

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Laura Menegatti Bevilacqua

**Influência da granulometria na atividade antioxidante e na extração de compostos bioativos de *Ilex paraguariensis***

Florianópolis

2020

Laura Menegatti Bevilacqua

**Influência da granulometria na atividade antioxidante e na extração de  
compostos bioativos de *Ilex paraguariensis***

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em  
Ciências Biológicas do Centro de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Santa  
Catarina como requisito para a obtenção do Título  
de Bacharel em Ciências Biológicas  
Orientadora: Profa. Dra. Brunna Cristina Bremer  
Boaventura

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bevilacqua, Laura Menegatti  
Influência da granulometria na atividade antioxidante e  
na extração de compostos bioativos de *Ilex paraguariensis* /  
Laura Menegatti Bevilacqua ; orientador, Brunna Cristina  
Bremer Boaventura, 2020.  
38 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,  
2020.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Compostos Fenólicos. 3.  
Propriedades Bioativas. 4. Atividade Antioxidante. 5.  
Granulometria. I. Boaventura, Brunna Cristina Bremer. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Ciências Biológicas. III. Título.

Laura Menegatti Bevilacqua

**Influência da granulometria na atividade antioxidante e na extração de compostos bioativos de *Ilex paraguariensis***

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 01 de dezembro de 2020.

---

Prof. Carlos Roberto Zanetti, Dr.

Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.(a) Brunna Cristina Bremer Boaventura, Dra.

Orientador(a)

Instituição UFSC

---

Prof.(a) Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dr.(a)

Avaliador(a)

Instituição UFSC

---

Prof.(a) Carlise Beddin Fritzen Freire, Dr.(a)

Avaliador(a)

Instituição UFSC

Dedico este trabalho à mulher que sempre esteve ao meu lado. Mãe, sem você eu nada seria.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a todos que de alguma maneira contribuíram para minha trajetória e execução deste trabalho.

Primeiramente à minha família, em especial minha mãe Dolores e minha madrinha Cleci, as quais não sou capaz de expressar minha imensa gratidão. Ao meu pai por se manter presente em cada nova fase. Às minhas avós Wilma e Maria, e ao meu irmão Leonardo, que sei que me abençoam de onde estiverem.

À Profa. Brunna Boaventura, à Thaiana e Hanna, pela oportunidade de realizar este trabalho, por toda a parceria, auxílio e harmonia exercidas ao longo do último ano.

Também agradeço aos outros dois orientadores que tive ao longo da graduação. Ao Prof. José Marino-Neto pela honra de tê-lo tido como meu primeiro orientador e ao Prof. Alex pela oportunidade de amadurecimento profissional e pessoal.

Ao MEC e ao PET Biologia UFSC por auxiliarem na minha permanência na Universidade, tanto financeira quanto psicológica. Ressalto o agradecimento ao incrível e indispensável tutor Prof. Renato Freitas por todo o acolhimento e inspiração, e a todos membros que convivi ao longo dos últimos 3 anos e meio.

Ao Victor, que nos últimos anos me apoiou de todas as formas possíveis e impossíveis. À Poliana, por ter tornado os 5 anos de graduação os melhores que eles poderiam ter sido e por me ensinar a sempre olhar o lado bom das coisas. À Gabriela que tornou o último ano muito mais divertido. Vocês certamente tornaram tudo mais leve. Aos melhores amigos que alguém poderia ter, Carol, Débora e Dionathan, que mesmo quando longe se mantiveram presentes. Eu amo muito vocês!

## RESUMO

Nativa da América do Sul, a *Ilex paraguariensis*, popularmente conhecida como erva-mate (EM), pertence à família das *Aquifoliaceae*. Apesar das tentativas de popularizar a comercialização, a principal forma utilizada ainda é a tradicional: o chimarrão. A EM possui compostos bioativos, como a cafeína e os compostos fenólicos (CF), que fazem com que seja um objeto de estudo atrativo para botânica e farmacologia. Por promoverem atividade antioxidante no organismo, a ingestão de CF atua de forma benéfica na saúde, prevenindo doenças metabólicas e neurológicas. Os principais ácidos fenólicos presentes na EM são os clorogênicos e hidroxicinâmicos (p-cumárico e cafeico). Alguns fatores podem influenciar na concentração de compostos bioativos, como é o caso da granulometria, o que pode se dar pelo fato da extração de fitoquímicos ser influenciada pela área de contato disponível. Apesar de bem descrita em outras espécies, ainda não se sabe como o tamanho da partícula afeta a extração de fitoquímicos na EM. Portanto, este trabalho buscou elucidar se a granulometria de amostras comerciais compostas apenas por folhas verdes de *Ilex paraguariensis* afeta a extração por infusão de compostos bioativos e a atividade antioxidante das amostras. As granulometrias utilizadas foram: ultra refinada (5 a 12  $\mu\text{m}$ ), farinha (até 1 mm), 2 mm e 5 mm. As infusões foram preparadas imediatamente antes das análises. Para cada análise foram feitas três infusões de cada granulometria, sendo todas em triplicata. Para a avaliação da concentração de cafeína, ácidos cafeico, clorogênico e p-cumárico, utilizou-se de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) nas absorvâncias de 280 nm e 325 nm. Para a análise da atividade antioxidante foram utilizados os protocolos ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína) -6-ácido sulfônico) e Potencial de Redução do Íon Ferro (FRAP). Já para os Compostos Fenólicos totais (CFT) foi utilizado o método Folin-Ciocalteu. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP) e submetidos à análise de variância (ANOVA,  $p < 0,05$ ), seguido pelo teste de Tukey. Para análise de correlação linear foi utilizado o teste de Pearson. Todas as análises foram feitas utilizando o software STATISTICA v. 10. A concentração de cafeína foi maior nas duas amostras de maior granulometria. Os ácidos cafeico e clorogênico apresentaram uma maior concentração na ultra refinada (UR). O ácido p-cumárico não apresentou nenhuma diferença entre as quatro amostras analisadas. A atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS demonstrou similaridade, enquanto pelo método FRAP apresentou um aumento na amostra de 2 mm. Os CFT apresentaram correlação positiva com FRAP e cafeína ( $r = 0,72$  e  $r = 0,69$ , respectivamente), sendo que a cafeína e a FRAP também demonstraram correlação positiva entre si ( $r = 0,53$ ). Os protocolos usados para avaliar a atividade antioxidante apresentaram limitações na tentativa de relacionar os valores com os CFT, sendo que os CFT não apresentaram relação direta com a granulometria. Considerando isso, o estudo fornece dados para um delineamento estratégico da utilização de cada granulometria, dependendo do objetivo do produto ou estudo a ser desenvolvido.

