> -clorogênico (1.18 min)	53,45	32,00	47,64	38,37	56,57	53,30	65,56	56,43	28,02	19,24	25,17	26,15
Ácido <i>crypto</i> -clorogênico (1.52 min)	52,18	34,10	48,97	42,94	62,02	66,40	73,30	65,82	24,42	19,00	23,00	25,19
Rutina (2.10 min)	16,02	19,94	21,38	8,90	14,39	19,49	24,78	14,12	11,28	10,14	15,51	16,80
Frutose (2.59 min) ^a	92,35	78,59	63,30	105,89	49,50	36,47	53,93	28,05	154,18	168,51	190,26	199,73
Glucose (2.86 min) ^a	157,35	134,18	109,43	156,47	58,53	29,83	51,05	26,98	230,31	243,32	297,40	243,12
Sacarose (3.20 min) ^a	45,45	96,83	62,75	49,31	111,23	198,35	163,38	128,91	17,51	11,84	15,71	18,79
Σ (carboidratos)	295,15	309,60	235,48	311,67	219,26	264,65	268,36	183,94	402,00	423,67	503,37	461,64

^a carboidratos foram quantificados separadamente das xantinas e fenólicos.

6.3.5 Análises de PCA para as quantificações

Os cromatogramas de UPLC obtidos na quantificação de fenólicos e xantinas foram analisados por quimeometria pela análise de PCA. Neste caso, foram analisados o efeito de três variáveis independentes (12 amostras obtidas após os tratamentos pós-colheita) sobre 11 compostos bioativos (variáveis dependentes). Na PCA para a quantificação dos compostos foram necessários 3 PC's para descrever grande parte da variância, sendo possível reduzir a dimensão original dos dados (11 variáveis, cada uma com 12 resultados diferentes) para 3 (3 PC's). PC1 explica ou contém 75,8% da variância dos dados originais. As PC's 2 e 3 explicam 16 e 5,8%, respectivamente. Os demais PC's (de 4 a 11) explicam muito pouco dos dados originais. A Figura 20-A mostra o gráfico de *scores* para PC1 versus PC2. Analisando-se o componente principal 1 (PC1) observa-se a formação de três grupos principais com relação a sua proximidade [(i, j, k e l), (a, b, c e d) e (e, f, g e h)] podendo-se relacionar PC1 com os tipos de tratamentos pós-colheita a que as folhas foram submetidas, os quais exercem grande influência na variabilidade dos dados analisados (concentração de compostos bioativos). Ainda nesta figura, analisando-se o componente principal 2, observa-se que este está relacionado ao local de cultivo de onde foram provenientes as folhas, já que neste PC há a separação entre os grupamentos citados anteriormente (a separado de b, c separado de d e uma menor separação entre os outros pares).

Na Figura 20-B encontra-se o gráfico de *scores* para PC1 versus PC3. O componente principal 3 faz a separação entre a e c e entre b e d, por exemplo, estando relacionado à idade da folha. Já que PC3 contém 5,8% da variância dos dados originais, a idade da folha é responsável por esta pequena variação nas concentrações dos compostos analisados.

