

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**INFLUÊNCIA DA IDADE DAS FOLHAS E DA LUMINOSIDADE
NOS TEORES DE METILXANTINAS, ÁCIDO CLOROGÊNICO,
FENÓLICOS TOTAIS E NA ATIVIDADE DE CAPTAÇÃO DE
RADICAIS LIVRES DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Ilex*
paraguariensis A. St. Hilaire**

Florianópolis

2012

CARLOS HENRIQUE BLUM DA SILVA

**INFLUÊNCIA DA IDADE DAS FOLHAS E DA LUMINOSIDADE
NOS TEORES DE METILXANTINAS, ÁCIDO CLOROGÊNICO,
FENÓLICOS TOTAIS E NA ATIVIDADE DE CAPTAÇÃO DE
RADICAIS LIVRES DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Ilex*
paraguariensis A. St. Hilaire**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do título de Mestre em Farmácia, sob orientação do Professor Dr. Flávio Henrique Reginatto e co-orientação do Professor Dr. Geraldo Ceni Coelho.

Florianópolis

2012

Catlogação na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

S586i Silva, Carlos Henrique Blum da
Influência da idade das folhas e da luminosidade nos
teores de metilxantinas, ácido clorogênico, fenólicos totais
e na atividade de captação de radicais livres de extratos
aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hilaire [dissertação] /
Carlos Henrique Blum da Silva ; orientador, Flávio Henrique
Reginatto. - Florianópolis, SC, 2012.
92 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Erva-mate. 3. Ácido Clorogênico. 4. Fenóis.
I. Reginatto, Flávio Henrique. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.
Título.

CDU 615.12

Aos meus pais, Jorge e Bernardete.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Flávio Henrique Reginatto, pela orientação, amizade, confiança e “paternidade científica”.

Ao meu coorientador, Professor Dr. Geraldo Ceni Coelho, pela coleta e identificação do material vegetal, e pelo suporte na parte estatística e de ecologia química.

Ao Professor Dr. Eloir Paulo Schenkel, pelo tema, pelo suporte e ensinamentos durante o mestrado.

Às professoras Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões e Dra. Maique Weber Biavatti, além do Professor Dr. Flávio Henrique Reginatto, pelo aprendizado nestes dois anos de estágio em docência na disciplina de Farmacognosia.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, principalmente aqueles dos quais fui aluno nas disciplinas cursadas no mestrado.

Às técnicas do laboratório Claudinha e Solange.

À CAPES/REUNI pela bolsa.

Aos amigos e colegas de laboratório Geison, Caroline, Tatiana, Cassandra, Andressa, Francine, Fernanda, Maria Isabel, Solomon, Ana, Karen, Vanessa, Simone, Maria Tereza, Éverson, pelo companheirismo, pela ajuda e pelos momentos agradáveis dos quais desfrutamos juntos. Agradeço especialmente os colegas Vítor e Junia, os quais me ajudaram muito na reta final da parte prática deste trabalho.

Aos amigos dos laboratórios parceiros, Laboratório de Controle de Qualidade, Laboratório de Farmacotécnica e Laboratório de Virologia Aplicada.

Aos meus pais Jorge e Bernardete, pelo amor, confiança, carinho e suporte. Obrigado por tornarem isto possível, mas acima de tudo, obrigado por sempre acreditarem em mim, na minha capacidade e no meu sonho.

À minha noiva Samara, por todo amor, carinho, paciência e ajuda nestes dois anos de mestrado. Obrigado por acreditar em mim, até mais do que eu mesmo acredito. Obrigado por sempre me dar forças para vencer as barreiras, seja com palavras, com um abraço ou apenas com sua presença.

RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae) é uma espécie vegetal nativa da América do Sul, amplamente utilizada nesta região por seu potencial industrial na preparação de bebidas, chás e produtos dermocosméticos. Suas propriedades estão diretamente relacionadas à presença de metabólitos secundários, como as saponinas, as metilxantinas e os compostos fenólicos. O presente trabalho teve como objetivo investigar a influência da idade das folhas e da luminosidade nos teores de metilxantinas, ácido clorogênico, fenólicos totais e na atividade de captação de radicais livres de extratos aquosos das folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hilare em uma população situada em Chapecó, Santa Catarina. As análises quantitativas foram realizadas por espectrofotometria no UV/Vis e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados mostraram uma grande variabilidade nos teores de todos os metabólitos avaliados. A intensidade luminosa em condições naturais não alterou significativamente ($P > 0,05$) os teores de cafeína, teobromina, ácido clorogênico e fenólicos totais, assim como a atividade de captação de radicais livres dos extratos. Por outro lado, a idade das folhas demonstrou influência significativa ($P < 0,05$) nos teores de cafeína, metilxantinas totais e fenólicos totais dos extratos avaliados. Adicionalmente, a atividade de captação de radicais livres dos extratos também foi influenciada significativamente ($P < 0,05$) pela idade das folhas, havendo uma correlação inversa entre os valores de EC_{50} e os teores de compostos fenólicos totais. Por fim, o ácido clorogênico não se caracterizou como um marcador químico eficiente, no que tange a atividade antioxidante, para a espécie vegetal *Ilex paraguariensis*.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*; erva-mate; metilxantinas; ácido clorogênico; compostos fenólicos; atividade antioxidante.

ABSTRACT

Influence of age of leaves and luminosity on the methylxanthines, chlorogenic acid and total phenolic content and on the free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* A. St. Hilaire aqueous extracts

Yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae) is a South American native specie, widely used for its industrial potential in the preparation of drinks, teas and cosmetics. Its properties are directly related to the presence of secondary metabolites, such as saponins, methylxanthines and phenolic compounds. This study aimed to investigate the influence of leaf age and luminosity on the contents of methylxanthines, chlorogenic acid, total phenolics and on the free radical scavenging capacity of the aqueous extracts from of *Ilex paraguariensis* A. St. Hilaire leaves, in a population from Chapecó, Santa Catarina. Quantitative analyses were performed by UV/Vis and by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed a great variability in all metabolites content measured. The light intensity under natural conditions did not change significantly ($P > 0,05$) the caffeine, theobromine, chlorogenic acid and total phenolic content, as well as the free radical scavenging capacity. On the other hand, the age of leaves showed significant influence ($P < 0,05$) on the caffeine, methylxanthines, and total phenolic content of the evaluated extracts. Additionally, the free radical scavenging capacity was also significantly affected ($P < 0,05$) by the leaf age, with an inverse correlation between the EC₅₀ values and the total phenolic content. Finally, the chlorogenic acid was not characterized as an efficient chemical marker, regarding to the antioxidant activity for *I. paraguariensis* species.

Keywords: *Ilex paraguariensis*; yerba-mate; methylxanthines; chlorogenic acid; phenolic compounds; antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em uma planta.	32
Figura 2: Aspectos morfológicos da erva-mate.	35
Figura 3: Rotas biossintéticas prováveis para xantinas em <i>Camellia sinensis</i> , <i>Coffea arabica</i> e <i>Ilex paraguariensis</i>	39
Figura 4: Metilxantinas da erva-mate	40
Figura 5: Estrutura química dos principais flavonoides encontrados na erva-mate.....	42
Figura 6: Estrutura química dos ácidos fenólicos majoritários encontrados na erva-mate.....	43
Figura 7: Cromatograma do extrato aquoso das folhas de brotação da amostra 2 de <i>I. paraguariensis</i> (2 mg.mL ⁻¹) por CLAE-DAD com detecção em 280 nm.....	55
Figura 8: Gráfico da média dos teores de cafeína dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades de todos os indivíduos.	56
Figura 9: Gráfico da média dos teores de teobromina dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades de todos os indivíduos.....	57
Figura 10: Gráfico da média dos teores de metilxantinas totais dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades de todos os indivíduos	57
Figura 11: Cromatograma do extrato aquoso das folhas de brotação da amostra 2 de <i>I. paraguariensis</i> (4 mg.mL ⁻¹) por CLAE-DAD com detecção em 320 nm.....	60
Figura 12: Gráfico da média dos teores de ácido clorogênico dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades de todos os indivíduos	62
Figura 13: Interações propostas entre o sal Fast Blue BB e os ácidos fenólicos, caféico e clorogênico em solução tampão NaOH.....	63
Figura 14: Gráfico da média dos teores de fenólicos totais dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades de todos os indivíduos.....	65
Figura 15: Esquema representativo da neutralização do radical DPPH por um hidrogênio de um antioxidante.....	67
Figura 16: Gráfico da média dos valores de EC ₅₀ dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades dos 11 indivíduos de erva-mate.	67

Figura 17: Gráfico da correlação entre teor de compostos fenólicos e valores de EC₅₀ dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades das 11 plantas de erva-mate consideradas individualmente. 68

Figura 18: Gráfico da correlação entre teor de compostos fenólicos e valores de EC₅₀ dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades da média dos 11 indivíduos de erva-mate, separados por idade da folha e intensidade da luminosidade. 69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Estrutura química das matessaponinas.	47
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros validados nos métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de cafeína, teobromina e ácido clorogênico em extratos aquosos de <i>I. paraguariensis</i>	54
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

UV: Ultravioleta

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CG: Cromatografia gasosa

CLUE: Cromatografia líquida de ultra eficiência

DAD: Detector de UV por arranjos de diodos

EM: Espectometria de massas

INM: Instituto Nacional do Mate

IBDF: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMP: Ácido inisínico

SAM: S-adenosilmetionina

ACQ: Ácidos cafeoilquínicos

PAL: Fenilalanina amônia liase

CL: Cromatografia líquida

TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

EC₅₀: Concentração necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH

DPPH: 2,2- difenil-1-picrilhidrazil

ERO: Espécies reativas de oxigênio

DPPH-H: 2,2- difenil-1-picrilhidrazil reduzido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	30
2.1 Metabolismo secundário vegetal	30
2.1.1 Fatores que afetam o metabolismo secundário	31
2.2 <i>Ilex paraguariensis</i>	34
2.2.1 Aspectos botânicos.....	34
2.2.2 Aspectos sociais e econômicos	36
2.2.3 Metabólitos secundários em <i>Ilex paraguariensis</i>	37
2.2.3.1 Metilxantinas	37
2.2.3.2 Compostos fenólicos.....	41
2.2.3.3 Saponinas	45
3 OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo geral	48
3.2 Objetivos específicos	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Material vegetal	49
4.2 Obtenção dos extratos aquosos de <i>Ilex paraguariensis</i>	49
4.3 Determinação do resíduo seco.....	49
4.4 Análise dos teores de metilxantinas e ácido clorogênico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)	50
4.5 Análise dos teores de fenólicos totais.....	51
4.6 Capacidade de captação de radicais livres	51
4.7 Validação dos procedimentos analíticos	51
4.8 Análise estatística.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Validação dos procedimentos analíticos por CLAE	53
5.2 Teores de metilxantinas em <i>Ilex paraguariensis</i>	55
5.3 Teores de ácido clorogênico em <i>Ilex paraguariensis</i>	60

5.4 Teores de compostos fenólicos totais em <i>Ilex paraguariensis</i> ..	62
5.5 Atividade antioxidante.....	66
6 CONCLUSÕES.....	72
7 REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE	91

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hilaire) é um produto alimentar de consumo diário por parcelas significativas da população do Sul do Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e, em menor escala, Chile. A indústria ervateira é parte de um complexo do agronegócio, tendo nos estados do Sul um mercado consolidado, e um mercado potencial nos estados do Sudeste e região Central do Brasil, seja com o hábito do chimarrão, do tererê ou como chá-mate. Tendo em vista que o chimarrão, o tererê e o chá-mate são considerados bebidas genuínas do Mercosul, esse mercado não se limita apenas às fronteiras brasileiras (ANTONI, 1995; VALDUGA, 2002). Sua utilização popular na forma de infusão (chimarrão e chá-mate) ou macerada (tererê) está intimamente ligada ao fato de apresentar propriedades diuréticas, digestivas e estimulantes do sistema nervoso central (PIO-CORRÊA, 1978; BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINCKMANN, 2000; DERMARDEROSIAN, 2001; WICHTL, 2003).

Além destas propriedades ligadas ao uso popular, cabe destacar que diversas outras potenciais atividades farmacológicas já foram investigadas e descritas para *Ilex paraguariensis*, como as atividades antioxidante (GUGLIUCCI; STAHL, 1995; FILIP et al., 2000; SCHINELLA et al., 2000; BRACESCO et al., 2003; BIXBY et al., 2005; SCHINELLA; FANTINELLI; MOSCA 2005; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI 2007; FILIP et al., 2007; MARKOWICZ BASTOS et al., 2007; RIVELLI et al., 2007; MARTINS et al., 2009; TURNER et al., 2011; ANESINI et al., 2012; VALERGA; RETA; LANARI, 2012); antiviral (MÜLLER et al., 2007; LÜCKEMEYER et al., 2011); antiedematogênica (MONTANHA, 1990); antiobesidade (MARTINET; HOSTETTMANN; SCHUTZ, 1999; PAGANINI STEIN et al., 2005; DICKEL; RATES; RITTER, 2007; PANG; CHOI; PARK 2008); antiparkinsoniana (MILIOLI et al., 2007) antidiabética (OLIVEIRA et al., 2008; GUGLIUCCI et al., 2009) e anticarcinogênica (RAMIREZ-MARES; CHANDRA; DE MEJIA, 2004; ARBISER et al., 2005; GONZALEZ DE MEJIA et al., 2005; GONZALEZ DE MEJIA et al., 2010).

Quanto à composição química, diversos grupos de metabólitos secundários já foram descritos para a erva-mate, como as metilxantinas, cafeína e teobromina (FILIP et al., 1998; REGINATTO et al., 1999), os ácidos fenólicos, os quais encontram-se em grande concentração nesta espécie vegetal (FILIP et al., 2001; DE SOUZA et al., 2011), como o ácido clorogênico, neo-clorogênico, os ácidos 3,4, 3,5 e 4,5-

dicafeoilquínico e o ácido tricafeoilquínico. Adicionalmente, estão presentes os flavonóides rutina, campferol, quercetina e glicosídeos de quercetina (OHEM; HÖLZL, 1988; RICCO et al., 1991; FILIP et al., 2001; DE SOUZA et al., 2011) e as saponinas (GOSMANN; SCHENKEL; SELIGMANN, 1989; SCHENKEL; MONTANHA; GOSMANN, 1996; KRAEMER et al., 1996; SUGIMOTO et al., 2009; DE SOUZA et al., 2011).

Diversos estudos têm sido conduzidos no intuito de avaliar variações quantitativas intra e inter populacionais na produção destes metabólitos sob diferentes condições (MAZZAFERA, 1994; ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, 2000; COELHO et al., 2007; ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, 2007; HECK; SCHMALKO; DE MEJIA, 2008; RAKOCEVIC & MARTIM, 2010; DARTORA et al., 2011), pois é sabido que a constância nos teores destes compostos pode constituir fator determinante para a manutenção das características químicas, farmacológicas, agrônômicas, organolépticas, nutricionais e comerciais dos produtos derivados de *I. paraguariensis*. (TAKETA, 1997; COELHO, 2002). Além disso, a composição química pode afetar também a relação entre esta planta e outros vegetais ou seres vivos (COELHO, 2002).

Entretanto, a maioria dos estudos sobre este tema trata de plantas cultivadas e não silvestres. Ademais, a variação quantitativa nos teores de metilxantinas, ácido clorogênico e compostos fenólicos, assim como sua correlação com a capacidade de captação de radicais livres, ainda não foi estudada em indivíduos de uma mesma população sob diferentes condições de luminosidade e com folhas de diferentes idades. O fato de se estudar variações quantitativas nos teores destes metabólitos em indivíduos de uma mesma população, tem como grande vantagem, a minimização de efeitos relativos a fatores ambientais e fenológicos.

Os grupos de metabólitos estudados neste trabalho são os compostos fenólicos e as metilxantinas, visto que ambos ocorrem em grande quantidade na erva-mate, sendo os primeiros apontados como os principais metabólitos responsáveis pela atividade antioxidante descrita para a espécie, e os últimos por suas relevantes propriedades digestivas, diuréticas e estimulantes do sistema nervoso central. Embora inúmeras propriedades farmacológicas tenham sido descritas até o momento, a atividade antioxidante nos despertou maior interesse, seja pelo número de trabalhos na literatura, seja pelo potencial como possível fonte de obtenção de novas moléculas bioativas para o mercado farmacêutico e pelos benefícios aos seus consumidores, oriundos do uso popular diário.