**Palavras-chave:** Erva-mate. Compostos fenólicos. Compostos bioativos. Atividade antioxidante. Granulometria.

## ABSTRACT

Native from South America, *Ilex paraguariensis*, popularly known as yerba mate (YM), belongs to the Aquifoliaceae family. Despite attempts to popularize it, the main form consumed is still the traditional one: chimarrão. YM has bioactive compounds, such as caffeine and phenolic compounds, which make it an attractive object of study for botany and pharmacology. As they promote antioxidant activity in the body, the intake of CF acts in a beneficial way in health, preventing metabolic and neurological diseases. The main phenolic acids present in YM are chlorogenic and hydroxycinnamic (p-cumaric and caffeic). Some factors can influence the concentration of bioactive compounds, such as granulometry, which may be due to the fact that the extraction of phytochemicals is influenced by the contact area. Despite knowing in other species, it is not yet known how particle size affects the extraction of phytochemicals in YM. Therefore, the objective of this study is to elucidate whether the granulometry of commercial samples composed only of green leaves of *Ilex paraguariensis* affects the extraction by infusion of bioactive compounds and the antioxidant activity of the samples. The granulometries used were: ultra-refined (5 to 12  $\mu\text{m}$ ), coarse flour (up to 1 mm), 2 mm and 5 mm. The infusions were prepared immediately before the analyzes. For each parameter, three infusions of each granulometry were made, and were analyzed in triplicate. For the evaluation of the concentration of caffeine, caffeic, chlorogenic and p-cumaric acids, high performance liquid chromatography (HPLC) was used at absorbances of 280 nm and 325 nm. For the analysis of antioxidant activity, were used the protocols ABTS (2,2-azino-bis- (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). For the total phenolic compounds, the Folin-Ciocalteu method was used. Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and subjected to analysis of variance (ANOVA,  $p < 0.05$ ), followed by the Tukey test. Pearson's test was used for linear correlation analysis. All analyzes were performed using the software STATISTICA v. 10. The concentration of caffeine showed to be higher in the two samples of greater granulometry. Caffeic and chlorogenic acids showed a higher concentration in ultra-refined (UR). The p-cumaric acid did not present any difference between the four samples analyzed. The ABTS method demonstrated similarity, while the FRAP method showed an increase in the sample of 2 mm. The CFT showed a positive correlation with FRAP and caffeine ( $r = 0.72$  and  $r = 0.69$ , respectively). Caffeine and FRAP also showed a positive correlation ( $r = 0.53$ ). The protocols used to evaluate the antioxidant activity had limitations in the attempt to relate the values to the phenolic compounds, and they did not present a direct relationship with the particle size. The study provides data for a strategic design of the use of each type of granulometry, depending on the purpose of the product or study to be developed.

**Keywords:** Yerba mate. Phenolic compounds. Bioactive compounds. Antioxidant Activity. Granulometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Infográfico demonstrando a metodologia do trabalho .....	23
Figura 2 – Correlações entre as variações das concentrações da FRAP, CFT e cafeína.....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Granulometria da EM e sugestão de consumo, segundo o fabricante. ....	22
Tabela 2 - Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos compostos bioativos presentes nas quatro diferentes granulometrias de EM.....	27
Tabela 3 - Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) da atividade antioxidante pelas metodologias ABTS e FRAP presentes nas quatro diferentes granulometrias de EM.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico

CF Compostos Fenólicos

CFT Compostos Fenólicos Totais

CQA Ácido Clorogênico

diCQA Ácido dicafeoilquínico

EM Erva Mate

FRAP Potencial de Redução do Íon Ferro

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

UR Ultra Refinada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	A ERVA-MATE .....	12
1.2	PROPRIEDADES BIOATIVAS E EFEITOS NA SAÚDE .....	14
1.3	EFEITO DO PROCESSAMENTO NO TEOR DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	19
1.4	OBJETIVOS .....	21
1.4.1	<b>Objetivo geral</b> .....	21
1.4.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	21
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	22
2.1	AMOSTRAS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	22
2.2	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT) .....	23
2.3	DETECÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	24
2.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	24
2.4.1	<b>Potencial de Redução do Íon Ferro (FRAP)</b> .....	25
2.4.2	<b>ABTS</b> .....	25
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
3.1	COMPOSTOS BIOATIVOS.....	27
3.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E A RELAÇÃO COM OS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	28
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	32
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	33

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A ERVA-MATE

O gênero *Ilex* pertence à família das Aquifoliaceae e abrange cerca de 600 espécies, distribuídas principalmente na América e Europa. Nativa da América do Sul, doze espécies são descritas, dentre elas a *Ilex paraguariensis*. A *I. paraguariensis*, popularmente conhecida como erva-mate (EM), foi descrita pelo botânico francês Auguste de Saint-Hilaire (1779-1853), durante uma expedição ao Brasil que se iniciou em 1816 e durou 4 anos. A espécie é tradicionalmente conhecida por seu consumo no chimarrão e tererê (GOTTLIEB; GIBERTI; POGGIO, 2005).

No Brasil, durante a década de 80, a extensão natural de EM chegou a abranger cerca de 450.000km<sup>2</sup>, representando 5% do território nacional. Ocorre principalmente em altitudes altas, de 400 a 800 m acima do nível do mar, entre os estados do Sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) e Sudeste (Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo). As condições ideais de crescimento e produção são climas úmidos e solos ácidos (OLIVEIRA; ROTTA, 1985). O Brasil é o maior produtor mundial, sendo o Rio Grande do Sul o principal Estado produtor, seguido pelo Paraná e Santa Catarina (IBGE, 2019).

Apesar da descrição ter sido feita no século XIX, a utilização desta espécie já era feita pelos índios originários da América do Sul. Um dos exemplos mais antigos que se tem registro é feito pelos quíchuas, índios da civilização inca que habitavam o Peru. A origem do termo “*mate*” possivelmente se deu por conta desse povo, pois “*mati*” em seu idioma é derivado de cuia/porongo, recipiente em que a infusão é consumida. Já no Paraguai e no sul do Brasil, os responsáveis pela popularização foram os guaranis. A partir destes povos, e dos benefícios relatados por eles após o consumo, o mate se dissipou pelo resto da América do Sul (BOGUSZEWSKI, 2007).

No início da colonização europeia na região, o mate era descrito como “erva do diabo” pelos jesuítas, que ocuparam a América entre os anos de 1610 e 1768 com o intuito da catequização dos povos originários. O termo pejorativo era utilizado por conta da descrição de efeitos como uma súbita energia e um possível vício após a utilização. Apesar da tentativa de proibir o consumo, foram justamente os jesuítas que aprimoraram as técnicas de plantio e cultivo, uma vez notada a possibilidade de lucro com a exportação (LINHARES, 1969).

O comércio de EM tornou-se de importância majoritária na economia do Sul do Brasil até a vinda massiva de imigrantes europeus para a região. Essa grande imigração implementou mudanças nas formas de agricultura e pecuária, ocasionando a reestruturação da vegetação nativa, e por conta disso, no final do século XIX os ervateiros começaram a ser excluídos da rota econômica (GERHARDT; NODARI; MORETTO, 2017).

Atualmente a EM e seus produtos derivados são consumidos mundialmente. Em países como Estados Unidos e Alemanha é utilizada como chá (infusão) e como fonte de cafeína na produção de bebidas energéticas. A expansão do consumo também abrange países como Espanha, Itália, França e Rússia (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016). Entretanto, a principal forma utilizada ainda é a tradicional: o chimarrão. O chimarrão é tomado utilizando uma cuia, feita geralmente de porongo, onde ocorre a infusão da erva com água quente. A infusão é sugada através de uma bomba, um canudo feito de metal. Outra forma popular de ingestão é o tererê, que ao contrário do chimarrão, tem seu processo de infusão realizado com água gelada (BOGUSZEWSKI, 2007).

Enquanto no século XIX a mistura com diferentes plantas era sinal de uma qualidade inferior ou de falsificação do produto, no comércio atual, é comum os fabricantes incluírem açúcar e/ou outras plantas, como é o caso da hortelã, a fim de saborizar e suavizar o amargor da erva. Apesar de hoje essas adições serem permitidas, a caracterização de qualidade dos chás no Brasil exige que a comercialização de EM verde deve ser constituída com no mínimo 70% de folhas e no máximo 30% outras partes do ramo (ANVISA, 1998).

Visando a ampliação do comércio, nos últimos 10 anos as tentativas por parte da indústria de adequar as formas de consumo ao paladar popular vêm aumentando. Atualmente o Brasil exporta principalmente para os Estados Unidos e países da Europa e Ásia, onde é utilizada como matéria prima para produtos como chá gelado, cervejas, refrigerantes e indústria farmacêutica e de cosméticos (CROGE; CUQUEL; PINTRO, 2020).

Morfologicamente, a *I. paraguariensis* possui entre 4 e 8 m de altura, dependendo das condições ambientais presentes durante o crescimento. É uma angiosperma, portanto vascular, diploide, com presença de sementes, flores e frutos. As flores da EM surgem em outubro e frutificam entre janeiro e abril (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Suas sementes são tetrâmeras e possuem dormência, que ocorre

devido ao tegumento resistente ou à imaturidade do embrião. Essa dormência pode ser quebrada a partir de sinais ambientais, como o frio, ou através da passagem pelo sistema digestivo de algumas aves (ZANON, 1988).