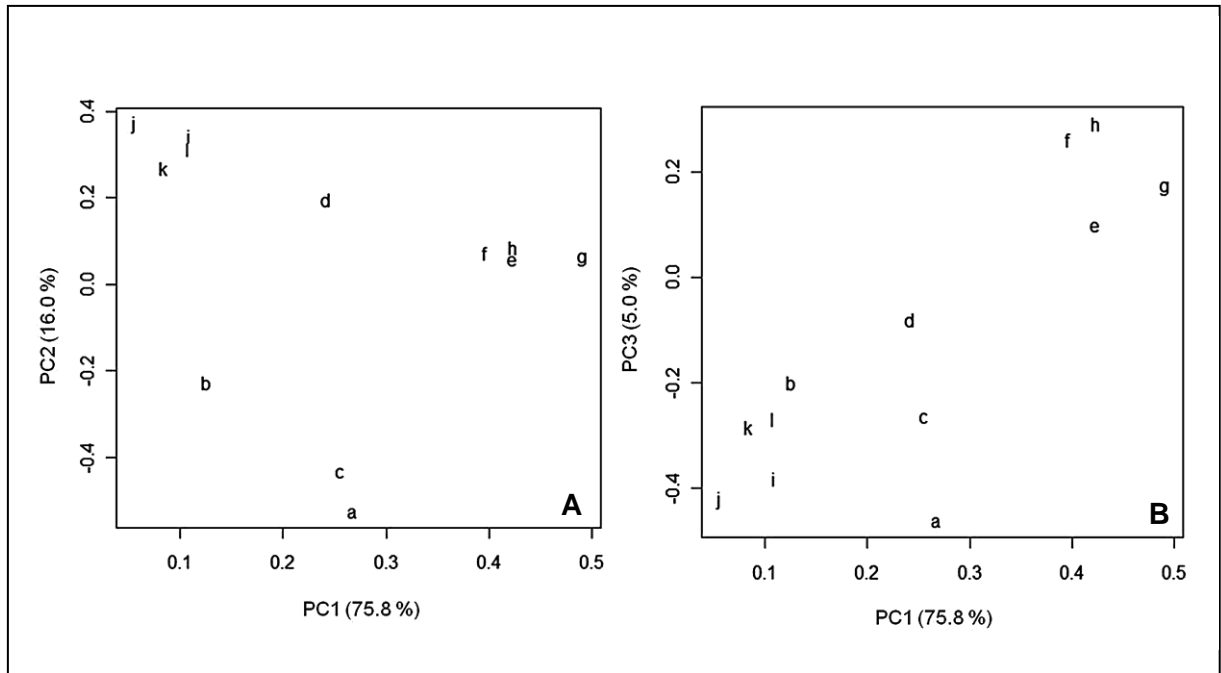


FIGURA 20 – ANÁLISES DE PCA. GRÁFICOS DE SCORES PARA CADA COMPONENTE PRINCIPAL COM SUA PERCENTAGEM DE VARIÂNCIA. EM (A) PC1 VERSUS PC2 E EM (B) PC1 VERSUS PC3. (a) **SJSIN**, (b) **SJSBIN**, (c) **SMSIN**, (d) **SMSBIN**, (e) **SJSC**, (f) **SJSBC**, (g) **SMSC**, (h) **SMSBC**, (i) **SJSO**, (j) **SJSBO**, (k) **SMSO** E (l) **SMSBO**.

6.3.6 Atividade antioxidante

6.3.6.1 Atividade sequestrante de radicais livres (DPPH)

A atividade sequestrante de radicais livres (%) dos sobrenadantes etanólicos é mostrada na Tabela 9. Para cada tratamento quatro concentrações foram testadas. Em geral, a captação dos radicais (%) aumenta com o aumento da concentração dos extratos e na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ a amostra SJSBC atinge 60%. Nessa mesma concentração Saldanha (2005) encontrou uma captação de 44% para as folhas de erva-mate tostadas. Miliauskas *et al.* (2003) discutem que os extratos que apresentam alta capacidade de captação de DPPH (superiores a 90%) correspondem praticamente a totalidade de captação deste radical livre em função do método, pois o mesmo apresenta uma absorção residual permanente, podendo equivaler até a aproximadamente 7% da captação final total.

TABELA 9 – ATIVIDADE SEQUESTRANTE DE DPPH (%) E CE₅₀ DOS SOBRENADANTES ETANÓLICOS DAS FOLHAS DE ERVA-MATE.

Amostras	Captação de radicais livres (%)				CE ₅₀ (µg extract/mL)
	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	
SJSIN	17,14±0,60 ^a	20,81±0,32 ^a	31,12±2,49 ^a	43,75±2,12 ^a	238,86±0,16 ^a
SJSBIN	17,66±1,26 ^a	22,68±1,29 ^a	23,19±2,70 ^b	32,20±2,46 ^b	383,25±0,25 ^b
SMSIN	22,04±2,40 ^a	22,64±0,38 ^a	29,27±1,43 ^a	41,00±3,21 ^a	294,80±0,09 ^a
SMSBIN	18,50±1,76 ^a	24,11±0,91 ^a	33,09±2,71 ^a	44,44±1,43 ^a	221,57±0,28 ^a
SJSC	19,39±1,76 ^a	23,78±0,91 ^a	33,11±2,71 ^a	44,14±1,43 ^a	254,83±0,12 ^a
SJSBC	23,93±3,93 ^b	25,09±0,23 ^b	39,23±0,50 ^c	60,32±0,32 ^c	173,22±0,35 ^c
SMSC	18,54±1,93 ^a	24,05±1,27 ^a	36,73±0,31 ^c	51,18±1,64 ^c	178,78±0,12 ^c
SMSBC	21,27±1,15 ^a	27,94±1,55 ^b	36,81±1,01 ^c	61,04±1,23 ^c	158,40±0,25 ^c
SJSO	21,81±0,85 ^a	21,44±1,24 ^a	24,49±1,46 ^b	34,75±0,75 ^b	366,75±0,42 ^b
SJSBO	18,38±1,98 ^a	19,23±0,56 ^c	24,35±0,61 ^b	24,74±0,89 ^d	736,50±0,16 ^d
SMSO	17,63±0,55 ^a	24,09±0,74 ^a	26,94±1,13 ^b	34,76±0,45 ^b	375,25±0,07 ^b
SMSBO	20,49±1,10 ^a	19,18±2,45 ^c	22,38±0,50 ^b	29,04±0,70 ^d	700,00±0,32 ^e
BHT	37,18±0,73 ^c	56,16±2,47 ^d	83,88±0,73 ^d	91,91±0,71 ^e	37,86±0,21 ^f

* Valores representados em médias com seus respectivos desvios padrões. Diferentes letras em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Não foram observadas diferenças significativas entre os extratos provenientes de folhas com idades diferentes e os provenientes de locais de cultivos diferentes. Mas diferenças ocorreram com relação ao tratamento que as folhas foram submetidas pós-colheita. Em comparação aos tratamentos a percentagem de captação seguiu a seguinte ordem decrescente: cancheada > *in natura* > oxidada. Considerando que a atividade esta diretamente relacionada com a concentração de compostos fenólicos, este resultado está de acordo com a quantificação de fenóis presentes nas amostras.