Sendo assim, devido ao uso tradicional da erva-mate como alimento e como matéria-prima para as indústrias farmacêutica e cosmética, ao alto teor de metilxantinas e compostos fenólicos em suas folhas, seu potencial farmacológico, seu cultivo e disponibilidade em grande escala, torna-se indispensável o conhecimento sobre a influência da luminosidade e da idade das folhas neste vegetal e a correlação destes fatores com o seu potencial farmacológico, em particular a atividade de captação de radicais livres.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metabolismo secundário vegetal

Diferentemente do metabolismo primário, as classes e características químicas particulares das substâncias do metabolismo secundário são diferentes para cada espécie, podendo assim caracterizá-las (GOTTLIEB et al., 1996). Os produtos do metabolismo secundário, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema. De fato, já foram reconhecidas funções como defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra os raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, bem como sua participação em alelopatias (HARBORNE, 1988).

Segundo Rhodes (1994), o aparecimento de metabólitos biologicamente ativos na natureza é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, sendo que a co-evolução de plantas, insetos, microorganismos e mamíferos conduz à síntese de metabólitos secundários com funções de defesa ou atração principalmente. Dessa forma, por serem fatores de interação entre organismos, os metabólitos secundários, frequentemente, apresentam atividades biológicas relevantes. Muitos são de importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e cosmética, entre outras.

É bastante conhecido que as plantas são utilizadas com finalidades terapêuticas, desde os primórdios da humanidade. Enquanto buscava alimentação para sua sobrevivência, o homem se deparou com as propriedades curativas e por vezes tóxicas das plantas, originando um conhecimento empírico que, associado ao conhecimento científico, permitiu avanços no tratamento de enfermidades, através do uso de fármacos extraídos de vegetais. Apesar da revolução na indústria farmacêutica, impulsionada pela produção de fármacos sintéticos, os medicamentos de origem natural nunca deixaram de ter sua importância médica e econômica. Estudos sobre a origem de fármacos desenvolvidos no período de 1981 a 2006 indicaram que produtos naturais ou seus derivados compreendem cerca de 50% de todos os novos medicamentos lançados no mercado farmacêutico neste período (NEWMAN; CRAGG, 2007; NEWMAN, 2008). Ácido salicílico, atropina, efedrina, morfina, digoxina, taxol, vincristina e vimblastina são alguns exemplos de medicamentos de amplo uso na prática clínica, ratificando a importância do metabolismo secundário vegetal (VERPOORTE, 2000; ALVES,

2001; GILANI; RAHMAN, 2005; PATWARDHAN, 2005; CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007).

2.1.1 Fatores que afetam o metabolismo secundário

Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, o que torna sua biossíntese frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001). Segundo Gobbo-Neto; Lopes (2007), a taxa de produção de metabólitos secundários pode ser coordenada ou alterada por diversos fatores, sendo que os principais são sazonalidade, ritmo circadiano, estádios de desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica e de nutrientes, radiação ultravioleta, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (Figura 1).

Os autores destacam ainda que um aspecto importante a ser considerado, é que a maior parte dos estudos sobre influência destes fatores na produção de metabólitos secundários têm se limitado a um grupo restrito de espécies, que ocorrem predominantemente em regiões temperadas, muitas das quais são comercialmente importantes e que podem ter sofrido fortes pressões seletivas antrópicas. O comportamento químico destas espécies, portanto, nem sempre é representativo de plantas selvagens ou de outros tipos de habitat (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

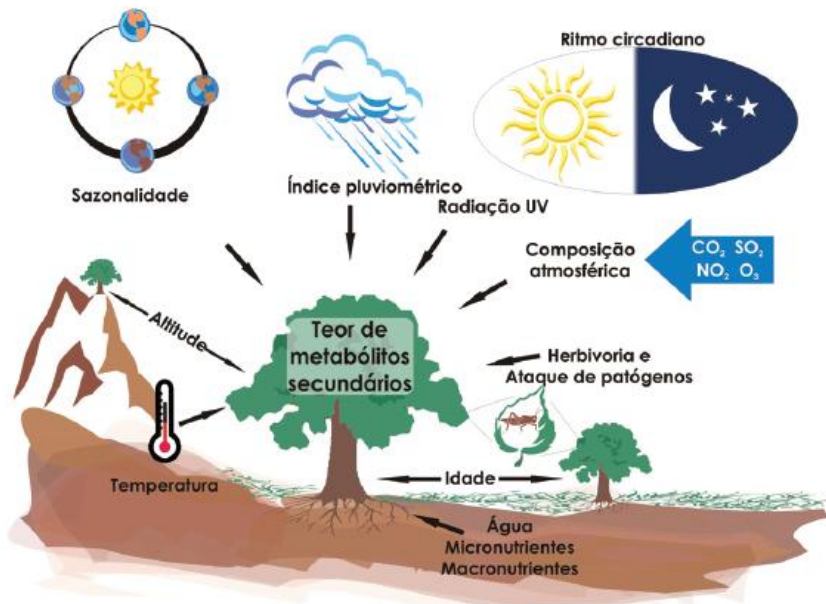


Figura 1: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em uma planta (Fonte: GOBBO-NETO; LOPES 2007).

Em que pese todos os fatores que possam influenciar na produção de compostos secundários pelas plantas, nesta revisão da literatura serão discutidos, de forma mais detalhada, os fatores sobre os quais as amostras coletadas possam ter sofrido maior influência. Cabe ressaltar que todos os indivíduos avaliados no presente trabalho pertencem a uma mesma população e local, e estão submetidos à influência dos mesmos fatores ambientais, com exceção da intensidade de luminosidade, pois alguns indivíduos encontram-se recobertos sob vegetação nativa.

No que tange à intensidade luminosa, existe uma correlação positiva já estabelecida na literatura com a produção de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides (WATERMAN & MOLE, 1994; CUADRA; HARBORNE; WATERMAN, 1997; TATTINI et al., 2004). Este fato é explicado pela proteção contra a foto-destruição que estes metabólitos proporcionam ao absorver e/ou dissipar a energia solar, agindo assim como uma barreira, evitando danos aos tecidos mais internos pela radiação UV-B (280-320nm). Isto acontece porque os flavonoides estão acumulados principalmente na epiderme e camadas

adjacentes, pêlos, cutícula e material epicuticular, sendo dessa forma, utilizados pelos vegetais como filtros UV-B, absorvendo esta radiação, sem alterar a radiação fotossinteticamente ativa (WATERMAN; MOLE, 1994; BIEZA; LOIS, 2001). As enzimas da rota biossintética dos fenilpropanoides (fenilalanina amônia-liase e chalcona sintase, entre outras) podem ter sua expressão gênica induzida pela luz; no entanto, isto não se aplica a compostos fenólicos simples, os quais têm absorção máxima em comprimentos de onda consideravelmente mais curtos que os do UV-B (CHAPPELL; HAHLBROCK, 1984; WATERMAN; MOLE, 1994; BHARTI; KHURANA, 1997; GRACE; LOGAN, 2000).

Diversos autores, avaliando diferentes espécies vegetais, já demonstraram também a influência da idade e desenvolvimento da planta na quantidade total de metabólitos produzidos, bem como nas proporções relativas destes constituintes químicos (BOWERS; STAMP, 1993; HENDRIKS et al., 1997; HÖFT; VERPOORTE; BECK, 1998; DOAN; ERVIN; FELTON, 2004). Hartmann (1996), afirma que tecidos mais novos geralmente possuem maior taxa biossintética de metabólitos, como é o caso dos ácidos fenólicos (KOEPE, 1970 *apud* GOBBONETO; LOPES, 2007) e flavonoides (SLIMESTAD, 1998). É importante enfatizar também que embora a atividade metabólica seja elevada em períodos de crescimento tecidual rápido, frequentemente há uma correlação inversa com a produção de aleloquímicos (LILOV; ANGELOVA, 1987; WATERMAN; MOLE, 1989).

Ilex paraguariensis é considerada uma espécie vegetal tolerante à sombra ou reprodutora à sombra (FLOSS, 1994; COELHO; MARIATH, 1996; COELHO et al., 2000). Em contrapartida, frequentemente é cultivada em campo aberto (monocultivo) sob condições de máxima exposição ao sol. Mazzafera (1994) preparou através de maceração dinâmica, extratos aquosos das folhas de erva-mate. Em suas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), encontrou teores mais elevados de metilxantinas em folhas sombreadas, quando comparadas com folhas de uma mesma planta exposta ao sol. O autor também encontrou teores mais elevados de cafeína em folhas mais novas.

Athayde; Coelho; Schenkel (2000; 2007), analisando por CLAE amostras de folhas de *I. paraguariensis* de diferentes populações e de diferentes indivíduos da mesma população, reportaram não somente grande variabilidade interpopulacional nos teores de metilxantinas encontrados, mas também entre plantas dentro da mesma população. Em alguns casos, a variação entre os teores de cafeína de plantas da mesma população chegou a mais de 100 vezes.

Rachwal et al. (2000), encontraram uma diminuição de dez por cento nos teores de compostos fenólicos com uma redução de 38% na intensidade luminosa. De acordo com os autores, a quantidade de compostos fenólicos na erva-mate diminui com o aumento do sombreamento.

Esmelindro et al. (2004) prepararam extratos de folhas de *I. paraguariensis* utilizando extração supercrítica com dióxido de carbono, e avaliaram os teores de cafeína e teobromina em amostras submetidas a diferentes condições de luminosidade, e com seis, 12, 18 e 24 meses de idade através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os autores encontraram diferenças significativas entre os teores de metilxantinas, sendo que amostras de folhas que recebiam baixa intensidade luminosa e as mais jovens apresentaram os maiores teores de ambas as metilxantinas.

Mais recentemente, Dartora et al. (2011) avaliaram amostras de *I. paraguariensis* submetidas a diferentes condições de crescimento, tratamento e idade. Em uma análise rápida utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas (CLUE-DAD-EM), os autores identificaram e quantificaram cafeína e teobromina, derivados do ácido clorogênico, incluindo uma série de isômeros os quais não haviam sido ainda relatados para a espécie. Os resultados mostraram que os extratos aquosos das plantas da população exposta ao sol, sob a forma de monocultura exibiram teores superiores de metabólitos quando comparadas com amostras da população sombreada. Os autores verificaram ainda que amostras submetidas aos processos de sapeco e secagem apresentaram maior teor de compostos fenólicos, maior atividade antioxidante e um menor teor de metilxantinas quando comparadas com amostras *in natura*. Em contrapartida, não foram evidenciadas diferenças significativas nos teores destes metabólitos entre folhas de um e seis meses.

2.2 *Ilex paraguariensis*

2.2.1 Aspectos botânicos

A espécie arbórea *Ilex paraguariensis* A. St. Hilaire (Aquifoliaceae) foi classificada pelo naturalista francês August Saint Hilaire, em publicação de 1825, nas Memórias do Museu de História Natural de Paris (CARVALHO, 1994). Esta espécie vegetal se distribui amplamente pela América do Sul, crescendo em regiões subtropicais e temperadas da Argentina, Brasil, Paraguai e algumas populações

isoladas são encontradas também no Uruguai. No Brasil, a erva-mate ocorre em Minas Gerais e Rio de Janeiro, mas com maior área de ocorrência no Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul (PIO-CORRÊA, 1978; CARVALHO, 1994; GIBERTI, 1995; TORMEN, 1995).

A erva-mate é uma árvore de crescimento lento ou moderado e de altura variável, podendo atingir 25 metros de altura em seu habitat natural. Em cultivo agrícola (Figura 2A), a altura média é de três a cinco metros (PIO-CORRÊA, 1978; CARVALHO, 1994). Quanto à morfologia, suas folhas são simples, alternas, oblongas, estreitas na base e ligeiramente obtusas no vértice. As bordas são denteadas, especialmente da metade para a extremidade, medindo oito a dez centímetros de comprimento e quatro a cinco centímetros de largura, com nervuras salientes, coloração verde escura na face adaxial e verde clara na abaxial (CARVALHO, 1994; GUPTA, 1995). O pecíolo é curto e retorcido e as flores são brancas, pequenas, dispostas na região axilar das folhas superiores, com quatro pétalas agrupadas em cachos (Figura 2B). Apesar de conter estames e pistilos, as flores são imperfeitas dióicas, nas pistiladas os estames não produzem pólen e nas estaminadas o pistilo aborta (CARVALHO, 1994).

O fruto é uma baga globosa, pequena (4-6 mm de diâmetro), de cor verde quando novo e vermelho-arroxeadado quando maduro (Figura 2C). Possui quatro a cinco sementes (Figura 2D). Possui dispersão zoocórica, pois é muito apreciado pelos pássaros, que disseminam naturalmente essa espécie (CARVALHO, 1994).



Figura 2: Aspectos morfológicos da erva-mate; A= exemplar adulto, B= folhas e flores, C= frutos e D= sementes. (Fonte: LORENZI; MATOS, 2008).

2.2.2 Aspectos sociais e econômicos

Erva-mate é uma cultura agrícola importante no Sul do Brasil, Paraguai e Argentina, haja vista que suas folhas e ramos são principalmente matéria-prima para bebidas e chás, especialmente nas formas tradicionais de chimarrão e tererê. 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. É estimado que na América do Sul, aproximadamente 30% da população ingira mais de um litro dessas bebidas por dia (PASINATO, 2004; HECK; DE MEJIA, 2007).

Por sua importância sociocultural e econômica, este vegetal tornou-se a árvore símbolo do Rio Grande do Sul (BRASIL, 1980) e o chimarrão sua bebida símbolo (BRASIL, 2003). Além disso, a erva-mate também foi oficialmente incorporada à cesta básica desse Estado. O gaúcho tem em seu perfil comportamental o hábito de beber chimarrão, significando que, para garantir a qualidade de vida, a erva-mate é um produto de aquisição essencial (CARPANEZZI, 1995; TORMEN, 1995).

Em 1938, o Instituto Nacional do Mate (INM), cuja sede situava-se no Rio de Janeiro, fazia campanhas de divulgação do chá-de-mate. Algumas empresas tentaram explorar o setor, tendo destaque a empresa Mate Leão. Em 1964, o INM foi extinto e, em 1965, foi criado o Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF), onde a produção ervateira foi deixada de lado e o foco tornou-se a arrecadação dos incentivos fiscais com a plantação de pinus, eucaliptos e outras espécies. Logo, o IBDF foi extinto e a produção de erva-mate passou a ser regida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (TORMEN, 1995).

Até pouco tempo atrás, o setor ervateiro dependia quase que exclusivamente da comercialização da erva-mate na sua forma tradicional de chimarrão, o que limitava o mercado às regiões onde é produzida. Alguns estudos têm sido conduzidos com o intuito de identificar formas comerciais alternativas para aplicação da erva-mate, visando agregar valor a essa importante matéria prima regional (VALDUGA, 2002).

Mais recentemente, a indústria ervateira tem concentrado esforços em ampliar o mercado da erva-mate através do lançamento de novos produtos, como os compostos de erva-mate e o chá aromatizado. Nos últimos anos, iniciou-se também a demanda de maiores quantidades desta matéria-prima para as indústrias química e farmacêutica, visando à produção de produtos de higiene e beleza que utilizam a essência de

erva-mate para a produção de diversas formas farmacêuticas e cosméticas como sabonete líquido, xampus e cremes para pele (MOSELE, 2002).

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2011), a erva-mate foi um dos produtos não madeireiros do extrativismo vegetal que mais se destacaram em 2010 pelo valor da produção, que chegou a 100,5 milhões de reais. Considerando que 99,9% da produção está concentrada na Região Sul, este valor mostra a importância econômica da cultura da erva-mate nesta região. O volume de produção chegou a 227.462 toneladas nos ervais nativos, representando um aumento de 4,3% em relação ao ano anterior. Deste montante, 166.682 toneladas foram produzidas no Paraná, 36.274 toneladas em Santa Catarina e 24.231 toneladas no Rio Grande do Sul. Dos 20 maiores municípios produtores, 15 são paranaenses, três estão em Santa Catarina e dois são gaúchos. Juntos são responsáveis por 65,7% da produção nacional.