Além da quebra de dormência auxiliada pelo trato gastrointestinal de algumas aves, é documentado que cerca de 100 espécies animais interagem com a EM. Muitos desses animais também contribuem na dispersão de suas sementes, sendo que 85% destas espécies a utilizam como fonte de nutriente (IEDE, 1968). Já a interação com espécies vegetais foram observadas com *Araucaria angustifolia* (Bertol., O. Kuntze), *Canela-lageana* (*Ocotea pulchella*, Mart.) e *Imbuia* sp. (*Ocotea porosa*, Nees) (IBGE, 1991). Por ser uma fonte de energia primária, é responsável conjuntamente com outras espécies vegetais pela manutenção da cadeia trófica local.

Possui algumas estratégias de defesa à predação, como a presença de saponinas e metilxantinas, especialmente a cafeína, que é tóxica para alguns insetos e confere sabor amargo ao vegetal, tornando-o menos palatável (COELHO, 2002). A alta quantidade destes e de outros compostos bioativos presentes na EM também desperta interesse da indústria para o desenvolvimento de alimentos funcionais, como gelatinas, bebidas gaseificadas, chocolates e barras de cereais (BERTÉ et al., 2011; CHIESA et al., 2012; MELLO et al., 2009; ZANCHETT et al., 2016). Também torna-se um atrativo objeto de estudo para áreas de pesquisa como botânica e farmacologia (GREIZERSTEIN et al., 2004).

## 1.2 PROPRIEDADES BIOATIVAS E EFEITOS NA SAÚDE

Dentre os constituintes da EM encontram-se diversos nutrientes, minerais (P, Fe, Mg) e vitaminas (complexos A, B, C e E), bem como diversos compostos bioativos, como os compostos fenólicos (CF), metilxantinas e saponinas (BRACESCO et al., 2011; CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016; ZAPATA et al., 2020).

Os compostos fenólicos (CF) são os principais compostos bioativos presentes na EM. São metabólitos secundários que possuem em sua estrutura química um anel benzeno com um ou mais grupos hidroxila associados. Possuem atividade antioxidante no organismo, ou seja, diminuem o estresse oxidativo celular (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006). O estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio na quantidade de radicais livres, que são aumentados por fatores externos, como alimentação e exposição excessiva a raios UV (FARAH;

DONANGELO, 2006). Apesar de em pequenas quantidades os radicais livres possuem funções fisiológicas importantes, como proteção cardiovascular e estimulação imunológica, em excesso são responsáveis por danos no DNA, envelhecimento, alterações no crescimento celular e aparecimento de doenças crônicas (BIRBEN et al., 2012).

Compostos que possuem capacidade antioxidante conseguem inibir os radicais livres excedentes, seja doando um elétron para a molécula que está instável ou a partir do sequestro de íons. Por conta desta propriedade, vegetais com capacidade antioxidante são considerados protetores contra doenças crônicas, neurodegenerativas e metabólicas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SOARES, 2002; FARAH; DONANGELO, 2006).

Estudos apontam a associação entre a prevenção e melhoria de diversas doenças. Um dos exemplos são as de doenças secundárias causadas pela obesidade, que em sua maioria, ocorrem devido à inflamação crônica, podendo gerar danos cardiovasculares, como aterosclerose, e metabólicos, como diabetes (SERGENT et al., 2012). A capacidade de prevenção de doenças cardiovasculares promovida pela EM ocorre de forma superior quando comparada com outros alimentos antioxidantes, como é o caso do chá verde (BALSAN et al., 2019).

Além disso, a EM demonstra regular o perfil lipídico e glicêmico. Araçari (2011) buscou avaliar os efeitos da EM em marcadores pró-inflamatórios de camundongos expostos à dieta hipercalórica. Os animais tiveram perda de peso, melhora na taxa glicêmica e houve uma regulação na expressão gênica (ARÇARI et al., 2011, 2013). Estes resultados também foram observados em ratos wistars sob as mesmas condições experimentais (BORGES et al., 2013). Somado a isso, através da competição do sítio ativo, alguns CF podem inibir o co transportador de glicose no intestino (GLUT1), o que justifica a capacidade da melhoria da glicemia (OLIVEIRA et al., 2008). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos com indivíduos obesos (KIM et al., 2015) Além disso, Boaventura (2012) demonstrou que os benefícios gerados pela ingestão a longo prazo ocorrem mesmo sem outras intervenções dietéticas.

Durante o exercício físico, a EM é capaz de aumentar a utilização de gorduras tanto em pessoas sedentárias quanto em indivíduos que praticam exercício físico regular. Ocorre a melhoria na performance em testes de curta duração (30 min), bem como aumento sérico de adrenalina e cafeína (ARETA et al., 2018). Também foi

demonstrado que mulheres saudáveis que ingeriram 2g de EM encapsuladas obtiveram uma maior metabolização de ácidos graxos e um aumento nos parâmetros de foco, energia e concentração (ALKHATIB; ATCHESON, 2017).

Outros efeitos protetores são observados, como neurológicos, podendo atuar na prevenção de sintomas e na progressão de doenças como Alzheimer e Parkinson. Evidências recentes demonstram redução na taxa de câncer de mama e redução na perda de massa óssea em mulheres em período de menopausa (RIACHI; DE MARIA, 2017). Sabe-se também que a atividade antioxidante é capaz de auxiliar na inibição do estresse oxidativo hepático e portanto reduz danos no fígado, tendo assim efeito hepatoprotetor (BRANCO et al., 2013).

Sendo assim, o consumo de CF atua de forma benéfica para a saúde, tanto no metabolismo, bem como na proteção dos sistemas cardiovascular, gastrointestinal e neurológico (SATO et al., 2011; SERGENT et al., 2012; ALKHATIB, 2014; ARETA et al., 2018; BALSAN et al., 2019).

Para os vegetais, os CF possuem funções relacionadas com a reprodução, crescimento, pigmentação e homeostasia, inibindo algumas condições de estresse ambiental e produzindo lignina na resposta primária à infecções (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; VERMERRIS; NICHOLSON, 2006). Possuem também a capacidade de retardar a oxidação, influenciando no valor nutricional e sensorial (cor, textura e amargor). Tais características tornam os alimentos com capacidade antioxidante extremamente interessantes de serem utilizados como aditivos em alimentos e bebidas industrializadas (HONORATO; BATISTA; NASCIMENTO, 2013).

A classificação dos CF pode ser feita de diversas formas, sendo as principais a quantidade de carbonos presentes na cadeia e a presença na natureza (comuns, muito comuns ou pouco comuns) (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

Dentre os ácidos fenólicos presentes na EM estão os clorogênicos (CQA), o gálico (3,4,5-trihidroxibenzóico) e os dicafeoilquínicos (diCQA). Cada um possui pelo menos três isômeros, no caso dos clorogênicos são os 3-, 4-, e 5- CQA e no dos dicafeoilquínicos 3,4-, 3,5- e 4,5- diCQA (FARAH; DONANGELO, 2006; VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

Das fontes de CQA encontradas no reino vegetal, a *I. paraguariensis* é a com maior concentração já descrita. Dentre os benefícios desta substância, está a diminuição das espécies reativas de oxigênio e a regeneração celular, prevenindo o

dano e estabilizando os níveis de outras moléculas antioxidantes, como a glutathione (BAEZA et al., 2014).

Dentre os ácidos hidroxicinâmicos presentes na EM, encontra-se o p-cumárico (3- 4- e 5-pCoQA) e o cafeico (3,4- dihidroxicinâmico) (FARAH; DONANGELO, 2006; HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005). O ácido p-cumárico possui função antibacteriana, a partir de mecanismos de rompimento da membrana celular e indução da apoptose (LOU et al., 2012). Já o ácido cafeico demonstra ter relação com a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL), sendo assim um antioxidante efetivo para esta função (NARDINI et al., 1995).