Os extratos de erva-mate cancheada apresentaram maior atividade de captação de radicais livres do que os extratos oriundos de folhas *in natura*, o mesmo

já foi encontrado em outros estudos com a erva-mate (SALDANHA, 2005) e com o café (NICOLI; ANESE; PARPINEL, 1997; DAGLIA *et al.*, 2000).

As reações de escurecimento não-enzimático representam um dos maiores fenômenos que podem ocorrer durante processos térmicos muito intensos, como no sapeco da erva-mate. A perda de atividade antioxidante pelos antioxidantes naturais pela progressiva degradação térmica pode ser minimizada pela formação de produtos a partir da reação de Maillard (Figura 21) (NICOLI *et al.*, 1997; DAGLIA *et al.*, 2000).

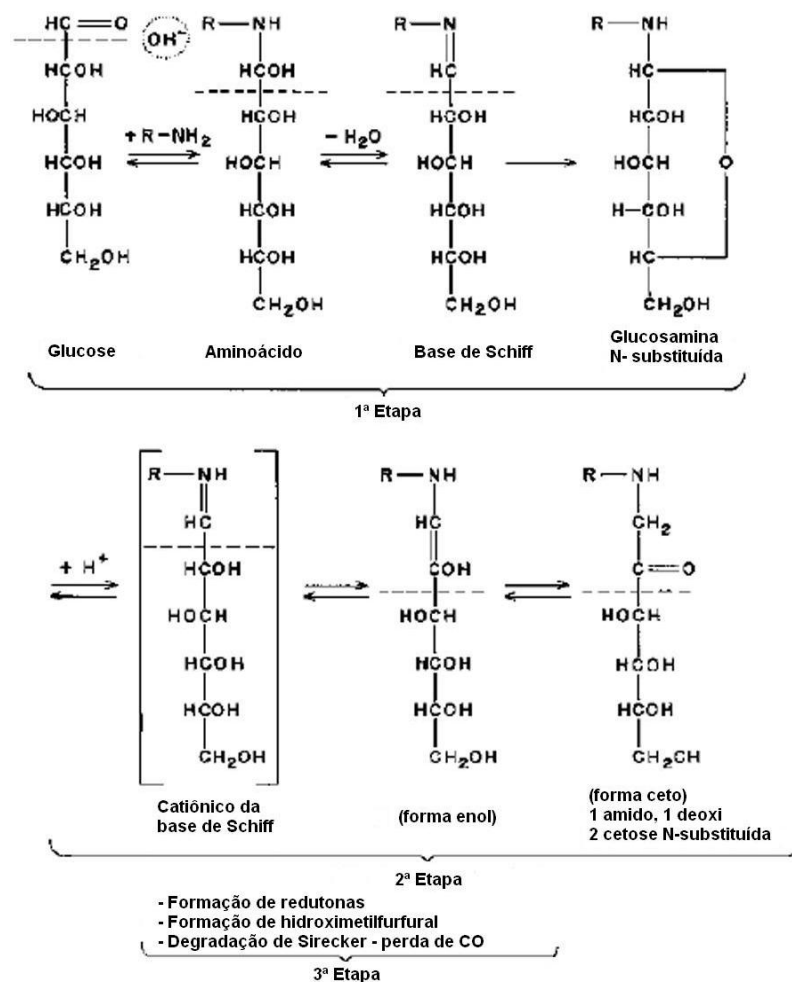


FIGURA 21 – ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE MAILLARD.

No caso da reação de Maillard, a elevada atividade antioxidante é geralmente associada a formação de melanoidinas (produtos finais de reação), que representam apenas uma das centenas de estruturas formadas a partir dessa reação (MANZOCCO *et al.*, 2001). Substâncias de alto peso molecular, como melanoidinas,

são provavelmente os maiores produtos com propriedades antioxidantes formados pelas reações de escurecimento não-enzimático (YAMAGUCHI, 1986).

6.3.6.2 Inibição da oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico

O sistema β -caroteno/ácido linoléico é constituído por uma emulsão, sendo considerado assim, um sistema aquoso-lipídico. Nesse método, a atividade antioxidante é avaliada pela capacidade de um extrato ou antioxidante isolado inibir o processo de oxidação do sistema, avaliado em um período de 2 horas. Diferentemente do que ocorre no método do DPPH, os antioxidantes deverão apresentar maior estabilidade para garantir maior atividade antioxidante. Os resultados obtidos para os extratos são apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) DOS SOBRENADANTES ETANÓLICOS DAS FOLHAS DE ERVA-MATE.