2.2.3 Metabólitos secundários em *Ilex paraguariensis*

Os metabólitos secundários encontrados na erva-mate são as metilxantinas, cafeína e teobromina (FILIP et al., 1983, 1998; REGINATTO et al., 1999), os ácidos fenólicos, os quais encontram-se em grande concentração nesta espécie vegetal (FILIP et al., 2001; DE SOUZA et al., 2011), os flavonóides rutina, campferol, quercetina e glicosídeos de quercetina (OHEM; HÖLZL, 1988; RICCO et al., 1991, 1995; FILIP et al., 2001; DE SOUZA et al., 2011) e as saponinas triterpênicas derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico (GOSMANN ; SCHENKEL; SELIGMANN, 1989; GOSMANN et al., 1995; KRAEMER et al., 1996; SCHENKEL et al., 1996, 1997; SUGIMOTO et al., 2009; DE SOUZA et al., 2011).

A seguir serão abordados aspectos químicos e farmacológicos das principais classes de metabólitos secundários presentes em *I. paraguariensis*.

2.2.3.1 Metilxantinas

As metilxantinas são constituintes químicos derivados de bases púricas, os quais possuem nitrogênio heterocíclico e apresentam atividade fisiológica marcante (ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, 1990; RATES, 2007).

A biossíntese das metilxantinas, a qual é apresentada resumidamente na Figura 3, tem como ponto inicial principal a adenina (SUZUKI et al., 1992; ASHIHARA, 2011). Esta purina contém o anel

de seis membros da pirimidina fundido com o anel de cinco membros do imidazol. Em vegetais superiores, o metabolismo das purinas tem sido bastante estudado nas espécies *Camellia sinensis* e *Coffea arabica*, sendo sintetizado nestes vegetais a partir do monofosfato de inosina (IMP) (Figura 3). A cafeína é sintetizada a partir da xantosina, via 7-metilxantosina, 7-metilxantina, e teobromina, sendo o grupo doador de metila o SAM (S-adenosilmetionina) (SUZUKI et al., 1992).

As metilxantinas cafeína e teobromina são acumuladas pelos vegetais nos vacúolos, formando complexos com fenilpropanóides. No caso da erva-mate, a associação com cafeína é predominantemente verificada com os ácidos cafeoilquínicos (ACQ) e dicafeoilquínicos. Waldhauser; Baumann (1996) verificaram que há correlação entre os teores de cafeína e ACQ, pois a síntese destes apresenta uma forte interação metabólica. Este fato foi verificado através da adição de cafeína em meios de cultura, estimulando a atividade da enzima chave no processo de formação dos fenilpropanóides, que é a fenilalanina amônia liase (PAL). Por outro lado, os autores verificaram também que a inibição desta enzima leva à diminuição da síntese de cafeína.

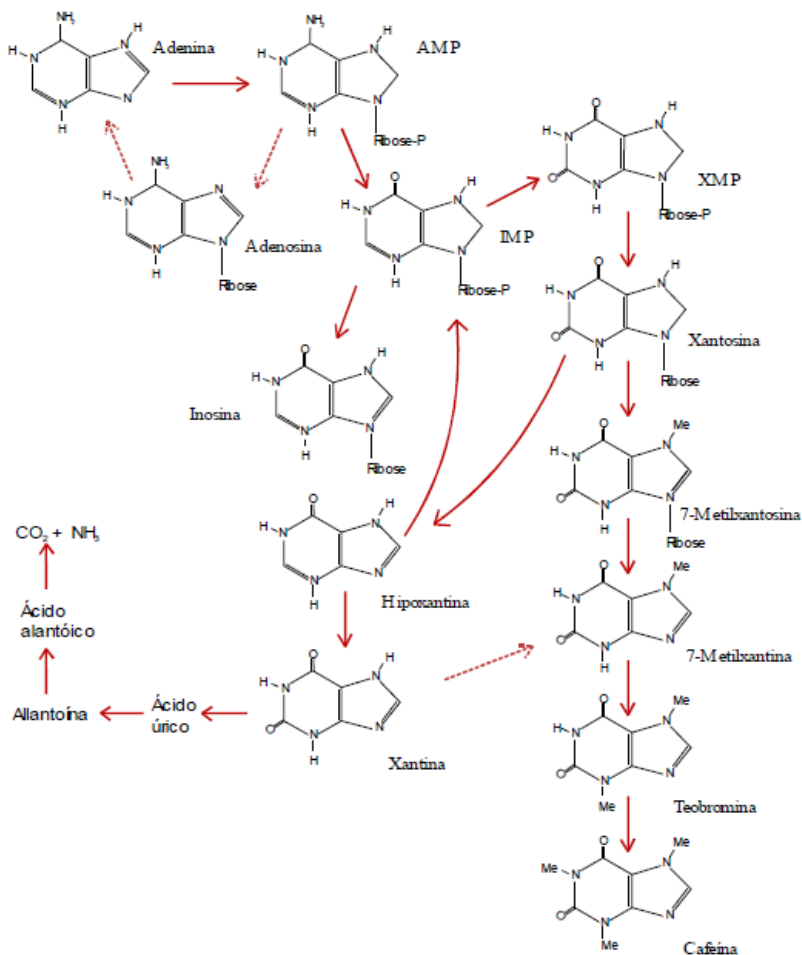


Figura 3: Rotas biossintéticas prováveis para xantinas em *Camellia sinensis*, *Coffea arabica* e *Ilex paraguariensis* adaptadas de COELHO, 2002 Me= CH₃.

Plantas de mais de 30 famílias são conhecidamente produtoras de metilxantinas. As famílias mais conhecidas são Aquifoliaceae (*Ilex paraguariensis*), Theaceae (*Camellia sinensis*), Rubiaceae (*Coffea arabica*), Sterculiaceae (*Theobroma cacao*, *Cola nitida*) e Sapindaceae (*Paulinia cupana*) (ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, 1990).

Na erva-mate, as metilxantinas encontradas são caféina, teobromina e teofilina (Figura 4). Embora a teofilina tenha sido relatada em pequenas quantidades por Mazzafera (1994), sua ocorrência nesta

espécie é controversa, visto que não é confirmada por inúmeros outros autores (BALASSAT et al., 1984; CLIFFORD & RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; FILIP et al., 1998; REGINATTO et al., 1999; ATHAYDE et al., 2000).

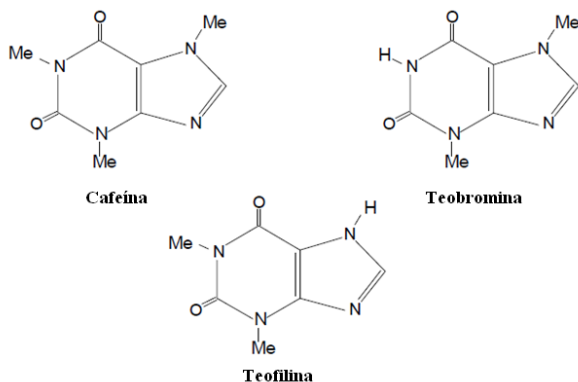


Figura 4: Metilxantinas da erva-mate adaptadas de RATES, 2007; Me = CH₃

Quanto às propriedades farmacológicas das metilxantinas, é preciso salientar o fato de que a utilização popular da erva-mate nas formas de infusão (chimarrão e chá-mate) ou macerada (tererê) está relacionada à presença desta classe de compostos, uma vez que estas exercem efeitos de estimulação nos sistemas nervoso central, cardiovascular, renal e digestivo (BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINCKMANN, 2000; DERMARDEROSIAN, 2001; WICHTL, 2003; RATES, 2007).

A ingestão de cafeína é relacionada ao efeito psicoestimulante e ainda ao desempenho cognitivo (NEHLIG; DAVAL; DEBRY, 1992; GASIOR et al., 2000; FERRÉ, 2008). Estudos realizados por Riedel et al., (1995) e Prediger et al., (2005) mostram que a cafeína reduz o prejuízo de memória induzido por escopolamina e melhora o aprendizado em um modelo animal de déficit de atenção. Alguns anos depois, Prediger et al. (2008) concluíram que o extrato hidroalcoólico de erva-mate também melhorou o aprendizado, devido a alta concentração de metilxantinas no extrato. Estudo realizado por Milioli et al. (2007), demonstrou efeito antiparkinsoniano do extrato hidroalcoólico de *I. paraguayensis* em alguns modelos animais. Outros trabalhos têm demonstrado ainda que a ingestão crônica de cafeína estaria associada a um menor risco de desenvolver doenças neurodegenerativas como

Alzheimer e Parkinson (AGUIAR et al., 2006; DALL'IGNA et al., 2007; PREDIGER, 2010).

Santos (2011) investigou a atividade neurofarmacológica de extratos aquosos e hidroetanólicos de *I. paraguayensis* e verificou um aumento da atividade locomotora em camundongos após tratamento subcrônico e crônico com extrato hidroetanólico. Embora não tenha sido relacionado estes resultados com o teor de metilxantinas do extrato, o autor também descreveu que ambos os extratos não afetaram o processo de aprendizagem e memória após tratamento agudo, sendo que o extrato aquoso foi capaz de prevenir o déficit de memória induzido por escopolamina.

2.2.3.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos apresentam grande diversidade estrutural e possuem em sua estrutura um anel aromático substituído por um ou mais grupamentos hidroxilas, sendo que o padrão de substituição do composto fenólico resultante é determinado pela origem biogenética dos mesmos (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Na erva-mate, os compostos fenólicos têm notável importância, estando presentes nas folhas de erva-mate os flavonoides e os ácidos fenólicos. Tais compostos apresentam importância nas propriedades da planta bem como de seus produtos comerciais quanto a atividades farmacológicas, principalmente atividade antioxidante (RANILLA, et al., 2010; MACEDO et al., 2011; VALERGA; RETA; LANARI, 2012; ANESINI et al., 2012)

Amplamente distribuídos no reino vegetal, os flavonoides representam um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados. Frequentemente são encontrados oxigenados e conjugados com açúcares (heterosídeos). As principais classes de flavonóides são: flavonas, flavonóis, flavanonas, *O*-heterosídeos, *C*-heterosídeos, antocianos, chalconas, isoflavonoides, biflavonoides, entre outras. (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Os flavonoides descritos para *I. paraguayensis* sofrem pouca variação estrutural, relacionando-se principalmente à quercetina livre e seus derivados glicosilados, além da presença de canferol e rutina (Figura 5). Cabe salientar ainda que estes metabólitos encontram-se em baixas quantidades percentuais nas folhas de erva-mate (RICCO et al., 1991; FILIP et al., 2001).

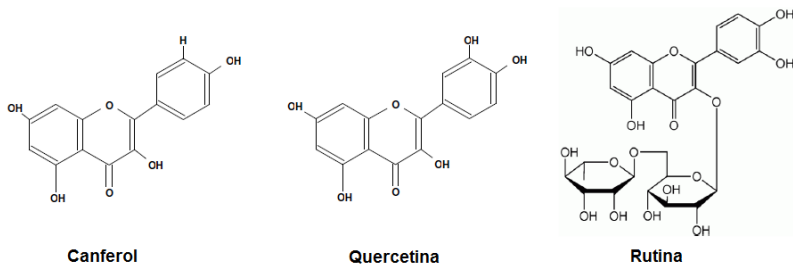


Figura 5: Estrutura química dos principais flavonoides encontrados na erva-mate.

Da mesma forma que os flavonoides, os ácidos fenólicos apresentam grande diversidade estrutural e são amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo classificados como derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico. Os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sináptico são quatro derivados do ácido cinâmico frequentemente detectados nos vegetais. Neste grupo, ainda podem ser encontrados os ésteres e heterosídeos de ácidos fenólicos e cinâmico. Também referidos como derivados do ácido fenilacrilico, destacam-se os derivados do ácido caféico, como por exemplo, o ácido clorogênico (5-*O*-cafeoilquínico) e seus isômeros, os ácidos criptoclorogênico, neoclorogênico e isoclorogênico (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Filip et al. (2001) avaliaram a presença de compostos fenólicos e de flavonoides em macerados aquosos de *I. paraguariensis* e outras sete espécies sul-americanas do gênero *Ilex* (*I. brevicuspis*; *I. theezans*; *I. microdonta*; *I. dumosa* var. *dumosa*; *I. taubertiana*; *I. pseudobuxus* e *I. argentina*), comumente utilizadas como adulterantes da erva-mate. Através das análises por CLAE-DAD, os autores encontraram maiores teores destes compostos em *I. paraguariensis*, quando comparados às outras sete espécies. Especificamente para *I. paraguariensis* foi detectado uma concentração de 9,6% de derivados fenólicos no extrato seco, com a presença de ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico (Figura 6) e de 0,06% dos flavonoides rutina, quercetina e kaempferol.

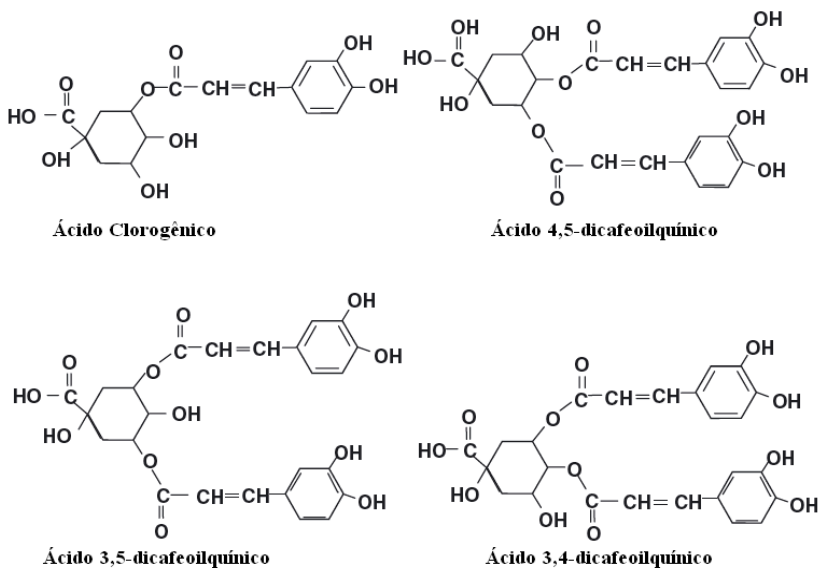


Figura 6: Estrutura química dos ácidos fenólicos majoritários encontrados na erva-mate, adaptadas de Heck; De Mejia (2007).

Clifford; Ramirez-Martinez (1990) prepararam extratos hidrometanólicos (70%) sob refluxo, e também infusões de cinco amostras de folhas de erva-mate obtidas em diferentes países. Através das análises por CLAE-UV, os autores verificaram a presença de ácido clorogênico e dos ácidos 4-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico e 3,5-dicafeoilquínico. Dentre as cinco amostras analisadas, o ácido 5-cafeoilquínico foi o composto majoritário em duas amostras, sendo que nas demais, os compostos detectados em maiores quantidades foram os ácidos clorogênico e 3,5-dicafeoilquínico.

Mazzafera (1997) preparou de acordo com o uso popular, infusões de 18 amostras de folhas de *I. paraguariensis* provenientes de diferentes locais de cultivo. Embora o autor tenha reportado a presença de cafeína, ácido clorogênico e ácido caféico em todas as amostras avaliadas, grandes variações nos teores das mesmas foram evidenciadas após as análises por CLAE-UV.

Carini et al. (1998), através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM), determinaram o perfil de compostos fenólicos em extratos aquosos brutos das folhas de erva-mate. Os autores identificaram dez compostos, incluindo três isômeros naturais do ácido cafeoilquínico (ácidos neoclorogênico, clorogênico e

criptoclorogênico), três isômeros do ácido dicafeoilquínico, rutina e dois isômeros do cafeoil-glicosídeo.

Em outro estudo, Bastos et al. (2006) investigaram os teores de ácidos fenólicos (ácidos caféico e 5-cafeoilquínico) e de flavonoides (quercetina, canferol e miricetina) em extratos aquosos de erva-mate, provenientes de diferentes estágios do seu processamento, por CLAE-DAD. Os teores dos ácidos caféico e 5-cafeoilquínico variaram em proporção inversa com o estágio do beneficiamento. Por outro lado, os autores não detectaram a presença de quercetina, miricetina e canferol nas amostras avaliadas.

Adicionalmente, em uma investigação sobre os teores de ácidos fenólicos e de flavonoides em extratos aquosos e etanólicos de folhas verdes e tostadas de erva-mate, através de EM, Bastos et al. (2007) identificaram os ácidos caféico, quínico, cafeoilquínico, feruloilquínico, dicafeoilquínico, cafeoil-glicosídeo e o flavonoide rutina como os principais compostos fenólicos. Dois novos compostos foram formados após o processo de sapeco, os quais foram identificados como ácidos cafeoilchiquímico e dicafeoilchiquímico.