Há algumas discordâncias quando comparada a efetividade da atividade antioxidante entre o ácido cafeico e o clorogênico. Ambos demonstram auxiliar na recuperação de doenças intestinais, entretanto o efeito antioxidante do clorogênico é significativamente menor (SATO et al., 2011). Além disso, quando analisada a absorção de ambos no intestino, o cafeico demonstra ser absorvido com maior facilidade (CHEN; HO, 1997; OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001). Em contrapartida, Cho (2010) demonstrou que o CQA é mais eficiente contra a oxidação lipídica em ratos expostos à dieta hipercalórica.

Aliado a isso, a EM possui diversos alcaloides, principalmente cafeína. Conhecida por ser um poderoso estimulante do sistema nervoso central, a cafeína se encontra na EM verde em contrações médias entre 1,74 a 3,01% (GERHARDT; NODARI; MORETTO, 2013). Possui diversos benefícios à saúde, como melhoria da função renal, perda de peso, e em doenças neurológicas, como o Alzheimer (DE MEJIA; RAMIREZ-MARES, 2014). Além disso, possui associação com a atividade antioxidante descrita anteriormente (FILIP et al., 2000). A concentração reduzida de cafeína presente na EM, quando comparada a outras espécies, como o café, se torna uma alternativa interessante, uma vez que apesar dos diversos benefícios, o consumo excessivo à longo prazo pode gerar danos à saúde, como perda da massa óssea, dores de cabeça, ansiedade e aumento da pressão arterial (DE MEJIA; RAMIREZ-MARES, 2014). Ademais, a presença de cafeína se torna de extremo interesse comercial, podendo ser utilizada em diversas bebidas energéticas industrializadas ou em suplementações alimentares (GERHARDT, 2012).

O consumo de plantas nativas vem aumentando ao longo dos últimos anos devido à movimentos que buscam formas naturais de alimentação para benefício da saúde. Entretanto para a segurança alimentar e para o uso correto de suas

propriedades é necessário que as espécies sejam conhecidas em sua totalidade e de maneira multidisciplinar, como morfologia, potencial tóxico, propriedades bioativas e farmacológicas (ARGENTA et al., 2011). A literatura acerca dos compostos presentes na EM e suas formas de utilização ainda é reduzida, apesar de já ser demonstrado os diversos efeitos positivos de sua ingestão (VIEIRA et al., 2009).

Veiga (2005) questiona a segurança e efetividade da utilização de plantas nativas no Brasil com o propósito da melhoria da saúde. Afirma que no país, a maioria da utilização de espécies vegetais e de seus princípios ativos não possui comprovação científica dos efeitos. Alerta ainda que a forma de preparo e cultivo influencia na presença de efeitos adversos, como a influência que agrotóxicos organofosforados utilizados no solo cultivado podem causar no metabolismo e sistema nervoso, ou seja, o oposto do desejado quando consumido.

A determinação destes compostos exige uma sequência de passos, iniciando pelo preparo da matriz, que geralmente é feito em solventes orgânicos, como água, metanol ou uma mistura dos dois. A sequência da análise exige a extração dos compostos e técnicas de quantificação, sendo as principais espectrofotométricas o método Folin-Ciocalteu e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Alguns fatores podem influenciar na determinação da concentração de compostos bioativos, como a determinação do solvente utilizado no preparo, a origem da matéria prima, as etapas de processamento e o tamanho da partícula. Apesar disso, preparações de extratos utilizando EM comercial e a espécime vegetal não demonstraram diferença na atividade antioxidante, indicando que não há perda desta propriedade na industrialização da matéria prima. Isso demonstra que a atividade antioxidante permanece mesmo após as etapas de processamento (FILIP et al., 2000).

Em relação a extração em diferentes solventes, observa-se uma maior eficiência em solventes hidroalcolicos, pois os solventes aquosos possuem capacidade de extrair os compostos mais polares e os etanólicos os mais apolares (VIEIRA et al., 2009).

Quando comparados os extratos entre ervas verdes e torradas, mesmo em diferentes solventes, como é o caso do diclorometano, acetato de etila e n-butanol, não é observada diferença na concentração de compostos bioativos. Os três solventes demonstram o aumento da tolerância à glicose *in vivo*, bem como estocagem do

glicogênio hepático e aumento na secreção de insulina, o que corrobora com os estudos anteriores e novamente indica o benefício do consumo para portadores de diabetes (PEREIRA et al., 2012).

Apesar de os estudos fitoquímicos estarem aumentando (ZANCHETT et al., 2016; RIACHI; DE MARIA, 2017; RIACHI, 2018; ZAPATA et al., 2020), há uma incongruência no banco de dados que apresenta as composições do gênero *Ilex* presente na América do Sul (GOTTLIEB; GIBERTI; POGGIO, 2005). Essa escassez na literatura impede a determinação de um padrão de qualidade nacional e a compreensão total dos efeitos positivos e negativos da ingestão da bebida (MATSUMOTO, 2008).

Nessa perspectiva, o estudo básico de compostos bioativos e compreensão multidisciplinar da EM se torna essencial para o adequado consumo e padrão de qualidade do uso de plantas em detrimento da melhoria da saúde, bem como para o desenvolvimento de novos produtos (ARGENTA et al., 2011).

### 1.3 EFEITO DO PROCESSAMENTO NO TEOR DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

O crescimento de espécies vegetais pode ser afetado por diversas condições ambientais, como exposição solar, nutrientes disponíveis no solo, sazonalidade, temperatura e formas de plantio. Essas condições influenciam diretamente nas adaptações fisiológicas da planta ao ambiente, e conseqüentemente na concentração de seus compostos bioativos (RIACHI; DE MARIA, 2017). Levando em consideração que o objetivo de processos de extração, e sua maioria, buscam aumentar a quantidade e qualidade de compostos bioativos presentes, diversos estudos buscam compreender como estes fatores e técnicas influenciam na extração de fitoquímicos (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007; TSIBRANSKA; TYLKOWSKI, 2016).

Além das condições de plantio, o processamento industrial pode afetar a concentração dos compostos presentes na EM, como teor de gorduras, proteínas, glicose e cafeína. Dentre os fatores que mais influenciam está a temperatura, o tempo de infusão, o tipo de solvente e a granulometria das partículas, ou seja, a granulometria do produto final (RAJHA et al., 2014; RIACHI; DE MARIA, 2017).

Até a comercialização da matéria seca, a EM passa por diversos processos, sendo um deles a trituração. Durante essa etapa, os talos com maior granulometria não são adicionados ao produto, que passa por um novo processo de trituração,

diminuindo assim a granulometria final (VIEIRA et al., 2009). A redução do tamanho dos grânulos pode promover uma diferença na extração de compostos bioativos e demais nutrientes, o que pode se dar pelo fato da extração de fitoquímicos ser influenciada pela área de contato disponível, sendo que quanto menor o tamanho da partícula, maior a superfície de contato do grânulo com o solvente (MAKANJUOLA, 2017).

Estudos *in vitro* demonstram que a relação entre tamanho da partícula e a disponibilidade de alguns CF, como exemplo o ácido p-cumárico, é inversamente proporcional (HEMERY et al., 2010). Já estudos com trigo demonstram que a atividade antioxidante e os CFT presentes no farelo de trigo e no trigo não moído (grosso) diferem, mesmo quando utilizado o mesmo método de extração, sendo que o com a granulometria mais apresentou atividade antioxidante maior do que o triturado. Em contrapartida, o farelo de trigo obteve uma maior quantidade de CFT (BREWER et al., 2014).