Amostras	Atividade antioxidante (%)			
	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	200 μ g/mL
SJSIN	28,98 \pm 3,91 ^a	33,13 \pm 1,34 ^a	31,24 \pm 0,57 ^a	42,37 \pm 1,09 ^a
SJSBIN	25,35 \pm 2,73 ^a	28,34 \pm 0,68 ^a	35,35 \pm 1,03 ^a	40,14 \pm 1,40 ^a
SMSIN	32,54 \pm 3,25 ^b	40,14 \pm 0,62 ^b	44,24 \pm 1,15 ^b	46,65 \pm 0,74 ^b
SMSBIN	23,63 \pm 1,10 ^a	27,36 \pm 0,70 ^c	35,35 \pm 1,00 ^a	47,35 \pm 0,66 ^b
SJSC	37,56 \pm 2,04 ^b	42,35 \pm 0,77 ^b	50,26 \pm 0,56 ^c	55,35 \pm 1,46 ^c
SJSBC	35,71 \pm 1,98 ^b	47,34 \pm 2,11 ^b	52,35 \pm 1,54 ^c	66,34 \pm 1,56 ^d
SMSC	38,98 \pm 0,92 ^b	48,37 \pm 0,70 ^b	55,34 \pm 1,46 ^c	59,46 \pm 0,94 ^c
SMSBC	41,29 \pm 1,63 ^d	44,23 \pm 0,72 ^b	55,36 \pm 1,51 ^c	69,35 \pm 0,57 ^d
SJSO	23,47 \pm 0,31 ^a	24,13 \pm 0,68 ^c	28,34 \pm 1,03 ^d	33,25 \pm 1,09 ^e
SJSBO	22,56 \pm 1,30 ^c	23,16 \pm 1,26 ^c	27,84 \pm 1,42 ^d	29,13 \pm 0,94 ^f
SMSO	25,35 \pm 0,50 ^a	29,42 \pm 1,82 ^a	29,75 \pm 2,80 ^d	35,27 \pm 2,57 ^e
SMSBO	25,88 \pm 0,67 ^a	24,39 \pm 0,89 ^c	26,34 \pm 1,21 ^d	30,24 \pm 0,92 ^f
BHT	42,60 \pm 2,01 ^d	54,35 \pm 1,41 ^d	75,35 \pm 1,52 ^e	93,38 \pm 3,05 ^g

* Valores representados em médias com seus respectivos desvios padrões. Diferentes letras em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p > 5$).

Assim como no método do DPPH, a atividade antioxidante foi dose dependente, aumentando com o aumento da concentração dos extratos. A atividade antioxidante para as amostras variaram de 29,13% (SJSBO) a 69,35% (SMSBC) e novamente as folhas canheadas apresentaram uma atividade maior. O BHT apresentou uma atividade de 93,38% na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$.

7 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- Os polissacarídeos presentes nas folhas de erva-mate foram caracterizados como sendo arabinogalactanas do tipo II, ácidos poligalacturônicos e amido. No entanto, observa-se uma redução no sinal referente ao amido e uma redução no sinal referente aos grupos carboxílicos metil-esterificados das unidades de ácido galacturônico nos espectros de RMN para as folhas oxidadas. Dessa forma, o processo oxidativo poderia estar degradando os polissacarídeos.

- A técnica mais recente na área da cromatografia líquida - Ultra Performance Liquid Chromatography - foi empregada na separação de compostos bioativos das folhas de erva-mate. Os princípios de cromatografia líquida são mantidos, mas a sensibilidade, velocidade e resolução são melhoradas. O tempo de análise é reduzido e a separação dos compostos da erva-mate pôde ocorrer em menos de três minutos, enquanto que nos sistemas tradicionais, o tempo e o consumo de solvente para a mesma análise pode demorar mais de 35 min.

- A análise comparativa de todas as amostras indicaram que as folhas cultivadas ao sol apresentaram maior concentração de compostos ativos (fenóis, teobromina, cafeína e rutina) quando comparadas com as cultivadas em sombra. O tratamento a que as folhas foram submetidas após a colheita também teve influência sobre esta composição. Folhas processadas apresentaram um decréscimo na concentração de xantinas, enquanto que as oxidadas apresentaram uma menor concentração de compostos fenólicos, quando comparados com folhas *in natura* e cancheadas. Esta diminuição de compostos fenólicos pode reduzir as propriedades antioxidantes das folhas oxidadas, embora por outro lado, estas tenham apresentado um aumento na concentração de carboidratos de baixo peso molecular (principalmente frutose e glicose), o que pode vir a suavizar o sabor da bebida. Assim, os resultados apresentados fornecem uma orientação para a obtenção de folhas de *Ilex paraguariensis* enriquecidas em princípios biologicamente ativos, que poderiam ser aplicados nos alimentos, na farmacêutica e na cosmética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3307-3330, 1992.

ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; O'NEILL, M. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. **Progress in biotechnology: Pectins and Pectinases**, v. 14, p. 47-55, 1996.

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

ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, B. **As plantas que curam**. 2.ed. São Paulo: Editora Três, 1983. 140p.

ANDRADE, F. M., **Diagnóstico da Cadeia Produtiva da *Ilex paraguariensis* St. Hill Erva-Mate**. São Mateus do Sul-PR, 1999. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nipe/rbma/ervmenub.htm>> Acesso em: 05 abr. 2008.

ANUÁRIO Brasileiro da erva-mate. Santa Cruz do Sul: Gazeta Grupo de comunicações, 1999.