Marques; Farah (2009) analisaram a presença de derivados cafeoilquínicos nos extratos aquosos e metanólicos de dois tipos de amostras de erva-mate (folhas verdes e tostadas) e outras 13 plantas medicinais, através de CLAE-UV e CLAE-DAD-EM. Os autores identificaram, pela primeira vez em amostras de *I. paraguariensis*, os ácidos 3-feruloilquínico e 4-feruloilquínico. Adicionalmente, outros sete derivados cafeoilquínicos (ácidos 3-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico, 5-feruloilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico), além do ácido cafeico foram identificados.

No que se refere às propriedades farmacológicas de *I. paraguariensis*, os compostos fenólicos estão relacionados com grande parte delas (BRAVO et al., 2007). Filip et al. (2000) encontraram nos extratos aquosos da erva-mate, o maior teor de derivados cafeoilquínicos entre diversas espécies do gênero *Ilex*, havendo correlação, destes teores, com a atividade antioxidante detectada ($r^2=0,94$) através do ensaio de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico).

Schinella et al. (2000) investigaram as propriedades antioxidantes do extrato aquoso de *I. paraguariensis* obtido por infusão utilizando diferentes sistemas geradores de radicais livres. Os autores concluíram que o extrato foi capaz de inibir a peroxidação lipídica enzimática e não enzimática em microsomas de fígado de rato de forma dose-dependente. O extrato inibiu também a peroxidação induzida por

peróxido de hidrogênio das membranas das células vermelhas sanguíneas e exibiu propriedades de captação de radicais em relação ao ânion superóxido e ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Bixby et al. (2005), avaliando a capacidade de captação de radicais livres pelo método do DPPH, encontraram maior atividade antioxidante para os extratos aquosos de erva-mate em comparação ao chá-verde e chá-preto (*Camelia sinensis*), marcela (*Achyrocline satureoides*) e alguns tipos de vinhos tintos e brancos, sendo esta atividade diretamente proporcional ao conteúdo de compostos fenólicos.

Uma potente inibição do estresse oxidativo causado pelas ERO para o fígado e o coração foi demonstrada para extratos de erva-mate. Schinella et al. (2005) verificaram que a administração do extrato aquoso de erva-mate preparado por infusão diminuiu a oxidação lipídica no coração, protegendo o miocárdio de danos fisiológicos naturais.

2.2.3.3 Saponinas

A estrutura química das saponinas consiste basicamente de duas porções, uma denominada de sapogenina ou aglicona, com característica lipofílica, que pode ser triterpênica ou esteroidal, e outra com caráter hidrofílico, que é composta por açúcares. A classificação em saponinas monodesmosídicas e bidesmosídicas originou-se da possibilidade de o açúcar estar ligado a um ou dois sítios de glicosilação, respectivamente (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007).

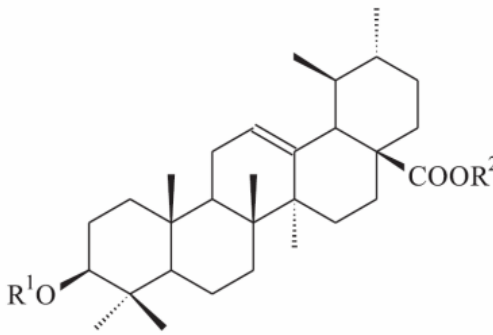
Para *I. paraguariensis* são relatadas 27 saponinas triterpênicas, nas quais a parte glicosídica é composta por glicose, ramnose, xilose e arabinose. Diferentemente das saponinas das demais espécies sul-americanas do gênero, as quais são predominantemente derivadas do ácido 19 α -hidroxi-ursólico, as saponinas das folhas desta espécie apresentam exclusivamente agliconas dos ácidos ursólico e oleanólico, sendo possível assim diferenciá-las das demais espécies (GOSMANN; SCHENKEL; SELIGMANN, 1989; MONTANHA, 1990; GOSMANN et al., 1995; KRAEMER et al., 1996; SCHENKEL; MONTANHA; GOSMANN, 1996; DE SOUZA et al., 2011).

A primeira saponina das folhas de *I. paraguariensis*, denominada matessaponina-1, foi isolada e identificada por Gosmann, Schenkel e Seligmann (1989). No ano seguinte Montanha (1990) isolou e identificou outras seis saponinas denominadas J1a, J1b, J2a, J2b, J3a e J3b. Outros três glicosídeos triterpênicos foram isolados das folhas e identificados por Gosmann et al. (1995) sendo denominadas matessaponinas-2, 3 e 4. Posteriormente Kraemer et al. (1996) isolaram e identificaram a saponina mais polar desta espécie, com seis unidades

monossacarídicas, denominada matessaponina-5, a qual encontra-se em concentrações baixas nas folhas. Martinet et al. (2001) identificaram duas saponinas minoritárias, denominadas guaiacina B e nudicaucina C, as quais são formas isoméricas das matessaponinas 1 e 2, respectivamente. A diferença reside na natureza da aglicona dessas saponinas, as quais apresentam o ácido oleanólico ao invés do ácido ursólico como sapogenina (Quadro 1).

Sugimoto et al. (2009) isolaram três glicosídeos triterpênicos das folhas de *I. paraguariensis* os quais foram identificados como mateglicosídeo A, mateglicosídeo B e mateglicosídeo C. Recentemente, De Souza et al. (2011) em uma análise por EM identificaram as saponinas já descritas na literatura e ainda novas saponinas, incluindo diversos isômeros. Os autores constataram que este isomerismo pode ocorrer tanto na aglicona quanto no açúcar.

Quadro 1: Estrutura química das matessaponinas, adaptadas de Coelho (2002).

Aglicona		
		
Ácido ursólico		
Saponinas	R ¹	R ²
Matessaponina 1	β-D-glicopiranosil (1→3)-α-L-arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil
Matessaponina 2	β-D-glicopiranosil(1→3)-[α-L-ramnopiranosil(1→2)]arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil
Matessaponina 3	β-D-glicopiranosil(1→3)- α-L-arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil(1→6)-β-D-glicopiranosil
Matessaponina 4	β-D-glicopiranosil(1→3)-[α-L-ramnopiranosil(1→2)]arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil(1→6)-β-D-glicopiranosil
Matessaponina 5	β-D-glicopiranosil(1→3)-[α-L-ramnopiranosil(1→2)]arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil(1→4)-α-L-ramnopiranosil(1→6)-β-D-glicopiranosil

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a influência da intensidade luminosa e da idade das folhas nos teores de metilxantinas, ácido clorogênico e fenólicos totais em *Ilex paraguariensis* e sua relação com a atividade captadora de radicais livres.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência da intensidade luminosa em condições naturais e da idade das folhas nos teores de metilxantinas em indivíduos de uma mesma população de *Ilex paraguariensis*.

- Avaliar a influência da intensidade luminosa e da idade das folhas nos teores de ácido clorogênico e fenólicos totais em indivíduos de uma mesma população de *Ilex paraguariensis*.

- Avaliar a influência da intensidade luminosa e da idade das folhas na atividade captadora de radicais livres e correlacionar a atividade detectada com a composição química dos extratos de *Ilex paraguariensis*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foram coletadas folhas de onze indivíduos de uma população nativa de *Ilex paraguariensis* situada no município de Chapecó, oeste do Estado de Santa Catarina (27° 08' 48" S; 52° 37' 01" W). Destes, cinco indivíduos estavam expostos diretamente ao sol, enquanto os outros seis se encontravam naturalmente sombreados pela cobertura de outras plantas dos estratos superiores da floresta. A intensidade de luminosidade (radiação fotossinteticamente ativa) foi avaliada através de um luxímetro LD-209 Instrutherm[®]. Foram feitas três medições em dias diferentes ao longo do ano (outubro de 2010, janeiro de 2011 e julho de 2011). O material vegetal foi coletado no mês de outubro de 2010 e separados pela idade em folhas de brotação (da gema ao terceiro nó), folhas de dois meses (do quarto ao oitavo nó) e folhas de seis meses (do nono nó em diante). As amostras foram congeladas, liofilizadas, moídas em moinho de facas e armazenadas em dessecador até a realização do processo de extração.

4.2 Obtenção dos extratos aquosos de *Ilex paraguariensis*

Os extratos de todas as amostras de folhas de erva-mate foram preparados através de infusão aquosa, para mimetizar a mais tradicional forma de uso desta bebida. Cinco gramas de folhas secas foram extraídas com 100 ml de água destilada (90°C) por 20 minutos. Todos os extratos foram filtrados, os volumes ajustados para 100 ml com água destilada e então foram congelados até o momento da realização das análises.

4.3 Determinação do resíduo seco

A determinação do resíduo seco foi realizada de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5^a Edição (Farmacopéia Brasileira, 2010), com pequenas modificações, com o intuito de se conhecer a concentração dos extratos avaliados. Alíquotas de 2,0 mL de cada extrato foram transferidas para pesa-filtros previamente dessecados e pesados. Após pesagem em balança analítica, os pesa-filtros foram colocados para dessecar em estufa a 105°C (\pm 3°C), por três horas. Após resfriamento em dessecador, os pesa-filtros foram novamente pesados e retornaram para a estufa por mais 30 minutos. Este procedimento foi repetido até atingir peso constante. O resíduo seco foi calculado em termos de massa restante sobre o volume inicial. O procedimento foi realizado em triplicata.

4.4 Análise dos teores de metilxantinas e ácido clorogênico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

As análises quantitativas de cafeína, teobromina e ácido clorogênico nos extratos das folhas de erva-mate foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência PerkinElmer® Série 200, equipado com detector de UV por arranjo de diodos, bomba quaternária, desgaseificador *on line* e amostrador automático. Os dados foram adquiridos através do software Chromera® Workstation. O volume de injeção utilizado para todas as análises foi de 20 µL sob a temperatura de 24°C (± 2°C). Para a análise das metilxantinas, a separação foi realizada em uma coluna Brownlee® Choice C₈ (150 x 4.6 mm i.d.; 5µm) PerkinElmer® e a fase móvel utilizada foi uma mistura metanol e uma solução aquosa de hidróxido de amônio a 0,2% nas proporções de 20:80 v/v respectivamente, a um fluxo constante de 0,9 mL min⁻¹. Para a análise do ácido clorogênico, a separação foi realizada em uma coluna Brownlee® Choice C₁₈ (250 x 4.6 mm i.d.; 5µm) e a fase móvel consistiu de um gradiente combinando acetonitrila (A) e solução aquosa de ácido acético 1%, com pH ajustado para 3.0 (B) nas seguintes condições: 0-25 minutos, gradiente linear de A-B (8:92 v/v) para A-B (10:90 v/v); 25-35 minutos, isocrático A-B (10:90 v/v). A fase móvel foi preparada diariamente e desgaseificada através de sonicação antes da utilização. Os cromatogramas foram adquiridos no comprimento de onda de 280 e 320 nm para metilxantinas e ácido clorogênico, respectivamente, enquanto os espectros de UV foram monitorados na faixa de 200 - 450 nm. Os picos foram caracterizados através da comparação do tempo de retenção, pelo espectro de UV das substâncias de referência, e através de co-injeção com substâncias de referência. As soluções padrão para confecção da curva analítica foram preparadas em diferentes faixas: Cafeína, 0,625–400 µg.mL⁻¹, teobromina, 0,312–75 µg.mL⁻¹ e ácido clorogênico 0,625–50 µg.mL⁻¹. Os extratos foram analisados a uma concentração de 2,0 mg.mL⁻¹ para a análise de metilxantinas e a 4,0 mg.mL⁻¹ para a análise do ácido clorogênico. Todas as análises foram realizadas em triplicata. As quantificações foram realizadas através de três curvas de calibração de sete pontos na faixa acima descrita, com valores de coeficiente linear (r²) maiores que 0,999. Os resultados foram expressos em miligramas do composto por grama de extrato (mg composto . g⁻¹ E).

4.5 Análise dos teores de fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais (TFT) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Medina (2011 a,b) a qual é baseada na interação direta entre polifenóis com o sal de diazônio *Fast Blue BB*. Foram preparadas sete soluções aquosas de ácido clorogênico na faixa de 10-150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a 1,0 mL de cada uma foram adicionadas alíquotas de 0,10 mL do reagente *Fast Blue BB* a 0,1%. Os tubos foram homogêneos por um minuto e alíquotas de 0,10 mL de NaOH 5% foram adicionados em todos os tubos. A reação permaneceu à temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) por 90 minutos e as absorvâncias foram medidas a 420 nm em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer® no intuito de se obter a curva analítica ($r^2 = 0,999$). O TFT dos extratos de *I. paraguariensis* foi obtido através do procedimento descrito acima, exceto pelo fato de que cada amostra foi analisada frente a um branco contendo somente a amostra para medir a interferência a 420 nm de compostos naturais não-fenólicos. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como miligramas equivalentes de ácido clorogênico por grama de extrato (mg EAC . g^{-1} E).

4.6 Capacidade de captação de radicais livres

A capacidade de captação de radicais livres foi realizada de acordo com o método do DPPH previamente descrito por Brand-Williams et al. (1995). Brevemente 100 μL de quatro concentrações diferentes de cada extrato foram adicionados a 3,90 mL de uma solução metanólica de DPPH (60 μM). As absorvâncias foram medidas a 515 nm em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®. A porcentagem de DPPH residual foi calculada e plotada frente à concentração da amostra no intuito de se obter os valores de EC_{50} , a qual é definida como a concentração antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH, e foi expressa em g de extrato por grama de DPPH ($\text{g}\cdot\text{g DPPH}^{-1}$). O ácido clorogênico foi utilizado como controle positivo. As análises foram realizadas em triplicata.

4.7 Validação dos procedimentos analíticos

Os procedimentos analíticos foram validados de acordo com Cass; Degani (2001) e ICH (2005). Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD).

4.8 Análise estatística

Os dados estão expressos como valores das médias \pm desvio padrão. Para a determinação dos valores de EC_{50} , foram usadas regressões lineares obtidas de curvas dose-resposta. Diferenças entre os tratamentos foram comparadas por Análise de variância (ANOVA de duas vias), considerando a intensidade luminosa e a idade das folhas como fatores independentes e fixos, seguida por Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação dos procedimentos analíticos por CLAE

A validação de métodos analíticos é parte essencial no desenvolvimento destes, fornecendo uma evidência documentada de que o método é confiável para aquilo que se aplica (LANÇAS, 2008). Neste trabalho, por se tratar de métodos analíticos que empregam matrizes vegetais, a validação consistiu em uma série de procedimentos onde os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de quantificação e limite de detecção (CASS; DEGANI, 2001; ICH, 2005). Os parâmetros avaliados estiveram de acordo com o preconizado pela literatura (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros validados nos métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de cafeína, teobromina e ácido clorogênico em extratos aquosos de *I. paraguariensis*.

Composto	Precisão ^a				Exatidão ^b (Recuperação)		LQ ^c ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LD ^c ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	Repetibilidade		Precisão intermediária		Média (%)	D.P.R. (%)		
	Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	D.P.R. (%)	Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	D.P.R. (%)				
Cafeína	0,625	3,96	100,00	1,52	99,8	1,74	0,625	0,10
	100,00	0,97						
	400,00	1,35						
Teobromina	0,3125	4,08	15,00	0,87	101,3	1,33	0,3125	0,10
	15,00	1,26						
	75,00	1,85						
Ácido Clorogênico	0,625	3,05	15,00	1,64	100,9	1,97	0,625	0,3125
	15,00	1,12						
	50,00	2,31						

^a: Limite: Desvio Padrão Relativo (D.P.R.) < 5%

^b: A porcentagem de recuperação foi determinada através da injeção em triplicata de amostras contaminadas com soluções de referência.

^c: LQ = limite de quantificação; LD = limite de detecção

5.2 Teores de metilxantinas em *Ilex paraguariensis*

Nas condições cromatográficas empregadas para análise das metilxantinas, teobromina e cafeína apresentaram tempos de retenção de 3,1 e 9,1 minutos, respectivamente. A figura 7 apresenta o cromatograma de metilxantinas em folhas de brotação da amostra dois de *I. paraguariensis*. Cabe ressaltar que, de acordo com a maioria dos trabalhos existentes na literatura (BALTASSAT et al., 1984; CLIFFORD & RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; FILIP et al., 1998; REGINATTO et al., 1999; ATHAYDE et al., 2000; COELHO et al., 2007), a teofilina não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas.