Corroborando com estes dados, estudos com uva também demonstram que quanto menor a partícula, maior a capacidade de extração de CF, por conta do aumento da superfície de contato do solvente com os grãos (RAJHA et al., 2014). Os mesmos resultados foram observados na extração de polifenóis em própolis, quando testadas catorze diferentes granulometrias, entre 0.5 mm 70 mm (TSIBRANSKA; TYLKOWSKI, 2016). Estudos com três diferentes granulometrias de Chá da Índia (*Camellia sinensis*) e Gengibre (*Zingiber officinale*) também demonstraram que a atividade antioxidante e a capacidade de extração de compostos bioativos é inversamente proporcional ao tamanho da partícula (MAKANJUOLA, 2017).

Apesar disso, a literatura sobre a influência do tamanho da partícula na biodisponibilidade de compostos ativos e atividade antioxidante na EM é escassa, portanto, este trabalho pretende elucidar esta questão. Considerando o alto consumo de EM pela região sul da América, bem como os benefícios da EM para a saúde humana e suas possíveis utilizações no mercado alimentício, torna-se de extrema importância a caracterização da matéria prima, tanto para fins dietéticos e de suplementação, quanto para controle de qualidade.

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 Objetivo geral

Determinar se a granulometria de amostras comerciais de *Ilex paraguariensis* afeta a extração por infusão de compostos bioativos e a atividade antioxidante total, avaliando as granulometrias: ultra refinada (5 a 12  $\mu\text{m}$ ), farinha (até 1mm), 2 mm e 5 mm.

### 1.4.2 Objetivos Específicos

- a) Mensurar o teor de compostos fenólicos totais das amostras;
- b) Quantificar o teor de compostos fenólicos isolados das amostras a partir de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)
- c) Determinar o teor de cafeína das amostras a partir de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- d) Avaliar a atividade antioxidante das amostras a partir do potencial de redução do íon ferro (FRAP) e do radical 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS);
- e) Comparar a quantidade de compostos bioativos e a atividade antioxidante das amostras.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 AMOSTRAS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

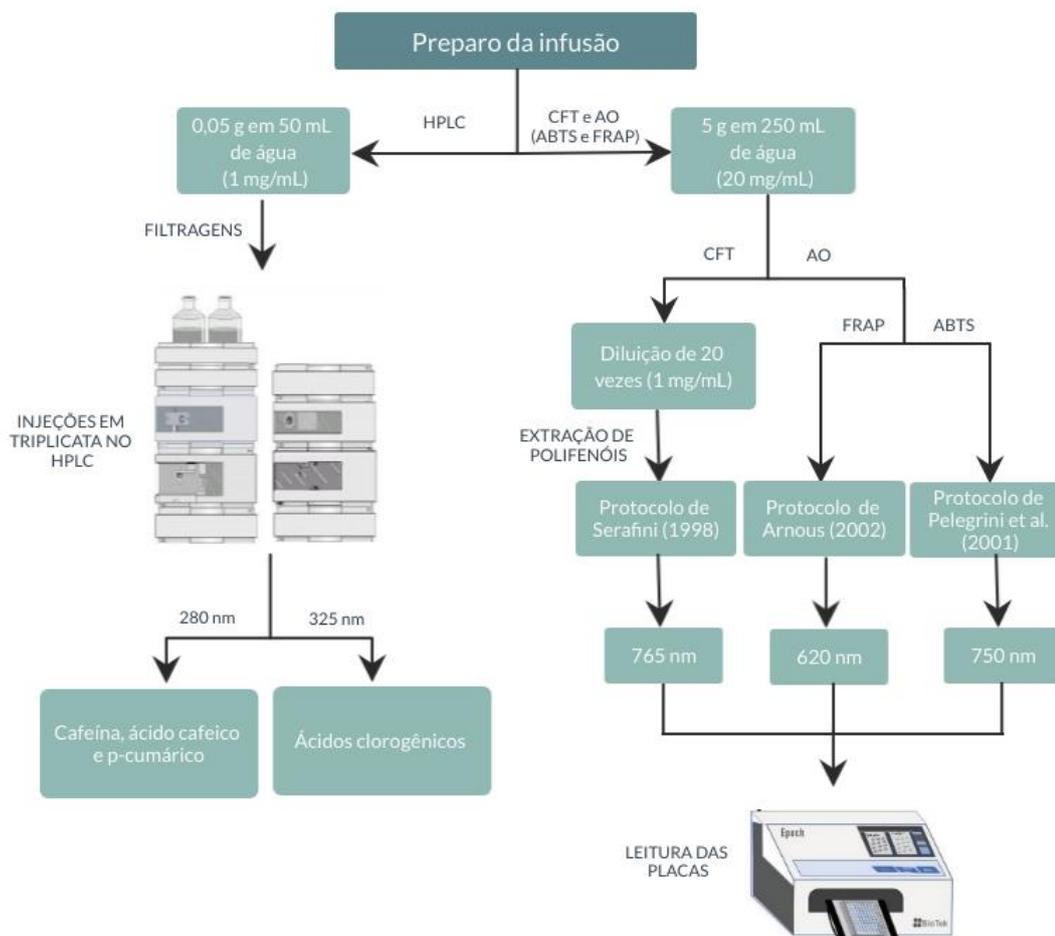
As amostras de *Ilex paraguariensis* foram fornecidas pela empresa *Mate tea from Brasil* (Cascavel/PR) e não contém conservantes ou aditivos químicos em sua composição. Foram analisados os quatro tipos de produto comercializados da linha *kõ'gõi*, que é composta apenas por folhas verdes e se diferenciam somente na granulometria. A Tabela 1 apresenta os tipos de EM analisados e a sugestão do modo de consumo, segundo instruções disponibilizadas pelo fabricante.

Tabela 1 - Granulometria da EM e sugestão de consumo, segundo o fabricante.

Granulometria	Forma de Consumo
Ultra Refinada	Infusão, sucos e preparo de alimentos
Farinha	Preparos industriais
2 mm	Infusão
5 mm	Infusão

A EM foi infundada em água deionizada à 90° por 10 minutos (MUARAKAMI, 2011), sendo as concentrações dos protocolos de compostos fenólicos totais e HPLC 1mg/mL e a concentração do potencial de redução do íon ferro e ABTS 20mg/mL. As infusões foram preparadas imediatamente antes das análises (Figura 1). Para cada parâmetro testado foram feitas três infusões de cada granulometria, sendo todas analisadas em triplicata. Desta maneira, cada amostra teve um total de 9 análises por parâmetro. A Figura 1 ilustra o delineamento experimental realizado no presente trabalho. A concentração das infusões seguiu a especificidade de cada protocolo, como descrito a seguir.

Figura 1 - Infográfico demonstrando a metodologia do trabalho.



AO (atividade antioxidante). HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). CFT (compostos fenólicos totais). FRAP (potencial de redução do íon ferro). ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico). Fonte: Elaborado pela autora (2020).

## 2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

As amostras foram filtradas e analisadas seguindo o protocolo Folin-Ciocalteu (SERAFINI; MAIANI; FERRO-LUZZI, 1998). Para a primeira extração adicionou-se HCl 1M nas amostras, para ocorrer a hidrólise dos polifenóis. Após a incubação a 37 °C por 30 minutos, foi adicionado NaOH 2M. O preparo foi novamente incubado, seguindo as mesmas condições de tempo e temperatura. Para a remoção das proteínas, adicionou-se ácido tricloroacético 20% (TCA). O preparo foi centrifugado a 1600 g por 10 min. O sobrenadante foi retirado e guardado a -4°C.

A segunda extração foi feita utilizando acetona 50%. O tubo foi centrifugado em 2800 g por 10 min. O sobrenadante da segunda extração foi unido com o da

primeira para então se obter a concentração de polifenóis totais. Para curva padrão utilizou-se ácido gálico 200 µg/mL.

Alíquotas de 300 µl do sobrenadante total foram retiradas e colocadas em um tubo contendo água deionizada e etanol 95%. Foi então adicionado 80 µl do corante Folin-Ciocalteu 50%. Passados os 5 minutos de incubação, foi adicionado carbonato de sódio 5%. Após 1 hora de repouso, as amostras foram medidas em triplicata com uma absorvância de 765 nm.