ASPINALL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1980. v. 3, p. 473-500.

ASPINALL, G.O. Structural chemistry of the hemicelluloses. **Advances in Carbohydrate Chemistry**. New York, 1959. p. 429-430.

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

AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p.143.

BALADRIN, M. F.; KLOKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLINGE, W. H. Natural plant chemicals: Source of industrial and medicinal materials. **Science**, v.228, p.1054-1060, 1985.

BASSANI, V. L.; CAMPOS, A. M. Desenvolvimento de extratos secos e nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hill; aquifoliácea (erva-mate) visando à exploração do potencial vegetal como fonte de produtos. In: 1º CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA-MATE, 1997, Curitiba. **Anais**. Curitiba-PR, 1997. p. 69-83.

BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v.12, p. 423-432, 2007a.

- BASTOS, D. H.; OLIVEIRA, D. M.; MATSUMOTO, R. L. T.; CARVALHO, P. O. RIBEIRO, M. L. Yerba mate: Pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v., p. 399-404, 2007b.
- BASTOS, D. H. M.; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y. S.; TORRES, E. A. F. S. Bioactive compounds content of Chimarrao infusions related to the moisture of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 49, p.399-404, 2006a.
- BASTOS, D. H. M.; ISSHIMOTO, E.; MARQUES, M. O. M.; FERNANDO, F. A.; TORRES, E. A. F. S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19(6-7), p.538-543, 2006b.
- BASTOS, D. H. M.; TORRES, E. A. F. S. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Nutrire**, v. 26, p. 77-89, 2003.
- BEEBE, K.; PELL, R.; SEAHOLTS, N. B. **Chemometric: A practical guide**. New York: John Wiley & Sons, 1998.
- BeMILLER, J. N. **Polysaccharides**. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, 7p. 2001.
- BERKAI, D.; BRAGA, C. A. **500 anos de história da erva-mate**. 2. ed. Editora Cone Sul, 2000.
- BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**, v. 77, p. 345-358, 2005.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 26, p. 1199-1200, 2002.
- BÖTTCHER, H.; GÜENTHER, I.; KABELITZ, L. Physiological postharvest responses of common Saint-John's wort herbs (*Hypericum perforatum* L.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 29, p. 342-350, 2003.
- BRASIL. **Ministério da Saúde** – Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998, publicada no Diário Oficial da União de 29 de junho de 1998.
- 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.
- BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Unwin Hyman, 1990. 194 p.
- BUNKOVA, R.; MAROVA, I.; NEMEC, M. Antimutagenic properties of green tea. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 60, p. 25-29, 2005.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1879-1900, 2009.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como Fonte de Medicamentos. **Ciência e Cultura Temas e tendências SBPC**, v. 55, p. 37-39, 2003.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phototherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMPOS, A. M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate)**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

CARDOSO-JÚNIOR, E. L.; FERRARESE-FILHO, O.; CARDOSO-FILHO, L.; FERRARESE, M. L. L.; DONADUZZI, C. M.; STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds contents in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v 20, p. 1-10, 2007.

CARDUCCI, C. N.; DABAS, P. C.; MUSE, J. O. Determination of inorganic cations by capillary ion electrophoresis in *Ilex paraguariensis* (St. H.), a plant used to prepare tea in South America. **Journal of AOAC International**, v. 83, p.1167-1173, 2000.

CARINI, M.; FACINO, R. M.; ALDINI, G.; CALLONI, M.; COLOMBO, L. Characterization of phenolic antioxidants from Mate (*Ilex paraguayensis*) by liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 12, p.1813-1919, 1998.

CARPITA, N. C.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. USA: Courier, 2000. p. 52-108.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Curitiba: EMPRAPA/CNPFlorestas,1994.

CENI, G. C. **Oxidases de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill): extração, estabilidade térmica e influência da exposição ao microondas**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, 2005.

CHANDRA, S.; DEMEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extracts of ardisia compressa in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3590, 2004.

CHYAU, C. C.; TSAI, S. Y.; KO, P. T.; MAU, J. L. Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. **Phytomedicine**, v. 9, p. 3-8, 2002.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A polysaccharide from a tea (Infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1018-1021, 2006.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 703-706, 2004.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p.1033-1043, 2000.

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

COSTA, S. G. **A erva-mate**. UFPR, 1989

DACROCE, D. M. **Cadeia Produtiva da erva-mate em Santa Catarina**. Chapecó: EPAGRI/CPMP, 1996. 35 p.

DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; GREGOTTI, C.; BERTE, F.; GAZZANI, G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p. 1449-1454, 2000.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudates: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 320, p. 167-175, 1999.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1207-1214, 1998.

DEY, P. M.; BROWNLEADER, M. D.; HARBORNE, J. B. The plant, the cell and its molecular components. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 6-9.

Di STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. UNESP. 1995. 230p.