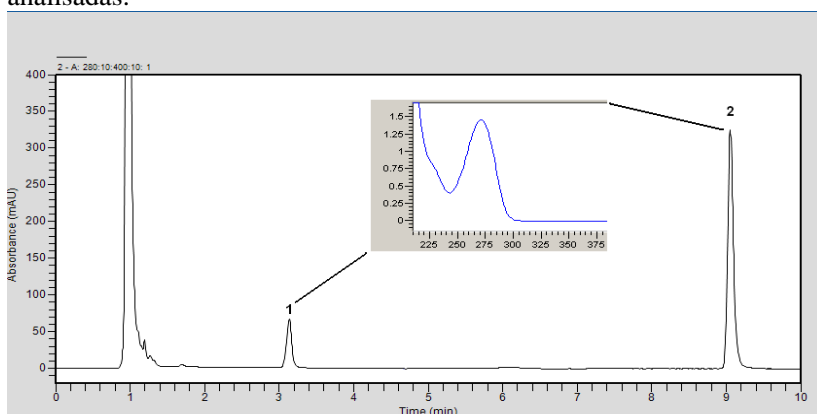


Figura 7: Cromatograma do extrato aquoso das folhas de brotação da amostra 2 de *I. paraguariensis* (2 mg.mL⁻¹) por CLAE-DAD com detecção em 280 nm. 1 = Teobromina; 2 = Cafeína

A análise dos dados permite afirmar que há grande variabilidade nos teores de cafeína e teobromina de cada indivíduo analisado nesta população de *I. paraguariensis*, tanto para os que estão expostos à alta intensidade luminosa (Apêndice 1), quanto aqueles que encontram-se sombreados (Apêndice 2). Isto pode ser claramente exemplificado pelos indivíduos dez e onze, cujos teores de cafeína em folhas de brotação são de 133,98 e 46,71 mg.g⁻¹, respectivamente. Comparando-se os teores de teobromina nas mesmas folhas de brotação, nestes mesmos indivíduos, também foi possível verificar esta variabilidade, porém o indivíduo dez apresentou o menor teor (3,07 mg.g⁻¹), enquanto o indivíduo 11 apresentou o maior teor entre os indivíduos, o qual foi de 18,15 mg.g⁻¹. Athayde et al. (2007) também observaram uma alta amplitude dos teores de metilxantinas entre

indivíduos de uma mesma população de erva-mate e também entre diferentes populações. Em alguns casos, a variação detectada pelos autores entre os teores de cafeína de plantas da mesma população chegou a mais de 100 vezes.

Do ponto de vista estatístico, através da análise empregada (ANOVA de duas vias e Teste de Tukey) pode-se verificar que a intensidade da luminosidade não exerce influência estatisticamente significativa ($P > 0.05$) nos teores de cafeína, teobromina e metilxantinas totais (Figuras 8, 9 e 10).

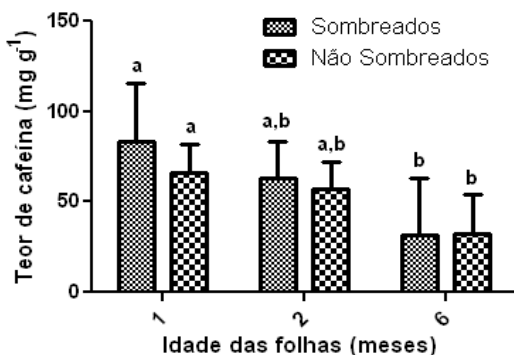


Figura 8: Gráfico da média dos teores de cafeína dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades de todos os indivíduos. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Teste de Tukey, $P < 0.05$).

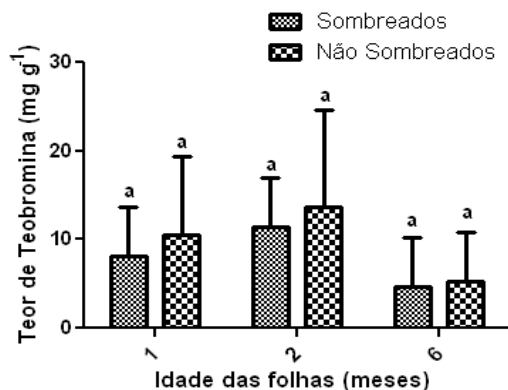


Figura 9: Gráfico da média dos teores de teobromina dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades de todos os indivíduos. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Teste de Tukey, $P < 0.05$).

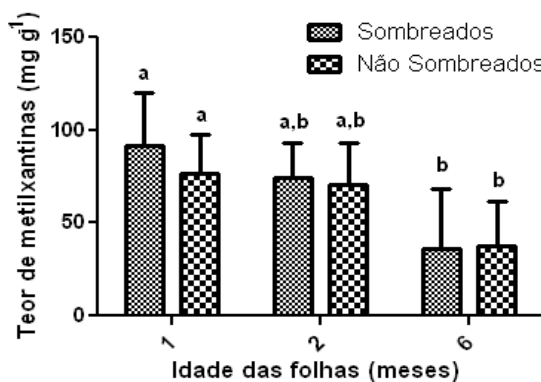


Figura 10: Gráfico da média dos teores de metilxantinas totais dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades de todos os indivíduos. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Teste de Tukey, $P < 0.05$).

Os dados da literatura neste sentido são controversos, uma vez que Dartora et al. (2011) relataram teores mais altos de teobromina e cafeína em folhas expostas ao sol quando comparadas às sombreadas. Por outro lado, Mazzafera (1994) comparando as folhas de um mesmo indivíduo de erva-mate verificou que as folhas mais sombreadas apresentam teores mais elevados de metilxantinas. Coelho et al. (2007) em um experimento envolvendo sombreamento artificial de *I.*

paraguariensis evidenciou um aumento significativo nos teores de teobromina quando comparadas às plantas expostas à luminosidade. Neste mesmo estudo, os autores também avaliaram os efeitos da luminosidade nos teores de metilxantinas em indivíduos sombreados naturalmente, e verificaram nestas plantas, um aumento significativo de cafeína com o sombreamento. Adicionalmente, Esmelindro et al. (2004) encontraram diferenças significativas entre os teores de metilxantinas, sendo que amostras de folhas que recebiam baixa intensidade luminosa apresentaram os maiores teores destes metabólitos.

Os dados obtidos em nosso estudo não confirmam as proposições destes autores citados anteriormente, as quais podem ser embasadas na teoria do balanço entre carbono/nutrientes proposta por Bryant et al. (1983), com exceção do estudo de Dartora et al. (2011). De acordo com esta teoria, condições ambientais capazes de limitar a fotossíntese diminuem a produção de substâncias não-nitrogenadas, enquanto a produção de substâncias nitrogenadas é favorecida. O interior das florestas, onde o sombreamento das árvores dos estratos superiores diminui a intensidade de luz disponível para as plantas nos estratos intermediários e inferiores, é uma das situações onde se verifica estas condições ambientais desfavoráveis. Entretanto, este fato não é observado para diversas espécies vegetais, sendo que em alguns casos, o teor de substâncias como os alcaloides, pode aumentar em condições de maior luminosidade (JANSEN; STAMP, 1997; RALPHS et al., 1998; HÄGELE; ROWELL-RAHIER, 1999).

Por suas características biológicas e ecológicas, a erva-mate é considerada uma planta tolerante à sombra (FLOSS, 1994; COELHO; MARIATH, 1996; COELHO et al. 2000). As espécies tolerantes à sombra apresentam uma série de adaptações às condições de sub-bosque, incluindo as suas defesas contra insetos desfolhadores (COLEY, 1987). Coelho et al. (2007) verificaram que um aumento acentuado (ecologicamente significativo) de cafeína e teobromina ocorre somente a partir de um determinado nível de sombreamento.

Por outro lado, a idade das folhas demonstrou exercer influência significativa nos teores de cafeína e metilxantinas totais ($P < 0.05$), embora não para a teobromina. Analisando-se a média do conjunto de todos os indivíduos, fica evidente que há uma tendência de diminuição na produção de cafeína e metilxantinas totais ao longo do tempo, uma vez que os teores são menores em folhas de seis meses, intermediários em folhas de dois meses e maiores em folhas de brotação. Apesar de apresentarem esta tendência de diminuição, diferenças significativas nestes teores foram evidenciadas apenas entre folhas de brotação e de

seis meses. Já a teobromina não segue o mesmo padrão, pois teores mais elevados são encontrados em folhas de dois meses (Figura 9).

A influência da idade e desenvolvimento da planta no teor de metabólitos produzidos, assim como nas proporções relativas destes constituintes químicos já foi demonstrada por diversos autores, para diferentes espécies vegetais (BOWERS; STAMP, 1993; HENDRIKS et al., 1997; HÖFT; VERPOORTE; BECK, 1998; DOAN; ERVIN; FELTON, 2004). Apesar de Hartmann (1996) afirmar que tecidos mais novos geralmente possuem maior taxa biossintética de metabólitos, é importante enfatizar também, que embora a atividade metabólica seja elevada em períodos de crescimento tecidual rápido, frequentemente há uma correlação inversa com a produção de aleloquímicos (LILOV; ANGELOVA, 1987; WATERMAN; MOLE, 1989).

Em que pese a influência da idade seja bastante descrita para outras espécies, não há uma conclusão geral aplicável a todas as espécies vegetais, e nem estudos suficientes neste sentido com a espécie *I. paraguariensis*. Alguns autores já demonstraram a influência da idade das folhas na erva-mate. Mazzafera (1994) além de encontrar teores mais elevados de metilxantinas em folhas sombreadas, também encontrou teores mais elevados de cafeína em folhas mais novas. Esmelindro et al. (2004) encontraram um teor significativamente maior de cafeína e teobromina em folhas com seis meses em relação à folhas mais velhas. Mais recentemente, Dartora et al. (2011) avaliaram amostras de *I. paraguariensis* submetidas a diferentes condições de crescimento, tratamento e idade quanto aos teores de metilxantinas. Os resultados não evidenciaram diferenças significativas nos teores de metilxantinas entre folhas de brotação e seis meses.

Alguns estudos com erva-mate existentes na literatura avaliaram a influência da época de colheita no teor de metilxantinas. Schubert et al. (2006) encontram conteúdos significativamente elevados de metilxantinas na primavera e início do verão. Resultados semelhantes foram obtidos por Coelho et al. (2001), ao analisarem amostras de *I. paraguariensis* coletadas no estado do Paraná em duas épocas diferentes.

Coelho; Mariath (1996) constataram que a principal brotação em *I. paraguariensis* ocorre em fins de setembro e outubro, sendo que em algumas plantas, pode ocorrer uma brotação entre fevereiro e março. Os resultados obtidos por Athayde (2000), Coelho et al. (2001) e Schubert et al. (2006), podem ser explicados, em parte, pela idade das folhas, já que resultados experimentais indicam que a biossíntese de

cafeína em *Ilex* ocorre somente em folhas jovens (ASHIHARA, 1993). Dessa forma, os altos teores de metilxantinas identificados no verão podem ser atribuídos às folhas jovens, em desenvolvimento, pois os resultados do final de outono e inverno podem indicar folhas mais velhas, maduras, e com baixa atividade biossintética. Os dados apresentados em nosso trabalho corroboram esta teoria, uma vez que os teores de cafeína e metilxantinas totais apresentaram uma significativa redução com o envelhecimento das folhas.

Dessa forma, a idade das folhas, pode influenciar as características da matéria-prima e por consequência, de seus produtos industrializados.

5.3 Teores de ácido clorogênico em *Ilex paraguariensis*

A figura 11 apresenta o cromatograma do extrato aquoso das folhas de brotação da amostra dois de *I. paraguariensis*. O ácido clorogênico, cujo tempo de retenção foi de 13,0 min, foi detectado em todas as amostras analisadas neste trabalho, entretanto, em algumas delas apresentou teores abaixo do limite de quantificação (Apêndices 1 e 2). Também é possível visualizar no cromatograma (Figura 11), a existência de um pico com tempo de retenção de 7,1 minutos, cujo espectro na região UV é característico de ácido fenólico, o qual é majoritário em relação aos demais picos detectados no cromatograma. Embora o ácido clorogênico seja apontado como responsável por inúmeras atividades farmacológicas da erva-mate, nossos dados permitem questionar a escolha do ácido clorogênico, por diversos autores, como marcador químico da espécie (ANESINI; FERRARO; FILIP, 2006; PRUDÊNCIO et al., 2012; ANESINI et al., 2012).

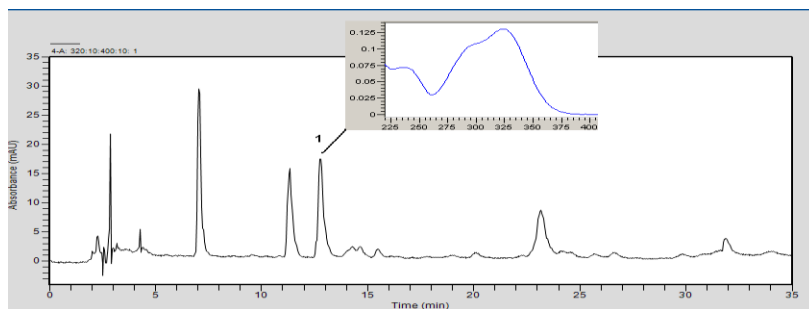


Figura 11: Cromatograma do extrato aquoso das folhas de brotação da amostra 2 de *I. paraguariensis* ($4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) por CLAE-DAD com detecção em 320 nm. 1 = Ácido Clorogênico.

A análise dos dados permite afirmar que há grande variabilidade nos teores de ácido clorogênico de cada indivíduo analisado, com exceção das folhas de dois meses de idade, cujos teores de ácido clorogênico variaram em uma faixa menor que as de brotação e seis meses. Esta variabilidade manifestou-se tanto para os indivíduos que estão expostos à alta intensidade luminosa (Apêndice 1), quanto àqueles que se encontram sombreados (Apêndice 2). O teor de ácido clorogênico em folhas de seis meses de idade no indivíduo um, por exemplo, foi de $0,59 \text{ mg.g}^{-1}$, enquanto o indivíduo dois apresentou teor de $10,60 \text{ mg.g}^{-1}$, o que significa um teor quase 20 vezes superior.

Outros autores já reportaram esta variabilidade no teor de ácido clorogênico em amostras de erva-mate. Clifford; Ramirez-Martinez (1990) verificaram que entre as amostras de folhas oriundas de diversos países, o ácido 5-cafeoilquínico foi o composto majoritário em duas amostras, sendo que nas demais, os compostos detectados em maiores quantidades foram os ácidos clorogênico e 3,5-dicafeoilquínico. Mazzafera (1997), ao preparar infusões de 18 amostras de folhas de *I. paraguariensis* provenientes de diferentes locais de cultivo, evidenciou grandes variações nos teores de cafeína, ácido clorogênico e ácido caféico em todas as amostras avaliadas.

A questão da influência da luminosidade no teor de ácido clorogênico presente nas folhas de *I. paraguariensis* já foi estudada por Heck et al. (2008) e Dartora et al. (2011). Heck et al. (2008) encontraram um aumento significativo no teor deste metabólito em amostras cultivadas na forma de monocultura, ou seja, diretamente expostas ao sol em relação às cultivadas sob vegetação. Resultados semelhantes foram verificados por Dartora et al. (2011), os quais encontraram um aumento da produção de ácido clorogênico e seus derivados em todas as amostras submetidas à alta incidência de luminosidade em relação a amostras sombreadas, comparando ainda a influência da luminosidade em amostras *in natura*, secas e tostadas e em folhas jovens e maduras.

No que tange a influência da luminosidade nos teores de ácido clorogênico em outras espécies, Oh et al. (2009) encontrou um aumento significativo nestes teores em amostras de alface submetidas à alta intensidade de luminosidade. Todos estes resultados corroboram uma correlação já bem estabelecida na literatura entre compostos fenólicos e luminosidade (WATERMAN & MOLE, 1994; CUADRA; HARBORNE; WATERMAN, 1997; TATTINI et al., 2004).

Entretanto, a análise dos dados obtidos em nosso trabalho não permite inferir que a intensidade da luminosidade exerce influência significativa ($P > 0.05$) nos teores de ácido clorogênico (Figura 12). Este fato talvez possa ser justificado pelo número pequeno de amostras avaliadas e pela grande variabilidade dos teores encontrados entre estes indivíduos (Apêndices 1 e 2).