### 2.3 DETECÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A amostra foi filtrada e então retirada uma alíquota de 1 mL para centrifugação por 10 min a 1 g, no intuito de retirar possíveis partículas que não foram removidas durante a primeira filtragem. As amostras foram novamente filtradas, utilizando uma membrana de 0,45 µm.

Alíquotas de 20 µl foram injetadas no cromatógrafo líquido, equipado com a coluna de fase reversa (Sulpeco C18, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e pré-coluna (Phenomenex C18, 4 mm x 2 mm, 5µm) conectada ao degaseificador DGU 20A5 com integrador CBM 20A e detector UV-Visível DAD SPD-M20A (Shimadzu, Kyoto, Japão).

O equipamento operou em 325 nm para a detecção de ácidos clorogênicos e hidroxicinâmicos e em 280 nm para cafeína, ácido cafeico, gálico e p-cumárico. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min em um gradiente linear. A fase móvel foi composta de 80% de solução de ácido cítrico 10 mM (pH = 2,5), acidificada com ácido clorídrico 6N e 20% de metanol (fases A e B).

A identificação dos compostos foi feita por meio de comparação com os tempos de retenção de seus respectivos padrões. Para a análise quantitativa foram utilizadas as curvas de calibração de cada padrão. A concentração final foi determinada pela média de três injeções consecutivas (FARAH; DONANGELO, 2006).

### 2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi determinada a partir de dois métodos espectrofotométricos: FRAP (potencial de redução do íon ferro) e ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona)-6-ácido sulfônico).

A diferença entre as duas técnicas é o pH, sendo ácido e neutro, respectivamente. A escolha da utilização de duas metodologias para o mesmo parâmetro ocorreu a partir do reconhecimento da limitação dos protocolos, uma vez que a atividade antioxidante pode ser influenciada pelos reagentes de trabalho. Estudos prévios sugerem que seja utilizada mais de uma técnica para a quantificação e comparação, testando assim diferentes condições de oxidação das amostras (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005).

#### **2.4.1 Potencial de Redução do Íon Ferro (FRAP)**

A preparação dos extratos utilizados para a FRAP (Potencial de Redução do Íon Ferro, do inglês Ferric Reducing Antioxidant Power) foi feita seguindo o protocolo de Benzie e Strain (1996) com modificações de Arnous (2002). O padrão utilizado para a curva de calibração foi o Trolox 8 mM (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (BENZIE; STRAIN; 1996).

Alíquotas de 100 µl foram adicionadas a 100 µl de cloreto férrico 3mM e incubadas em banho maria a 37° por 30 minutos. Foi então adicionado 1,8 mL do reagente de trabalho TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridil)-s-triazina) 1 mmol/L. Após 10 minutos a absorbância foi medida em triplicata a 620 nm.

#### **2.4.2 ABTS**

A preparação da infusão, bem como o restante da técnica foi feita seguindo o protocolo de Pelegrini et al. (2001). A curva padrão foi delineada com Trolox 8 mM (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) e o reagente de trabalho utilizado foi o ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico). A leitura das amostras (5 µl) foi realizada em tampão acetato (200 µl), em triplicata a uma absorbância de 750 nm.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram feitas em triplicata e os dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Para verificar a relação entre a atividade antioxidante e o teor de compostos bioativos foi feita a correlação linear utilizando o teste de correlação de Pearson. Os resultados foram considerados com diferença estatística quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram feitas utilizando o software STATISTICA v. 10 (StatSoft Inc., Tulsa-OK, EUA).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS

A concentração dos compostos fenólicos totais e de quatro compostos bioativos analisados (cafeína, ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido p-cumárico) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos compostos bioativos presentes nas quatro diferentes granulometrias de EM.

Granulometria	CFT	Ác. Cafeico	Ác. clorogênico	Ác. p-cumárico	Cafeína
Ultra refinada	94,79 $\pm$ 8,60 <sup>a</sup>	5,93 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	15,47 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	8,02 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	8,23 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>
Farinha	59,87 $\pm$ 6,39 <sup>b</sup>	4,24 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	11,18 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	7,12 $\pm$ 1,30 <sup>a</sup>	2,19 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>
2 mm	140,21 $\pm$ 12,25 <sup>c</sup>	4,07 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	10,56 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	8,41 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	10,97 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>
5 mm	79,16 $\pm$ 11,8 <sup>d</sup>	3,50 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	9,65 $\pm$ 0,38 <sup>c</sup>	7,04 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	10,28 $\pm$ 11,8 <sup>c</sup>

Os dados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=3). CFT, compostos fenólicos totais. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as amostras de diferentes granulometrias ( $p < 0,05$ ).

Os CFT são os principais compostos presentes na EM e influenciam na atividade antioxidante da planta (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006). Estudos prévios demonstram que a relação entre a presença de CFT e a atividade antioxidante é direta, sendo quanto maior a presença de CFT, maior a atividade antioxidante (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007). Em relação à extração de CF e granulometria, já foi demonstrado em trigo, uva, própolis, chá da Índia e gengibre que a redução do tamanho da partícula aumenta a capacidade de extração de CF pelo solvente (BREWER et al., 2014; RAJHA et al., 2014; TSIBRANSKA; TYLKOWSKI, 2016; MAKANJUOLA, 2017). Entretanto, nosso estudo demonstrou uma não proporcionalidade entre o tamanho da partícula e a concentração de CF, pois apesar de as amostras terem apresentado diferença significativa entre si, a EM que apresentou o maior teor de fenólicos foi a de 2 mm.

O ácido cafeico (280 nm) e o clorogênico (325 nm) demonstraram ter uma diferença significativa entre a ultra refinada e as outras três amostras, sendo a que apresentou a maior concentração e a 5 mm a menor. Dessa forma, ambos ácidos

apresentaram uma relação inversamente proporcional entre granulometria e concentração, sendo quanto menor a granulometria, maior a quantidade presente na amostra, corroborando com nossa hipótese inicial.

Apesar de ambos apresentarem a mesma tendência em relação à granulometria, observou-se uma maior concentração de ácido clorogênico do que de ácido cafeico nos quatro tipos de amostra. Vale ressaltar que a compreensão da biodisponibilidade no organismo do ácido cafeico e clorogênico ainda é limitada e controversa. O ácido cafeico demonstra ter um efeito antioxidante maior e ser absorvido com maior facilidade no organismo (CHEN; HO, 1997; OLTTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001; SATO et al 2011). Entretanto, quando avaliados outros parâmetros, como a capacidade de retardar a oxidação lipídica, o ácido clorogênico aparenta ser mais efetivo (CHO et al., 2010). Portanto, para elucidar os efeitos desta diferença de concentração no organismo é necessária a realização de estudos pré-clínicos e clínicos.

De acordo com Hemery (2010), a relação entre granulometria e ácido p-cumárico (280 nm) também aparenta ser inversamente proporcional, entretanto as análises demonstraram similaridade do composto entre as quatro amostras.

A concentração de cafeína (280 nm) foi significativamente menor na farinha e maior nas granulometrias de 2 mm e 5 mm, quando comparadas com a ultra refinada. Considerando isso, as amostras mais indicadas para utilização industrial em bebidas com finalidades energéticas seriam as duas com maior granulometria, e a menos indicada seria a farinha. Vale ressaltar que além das condições do solo durante o plantio e sazonalidade, a idade da folha também pode influenciar na concentração de cafeína, sendo que quanto mais velha, menor a quantidade encontrada (VALDUGA et al., 1997).

### 3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E A RELAÇÃO COM OS COMPOSTOS BIOATIVOS

A atividade antioxidante das amostras está apresentada na Tabela 3. A atividade antioxidante foi analisada através de dois protocolos espectrofotométricos: FRAP e ABTS. No protocolo FRAP observa-se a capacidade de Redução do Íon Ferro ( $Fe^{3+}$ ), enquanto o ABTS é medido através da captura de íons. Apesar de ambos métodos demonstrarem a atividade antioxidante, ensaios anteriores apontam

diferenças significativas nos resultados quando expostos à diferentes reagentes de trabalho, portanto optou-se pela utilização dos dois protocolos para a análise deste parâmetro (WOJDYŁO; OSZMIAŃSKI; CZEMERYYS, 2007).

O protocolo utilizado com a metodologia do ABTS não demonstrou nenhuma diferença significativa na atividade antioxidante entre as amostras. Já o protocolo FRAP apresentou um significativo aumento na amostra de 2 mm.

Tabela 3 - Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) da atividade antioxidante pelas metodologias ABTS e FRAP presentes nas quatro diferentes granulometrias de EM.

Granulometria	ABTS	FRAP
Ultra refinada	2.739,11 $\pm$ 21,82 <sup>a</sup>	765,00 $\pm$ 43,92 <sup>a</sup>
Farinha	2.721,33 $\pm$ 32,18 <sup>a</sup>	775,64 $\pm$ 33,28 <sup>a</sup>
2 mm	2.726,88 $\pm$ 31,77 <sup>a</sup>	1031,66 $\pm$ 81,64 <sup>b</sup>
5 mm	2.723,556 $\pm$ 72,12 <sup>a</sup>	851,57 $\pm$ 86,99 <sup>a</sup>

ABTS, 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico. FRAP, potencial de redução do íon ferro. Os dados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=3). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

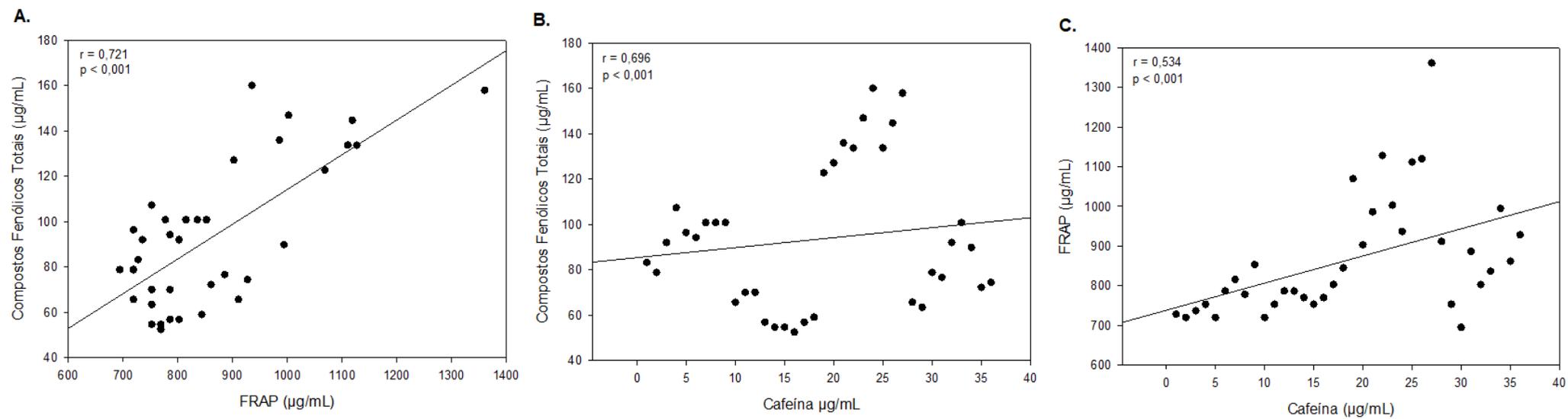
Estudos demonstram que a atividade antioxidante ocorre por conta de diversos fatores, como a presença dos compostos fenólicos (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007), tendo como principal exemplo a relação diretamente proporcional da concentração de ácidos clorogênicos e cafeicos com a atividade antioxidante (ANESINI et al., 2012). Quando analisada a correlação linear (Figura 2), os CFT apresentaram correlação positiva com FRAP e cafeína ( $r = 0,72$  e  $r = 0,69$ , respectivamente). A cafeína e a FRAP também demonstraram correlação positiva entre si ( $r = 0,53$ ).

Já foi demonstrada a correlação entre a atividade antioxidante e compostos fenólicos (BOAVENTURA, 2015). Entretanto Kähkönen (1999) analisou a relação entre os CFT e a atividade antioxidante de 92 espécies vegetais e em nenhuma observou-se proporcionalidade entre as concentrações, demonstrando que não necessariamente há uma relação direta entre os dois parâmetros. No estudo de Brewer (2014) com trigo moído e farelo de trigo também não houve correlação na quantificação de atividade antioxidante e CFT.

Além da intervenção dos reagentes de trabalho das metodologias utilizadas para analisar a atividade antioxidante (WOJDYŁO; OSZMIAŃSKI; CZEMERYYS, 2007),

o tipo de composto fenólico presente na amostra também pode apresentar alterações no método Folin-Ciocalteu (KÄHKÖNEN et al., 1999). Considerando isso, o embasamento encontrado na literatura torna-se controverso. Apesar de na teoria ambos parâmetros estarem relacionados, nosso trabalho corrobora com a perspectiva de que não se pode prever a atividade antioxidante a partir da concentração de CFT e com o trabalho de Huang, Boxing e Prior (2005), que propõe a necessidade de mais de uma metodologia para a análise da atividade antioxidante.

Figura 2– Correlações entre as variações das concentrações da FRAP, CFT e cafeína.



## 4 CONCLUSÃO

A EM possui diversos compostos bioativos responsáveis pela atividade antioxidante, dentre eles a cafeína e os compostos fenólicos. Estudos prévios demonstraram que um dos fatores que influencia na qualidade e quantidade da extração de compostos é a granulometria, ou seja, o tamanho da partícula. No presente trabalho buscamos avaliar a concentração de compostos bioativos em quatro diferentes granulometrias de EM verde: ultra refinada, farinha (até 1mm), 2 mm e 5 mm. Os quatro compostos selecionados para análise foram: cafeína, ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido p-cumárico. Além disso, também avaliamos a atividade antioxidante através de duas metodologias (FRAP e ABTS), com o objetivo de correlacioná-la com a concentração de Compostos Fenólicos Totais (CFT).

A concentração de cafeína foi maior nas duas amostras de maior granulometria (2 mm e 5 mm), sendo as mais indicadas para possíveis formulações de bebidas energéticas. Em contrapartida, os ácidos cafeico e clorogênico apresentaram uma maior concentração na menor granulometria (UR). O ácido p-cumárico não apresentou nenhuma diferença significativa entre as quatro amostras analisadas.

Em relação à atividade antioxidante, a metodologia ABTS demonstrou similaridade entre as quatro amostras, enquanto a FRAP apresentou um aumento na amostra de 2 mm. Os protocolos usados para avaliar a atividade antioxidante apresentaram limitações na tentativa de relacionar os valores com os CFT, sendo que os CFT não demonstraram apresentar relação direta com a granulometria. Apesar de a atividade antioxidante ter se demonstrado controversa, a presença dos ácidos cafeico e clorogênico já é bem descrita na literatura como indicador de atividade antioxidante, sendo assim, como matéria prima para alimentos funcionais e para estudos farmacêuticos, sugere-se a utilização da UR.

Considerando isso, o estudo fornece dados para um delineamento estratégico da utilização de cada tipo de granulometria dependendo do objetivo do produto ou estudo a ser desenvolvido.

## 5 REFERÊNCIAS

- ALKHATIB, A. Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) ingestion augments fat oxidation and energy expenditure during exercise at various submaximal intensities. **Nutrition and Metabolism**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2014.
- ALKHATIB, A.; ATCHESON, R. Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) metabolic, satiety, and mood state effects at rest and during prolonged exercise. **Nutrients**, v. 9, n. 8, 2017.
- ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 299–304, 2012.
- ARÇARI, D. P. et al. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n. 2, p. 110–115, 2011.
- ARÇARI, D. P. et al. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 809–815, 2013.
- ARETA, J. L. et al. Metabolic and Performance Effects of Yerba Mate on Well-trained Cyclists. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 50, n. 4, p. 817–826, 2018.
- ARGENTA, S. C. et al. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v. 7, n. 1809–1636, p. 51–60, 2011.
- B. BOAVENTURA. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CRIOCONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). p. 135, 2015.
- BAEZA, G. et al. Green coffee hydroxycinnamic acids but not caffeine protect human HepG2 cells against oxidative stress. **Food Research International**, v. 62, p. 1038–1046, 2014.
- BALSAN, G. ET AL. Effect of yerba mate and green tea on paraoxonase and leptin levels in patients affected by overweight or obesity and dyslipidemia: a randomized clinical trial. **Nutrition Journal**, v. 18, n. 1, p. 5, 2019.
- BENZIE, IRIS F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 239, n. 31, p. 70–76, 1996.
- BERTÉ, K. A. S. et al. Desenvolvimento de gelatina funcional de erva-mate. **Ciencia Rural**, v. 41, n. 2, p. 354–360, 2011.
- BIANCHI, MARIA DE LOURDES PIRES, ANTUNES, L. M. G. FREE RADICALS AND THE MAIN DIETARY ANTIOXIDANTS. **Revista de Nutrição**, v. 35, n. 1, p. 123–130, 1999.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.
- BOGUSZEWSKI, J. H. Uma história cultural da erva-mate : o alimento e suas

representações. **Dissertação UFPR**, 2007.

BORGES, M. C. et al. The effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on metabolic and inflammatory parameters in high-fat diet-fed Wistar rats. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, n. 5, p. 561–569, 2013.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378–384, 2011.

BRANCO, C. et al. Organic and Conventional Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) Improves Metabolic Redox Status of Liver and Serum in Wistar Rats. **Antioxidants**, v. 2, n. 3, p. 100–109, 2013.

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

BREWER, L. R. et al. Wheat bran particle size influence on phytochemical extractability and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 152, p. 483–490, 2014.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440–454, 2016.

CHEN, J. H.; HO, C. T. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2374–2378, 1997.

CHO, A. S. et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 937–943, 2010.

COELHO, G. C. Teores de metilxantinas e saponinas e morfologia foliar de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) sob a influência de diferentes fatores ambientais e em diferentes variedades e populações. p. 184, 2002.

CROGE, C. P.; CUQUEL, F. L.; PINTRO, P. T. M. Yerba mate: Cultivation systems, processing and chemical composition. a review. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 5, p. 1–11, 2020.

DE MEJIA, E. G.; RAMIREZ-MARES, M. V. Impact of caffeine and coffee on our health. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 10, p. 489–492, 2014.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 23–36, 2006.

FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437–1446, 2000.

GERHARDT, M. Colonos ervateiros: história ambiental e imigração no Rio Grande do Sul. **Esboços - Revista do Programa de Pós-Graduação em História da UFSC**, v. 18, n. 25, p. 73–95, 2012.

GERHARDT, M.; NODARI, E. S.; MORETTO, S. P. **História ambiental e migrações diálogos História Ambiental e Migrações : Diálogos**. [s.l: s.n.].

- GOTTLIEB, A. M.; GIBERTI, G. C.; POGGIO, L. Molecular analyses of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in southern South America, evidence from AFLP and its sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 2, p. 352–369, 2005.
- GREIZERSTEIN, E. J. et al. Cytogenetic studies of Southern South-American *Ilex*. **Caryologia**, v. 57, n. 1, p. 19–23, 2004.
- HEMERY, Y. M. et al. Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1429–1438, 2010.
- HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.
- IEDE, E. T. CONSIDERAÇÕES SOBRE A ENTOMOFAUNA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* ST. H I L.). p. 111–118, 1968.
- KÄHKÖNEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954–3962, 1999.
- KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328–2375, 2013.
- KIM, S. Y. et al. Anti-obesity effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*): A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2015.
- LOU, Z. et al. P-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 550–554, 2012.
- LUCINÉIA CHIESA, C.; A SCHLABITZ, C. F. V. DE S. Efeito da adição de erva-mate nas características sensoriais e físico- químicas de barras de cereais. v. 71, n. 1, p. 105–110, 2012.
- MAKANJUOLA, S. A. Influence of particle size and extraction solvent on antioxidant properties of extracts of tea, ginger, and tea–ginger blend. **Food Science and Nutrition**, v. 5, n. 6, p. 1179–1185, 2017.
- MATSUMOTO, R. L. T. Atividade antioxidante do chá mate (*Ilex paraguariensis*). 2008.
- MELLO, A. C. B. et al. Bebida gaseificada de erva-mate verde. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 19–26, 2009.
- MURAKAMI, A. N. N. et al. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2211–2216, 2011.
- NARDINI, M. et al. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 5, p. 541–552, 1995.
- NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual review of phytopathology. Vol. 30**, p. 369–389, 1992.

OLIVEIRA, D. M. et al. Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic wistar rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 10527–10532, 2008.

OLIVEIRA, Y. M. M. DE; ROTTA, E. Area de distribuição natural de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Embrapa Florestas**, n. 1969, p. 17–36, 1985.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 1, p. 66–71, 2001.

PEREIRA, D. F. et al. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v. 19, n. 10, p. 868–877, 2012.

RAJHA, H. N. et al. Extraction of Total Phenolic Compounds, Flavonoids, Anthocyanins and Tannins from Grape Byproducts by Response Surface Methodology. Influence of Solid-Liquid Ratio, Particle Size, Time, Temperature and Solvent Mixtures on the Optimization Process. **Food and Nutrition Sciences**, v. 05, n. 04, p. 397–409, 2014.

RIACHI, L. G. Efeito da luz solar durante o cultivo e das condições de processamento sobre os fitoquímicos da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A . St . – Hil .) e análise do consumo do chá mate sobre o teor sérico de creatina quinase em voluntários com idade a partir. p. 94, 2018.

RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308–320, 2017.

SATO, Y. et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 136–138, 2011.

SERAFINI, M.; MAIANI, G.; FERRO-LUZZI, A. Alcohol-Free Red Wine Enhances Plasma Antioxidant Capacity in Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 6, p. 1003–1007, 1998.

SERGENT, T. et al. Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 68–73, 2012.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200–208, 2007.

THATYAN CAMPOS HONORATO, ELGA BATISTA, KAMILA DE OLIVEIRA DO NASCIMENTO, T. P. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 1981–8203, p. 1–11, 2013.

TSIBRANSKA, I.; TYLKOWSKI, B. Solid-liquid extraction of bioactive compounds: effect of polydiSperSity and particle Size evolution. **Journal of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 5, p. 489–499, 2016.

VALDUGA, E. et al. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FOLHA DE *Ilex paraguariensis* St. Hil. (ERVA-MATE) E DE OUTRAS ESPÉCIES UTILIZADAS NA ADULTERAÇÃO DO MATE. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 15, n. 1, p. 25–36, 1997.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. Families of phenolic compounds and means of classification. **Phenolic Compound Biochemistry**, p. 1–34, 2006.

VIEIRA, M. A. et al. Análise de compostos fenólicos, metilxantinas, tanino e atividade antioxidante de resíduo do processamento da erva-mate: uma nova fonte potencial de antioxidantes. **2nd International Workshop Advances in Cleaner Production. Key elements for a sustainable world: energy, water and climate change.**, n. June 2016, p. 11, 2009.

WOJDYŁO, A.; OSZMIAŃSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 940–949, 2007.

ZANCHETT, C. S. et al. Desenvolvimento de chocolate branco com extrato de erva-mate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, p. 1–9, 2016.

ZAPATA, F. J. et al. Caffeine, but not other phytochemicals, in mate tea (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) attenuates high-fat-high-sucrose-diet-driven lipogenesis and body fat accumulation. **Journal of Functional Foods**, v. 64, n. October, p. 103646, 2020.

ZANON, A. **Produção de sementes de erva-mate**. Curitiba: Embrapa, 1988.