DONADUZZI, C. M.; COELHO, S. R. M.; CARDOSO, E. L.; GALLO, A. G.; HUPPES, G. K.; KUHN, I. M. V.; SCHICHEL, C. Teores de cafeína, polifenóis totais e taninos de amostras de erva-mate comercializadas na região de Toledo, Paraná. In: II CONGRESSO SUL AMERICANO DE ERVA-MATE. **Anais**. 2000 p.158-161.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Effects of industrial processing steps on the physico-chemical characteristics of mate tea leaves. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 199-204., 2002.

FALK, H.; STANEK, M. Two-Dimensional ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopy and the Structural Aspects of Amylose and Amylopectin. **Monatshefte für Chemie/ Chemical Monthly**, v. 128, p. 777-784, 1997

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. Uso analítico de tecidos e extratos brutos vegetais como fontes enzimáticas. **Quimica Nova**, v. 25, p.455-464, 2002.

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.

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

FILISSETTI-COZZI, T. M. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FINCHER, G. B.; STONE, B. A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 34, p. 47-70, 1983.

FLAMENT, I. Coffe, cocoa and tea. In: MAARSE, H. **Volatile Compounds in Food and Beverages**. Nova York: Marcel Dekker, 1991. p. 617-669.

FRANSEN, C. T. M.; HASELEY, S. R.; HUISMAN, M. M. H.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J.; AMERLING, J. P.; VLIEGENTHART, J. F. G. Studies on the structure of a lithium-treated soybean pectin: characteristics of the fragments and determination of the carbohydrate substituents of galacturonic acid. **Carbohydrate Research**, v. 328, p. 539-547, 2000.

GNOATTO, S. C.; DASONVILLE-KLIMPT, A.; DO NASCIMENTO, A.; GALÉRA, P.; BOUMEDIENE, K.; GOSMANN, G.; SONNET, P.; MOSLEMI, S. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.42, p.1864-1877, 2008.

GNOATTO, S. C. B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 723-726, 2005.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, v.142, p. 119-132, 1984.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 53, p. 1212-1222, 1975.

GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A. T.; SCHENKEL, E. P. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 438-441, 1995.

HARA, Y. **Green tea: health benefits and applications**. New York: Marcel Dekker Inc, 2001. p 16-20.

HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; DEMEJIA, E. G. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8394-8403, 2008.

HECK, C. I.; DEMEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007

IBGE – Banco de Dados – Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em: <<http://www.sidra.gov.br>>. Acesso em 05 jun. 2009.

ISOBELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, p. 695-699, 2010.

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

JAYARAMAN A.; MUTHUSAMY, P.; SUBBAIYAN, M.; KRISHNASAMY, S. Improvement of Tea Leaves Fermentation with *Aspergillus* spp. Pectinase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 299-303, 2002.

KIKATANI, T.; WATANABE, Y.; SHIBUYA, T. Different effects of methylxanthines on central serotonergic postsynaptic neurons in a mouse behavioral model. **Pharmacology Biochemistry**, 44, p. 457-461, 1993.

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

LAPA, A. J.; CADEN, S.; LANDMAN, M. T. R. L.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais**. v.1, 2003. 5p.

LORIST, M. M.; TOPS, M. Caffeine, fatigue and cognition. **Brain and Cognition**, v. 53, p. 82-94, 2003

MANZOCCO, L.; CALLIGARIS, S.; MASTROCOLA, D.; NICOLO M. C.; LERICI, C. R. Reviw of no-enzimatic browning and antioxidant capacity in processed foods. **Trends in Food Science and Technology**, v.11, p. 340-346, 2001.

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

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1998.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Teores de Catequinas e Teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n. 2, p. 401-407, 2006.

MAURER-MENESTRINA, J.; SASSAKI, G. L.; SIMAS, F. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structure of a highly substituted α -xylan of the gum exudate of the palm *Livistonia chinensis* (chinese fan). **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1843-1850, 2003.

MEDIC-SARIC, M.; JASPRICA, A. M.; MALES, Z. Application of TLC in the Isolation and Analysis of Flavonoids. In: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phitochemistry**. US: CRC Press, 2008. v.99, p. 405-423.

MELLINGER, C. G.; CARBONERO, E. R.; NOLETO, G. R.; CIPRIANI, T. R.; OLIVEIRA, M. B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemical and biological properties of an arabinogalactan from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1479-1483, 2005b.

MENDES, R. M. **O Caracterização e avaliação da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), beneficiada no estado de Santa Catarina. 2005.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MENESTRINA, J. M.; IACOMINI, M.; JONES, C.; GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 715-721, 1998.

MEYER, S.; CEROVIC, Z. G.; GOULAS, Y.; MONTPIED, P.; DEMONTES-MAINARD, S.; BIDEL, L. P. R.; MOYA, I.; DREYER, E. Relationships between optically assessed polyphenols and chlorophyll contents and leaf mass per area ratio in woody plants: A signature of the carbon-nitrogen balance within leaves. **Plant Cell & Environment**, v. 29, p. 1338-1348, 2006.

MEYER, A. S.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. **Food Chemistry**, v. 61, p. 71-75, 1998.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MING, L. C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. **Horticultura Brasileira**, v.12, p. 3-9, 1994.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 266-277, 2008.

MOLIN, R. F. **Desenvolvimento de processo oxidativo de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hill).** Dissertação de Mestrado em Ecologia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, 2009.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 4050-4063, 2009.