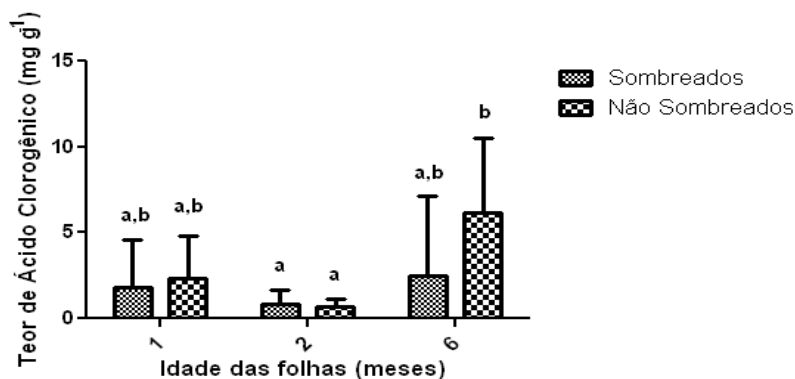


Figura 12: Gráfico da média dos teores de ácido clorogênico dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades de todos os indivíduos. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Teste de Tukey, $P < 0.05$).

Por outro lado, a análise estatística evidenciou que a idade das folhas exerce influência significativa ($P < 0.05$) no teor de ácido clorogênico. É possível observar que há uma tendência de aumento na produção de ácido clorogênico do segundo para o sexto mês de desenvolvimento, sendo estatisticamente significativo ($P < 0,05$) para os indivíduos expostos à alta luminosidade, embora o mesmo não seja verificado para os sombreados.

5.4 Teores de compostos fenólicos totais em *Ilex paraguariensis*

A determinação dos teores de compostos fenólicos totais nos extratos aquosos de erva-mate foi realizada através do método do Sal de diazônio *Fast Blue BB*, desenvolvido recentemente por Medina (2011a,b). Este método é rápido e simples e está fundamentado na ligação de compostos fenólicos com o sal de diazônio resultando na formação de complexos “azo”. O sal *Fast Blue BB* contém um grupo diazônio, onde o nitrogênio é retido na ligação com o grupo ativador (-OH) do composto fenólico. Este acoplamento ocorre em soluções levemente alcalinas onde os fenólicos podem ser convertidos a íons

fenóxido. A Figura 13 mostra como ocorre este acoplamento nos ácidos caféico e clorogênico.

Em relação ao método de Folin and Ciocalteu (1927), o qual é a técnica mais descrita na literatura para a determinação de compostos fenólicos totais, o método utilizado em nosso trabalho tem como vantagem a não interferência de compostos não fenólicos e substâncias redutoras (ácido ascórbico, glicose, frutose, sulfitos) comumente presentes em frutas, vegetais, sucos e aditivos alimentícios. Adicionalmente, alguns aminoácidos (tirosina e triptofano) e proteínas também formam a coloração azul com o reagente de Folin-Ciocalteu (PETERSON, 1979, 1983).

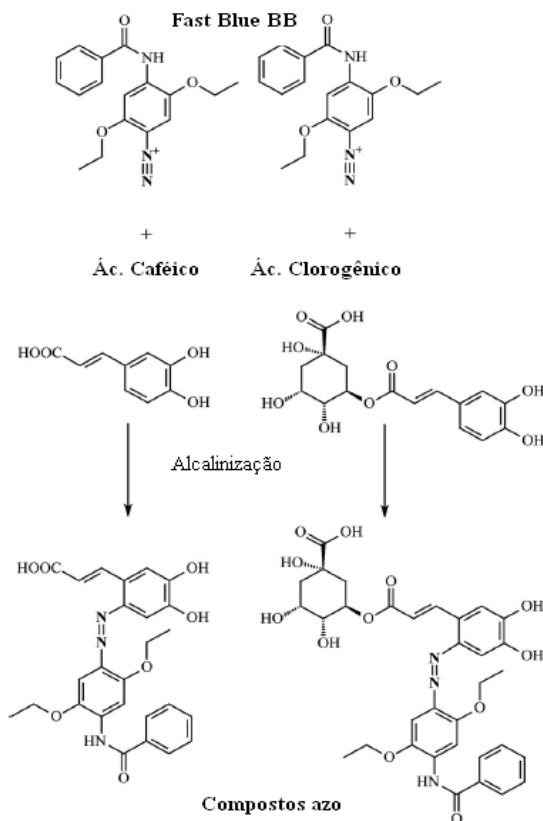


Figura 13: Interações propostas entre o sal Fast Blue BB e os ácidos fenólicos, caféico e clorogênico em solução tampão NaOH, adaptado de Medina (2011b).

Os resultados obtidos demonstram uma alta concentração de compostos fenólicos nas amostras de erva-mate avaliadas, confirmando os inúmeros dados existentes na literatura, os quais reportam elevados teores destes compostos, principalmente derivados cafeoilquínicos. Filip et al. (2001) encontraram maiores teores destes compostos em *I. paraguariensis*, quando comparados às outras sete espécies, tendo sido detectada uma concentração de 9,6% de derivados fenólicos no extrato seco e de 0,06% de flavonoides. Marques; Farah (2009) demonstraram que em erva-mate há em média 55% de derivados cafeoilquínicos nas folhas verdes e 73% nas folhas tostadas além de haver semelhança entre os teores destes compostos nos extratos aquosos e nos extratos metanólicos. Adicionalmente, Bracesco et al. (2003) encontraram uma concentração de compostos fenólicos três vezes superior ao teor destes compostos em chá-verde.

Por outro lado, os resultados mostram que igualmente ao que ocorre com os teores de metilxantinas e de ácido clorogênico, há grande variabilidade nos teores de compostos fenólicos nas plantas quando analisadas individualmente. É possível observar que tanto para o grupo de indivíduos sombreados (Apêndice 2) quanto para aqueles expostos à alta intensidade luminosa (Apêndice 1) ocorrem variações de até três vezes no teor de fenólicos totais. Esse perfil fica evidente quando comparamos as folhas de seis meses dos indivíduos dois e três de *I. paraguariensis*, expostos à maior luminosidade, cujos teores são de 217,52 e 75,27 mg g⁻¹, respectivamente.

Ainda analisando as plantas individualmente, verifica-se para todos os indivíduos expostos à alta luminosidade (Apêndice 1), uma redução nos teores de compostos fenólicos ao longo do tempo de desenvolvimento das folhas. Já os indivíduos sombreados (Apêndice 2), não apresentam o mesmo comportamento, pois embora os exemplares oito, dez e 11 demonstrem diminuição nos teores destes metabólitos, os indivíduos seis, sete e nove possuem um aumento nos teores de fenólicos totais em folhas de dois meses, sendo que os menores teores são encontrados em folhas mais velhas (seis meses).

Entretanto, quando avaliamos a média do conjunto de todos os indivíduos, fica evidente que há uma diminuição na produção de compostos fenólicos ao longo do tempo, uma vez que os teores são maiores em folhas de brotação, intermediários em folhas de dois meses e menores em folhas de seis meses (Figura 14). Sendo assim, a idade das folhas exerce influência significativa ($P < 0.05$) nos teores de fenólicos totais, enquanto a intensidade da luminosidade não exerce tal influência ($P > 0.05$).

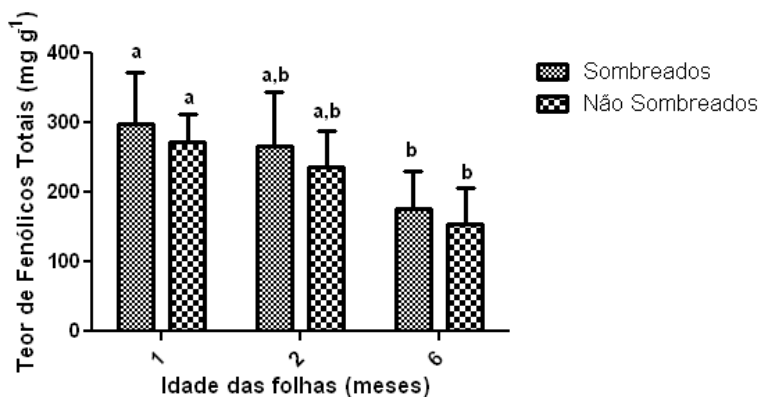


Figura 14: Gráfico da média dos teores de fenólicos totais dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades de todos os indivíduos. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Teste de Tukey, $P < 0.05$).

A influência da luminosidade no teor de compostos fenólicos presentes nas folhas de *I. paraguariensis* já foi estudada por alguns autores, sendo que os resultados, novamente não são confirmados em nosso trabalho. Rachwal et al. (2000), inferiram que a quantidade de compostos fenólicos na erva-mate diminui com o aumento do sombreamento. Em um experimento com sombreamento artificial, os autores encontraram uma diminuição significativa de dez por cento nos teores de compostos fenólicos quando a intensidade luminosa foi reduzida em 38%. Comparando os teores de ácidos fenólicos em amostras diretamente expostas ao sol, cultivadas sob a forma de monocultura, em relação às cultivadas sob vegetação nativa, Heck et al. (2008) também encontraram um aumento significativo no teor de ácidos fenólicos. Da mesma forma, Dartora et al. (2011) também obtiveram resultados semelhantes avaliando amostras de *I. paraguariensis* submetidas a diferentes condições de crescimento, tratamento e idade. Os resultados encontrados pelos autores mostraram que os extratos aquosos das plantas da população cultivada sob a forma de monocultura, diretamente exposta ao sol, exibiram teores superiores de compostos fenólicos quando comparadas com amostras da população sombreada.

No entanto, Dartora et al. (2011) não evidenciaram diferenças significativas nos teores de compostos fenólicos entre folhas de um e seis meses, contrariando novamente os resultados obtidos neste trabalho,

onde há uma diminuição significativa ($P < 0.05$) nos teores destes metabólitos entre folhas de brotação e folhas de seis meses.

Chama a atenção o fato de que os dados permitem observar uma relação inversa entre os teores de ácido clorogênico e fenólicos totais em relação à idade das folhas. Enquanto o ácido clorogênico apresenta um aumento, o teor de fenólicos totais reduz ao longo do tempo.

Outro aspecto a ser abordado é o fato de Waldhauser; Baumann (1996) terem demonstrado uma interação metabólica na síntese de cafeína e dos ACQ e dicafeoilquínicos, através de uma correlação significativa encontrada entre os teores destas substâncias. Nossos resultados demonstraram não haver correlação ($P > 0,05$) entre os teores de cafeína e ácido clorogênico nas amostras avaliadas. Entretanto, esta correlação se apresenta diretamente significativa ($P = 0,0008$) e linear ($r^2 = 0,953$), quando correlacionamos os teores de cafeína com os teores de fenólicos totais das plantas agrupadas (idade da folha x incidência de luminosidade). Embora a técnica utilizada para doseamento de fenólicos totais não seja seletiva e específica para os ACQ e dicafeoilquínicos, sabe-se que estas são as principais substâncias da classe dos compostos fenólicos presentes na erva-mate.

5.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), que consiste basicamente na capacidade de captura do radical livre DPPH pelas substâncias antioxidantes presentes na amostra. Quando o elétron desemparelhado do radical DPPH emparelha com o hidrogênio de um antioxidante estabilizador de radical livre formando o DPPH-H reduzido, a coloração violeta passa para o amarelo, conforme demonstrado na Figura 15. Neste método, os radicais de DPPH, que absorvem a 515 nm são, em parte, neutralizados pelos compostos antioxidantes, o que resulta na redução da absorbância do sistema reacional.

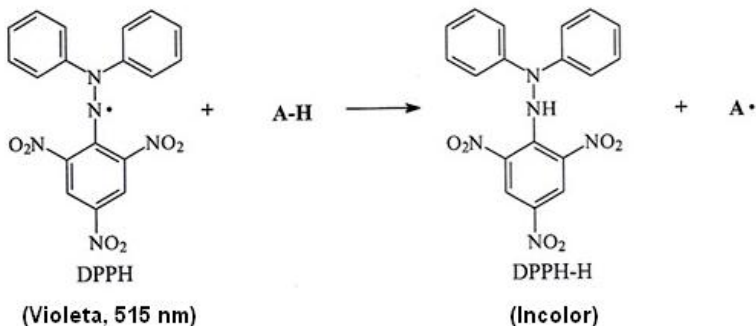


Figura 15: Esquema representativo da neutralização do radical DPPH por um hidrogênio de um antioxidante.

Os valores de EC_{50} demonstraram grande variabilidade entre os indivíduos estudados, variando numa faixa de 6,32 a 265,48 g.g DPPH⁻¹ (Apêndices 1 e 2). Estatisticamente foi possível observar que a idade das folhas influencia na capacidade de captura de radicais livres de forma significativa ($P < 0,05$), sendo que há um aumento significativo nesta capacidade ao longo do tempo nos indivíduos sombreados. Por outro lado, a luminosidade novamente não apresentou influência (Figura 16).

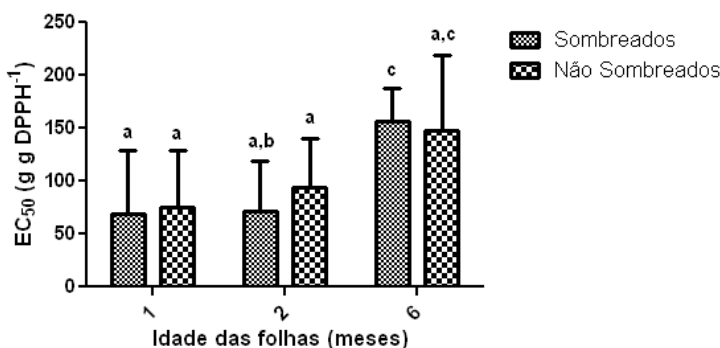


Figura 16: Gráfico da média dos valores de EC_{50} dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades dos 11 indivíduos de erva-mate. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Teste de Tukey, $P < 0.05$).

É possível observar uma correlação inversa entre teor de fenólicos totais e valores de EC_{50} , pois quanto maior o teor de compostos fenólicos, menor a concentração necessária para reduzir em 50% a quantidade de DPPH no meio reacional. Do ponto de vista da ecologia química, é interessante avaliar os indivíduos em sua totalidade,

para facilitar o entendimento da forma como as plantas respondem individualmente a estes fatores. Nesta abordagem, uma correlação significativa ($P = 0,0019$) é verificada, porém com um coeficiente de correlação linear baixo ($r^2 = 0,272$) (Figura 17).

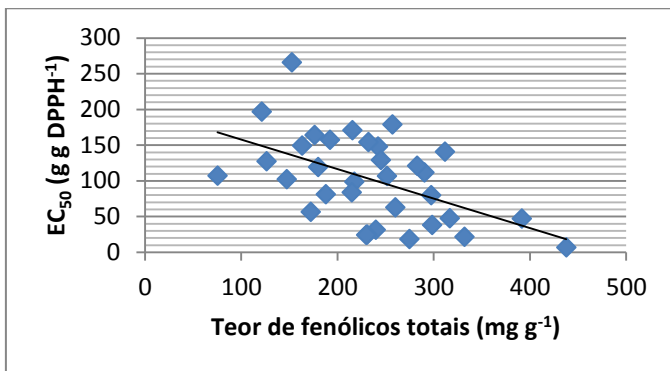


Figura 17: Gráfico da correlação entre teor de compostos fenólicos e valores de EC_{50} dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades das 11 plantas de erva-mate consideradas individualmente ($r^2 = 0,272$) ($P = 0,0019$).

Do ponto de vista industrial e farmacêutico, torna-se necessário um enfoque que leve em consideração a constância nas propriedades da matéria-prima vegetal a ser utilizada na preparação de produtos alimentícios, e formas farmacêuticas intermediárias e cosméticas. Dessa forma, quando as plantas são agrupadas (idade da folha x incidência de luminosidade), esta correlação se mostra tão efetiva quanto a abordagem anterior ($P = 0,0022$), porém se apresenta de forma mais linear ($r^2 = 0,9246$) (Figura 18).