MORRÉ, D. J.; MORRE, D. M.; SUN, H.; COOPER, R.; CHANG, J.; JANLE, E. M. Tea catechin synergies in inhibition of cancer cell proliferation and of a cancer specific cell surface oxidase (ECTO-NOX). **Pharmacology & Toxicology**, v. 92, 234-241, 2003.

MOSELE, S. H., **A governança na cadeia agroindustrial da erva-mate na região do Alto Uruguai Rio-Grandense**. Dissertação de Mestrado em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2002.

MOSELE, S. H. **Produção e manejo da cultura de erva-mate**. Porto Alegre: SEBRAE. 1998. 56p.

MUKAI, K.; NAGAI, S.; OHARA, K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by tea catechins in ethanol solution. **Free radical Biology & Medicine**, v. 39, p. 752-761, 2005.

MUKHATAR, H.; AHMAD, N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1698S-1702S, 2000.

MUTHUMANI, T.; KUMAR, K. Influence of fermentation time on the development of compounds responsible for quality in black tea. **Food Chemistry**, v.101, p.98-102, 2007.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, N. T. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. **Cancer Letters**, v.114, p. 71-74, 1997.

ODY, P. **The complete medicinal herbal**. Nova Iorque: Dorling Kindersley.1993. 192p.

PANEK, A. Dosagem da peroxidase nas folhas de mate. **Boletim do Instituto de Química Agrícola**, n. 39, p. 7-12, 1955.

PARANÁ. Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Erva-mate. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva de erva-mate**. Curitiba, 2000. Série PADCT III, n. 1.

PASINATO, R. **Aspectos etnoentomológicos, socioeconômicos e ecológicos relacionados à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), no município de Lontra, Paraná, Brasil**. Dissertação de Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

POMILIO, A. B.; TRAJTEMBERG, S.; VITALE, A. A. High-performance capillary electrophoresis analysis of Mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electro kinetic capillary chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.13, p. 235-241, 2002.

RANGANATH, S.; MARIMUTHU, S.; RAJU, K. Effect of withering process in biochemical composition and green leaf quality aspects of black tea (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze). **Journal of Plantation crops**, v. 22, p. 36-43, 1994.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 61-71.

REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 205-236.

RENARD, C. M. G. C.; LAHAYE, M.; MUTTER, M.; VORAGEN, F. G. J.; THIBAUT, J. F. Isolation and structural characterisation of hamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 305, p. 271-280, 1998.

RIO GRANDE DO SUL. Lei nº 11.929, de 20 de junho de 2003. Leio do churrasco e chimarrão. Institui o churrasco como “prato típico” e o chimarrão como “bebida símbolo” do estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, RS, 23 de jun.2003.

RUCKER, N. G. A; MACARI, JR.; ROCHA JR., W. F. **Agronegócio da erva-mate no estado do Paraná: diagnóstico e perspectivas para 2003**. In: Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná. Disponível em: <www.pr.gov.br/colepar/seab>. Acesso em: 10 de maio de 2009.

SABBATELA, P. O.; BRUMOVSKI, L. A.; ACUNA, G. SMORZSEWSKI, M. Variación de sólidos solubles de la yerba mate durante el desarrollo de una mateada. In: CONGRESSO SULAMERICANO DE ERVA-MATE, 4., 2006, Posadas, Argentina. **Anais**: Posadas, Argentina, 2006.

SAKANARA, S.; TACHIBANA, Y.; OKADA, Y. Preparations and antioxidants properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). **Food Chemistry**, v.89, p. 569-575, 2005.

SALDANHA, L. A. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camelia sinensis*). Dissertação de Mestrado em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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

SASSAKI, G. L. ; SOUZA, L. M. ; SERRATO, R ; CIPRIANI, T. R. ; GORIN, P ; IACOMINI, M. Application of acetate derivatives for gas chromatography mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography**, v. 1208, p. 215-222, 2008.

SASSAKI, G. L., SOUZA, L. M., CIPRIANI, T. R., & IACOMINI, M. TLC of carbohydrates. In: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phitochemistry**. US: CRC Press, 2008. v. 99, p. 255–276

SCHMALKO, M. E.; ALZAMORA, S. M. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during Yerba Mate processing. **Drying Technology**, v. 19, p. 599-610, 2001.

SCHUBERT, A.; ZANIN, F. F.; PEREIRA, D. F.; ATHAYDE, M. L. Annual variations of methylxanthines in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) samples in Ijuí and Santa Maria, State of Rio Grande Do Sul. **Química Nova**, v. 29, p.1233-1236, 2006.

SHON, M.-H.; KIM, T.-H.; SUNG, N.-J. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of Hymenochaetaceae) extracts. **Food Chemistry**, v. 82, p. 593–597, 2003.

SIMAS, F. F. **Polissacarídeos da goma de exsudato e da polpa dos frutos de *Prunus pérsica*: caracterização estrutural e análises reológicas**. Tese de Doutorado em Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SKIPSKI, V. P. Thin layer chromatography of neutral glycolipds. **Methods in Enzymology**, v. 35, p. 396-425, 1975

SKY, E. E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura Temas e tendências SBPC**, v. 55, p.35-36, 2003.

SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; SANT'ANA, C. F.; IACOMINI, M. GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. Heart-cutting two-dimensional (size exclusionxreversed phase) liquid chromatography–mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal Chromatography. A**, v. 1216, p. 99-105, 2009.

SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; SERRATO, R. V.; COSTA, D. E.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by offline and online high performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal Chromatography. A**, v. 1207, p. 101-109, 2008.

STAHL, E. **Thin-Layer Chromatography**. 2 ed. New York: Springer-verlag Berlin Heidelberg, 1969.

SUGANUMA, M.; OKABE, S.; KAI, Y.; SUEOKA, N.; SUEOKA, E.; FUJIKI, H. Synergistic effects of (-) epigallocatechin gallate with (-) epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in the lung cancer cell line PC-9. **Cancer Research**, v. 59; p. 44-47, 1999.

TAKEO, T. Green tea and semi-fermented teas. In: WILSON, K. C.; CLIFFORD, M. N. (eds.) **Tea cultivation to consumption**. London: Chapman and Hall, 1992. p. 413-414.

TAKETA, A.T. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Mate). **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 205-211, 2004.

TENÓRIO SANZ, M. D.; TORIJA ISASA, M. E. Mineral elements in Mate herb (*Ilex paraguariensis* St. H.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 41, p.441-454, 1991.

TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of gum arabic: aids for structural assignments in the polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 151-158, 2002.

VALDUGA, A. T.; FINZER, J. R. D.; MOSELE, S. H., **Processamento de erva-mate**. Erechim: Edifapes, 2003. 182p.

VALDUGA, A. T. **Uso sustentado e processamento de *Ilex paraguariensis* St Hill (Erva-mate)**. Tese de Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2002.

VALDUGA, E., **Caracterização química e anatômica da folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e de espécies utilizadas na adulteração do mate**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 1994.

VAN DEN DRIESSCHE, R. Prediction of mineral status of trees by foliar analysis. **The Botanical Review**, v.40, p.347-394, 1974.

VIEIRA, M. A.; ROVARIS, A. A.; MARASCHIN, M.; SIMAS, K. N.; PAGLIOSA, C. M.; PODESTÁ, R.; AMBONI, R. D. M. C.; BARRETO, P. L. M.; AMANTE, E. R. Chemical characterization of candy made of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 4637–4642, 2008.

VIEIRA, A. R. R.; SUERTEGARAY, C. E. O.; HELDWEIN, A. B.; MARACHIN, M.; SILVA, A. L. Influência do microclima de um sistema agroflorestal na cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v.11, p.91-97, 2003.

VOLAK, J.; STODOLA, J. 1990. **Plantas Mediciniais**. Ed. Inquérito. 319p.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97-104, 2006.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963.

XANDER, C. G.; ACOSTA, L. M.; SCIPIONI, G. P.; ARGÜELO, B.; DEL, V. Inativación térmica de peroxidases em *Ilex Paraguariensis* St Hill y *dumosa*. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA-MATE, 2., Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: Organizadores, 2000.

YAMAGUCHI, N. Antioxidative activity of the oxidation products prepared from melanoidns. In: **Proceedings of the 3rd International Symposium on the Maillard Reaction**. Fujimaki, M.; Namiki, M.; Kato, H. Eds Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, p.291-299, 1986.

ZAPOROZHETS, O. A.; KRUSHYNSKA, O. A.; LIPKOVSKA, N. A.; BARVINCHENK, V.N. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 21-25, 2004.

Anexo I

Elsevier Editorial System(tm) for Food Chemistry
Manuscript Draft

Manuscript Number: FOODCHEM-D-10-03268

Title: UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and aging

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: *Ilex paraguariensis*; UPLC-MS analysis; phenols; xanthines; carbohydrates

Corresponding Author: Dr. Guilherme Lanzi Sasaki, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Paraná

First Author: Nessana Dartora, Student

Order of Authors: Nessana Dartora, Student; Lauro M Souza, Dr.; Arquimides P Santana-Filho, Student; Marcello Iacomini, Professor; Alice T Valduga, Professor; Philip A Gorin, Professor; Guilherme L Sasaki, Professor

Abstract: Teas from mate have been widely consumed for centuries in Brazil, Argentina, Paraguay, and Uruguay. We now determine how age, growth conditions and post-harvesting processes of leaves from *Ilex paraguariensis* affect the concentration of bioactive compounds and their antioxidant capacity. Phenolics, xanthines, and carbohydrates were identified and quantified by ESI-MS and UPLC. On the average, sun-exposed (monoculture) leaf extracts exhibited higher levels of bioactive compounds, as compared to shaded (forest grown) ones. PCA analysis of all the samples indicated that those obtained after blanching (sapeco in Portuguese) and drying contained more phenolics and a smaller concentration of xanthine than those in natura. The oxidized leaves presented lower concentrations of phenolics, and consequently a decline in antioxidant activity. when No differences were found depending on leaf age.