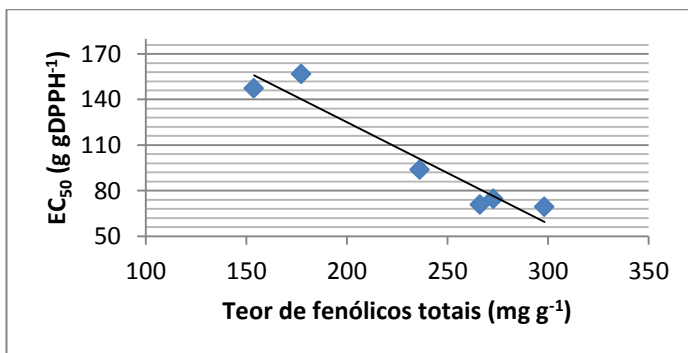


Figura 18: Gráfico da correlação entre teor de compostos fenólicos e valores de EC₅₀ dos extratos aquosos das folhas de diferentes idades da média dos 11 indivíduos de erva-mate, separados por idade da folha e intensidade da luminosidade ($r^2 = 0,9246$) ($P = 0,0022$).

A potente atividade antioxidante de extratos de erva-mate já foi demonstrada por inúmeros autores, assim como sua correlação com os teores de compostos fenólicos.

Utilizando diferentes sistemas geradores de radicais livres, Schinella et al. (2000) concluíram que o extrato aquoso de *I. paraguariensis* foi capaz de inibir a peroxidação lipídica enzimática e não enzimática em microsomas de fígado de rato de forma dose-dependente. O extrato inibiu também a peroxidação induzida por peróxido de hidrogênio das membranas das células vermelhas sanguíneas e exibiu propriedades de captação de radicais em relação ao ânion superóxido e ao radical DPPH. Utilizando a mesma metodologia do radical DPPH, Bixby et al. (2005) encontraram correlação positiva direta entre atividade antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos, sendo esta atividade maior para os extratos aquosos de erva-mate em comparação ao chá-verde e chá-preto (*Camelia sinensis*), marcela (*Achyrocline satureoides*) e alguns tipos de vinhos tintos e brancos.

O estudo da erva-mate quanto à sua habilidade em captar espécies reativas de oxigênio (ERO) tem sido correlacionado com a atividade tipo peroxidase, a qual é diretamente proporcional aos teores de compostos fenólicos de *I. paraguariensis*. Do ponto de vista biológico, isto significa que estes metabólitos atuam de maneira similar às 293 enzimas antioxidantes naturais, podendo prestar grande ajuda neste mecanismo de defesa. (ANESINI; FERRARO; FILIP, 2006). Neste ano, Anesini et al. (2012) demonstraram que os ácidos clorogênico e caféico e o flavonoide rutina presentes nos extratos

aquosos das amostras de *I. paraguariensis* investigadas, contribuem diretamente para a atividade antioxidante detectada para a espécie através da captação de radicais DPPH e prevenção da peroxidação lipídica.

A oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) induzida por radicais livres, por exemplo, desempenha papel importante na aterosclerose. Neste contexto, extratos aquosos de *I. paraguariensis* tem demonstrado capacidade de inibição da oxidação de LDL, inibindo assim a peroxidação lipídica e, por consequência, a oxidação de DNA (GUGLIUCCI; STAHL 1995; GUGLIUCCI 1996; BRACESCO et al., 2003). Anesini et al. (2012), além de verificarem o papel dos ácidos clorogênico e caféico e do flavonoide rutina, conforme citado anteriormente, também verificaram que a metilxantina cafeína não apresenta atividade de captação de radicais livres, e ainda induz a peroxidação lipídica do ácido linoléico, atuando como um composto pro oxidante.

Embora não tenha sido testada a atividade de captação de radicais DPPH da cafeína isoladamente, nossos dados revelaram uma correlação significativa ($P = 0,0048$) entre os teores de cafeína e a atividade antioxidante detectada. Esta correlação pode ser explicada pelos teores de fenólicos totais, os quais se correlacionam diretamente com os teores de cafeína. Sendo assim, a atividade detectada provavelmente está associada aos teores de compostos fenólicos e não aos teores de cafeína. A questão da prevenção da peroxidação lipídica, na qual a cafeína é apontada como um composto pro oxidante, permanece sem esclarecimentos em nosso trabalho, uma vez que a atividade antioxidante não foi avaliada através do método do Tiocianato Férrico, e sim pelo método do DPPH. Dessa forma, não é possível afirmar qual o papel da cafeína presente nas amostras avaliadas na prevenção desta peroxidação lipídica.

Apesar dos inúmeros estudos realizados *in vitro*, o primeiro estudo em humanos sobre a capacidade antioxidante em *I. paraguariensis* foi realizado por De Moraes et al. (2009). Os autores mostraram uma redução dos níveis de LDL e um aumento nos níveis de HDL em indivíduos com dislipidemia, tratados por dois meses com extrato aquoso de *I. paraguariensis*. Os autores também mostraram que o extrato promoveu uma redução adicional dos níveis de LDL em indivíduos em terapia com estatinas, sugerindo que a bebida pode ser usada para reduzir as doses utilizadas de estatina.

O colesterol HDL é o principal transportador de uma enzima antioxidante chamada paraoxonase 1 (PON1), a qual protege o LDL da

oxidação e reduz a oxidação de macrófagos, sendo portanto, ateroprotetora. A atividade da PON1 pode ser significativamente reduzida pela oxidação do HDL pelo ácido hipoclorídico (HOCl). Este por sua vez, é liberado por neutrófilos e macrófagos, os quais abundam em lesões inflamatórias. Gugliucci et al. (2009a,b) mostraram que o ácido clorogênico protege a PON1 presente no HDL humano desta inativação causada pelas concentrações fisiológicas de ácido hipoclorídico.

Matsumoto et al. (2009) avaliaram os efeitos da suplementação com erva-mate em humanos na suscetibilidade plasmática à oxidação e na expressão gênica de enzimas antioxidantes. Os resultados encontrados pelos autores sugerem que o consumo regular de extratos aquosos de *I. paraguariensis* pode aprimorar as defesas antioxidantes por múltiplos mecanismos, não somente pelo aumento de compostos bioativos circulantes, mas também pelo aumento da regulação do maquinário enzimático celular para enfrentar o estresse oxidativo.

Apesar de o ácido clorogênico ser conhecidamente um composto antioxidante, inclusive tendo sido utilizado como controle positivo da técnica do DPPH ($EC_{50} = 13,84 \text{ g.g DPPH}^{-1}$), a atividade demonstrada pelos extratos de *Ilex paraguariensis* estudados neste trabalho parece estar mais intimamente relacionada com o teor de outros compostos fenólicos presentes nas amostras, uma vez que foi observada correlação da atividade antioxidante com o teor de fenólicos totais, porém não foi verificada tal correlação com os teores de ácido clorogênico. Adicionalmente, como já descrito no item 5.3, os teores de ácido clorogênico apresentaram grande variabilidade entre indivíduos, sendo detectado apenas traços em algumas amostras. Estes fatos sugerem que o ácido clorogênico possivelmente não seja o principal componente responsável pela atividade biológica detectada e, por consequência, pode não se caracterizar como um marcador químico eficiente para a espécie, no que tange a atividade antioxidante.

6 CONCLUSÕES

- A intensidade luminosa em condições naturais não altera significativamente os teores de cafeína, teobromina, ácido clorogênico e fenólicos totais em extratos aquosos dos indivíduos de uma população de *Ilex paraguariensis*.

- A atividade de captação de radicais livres dos extratos aquosos dos indivíduos de uma população de *Ilex paraguariensis* não é influenciada significativamente pela intensidade luminosa em condições naturais.

- A idade das folhas possui influência significativa nos teores de cafeína, metilxantinas totais, ácido clorogênico e fenólicos totais em extratos aquosos dos indivíduos de uma população de *Ilex paraguariensis*.

- Os teores de teobromina em extratos aquosos dos indivíduos de uma população de *Ilex paraguariensis* não são influenciados significativamente pela idade das folhas.

- A idade das folhas influencia significativamente a capacidade de captura de radicais livres em extratos aquosos de *Ilex paraguariensis*.

- Há uma correlação inversa significativa entre os valores de EC_{50} e os teores de compostos fenólicos totais.

- O ácido clorogênico não se caracterizou como um marcador químico eficiente para *Ilex paraguariensis* no que tange a atividade antioxidante avaliada.

7 REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. M. V. et al. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.84, p.415–419, 2006.

ALVES, H. D. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Técnicos de Química Nova na Escola**, v.3, p. 10-15, 2001.

ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. **Food Chemistry**, v.97 (3), p.459-464, 2006.

ANTONI, V. L. **Estrutura competitiva da Indústria Ervateira no Rio Grande do Sul**, Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

ARBISER, J. L. et al. Naturally occurring proteasome inhibitors from Mate tea (*Ilex paraguayensis*) serve as models for topical proteasome inhibitors. **Journal of Investigative Dermatology**, v.125, p. 207-212, 2005.

ASHIHARA, H. Purine metabolism and the biosynthesis of caffeine in maté leaves. **Phytochemistry**, v.33 (6), p.1427-1430, 1993.

ATHAYDE, M. L. **Metilxantinas e saponinas em quatro populações de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.; Triterpenos e saponinas em outras espécies do gênero *Ilex***. 2000. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2000.

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

ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E.P. Populational diversity on methylxanthines content of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., *Aquifoliaceae*). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.2, p.275-279, 2007.

ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, M. I. Purine alkaloids. *The alkaloids*, vol. 38, p. 225-323, Academic Press, Inc. BALTASSAT, F.; DARBOUR, N.; FERRY, S. Purine content of caffeine-containing plant products. I. *Ilex paraguariensis* (mate). **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v.18 (4), p.195-203, 1984

BASTOS, D. H. M. et al. Bioactive compounds content of Chimarrão infusions related to the moisture of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.3, p.399-404, 2006.

BASTOS, D. H. M. et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v.12, p.423-432, 2007.

BASTOS, D. H. M. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v.12, p.423-432, 2007.

BHARTI, A. K.; KHURANA, J. P. Mutants of *Arabidopsis* as tools to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, p. 765-776, 1997.

BIEZA, K.; LOIS, R. An *Arabidopsis* Mutant Tolerant to Lethal Ultraviolet-B Levels Shows Constitutively Elevated Accumulation of Flavonoids and Other Phenolics. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1105-1115, 2001.

BIXBY, M. et al. *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 Science**, v.77, p.345-358, 2005.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. Herbal medicine: expanded commission and monographs. **American Botanical Council**, p. 249-252, 2000.

BOWERS, M. D.; STAMP, N. E. Effects of plant age, genotype, and herbivory on *Plantago* performance and chemistry. **Ecology**, v. 74, p. 1778-1791, 1993.

BRACESCO, N. et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.9, p.379-387, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v.28 (1), p.25-30, 1995.

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

BRASIL, Lei n.7.439 de 8 de dezembro de 1980. Institui a Erva-Mate "*Ilex paraguariensis*" como árvore símbolo do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, dez 1980.

BRASIL, Lei n. 11.929, de 20 de junho de 2003. Institui o churrasco como "prato típico" e o chimarrão como "bebida símbolo" do Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. Porto Alegre, jun 2003.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, v.2, p. 546, 2010.

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.

BRYANT, J. P.; CHAPIN III, F. S.; KLEIN, D. R. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory (hare *Lepus capensis*). **Oikos**, v.40, (3), p. 357-368, 1983.

CARINI, M. et al. Characterization of phenolic antioxidants from Mate (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.12, p.1813-1819, 1998.

CARPANEZZI, A. A. Cultura da erva-mate no Brasil: conflitos e lacunas. In: WINGE,

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Florianópolis: Editora da UFSC/Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p. 519-536.

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: CNPF/ EMBRAPA, p. 280-287, 1994.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação**, ed. UFSCar: São Carlos, Brasil, 2001.

CHAPPELL, J.; HAHLBROCK, K. Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitor. **Nature**, v. 311, p. 76-78, 1984.

CHATTOPADHYAY, D.; NAIK, T. N. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure- activity relationship and scope. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.7, p. 275-301, 2007.

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

COELHO, G. C. et al. Efeito do sombreamento sobre a sobrevivência, morfologia e química da erva-mate. In: **II° CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA MATE. III° REUNIÃO TÉCNICA DE ERVA MATE**. 2000, Encantado/RS, Porto Alegre: Edição dos Organizadores, p. 396-399, 2000.

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**. 2002. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2002.

COELHO, G. C. et al. Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, n.2, p.75-80, 2007.

COELHO, G. C., ATHAYDE, M. L., SCHENKEL, E. P. Methylxanthines of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *vestita* Loes. and var. *paraguariensis*. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.37, (2), p.153-158, 2001.

COELHO, G. C.; MARIATH, J. E. A. Inflorescences morphology of *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*) species from Rio Grande do Sul, Brazil. **Feddes Repertorium**, v.107, n.1-2, p.19-30, 1996.

COLEY, P. D. Interspecific variation in plant anti-herbivore properties: the role of habitat quality and rate of disturbance. **New Phytologist**, v.106 (1 Supplement) , p.251-263, 1987.

CUADRA, P.; HARBORNE, J. B.; WATERMAN, P. G. Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteoalbum* in response to UV-B radiation. **Phytochemistry**, v. 45, p. 1377-1383, 1997.

DALL'IGNA, O.P. et al. Caffeine and adenosine A2a receptor antagonists prevent β -amyloid (25–35)-induced cognitive deficits in mice. **Experimental Neurology**, v.203, p.241–245, 2007.

DARTORA, N. et al. UPLC-PDA–MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**,v.129, p.453–1461, 2011.

DE MEJIA, E. G. et al. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v.2 (1) , p. 23-34, 2010

DE MEJIA, E. G. et. al. Effect of Yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1966-1973, 2005.

DE MEJIA, E. G. et. al.. 2010. Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **J. Functional Foods**, v.2, p.23 -34, 2010

DE MORAIS, E. C. et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.8316–8324, 2009.

DE SOUZA L. M. et al. Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: Development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7307– 7315, 2011.

DERMARDEROSIAN, A. The Review of Natural products. St Louis: Facts & Comparisons, p. 396-397, 2001.

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

DOAN, A. T.; ERVIN, G.; FELTON, G. Temporal effects on jasmonate induction of anti-herbivore defense in *Physalis angulata*: Seasonal and ontogenetic gradients. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 117-126, 2004.

ESMELINDRO, A. A. et al. Influence of Agronomic Variables on the Composition of Mate Tea Leaves (*Ilex paraguariensis*) Extracts Obtained from CO₂ Extraction at 30 °C and 175 bar. **J. Agric. Food Chemistry**, v.52, p.1990–1995, 2004

FERRÉ, S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. **Journal of Neurochemistry**, v.105, Issue 4, p.1067–1079, 2008.

FILIP, R. et al. Análisis de las hojas y tallos de *Ilex argentina* Lillo. I. Xantinas. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 2, p. 87-90, 1983.

FILIP, R. et al. Mate substitutes or adulterants: Study of xanthine content. **Phytotherapy Research**, v. 12 (2), p. 129-131, 1998.

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

FILIP, R.. et al. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72 (7), p. 774-778, 2001.

FILIP, R.. et. al. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibulatory glands. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.649-655, 2007.

FLOSS, P. A. **Variações genéticas entre populações naturais de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) avaliadas em Chapecó-SC e Três Barras-SC.** Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP.1994.

FOLIN, O.; & CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.73, p.627-650, 1927.

GASIOR, M. et al. Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically exposed to caffeine: effect of caffeine dose. **Journal Pharmacology and Experimental. Therapeutics**, v.295, p.1101-1111, 2000.

GIBERTI, G. C. Los parientes silvestres de la yerba mate y el problema de su adulteracion. **Dominguezia**, v.7, n.1, p.1-22, Buenos Aires, 1989.

GILANI, A. H.; RAHMAN, A. U. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.43-49, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, vol.30, n2, p.374-381, 2007.

GOSMANN, G. et al. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v.58, n.3, p.438-441, 1995.

GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; SELIGMANN, O. A new saponin from mate, *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v.52,

n.6, p.1367-1370, 1989.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. de M. B..
Biodiversidade: um enfoque químico-biológico. Rio de Janeiro,
Editora da UFRJ, 1996.

GRACE, S. C.; LOGAN, B. A.; Energy dissipation and radical
scavenging by the plant phenylpropanoid pathway.
Philosophical Transactions of the Royal Society B, v. 355, p. 1499-
1510, 2000.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction
of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. **Biochemical and
Biophysical Research Communications**, v.224, p.338-344, 1996.

GUGLIUCCI, A. et al. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex*
paraguariensis extracts are the main inhibitors of AGE generation by
methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v.80 (6), p.339-344,
2009.

GUGLIUCCI, A. et al. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity
in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological
concentrations of hypochlorite. **Fitoterapia**, v.80, p.138–142, 2009.

GUGLIUCCI, A. et al. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex*
paraguariensis extracts are the main inhibitors of AGE generation by
methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v.80, p.339–344, 2009.

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

GUPTA, M. P. **270 Plantas Medicinales Iberoamericanas.** Santafé de
Bogotá: CYTED, p. 46-47, 1995.

H.; FERREIRA, A. G. et al. (Eds.). **Erva-mate: Biologia e cultura no
Cone Sul,** Porto Alegre: Editora da UFRGS, p. 356, 1995.

HÄGELE, B. F.; ROWELL-RAHIER, M. Genetic and environmental-
based variability in secondary metabolite leaf content of *Adenostyles*

alliariae and *A. alpina* (Asteraceae). A test of the resource availability hypothesis. **Oikos**, v.85, (2), p.234-246, 1999.

HARBORNE, J. B. Introduction to ecological biochemistry. 3.ed. London: Academic Press, p. 387, 1988.

HARTMANN, T. Global harmonization of herbal health claims. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 80, p. 177-179, 1996.

HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; DE MEJIA, 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.; SCHMALKO, M.; DE MEJIA, 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, (18), p.8394-8403, 2008.

HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review and chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v.72, n.9, p.138-151, 2007.

HENDRIKS, H. et al. The content of parthenolide and its yield per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. **Planta Medica**, v. 63, p. 356-359, 1997.

HÖFT, M.; VERPOORTE, R.; BECK, E. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity. **Planta Medica**, v. 64, p. 148-152, 1998.

IBGE - Banco de dados. IBGE – Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA 2011. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jan 2012.

ICH - International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Q2 (R1), London, 2005.

JANSEN, M. P. T.; STAMP, N. E. Effects of light availability on host plant chemistry and the consequences for behavior and growth of an insect herbivore. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.82, (3), p.319-333, 1997.

KOEPPE, D. E. et al. Pharmacological screening of plant decoctions commonly used in Cuban folk medicine. **Plant Physiology**, v. 23, p. 258-261, 1970.

KRAEMER, K. H. et al. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1119-1122, 1996.

KUTCHAN, T. M. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. **Plant Physiology**, v. 125, p. 58-62, 2001.

LANÇAS, F. M. Avanços Recentes e Tendências Futuras das Técnicas de Separação: uma visão pessoal. **Scientia Chromatographica**, v.0, p.17-44, 2008.

LILOV, D.; ANGELOVA, Y. Changes in the content of some phenolic compounds in connection with flower- and fruit-formation of vine. **Biologia Plantarum**, v. 29, p. 34-37, 1987.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, p. 90-91.

LÜCKEMEYER, D. D. et al. Effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.(Yerba Mate) on Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Replication. **Phytotherapy Research**, 2011.

MACEDO, J. A.; BATTESTIN, V.; RIBEIRO, M. L.; MACEDO, G. A. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry**, v.126, (2), pp. 491-497, 2011.

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

MARTINET, A. et al. NMR and LC-MSn characterisation of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemical analysis**, v.12, n.1, p.48-52, 2001.

MARTINET, A.; HOSTETTMANN, K.; SCHUTZ, Y.

Thermogenic effects of commercially available plant preparations aimed at treating human obesity. **Phytomedicine**, v.6, p.231-238, 1999.

MARTINS, F. et al. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. **British Journal of Nutrition** v.101 (4), p.527-532, 2009.

MATSUMOTO, R. L. et al. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.1775–1780, 2009.

MAZZAFERA, P. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.6, p.149-151, 1994.

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

MEDINA, M. B. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. **Journal of Functional Foods**, v.3, p.79-87, 2011a.

MEDINA, M. B. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.1565-1571, 2011b.

MEYER, S. et al. 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 EnViron**, v.29, p.1338–1348, 2006.

MILIOLI, E. M. et al. Effect of acute administration of hydroalcohol extract of *Ilex paraguariensis* St Hilaire (Aquifoliaceae) in animal models of Parkinson's disease. **Phytotherapy Research**, v.21, p.771-776, 2007.

MIRANDA, D. D. C. et al. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, v. 23 (4), p. 261-265, 2008.

MONTANHA, J. A. **Estudo químico e biológico das saponinas de Ilex paraguariensis St. Hil Aquifoliaceae**. 1990. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Análise, Síntese e Controle de Medicamentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 1990.

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

MÜLLER, V. et al. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against Herpes Simplex Virus type 1 and Rabies Virus. **Phytotherapy Research**, v.21, n.10, p.970-974, 2007.

NEHLIG, A; DAVAL, J. L.; DEBRY, G. Caffeine and the centralnervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. **Brain Research**, v.17, p.139-170, 1992.

NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potencial drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, n.9, p.2589-2599, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, n.3, p. 461-477, 2007.

OH, M.; CAREY, E. E.; RAJASHEKAR, C. B. Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce Plant Physiology and Biochemistry 47 (2009) 578–583

OHEM & HÖLZL, Some new investigations on *Ilex paraguariensis*: flavonoids and triterpenes. **Planta Medica** , vol 54, n 6, p 576; 1988.

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, p.10527-10532, 2008.

PAGANINI STEIN, F.L. et al. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biological Research For Nursing**, v.7, p.146-156, 2005.

PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.476, p. 78-185, 2008.

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

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal os Ethnopharmacology**, v.100, p.50-52, 2005.

PETERSON, G. L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**, v.100, p.201-220, 1979.

PETERSON, G. L. Determination of total protein. **Methods in Enzymology**, v.91, p.95-119, 1983.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 4, 1978, p. 138-143.

PREDIGER, R. D. S. Effects of caffeine in Parkinson's disease: From neuroprotection to the management of motor and non-motor symptoms. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.20, n.1, p.S205-S220, 2010.

PREDIGER, R. D. S. et al. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) - The spontaneously hypertensive rat (SHR). **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.8, (4), p. 583-594, 2005.

PREDIGER, R. D. S. et al. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.465–473, 2008.

PRUDÊNCIO, A. P. A. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing Article in Press**, 2012.

PUANGPRAPHANT, S.; DE MEJIA, E.G. Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NFκB pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57 (19), p.8873-8883, 2009.

RACHWAL, M. F. G. et al. Influência da luminosidade sobre os teores de macronutrientes e tanino em folhas de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) In: **II Congresso Sul-Americano da erva-mate e III Reunião Técnica do Cone sul sobre a cultura da erva-mate** (anais), Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/ Prefeitura de Encantado-RS, 2000.

RAKOCEVIC, M.; MARTIM, S. F. Time series in analysis of yerba-mate biennial growth modified by environment. *International Journal of Biometeorology*, v. 55, p. 161-171, 2011.

RALPHS, M. H.; MANNERS, G. D.; GARDNER, D. R. Influence of light and photosynthesis on alkaloid concentration in larkspur. **Journal of Chemical Ecology**, v.24, (1), p.167-182, 1998.

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

RANILLA, L. G. et. al. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresource Technology**, v.101 (12) , p. 4676-4689, 2010.

RATES, S. M. K. Metilxantinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Florianópolis: Editora da UFSC/Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p.519-536.

RATES, S. M. K. Metilxantinas. In: SIMÕES, C. M.O.; SCHENKEL, E. P., et al (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**.6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC/Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p.711-740.

REGINATTO, F. H. et al. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species - caffeine and theobromine in ervamate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.10, n.6, p.443-446, 1999.

RHODES, M. J. C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. **Plant Molecular Biology**, v. 24, p.1-20,1994.

RICCO, R. A. et al. Estudio comparativo de flavonoides em seis especies austrosudamericana del gênero *Ilex*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.10, n.1, p.29-35, 1991.

RIEDEL, W. et. al. Caffeine attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. **Psychopharmacology**, v.122, (2), p.158-168, 1995.

RIVELLI, D. P. ET al. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH reduction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, n.2, p.215-222, 2007.

SANTOS, E. C. S. **Investigação da atividade neurofarmacológica de *Ilex paraguariensis* em camundongos**. 2011. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 2011.

SCHENKEL, E. P. et al. Saponins from maté (*Ilex paraguariensis*) and the other South American *Ilex* species: Ten years research on *Ilex*

saponins. **Ciência e Cultura**, v.49, n.5-6, p.359-363,1997.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M.O.; SCHENKEL, E. P., et al (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**.6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC/Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p.711-740.

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

SCHINELLA, G. R. et al. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.269, n.2, p.357-360, 2000.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; MOSCA, S. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitricoxide-dependent mechanism. **Clinical Nutrition**, v.24, p.360-366, 2005.

SCHUBERT, A. et al. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. ST. - HIL. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1233-1236, 2006.

SLIMESTAD, R. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 225-229, 1998.

SUGIMOTO, S. et al. Brazilian Natural Medicines. III. Structures of triterpene oligoglycosides and lipase inhibitors from Mate, leaves of *Ilex paraguariensis*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.57, n.3, p.257-261, 2009.

TAKETA, A. T. C. **Saponinas de *Ilex brecciuspis* Reissek**, 1997. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 1997.

TATTINI, M. et al. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytologist**, v.163 (3), p. 547-561, 2004.

TORMEN, M. J. Economia ervateira brasileira. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G., et al(Eds.). **Erva-mate: Biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Editora da UFRGS, 1995. p. 27-40.

TURNER, S. et al. Evaluation of the antioxidant activity and polyphenols content of *Ilex paraguariensis* (mate) during industrialization. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v.3 (1), p. 23-30, 2011.

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

VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de erva-mate (*Ilexparaguariensis* St. Hill) e de espécies utilizadas na adulteração do mate**. 1994 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 1994.

VALERGA, J.; RETA, M.; LANARI, M. C. Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n.1, p. 28–35, 2012.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the New Millennium: Leadfinding and Biotechnology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, n.3, p.253-262, 2000.

WALDHAUSER, S. S. M.; BAUMANN, T. W. Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. **Phytochemistry**, v.42, n.4, p.985-996, 1996.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Insect-plant interactions**; BERNAYS, E. A. ed.; 1st ed., CRS Press: Boca Raton, 1989, vol. 1, cap. 4

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**, 1st ed.; Blackwell scientific Publications: Oxford, 1994, cap. 3.

WICHTL, M. **Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A handbook for practice on a scientific basis**. 3. ed. Boca Raton: CRC, 2003, p. 366-368.

ZUANAZZI, J. A.S.; MONTANHA, J. B. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC/Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p. 577-614.

APÊNDICE

Apêndice 1: Teores de metilxantinas, cafeína, teobromina, ácido clorogênico, fenólicos totais e valores de EC₅₀ dos extratos das folhas dos indivíduos de *Ilex paraguariensis* expostos à alta intensidade luminosa.

Amostra	Idade das folhas	Cafeína ^a (mg.g ⁻¹)		Teobromina ^a (mg.g ⁻¹)		Metilxantinas ^a (mg.g ⁻¹)		Ácido Clorogênico ^a (mg.g ⁻¹)		Fenólicos Totais ^b (mg.g ⁻¹)		EC ₅₀ ^c (g.g ⁻¹ DPPH)	
		Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
1	Brotação	53,05	0,34	4,27	0,10	57,32	0,44	0,33	0,02	242,10	4,00	147,55	3,21
	2 meses	42,74	0,07	5,80	0,13	48,54	0,20	0,41	0,01	232,36	0,48	153,96	1,95
	6 meses	14,56	0,07	0,26	0,01	14,82	0,08	0,59	0,02	152,48	3,95	265,48	6,83
2	Brotação	46,43	0,15	4,43	0,01	50,86	0,16	1,62	0,05	331,92	9,27	21,27	0,41
	2 meses	38,76	0,24	5,97	0,02	44,73	0,26	0,90	0,02	316,89	2,27	47,40	1,83
	6 meses	8,46	0,06	1,05	0,01	9,51	0,07	10,60	0,17	217,52	4,23	98,43	2,28
3	Brotação	71,20	0,25	24,93	0,14	96,13	0,39	5,72	0,07	239,71	2,59	31,32	1,19
	2 meses	63,01	0,21	30,88	0,13	93,89	0,34	1,23	0,04	172,32	3,95	56,07	1,67
	6 meses	36,70	0,21	13,24	0,01	49,94	0,22	8,02	0,14	75,27	5,54	107,00	4,94
4	Brotação	86,52	0,37	5,83	0,04	92,35	0,41	4,10	0,04	260,14	5,52	62,32	2,19
	2 meses	74,88	0,11	7,00	0,04	81,88	0,15	0,88	0,03	214,84	5,87	83,68	2,58
	6 meses	61,70	0,08	2,97	0,02	64,67	0,10	9,02	0,36	147,33	1,81	101,74	3,91
5	Brotação	73,06	0,35	13,04	0,08	86,10	0,43	0,15	0,00	290,30	1,18	111,48	3,97
	2 meses	65,03	0,17	18,47	0,08	83,50	0,25	0,18	0,01	245,13	5,23	128,65	3,29
	6 meses	40,63	0,18	8,58	0,01	49,21	0,19	2,73	0,03	176,21	2,82	163,73	4,65

Teores quantificados através de ^a CLAE-DAD e ^b UV/Vis. ^c: Concentração necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH.

Apêndice 2: Teores de metilxantinas, cafeína, teobromina, ácido clorogênico, fenólicos totais e valores de EC₅₀ dos extratos das folhas dos indivíduos de *Ilex paraguariensis* sombreados.

Amostra	Idade das folhas	Cafeína (mg.g ⁻¹)		Teobromina (mg.g ⁻¹)		Metilxantinas (mg.g ⁻¹)		Ácido Clorogênico (mg.g ⁻¹)		Fenólicos Totais (mg.g ⁻¹)		EC ₅₀ (g.g ⁻¹ DPPH)	
		Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
6	Brotação	77,84	0,10	3,50	0,03	81,34	0,13	0,24	0,01	311,80	7,84	140,67	5,12
	2 meses	63,34	0,09	7,52	0,24	70,86	0,33	1,84	0,05	391,66	0,99	46,86	2,04
	6 meses	5,68	0,08	0,52	0,01	6,20	0,09	0,77	0,01	257,22	3,43	178,64	4,28
7	Brotação	54,55	0,25	7,92	0,04	62,47	0,29	0,38	0,01	282,81	1,63	120,82	3,57
	2 meses	44,39	0,04	10,89	0,01	55,28	0,05	0,43	0,02	297,45	0,57	79,55	2,92
	6 meses	11,57	0,09	2,19	0,02	13,76	0,11	1,16	0,01	215,54	3,77	170,40	2,56
8	Brotação	92,62	0,33	6,53	0,09	99,15	0,42	7,40	0,02	230,97	7,78	24,51	0,90
	2 meses	84,54	0,38	8,78	0,01	93,32	0,39	1,91	0,03	187,86	3,30	80,79	1,34
	6 meses	81,57	0,18	2,92	0,01	84,49	0,19	0,40	0,00	163,22	3,79	148,91	2,16
9	Brotação	95,94	0,07	9,81	0,01	105,75	0,08	1,86	0,03	251,40	7,33	106,36	1,86
	2 meses	90,50	0,12	11,30	0,05	101,80	0,17	0,29	0,01	298,34	2,17	37,72	1,27
	6 meses	59,90	0,11	8,02	0,15	67,92	0,26	11,99	0,06	179,84	10,18	119,01	2,67
10	Brotação	133,98	0,41	3,07	0,01	137,05	0,42	0,90	0,02	437,81	15,49	6,36	0,34
	2 meses	51,78	0,21	7,61	0,22	59,39	0,43	0,23	0,01	192,32	2,80	157,08	3,66
	6 meses	23,83	0,13	0,45	0,01	24,28	0,14	0,15	0,00	121,21	0,13	196,51	8,27
11	Brotação	46,71	0,17	18,15	0,05	64,86	0,22	0,15	0,00	274,72	8,95	17,94	0,29
	2 meses	43,15	0,11	22,22	0,04	65,37	0,15	0,19	0,01	229,75	3,73	24,21	0,64
	6 meses	6,77	0,04	14,25	0,06	21,02	0,10	0,41	0,01	126,50	1,46	127,17	2,11

Teores quantificados através de ^aCLAE-DAD e ^bUV/Vis. ^c: Concentração necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH.