

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INFLUÊNCIA DO TIPO DE PLANTIO E ETAPAS DO PROCESSO DE
INDUSTRIALIZAÇÃO SOBRE OS COMPOSTOS FENÓLICOS E
METILXANTINAS DA ERVA-MATE**

MILENA MALLMANN

Porto Alegre, agosto de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MILENA MALLMANN

**INFLUÊNCIA DO TIPO DE PLANTIO E ETAPAS DO PROCESSO DE
INDUSTRIALIZAÇÃO SOBRE OS COMPOSTOS FENÓLICOS E
METILXANTINAS DA ERVA-MATE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof.^a Dr.^a Rosângela Assis Jacques
Orientadora

Porto Alegre, agosto de 2018

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre 03/2014 e 08/2018, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Rosângela Assis Jacques. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr^a 1

Prof.^a Dr^a 2

Prof.^a Dr^a 3

Prof.^a Dr^a 4

Milena Mallmann

*“Onde há chimarrão existe amizade
Existe um povo que sabe que a
maior felicidade
É crer que a simplicidade te faz
rico em qualquer chão. ”*

Carlos Eduardo Back

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre enviando boas energias para que eu pudesse tomar as decisões corretas.

À psicóloga Fabiane Obregon Lago que me orientou e ajudou nos momentos de ansiedade.

À minha família pela compreensão, apoio e serenidade.

À minha orientadora prof^a. Dr^a. Rosângela Assis Jacques por toda orientação e paciência.

À empresa a qual trabalho, Braskem S.A., pelo apoio e incentivo.

Ao grupo de pesquisa LAAO, especialmente aos colegas e amigos Allan dos Santos Polidoro, Bruna Bernar Dias, Bruna Onorevoli, Enelise Scapin, Maurício Perin e Taís Klein que me ajudaram em todos os momentos, foram compreensivos e amigos.

Ao professor Dr. Eliseu Rodrigues por ceder equipamentos e espaço em seu laboratório indispensáveis para a realização deste trabalho.

À ervateira Barão por ceder as amostras e informações indispensáveis para a realização deste trabalho.

À engenheira Ana Paula Pícolo e ao sr. Célio Giacomel pela atenção e disponibilidade em ajudar.

Aos membros da banca por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	X
RESUMO	I
ABSTRACT.....	II
1. INTRODUÇÃO	4
1.1. OBJETIVOS	5
1.1.1. Objetivo Geral.....	5
1.1.2. Objetivos Específicos	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1. ERVA-MATE	8
2.1.1. Importância da erva-mate	8
2.1.3. Biologia reprodutiva	13
2.1.3. Habitat e distribuição geográfica.....	14
2.1.4. Composição química da erva-mate.....	15
2.1.4.1 Alcaloides.....	17
2.1.4.2 Polifenóis.....	18
2.1.4.3 Atividade Antioxidante da erva-mate.....	20
2.2. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	22
2.3. MÉTODOS DE ANÁLISE DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	26
2.4 FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS	27
2.4.1 Análise por componentes principais (PCA).....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. REAGENTES	32
3.2. PREPARO DAS AMOSTRAS.....	32
3.3 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO 5-CAFEOILQUÍNICO E DERIVADOS, CAFEÍNA, TEOBROMINA E RUTINA EMPREGANDO EAU	37
3.4. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO-5-O-CAFEOILQUÍNICO E DERIVADOS, CAFEÍNA, TEOBROMINA E RUTINA.....	38
3.5 ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (MÉTODO ORAC)	39
3.6 ANÁLISE DOS DADOS.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS	42
4.2.1 Metilxantinas	45
4.2.2 Ácidos cafeoilquínicos	46
4.2.3 Rutina	54
4.3. QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS	55
4.4 ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) E ANÁLISE HIERÁRQUICA DE AGRUPAMENTOS (HCA)	63
4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	76
5. CONCLUSÃO	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto ilustrativa da planta de erva-mate.....	13
Figura 2. Estrutura das metilxantinas. 2A:cafeína, 2B: teobromina e 2C: teofilina respectivamente.	18
Figura 3. Estrutura molecular dos derivados cafeoil. ^{[50][59]}	19
Figura 4. Estrutura química da rutina ^[60]	20
Figura 5. Estrutura da fluoresceína (esquerda) e diclorofluoresceína (direita) ^[71]	21
Figura 6. Diagrama variâncias e PC's adaptado de E. M. Humston, R. E. Synovec, 2011. ^[120]	28
Figura 7. Pré-processamento da matéria-prima.	33
Figura 8. Fluxograma de operações erva-mate da Ervateira Barão.	35
Figura 9. Fluxograma de operações chá mate tostado da Ervateira Barão.	36
Figura 10. Cromatograma obtido por HPLC-DAD correspondente ao método desenvolvido (amostra premium): A - 272 nm; B – 325 nm; C – 353 nm; D - sobreposição dos três comprimentos de onda, picos: 1 – teobromina; 2 – 3-CQA; 3 - cis-3-CQA ; 4 – 4-CQA ; 5 – 5-CQA; 6 – cafeína, 7 – 3,4-DI-CQA; 8 – 3,5-DI-CQA; 9 – rutina; 10 – 4,5-DI-CQA ; 11 – DI-CQA.....	43
Figura 11. Espectro de Massas do composto positivamente identificado (pico 1): A) MS teobromina; B) MS ² teobromina (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6).....	45
Figura 12. Espectro de massas do composto positivamente identificado (pico 6): A) MS cafeína; B) MS ² cafeína (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6).....	46
Figura 13. Estrutura das quebras dos ácidos cafeoilquínicos ^[50]	47
Figura 14. Espectro de massas do composto tentativamente identificado(pico 2): A) MS do 3-CQA; B) MS ² do 3-CQA (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6).....	47
Figura 15. Espectro de massas do composto tentativamente identificado (pico 3): A) MS do cis-3-CQA; B) MS ² do cis-3-CQA (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6)	48

Figura 16. Espectro de massas do composto tentativamente identificado (Pico 4):A) MS do 4-CQA; B) MS ² do 4-CQA (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6)	49
Figura 17. Espectro de massas do composto tentativamente identificado (pico 5): A) MS 5-CQA; B) MS ² 5-CQA(a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6)	50
Figura 18. Espectro de massas do composto tentativamente identificado (pico 7): A) MS do 3,4-DI-CQA; B) MS ² do 3,4-DI-CQA (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6)	51
Figura 19. Espectro de massas do composto tentativamente identificado(pico 8): A) MS do 3,5-DI-CQA ; B) MS ² do 3,5-DI-CQA (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6)	52
Figura 20. Espectro de massas do composto tentativamente identificado (pico 10): A) MS do 4,5-DI-CQA ; B) MS ² do 4,5-DI-CQA (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6)	53
Figura 21. Espectro de massas do composto tentativamente identificado (pico 11): A) MS do DI-CQA; B) MS ² do DI-CQA(a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6)	54
Figura 22. Espectro de massas do composto positivamente identificado (Pico 9 :A) MS rotina; B) MS ² rotina (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6)	55
Figura 23. Dendograma de todas as amostras de erva-mate analisadas.....	64
Figura 24. A) PC1 x PC2 de todas as amostras analisadas; B) PC1 x PC3 de todas as amostras analisadas; C) PC2 x PC3 de todas as amostras analisadas	66
Figura 25. Distribuição de componentes x variância	67
Figura 26. A) PC1 x PC2 amostras de erva-mate durante o processamento B) PC1 x PC3 amostras de erva-mate durante o processamento C) PC2 x PC3 amostras de erva-mate durante o processamento.....	68
Figura 27. Componentes principais x variância	70
Figura 28. A) PC1 x PC2 Ervas-mate prontas para consumo; B) PC1 x PC3 Ervas-mate prontas para consumo; C) PC2 x PC3 Ervas-mate prontas para consumo.....	71
Figura 29. A) PC1 x PC2 das amostras de erva-mate prontas para consumo por tipo de cultivo nativa (em vermelho) vs. plantada (em verde) B) PC2 x PC3 das amostras	

de erva-mate prontas para consumo por tipo de cultivo nativa (em vermelho) vs. plantada (em verde) das amostras de erva-mate prontas para o consumo. 73

Figura 30. A) PC1 x PC2 das amostras de erva-mate prontas para o consumo divididas por tipo de secador o qual foram submetidas: secador rotativo com fumaça (em vermelho) vs. secador em esteira sem fumaça (em verde) **B)** PC2 x das amostras de erva-mate prontas para o consumo divididas por tipo de secador o qual foram submetidas: secador rotativo com fumaça (em vermelho) vs. secador em esteira sem fumaça (em verde). 75

Figura 31. Dendograma com resultados de atividade antioxidante 78

Figura 32. PC1 X PC2 concentração de ácidos cafeoilquínicos e atividade antioxidante 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fluxo de processamento da erva-mate (adaptado de Junior e colaboradores 2016). ^[22]	11
Tabela 2. Pesquisa Agrícola Municipal de 2013. ^[28]	15
Tabela 3. Composição de porção de mate (62,5 g de folhas secas) considerada como a média usada diariamente pelos consumidores ^[22]	16
Tabela 5. Extrações de polifenóis e metilxantinas apresentados na literatura.....	23
Tabela 6. Compostos identificados positivamente e tentativamente no extrato de amostras de erva-mate obtido por UAE.	44
Tabela 7. Resultados dos ensaios de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação	57
Tabela 8. Repetitividade instrumental (Precisão).....	58
Tabela 9. Recuperação do método de extração	58
Tabela 10. Concentração das metilxantinas e rutina (mg.g^{-1}) nas diferentes amostras de erva-mate.	59
Tabela 11. Concentração dos ácidos cafeoilquínicos (mg. g^{-1}) nas diferentes amostras de erva-mate.....	60
Tabela 12. Códigos das amostras de erva-mate na PCA	63
Tabela 13. Concentração total de ácidos cafeoilquínicos e atividade antioxidante..	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3,4-DI-CQA	Ácido-3,4-di-cafeoilquínico
3,5-DI-CQA	Ácido-3,5-di-cafeoilquínico
3-cis-CQA	Ácido-cis-3-cafeoilquínico
3-CQA	Ácido-3-cafeoilquínico
4,5-DI-CQA	Ácido-4,5-di-cafeoilquínico
4-CQA	Ácido-4-cafeoilquínico
5-CQA	Ácido-5-cafeoilquínico
ACN	Acetonitrila
ASE	Accelerated Solvent Extraction
B-PE	β -ficoeritrina
C-3-G	Cianidina-3-glucosídeo
CAF	Cafeína
Camb	Cambona
CambV	Cambona embalada a Vácuo
Cha	Chá mate tostado
CI	Ionização química
CID	Dissociação Induzida por Colisão
Conc	Concentração
CV	Coeficiente de variação
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
	Sequestro do radical 2,2-difenil-14-picril- hidrazil
DPPH	
EAM	Extração Assistida por Microondas
EAS	Extração Acelerada por Solvente
EAU	Extração assistida por Ultrassom
EI	Ionização eletrônica
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
EUA	Os Estados Unidos da América
FL	Fluoresceína
GAE	Equivalente Ácido gálico
HCA	Análise por agrupamentos
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MS	<i>Mass Spectrometer</i>
NatSF	Nativa Secador Esteira Sem Fumaça
NI	Não Informado
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
Org	Orgânica
PCA	Análise por componentes principais
PDO	Peroxidase

PFO	Polifenoxidase
Pic	Pícolo
PicTer	Pícolo Tererê
PlanCF	Plantada Secador Rotativo Com Fumaça
PLE	Extração por Líquido Pressurizado
Prem	Premium
r^2	Coeficiente de determinação
R-PE	R-ficoeritrina
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i>
RUT	Rutina
SapNat	Sapitada Nativa
SapPlan	Sapitada Plantada
SFE	<i>Supercritid Fluid Extraction</i>
SLE	<i>Solid Liquid Extraction</i>
TE	Equivalente Trolox
TEOB	Teobromina
Ter	Tererê
TOF	<i>Time Of Flight</i>
TPC	<i>Total Phenolic content</i>
Trad	Tradicional
TSP	<i>Termospray</i>
UAE	<i>Ultrasound Assisted Extraction</i>
Uru	Tipo Uruguai
VerNat	Verde Nativa
VerPlan	Verde Plantada
λ	Comprimento de onda

RESUMO

Esta pesquisa teve por objetivo estudar a influência do tipo de plantio (crescimento a pleno sol e sombra) e etapas do processamento industrial (secagem, sapeco e torrefação) sobre duas classes de compostos (metilxantinas e compostos fenólicos) e potencial antioxidante da erva-mate provenientes da ervateira Barão. A extração dos compostos foi realizada pela técnica de ultrassom. A LC-DAD e LC/MSⁿ foi utilizada para a caracterização e quantificação dos extratos e a atividade antioxidante foi medida utilizando-se do método ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*). Foram identificados 11 compostos dentre os quais, 8 puderam ser quantificados. Os teores de teobromina obtidos ficaram na faixa entre 1,12 a 3,09 mg.g⁻¹, para a cafeína entre 6,12 a 28,99 mg.g⁻¹, para rutina entre 1,07 a 5,54 mg.g⁻¹ e para o ácido clorogênico entre 5,60 a 33,14 mg.g⁻¹. Os derivados do ácido clorogênico também foram identificados e a quantificação dos mesmos foi realizada por equivalência ao ácido clorogênico, os resultados obtidos ficaram entre 4,08 e 43,16 mg.g⁻¹ para o 3-CQA, 0,11 e 1,85 mg.g⁻¹ para o 4-CQA, 0,96 e 8,92 mg.g⁻¹ para o 3,4-DI-CQA, 3,46 e 57,81 mg.g⁻¹ para o 3,5-DI-CQA e 1,09 e 24,75 mg.g⁻¹ para o 4,5-DI-CQA. Os resultados obtidos foram analisados por componente principal resultando em três componentes principais correspondendo a aproximadamente 90% da variância total. Foi possível observar diferença entre as amostras verdes plantada (ao pleno sol) e nativa (à sombra), e entre as amostras de secador esteira sem fumaça e secador rotativo com fumaça tanto nas amostras que estavam passando pelo processo de industrialização quanto nas amostras prontas para consumo, salientando que o tipo de plantio e de secagem influencia na composição química das amostras. A amostra de chá tostado ficou isolada das demais, observando, portanto, que a etapa de tostagem da erva também pode modificar a composição em relação aos compostos bioativos. Os compostos majoritários em todas as amostras analisadas foram os ácidos cafeoilquínicos. A amostra mais rica em metilxantina e ácidos cafeoilquínicos foi a erva-mate nativa sapecada, e a amostra mais rica no flavonoide rutina foi a amostra pronta para consumo de tererê natural. Neste estudo foi observado que quanto maior a concentração de ácidos cafeoilquínicos maior foi a atividade antioxidante, a erva-mate nativa sapecada apresentou a maior atividade antioxidante.

ABSTRACT

This research had the objective of study of influence about cultivation (sunshine growing and shadow growing) and industrial process steps (drying, *zapeco* and toasting) about two classes of compounds (methylxanthines and phenolic compounds) and antioxidant potential of yerba mate from Barão industry. Compound extraction was made by ultrasound technique. LC-DAD and LC/MSⁿ was used to characterization and quantification, antioxidant capacity was measured by ORAC method (oxygen radical absorbance capacity). It was identified 11 compounds and 8 have been quantified. Theobromine contents was between 1.12 to 3.09 mg.g⁻¹, caffeine was between 6.12 and 28.99 mg.g⁻¹, rutine was between 1.07 and 5.54 mg.g⁻¹, and chlorogenic acid was between 5.6 and 33.14 mg.g⁻¹. Chlorogenic acid derivatives was identified and quantified by equivalence to chlorogenic acid, results were between 4.08 and 43.16 mg.g⁻¹ to 3-CQA, 0.11 and 1.85 mg.g⁻¹ to 4-CQA, 0.96 and 8.92 mg.g⁻¹ to 3,4-DI-CQA, 3,46 and 57,81 mg.g⁻¹ to 3,5-DI-CQA and 1.09 and 24.75 mg.g⁻¹ to 4,5-DI-CQA. Results were analyzed by principal component and three principal components were able to explain almost 90% of total variance between samples. It was possible to observe differences between green samples that was planted (sun cultivation) or native (shadow cultivation). It was possible to observe differences between samples that were drying in rotative drier and normal drier, suggesting that kind of cultivation and way to dry have influence in bioactive composition. Toasted tea sample was isolated, suggesting that toasting step have influence in bioactive composition too. Major compounds in all samples were CQA's. Sample richer in methyl xanthine and cafeoilquinic acid was native and *zapecada*, and sample richer in rutin was the sample ready to consumption nature *tererê*. In this study it was possible to observe that when more cafeoilquinic acids concentration, bigger is the antioxidant activity, native and *zapecada* sample presented the bigger antioxidant activity.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A erva-mate é, antes de tudo, um elemento histórico unificador na América do Sul subtropical tendo sido sugerido que a mesma fosse utilizada como símbolo desta região, por se tratar da região do planeta onde ela ocorre naturalmente e tem cultivo de expressão econômica. Por um longo período a erva-mate foi o primeiro produto das exportações brasileiras e a sua produção ainda se constitui numa das principais fontes de renda e de emprego, especialmente para os pequenos e médios produtores da região de ocorrência da espécie.^[1]

Em adição às questões já referidas, salienta-se que há hoje uma grande oferta desse produto (erva-mate), que juntamente com um mercado relativamente restrito, tem incentivado a busca não apenas de melhorias nas qualidades dos produtos em exploração, como também a busca de novas formas de aproveitamento da erva-mate.^[1]

A erva-mate é conhecida por terem sido identificados um grande número de compostos bioativos, os quais são responsáveis por seus benefícios^[2], tornando-a um ótimo produto para ser explorado. Com o aumento do desenvolvimento de produtos nos mercados de bebidas, cosméticos, medicamentos e higiene derivados da erva-mate, seu potencial tornou-se visível, aumentando o número estudos fitoquímicos para conhecer e explorar ainda mais o potencial da planta. No Ministério da Saúde no Brasil há o registro de 14 preparações derivadas da planta e na Alemanha existem 452 produtos comerciais à base desta espécie.^[2-4] De vários compostos conhecidos e responsáveis pelas propriedades benéficas da erva-mate, destacam-se dois em maior quantidade, os polifenóis (derivados do ácido clorogênico) e as metilxantinas (teobromina e cafeína).^[2]

Muitas das propriedades de produtos provenientes de plantas são associadas com a presença de compostos fenólicos, conhecidos por diminuir a incidência de câncer e doenças cardiovasculares. Esses compostos também podem ser empregados no processamento de alimentos como antioxidante natural, prevenindo a peroxidação de lipídeos, o que é uma das principais causas de deterioração dos alimentos.^[5] A atividade antioxidante da erva-mate vem sendo estudada e se mostrando importante característica da planta.^[6]

A tendência de mercado de demanda por produtos orgânicos pode ser atrelada a um ganho de valor agregado para a erva-mate quando a forma de cultivo obedece a princípios de sustentabilidade naturais do sistema e as exigências dos processos de adubação e outros fatores determinantes são cumpridas.^[3] Há também uma grande oferta da erva-mate, devido ao volume produzido, o que incentiva novas formas de aproveitamento e a busca da melhoria da qualidade dos produtos.^[7,8]

No Brasil, mais especificamente na região sul, a produção de erva-mate é destinada cerca de 90% para chimarrão e os 10% restantes para outras preparações.^[3] A erva-mate necessita passar por um processo de beneficiamento básico para ser utilizada como chimarrão. Esse processo é constituído pelas etapas de colheita, recepção, sapeco ou branqueamento, secagem, trituração, classificação, armazenamento, moagem, mistura, embalagem e expedição.^[4] Este processo de beneficiamento e suas etapas alteram a composição química da erva-mate, assim como o tipo de cultivo, clima e condições agrônômicas.^[9-12]

Diante do exposto, a presente pesquisa consiste na avaliação da influência do tipo de cultivo, dos diferentes tipos de secadores, e das etapas de processamento industrial (secagem, sapeco e torrefação) de amostras provenientes de uma mesma indústria sobre duas classes de compostos bioativos presentes na erva-mate: as metilxantinas e compostos fenólicos.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência do tipo de plantio (crescimento a pleno sol e sombra), etapas do processamento industrial (secagem, sapeco e torrefação) e dos diferentes tipos de secadores sobre duas classes de compostos (metilxantinas e compostos fenólicos) e potencial antioxidante da erva-mate.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Extrair compostos fenólicos e metilxaninas de diferentes amostras de erva-mate utilizando a técnica de extração assistida por ultrassom (EAU);

- Identificar tentativamente e por meio de padrões, os compostos bioativos dos extratos das amostras utilizando a técnica de HPLC-DAD-MSⁿ;
- Quantificar por meio de calibração externa os compostos identificados no extrato obtido utilizando a técnica de HPLC-DAD-MSⁿ;
- Determinar a atividade antioxidante dessas amostras por ORAC;
- Realizar análise por componentes principais para verificar as principais variações das amostras estudadas;
- Verificar as tendências da quantidade de ácidos cafeoilquínicos (CQA's) em relação à atividade antioxidante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ERVA-MATE

O maior número de espécies pertencentes ao gênero *Ilex*, que possui cerca de 500 espécies, encontra-se na região tropical das Américas e Ásia. A erva-mate, *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., também pertence à família *Aquifoliaceae*, que possui cerca de 600 espécies, e 60 delas ocorrem no Brasil. É uma planta característica da América do Sul subtropical.^[13,14]

A erva-mate ocorre no Nordeste da Argentina, Leste do Paraguai, Noroeste do Uruguai e Brasil. No Brasil, ela pode ser encontrada nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Sua área de ocorrência natural é de, aproximadamente, 450.000 km², o que equivale a quase 5 % do território brasileiro. A erva-mate tem preferência por solos medianamente profundos a profundos, sobretudo nas altitudes compreendidas entre 500 e 1.000 metros, podendo ser encontrada em regiões situadas acima ou abaixo destes limites, de maneira mais esparsa.^[15]

No Brasil, os índios guaranis foram os primeiros a fazer o uso da erva-mate. A tribo habitava a região entre as bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai sendo a extração da erva-mate a principal atividade econômica nessa região, entre meados do século XVI e início do século XVII, época em que ocorreu colonização espanhola no local.^[16]

A erva-mate é consumida como uma infusão, sendo preparada em um instrumento proveniente de um porongo, chamado cuia, e sorvido através de uma bomba, instrumento parecido com um canudo, porém com aberturas menores para filtrar as partículas de erva e feito de metal. Esta infusão recebe o nome de chimarrão.^[17]

2.1.1. Importância da erva-mate

Aproximadamente 68 espécies do gênero *Ilex* estão presentes no Brasil.^[14] O consumo de erva-mate, *Ilex paraguariensis*, como chimarrão na região sul do Brasil

e em países que fazem fronteira com essa região, como Argentina, Uruguai e Paraguai, fazem desta um importante elemento histórico.^[3]

O maior consumidor de chimarrão é o estado do Rio Grande do Sul. Essa bebida é há muitos anos considerada uma tradição no Estado. A região Sul consome cerca de 90% da produção de erva-mate para o chimarrão. Os 10% restantes são destinados para chás, mates solúveis entre outros.^[3]

Diversas preparações farmacêuticas também levam erva-mate, tendo sido incorporada a várias farmacopeias. Em função de suas propriedades estimulantes, terapêuticas, anti-inflamatórias, antirreumáticas, tônicas e diuréticas, existe aproximadamente 14 preparações derivadas da erva-mate registradas no Ministério da Saúde no Brasil.^{[4][18]} Além disso, também podem ser obtidos corantes e detergentes para uso hospitalar. No exterior essa planta tem mercado em função das amplas possibilidades de aproveitamento. No Brasil ainda está sendo pesquisado a nível laboratorial sobre esses detergentes e corantes.^[19]

A erva-mate necessita passar por um beneficiamento básico para ser utilizada como chimarrão. Esse processo é constituído pelas etapas de colheita, recepção, sapeco ou branqueamento, secagem, trituração, classificação, armazenamento, moagem, mistura, embalagem e expedição. As etapas do beneficiamento podem ter algumas variações de acordo com a região. O processamento genérico e por região pode ser visualizado na **Tabela 1**.^[4]

A etapa de sapeco ou branqueamento consiste em passar rapidamente os ramos com folhas sobre as chamas do sapecador. Isto porque nas folhas da erva-mate estão presentes enzimas polifenoxidase (PFO) e peroxidase (PDO), que foram identificadas em 1928 por Senglet como sendo as responsáveis pelo escurecimento das folhas. Essas enzimas oxidam os compostos fenólicos ao retirar as folhas da planta e expô-las ao ar, escurecendo-a.^[4]

Após a inativação enzimática que ocorre na etapa de sapeco, a erva-mate passa pelo processo de secagem, responsável pela retirada da umidade. Onde o material entra com 25% de umidade e sai com umidade em torno de 5%^[4]. Esta etapa é importante pois o excesso de umidade pode ocasionar deterioração microbiológica.^[20]

O processo de secagem pode ser realizado de duas formas: por secador rotativo, onde o produto permanece em contato direto com a fumaça por

aproximadamente 30 minutos, entrando com temperatura de 350 °C e saindo com temperatura de 110 °C, ou por secador de esteira, onde o produto permanece 3 horas e a temperatura varia entre 90 °C e 110 °C, ou seja, a temperatura neste segundo tipo de secagem tem maior uniformidade.^[12] Desta forma, percebe-se que a temperatura influencia no tempo de secagem o que pode contribuir para a composição química do produto final.

Após a secagem, o produto é fragmentado reduzindo o tamanho das partículas, cujo processo recebe o nome de cancheamento. Além de reduzir o volume, aumenta a superfície exposta para que haja maior interação com a atmosfera no caso de produção de erva-mate para chimarrão. A interação com atmosfera ocorre durante a etapa de estacionamento das folhas cancheadas. Para a produção de chás o produto não passa pela etapa de estacionamento.^[21]

A etapa de estacionamento pode ser realizada de forma natural ou acelerada. No estacionamento natural, o produto cancheado é ensacado e colocado em depósitos por tempo de 6 meses a 2 anos. No método acelerado, o produto cancheado é mantido em câmaras de 30 a 60 dias com temperatura e umidade relativa (UR) controladas: 60-65 °C e 50-60 % UR.^[22] O tempo e temperatura dos processos pode variar de acordo com a região. O processo de cada região está descrito na **Tabela 1**.

Após a etapa de estacionamento, o produto é moído em um socador até a granulometria ideal do produto final, e então é realizada a mistura (*blend*) característica de cada produto, embalado e comercializado.

As etapas do processamento influenciam na composição química da erva-mate. Um exemplo desta influência está no fato de que a erva-mate verde tem uma concentração significativamente mais baixa de princípios ativos comparada à erva após o processo de sapeco e secagem.^[23]

Tabela 1. Fluxo de processamento da erva-mate (adaptado de Junior e colaboradores 2016).^[22]

Produtos tradicionais				
Colheita	Branqueamento	Secagem	Envelhecimento	Produto
Fluxo de processos genérico				
Folhas e caules são coletados, ensacados e transportados para a unidade de processamento	As folhas são rapidamente aquecidas em um cilindro rotatório, sob fogo de lenha direto ou fogo de propano para desativar as enzimas de oxidação	As folhas são colocadas em um cilindro rotatório ou correia de secagem usando aquecimento ou aquecimento por fumaça filtrada ou aquecimento sem filtração da fumaça	O produto é triturado em partículas grandes e colocado para envelhecer em câmaras de cimento ou cedro	70 % de folhas 30 % de caules, tamanho de partícula é especificado para cada produto
Processo especificamente brasileiro				
Folhas e caules entre 6 e 12 meses	Temperatura: 400 °C Tempo: 8 min	Correia de secagem 90-110 °C por 3 h cilindro rotatório: 350 °C por 30 min	O produto seco é moído, embalado e vendido sem envelhecimento ou é envelhecido por 12 meses	Chimarrão ou mate

Processo especificamente Argentino				
Processa folhas macias e caules	Temperatura: 500 °C Tempo: 10 s a 3 min ou 120-140 °C por 20-40 s	Pré-secagem: 80-100 °C 3-5min e secagem com sistema contínuo de correia 90-110 °C por 2-3 h 2-5 % de umidade relativa	Natural: 9-12 meses a temperatura ambiente ou forçado: 62 dias a 69 °C 49 % umidade	Mate
Processo especificamente Paraguaio				
Processa folhas macias e caules	Temperatura: 500°C Tempo: 10 s a 3 min	Pré secagem: 80-100 °C 3- 5 min	Natural: 9-12 meses a temperatura ambiente	Mate, mate cozido, tererê
Chá mate				
Folhas e caules com 6-12 meses	Temperatura: 400 °C Tempo: 8 min	Cilindro rotatório 350 °C/30 min	Tostagem: 120 °C/15 min	Chá mate (mate tostado)

2.1.3. Biologia reprodutiva

A erva-mate é uma planta dióica e a polinização é realizada por pequenos insetos [24,25] e a dispersão das sementes é feita por pássaros, mais comumente pelos sabiás.

A floração da erva-mate ocorre de setembro a dezembro e a frutificação de dezembro a abril em todo o país. Somente aos cinco anos de idade os processos de floração e frutificação são iniciados em árvores provenientes de sementes, enquanto as árvores de propagação vegetativa têm esses processos iniciados aos dois anos de idade.[15]

A erva-mate foi classificada em 1820 pelo botânico Saint-Hillaire:

Divisão: Angiosperma

Classe: Dicotiledônea

Subclasse: Archichmydeae

Família: Aquifoliceae

Gênero: *Ilex*

Espécie: *Ilex paraguariensis* A. St. Hill



Figura 1. Foto ilustrativa da planta de erva-mate

2.1.3. Habitat e distribuição geográfica

A erva-mate é encontrada no Brasil, região leste do Paraguai, região nordeste da Argentina e noroeste do Uruguai. Sua área de ocorrência atinge em torno de 540 mil km²^[4], sendo Brasil, Argentina e Paraguai os três principais produtores de erva-mate. A produção anual brasileira estimada é de 1,4 milhões de toneladas, e desse total, em torno de 65 mil toneladas (4,6%) são exportadas.

Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina são os estados onde a erva-mate é encontrada no Brasil, o que corresponde a uma área de aproximadamente 450 mil km² de ocorrência, que equivale a cerca de 5 % do território nacional.^[26]

Em 2013 foram produzidas mais de 515 mil toneladas de erva-mate em uma área colhida de aproximadamente 67 mil hectares, gerando uma produtividade média de 7,6 toneladas/ha.^[27]

O principal responsável pela produção de ervais cultivados ou a pleno sol com 265 mil toneladas, resultando em 52% do total é o Rio Grande do Sul, logo após está o Paraná com 195 mil toneladas, que representa 38%.^[27]

Tabela 2. Pesquisa Agrícola Municipal de 2013.^[28]

Quantidade produzida de erva-mate verde (toneladas) PAM					
Ano	Brasil	PR	SC	RS	MS
2001	645.965	339.139	48.834	252.045	5.947
2002	513.526	221.779	45.600	240.252	5.895
2003	501.702	201.694	52474	238.949	8.585
2004	403.281	133.449	37.577	222.884	9.371
2005	429.730	164.752	37.629	218.982	8.367
2006	434.483	165.076	35.292	229.569	4.546
2007	438.474	136.266	37.909	259.317	4.982
2008	434.727	132.556	41.890	256.352	3.929
2009	443.126	135.000	46.254	258.651	3.221
2010	430.305	123.132	43.266	260.413	3.494
2011	443.635	122.202	45.614	272.719	3.100
2012	513.256	180.853	69.064	260.866	2.473
2013	515.451	195.403	50.740	265.515	3.793
Part. total	100%	38%	10%	52%	1%

A extração de ervais nativos ou sombreados, no ano de 2013 resultou na produção de 344.594 toneladas de erva-mate e o Paraná contribuiu com 74% dessa produção, seguido por Santa Catarina com 20% e o Rio Grande do Sul com 6%.^[28]

Cerca de 600 municípios desenvolvem a atividade ervateira na região sul, tornando-a a maior produtora de erva-mate do Brasil, produzindo anualmente em torno de 650 mil toneladas de folhas o que envolve cerca de 710 mil trabalhadores.^[3]

Produtos derivados de erva-mate são consumidos em outros países incluindo EUA, Alemanha e Síria, para a produção de chás e bebidas energéticas. Recentemente, o consumo de produtos de erva-mate foi expandido para diferentes países (Espanha, Itália, Austrália, França, Japão, Coreia e Rússia) por causa do sabor e propriedades estimulantes.^[22]

2.1.4. Composição química da erva-mate

A composição química da erva-mate é muito complexa, apresentando metilxantinas, saponinas, taninos, vitaminas, minerais, substâncias aromáticas, ácidos graxos, terpenos, álcoois, cetonas, aldeídos, fenóis, entre outros compostos. [3,26,29–31]

Tabela 3. Composição de porção de mate (62,5 g de folhas secas) considerada como a média usada diariamente pelos consumidores^[22]

Constituintes	Conteúdo
Nutrientes (g)	
Proteínas (Nx5,75)	0,8
Carboidatos	6,5
Gorduras totais	0,5
Minerais (mg)	
Potássio	679 ± 58
Magnésio	185 ± 16
Enxofre	59 ± 9
Cálcio	44 ± 13
Fósforo	41 ± 8
Manganês	34 ± 3
Zinco	2,26 ± 0,12
Ferro	0,33 ± 0,02
Cobre	0,29 ± 0,14
Vitaminas (mg)	
Vitamina C	15
Vitamina B1	3,6
Vitamina B2	1,2
Vitamina B6	0,47
Fitoquímicos ^a (mg)	
Polifenóis	3767-4085
Metilxantinas	303-962
Saponinas	50-146

^a Estimado das tabelas de material suplementar

Diversas substâncias fitoquímicas foram identificadas na erva-mate como responsáveis pelos seus benefícios, tais como os polifenóis (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido 3,4-dicafeilalquínico e ácido 3,5-dicafeilalquínico) e as xantinas (cafeína e teobromina) obtidos a partir dos alcaloides, flavonoides (quercetina, caempferol e rutina), aminoácidos, minerais (P, Fe e Ca), e vitaminas (C, B1, e B2).^[2] A essa composição atribui-se a grande gama de propriedades que ela apresenta: antioxidante, antiobesidade, antidiabético, diurético, químiopreventivo, estimulante.^[32]

Além dos compostos já citados, foi identificada a presença de saponinas, que são mais amargas e altamente solúveis em água.^[2] As folhas de erva mate contém quantidade de saponinas relativamente alta, de 5 a 10% do peso seco^[32]. Puangraphant *et al*^[33] quantificaram e purificaram saponinas de folhas de erva-mate secas e obtiveram de 10 a 15 mg.g⁻¹ de saponinas totais do peso seco.

Devido à alta atividade biológica da erva-mate e grande concentração de compostos ativos, o extrato de erva-mate tem sido aplicado em outros alimentos e suplementos. Diversos estudos foram realizados para comprovar as propriedades das substâncias presentes na erva-mate.^[26,32,34-45]

2.1.4.1 Alcaloides

As xantinas, pertencentes à classe dos alcaloides, encontradas na erva-mate são teofilina (1,3-dimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) e cafeína (1,3,7-trimetilxantina), esta última é encontrada em maior quantidade, cerca de 1 a 2% do peso total das folhas secas, seguida da teobromina com 0,3 a 0,9% do peso total das folhas secas.^[46] O método de consumo da erva-mate influencia a quantidade de xantinas extraídas.^[32] As maiores quantidades de xantinas são extraídas com infusões parciais com água quente.^[17] A quantidade de cafeína presente em uma xícara de erva-mate (78 mg) é similar ao encontrado em uma xícara de café (85mg); entretanto, o método típico de consumo da erva-mate envolve repetidas adições de água quente o que pode acrescentar até 260 mg de cafeína.^[32]

A estrutura das metilxantinas pode ser visualizada na **Figura 2**.

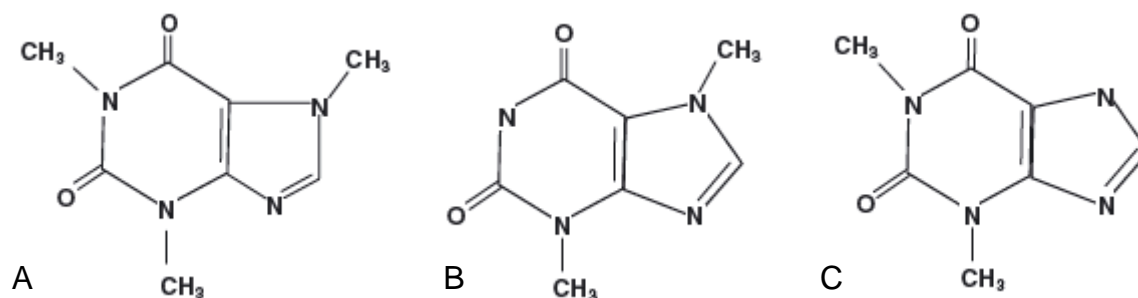


Figura 2. Estrutura das metilxantinas. 2A: cafeína, 2B: teobromina e 2C: teofilina respectivamente.

Dentre as metilxantinas, a cafeína destaca-se por ser mais estudada, possuindo propriedades estimulantes do sistema nervoso central.^[47] Além da propriedade estimulante, a cafeína apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória e antiapoptótica^[48], vasoconstritora periférica, relaxante muscular e estimulante do miocárdio.^[49] A indústria de cosméticos usa cafeína em produtos com ação anticelulite, por aumentar a microcirculação do sangue, e em produtos capilares, por estimular o crescimento de cabelo.^[47]

2.1.4.2 Polifenóis

Os polifenóis são moléculas que possuem o grupo aromático ligado a grupos hidroxila. Os métodos descritos na literatura científica para determinar o conteúdo de polifenóis são: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), e para identificar o teor total de polifenóis (TPC): tirosinase, biosensor e Folin Ciocalteu.^[2,22,32]

Os ácidos clorogênicos (CGA, do inglês *chlorogenic acids*) são uma família de ésteres formados entre os ácidos trans-cinâmicos (ácido cafeico, ferúlico, *p*-cumárico) e ácido quínico^[50-57], os quais pertencem à ampla classe denominada polifenóis.

O grupo de ácidos clorogênicos mais abundante na natureza é o de ácidos cafeoilquínicos (CQA). Os CQA's são formados pela esterificação de uma molécula de ácido cafeico com uma molécula de ácido quínico. Os produtos desta reação são os isômeros 3-CQA, 4-CQA e 5-CQA. Se a reação ocorre entre dois resíduos de ácido cafeico e um resíduo de ácido quínico, os produtos formados são o 3,4-DI-CQA, 3,5-DI-CQA e 4,5-DI-CQA.^[50-57]

Em média, cada grama de folhas gera em torno de 92 mg de ácido clorogênico. A concentração de polifenóis mostra forte correlação com a capacidade antioxidante.^[2]

Utilizando o método DPPH , $7,73 \pm 0,15$ mg de ácido clorogênico .mL⁻¹ de extrato aquoso apresenta em torno de $90,45 \pm 0,22\%$ de inibição de radicais livres^[2]

Segundo Turkmen *et al*^[58], utilizando como solvente uma solução água:acetona (1:1), há uma maior eficiência de extração de polifenóis.

Os derivados cafeoil são o ácido cafeico, ácidos 3,5-dicafeoilquínico (3,5-DI-CQA) e 4,5-dicafeoilquínico (4,5-DI-CQA).

Nome e abreviação	R ₃	R ₄	R ₅
ácido-3-o-cafeoilquínico (3-CQA)	C	H	H
ácido-5-o-cafeoilquínico (5-CQA)	H	H	C
ácido-4-o-cafeoilquínico (4-CQA)	H	C	H
ácido-3,4-di-o-cafeoilquínico (3,4-DI-CQA)	C	C	H
ácido-3,5-di-o-cafeoilquínico (3,5-DI-CQA)	C	H	C
ácido-4,5-di-o-cafeoilquínico (4,5-DI-CQA)	H	C	C

Figura 3. Estrutura molecular dos derivados cafeoil.^{[50][59]}

Os derivados cafeoil podem ser analisados por HPLC e espectrometria UV no comprimento de onda 330 nm e também HPLC acoplada ao detector de arranjo de diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detection*) com absorções em 242, 228 e 330 nm.^[2]

Segundo Filip *et al*^[36], os teores de ácidos cafeoil são correlacionados com ácido clorogênico numa concentração de $6,9 \pm 0,09$ mg.g⁻¹ de folhas secas ao se determinar o teor dos mesmos por HPLC VWD com leituras em 330nm.

Os flavonoides encontrados na erva-mate, como por exemplo a rutina, são estudados por suas propriedades quimiopreventivas. Mesmo sendo encontrada em baixas concentrações, podem contribuir para seu potencial anticâncer. [2]

A estrutura química da rutina está representada na **Figura 4**.

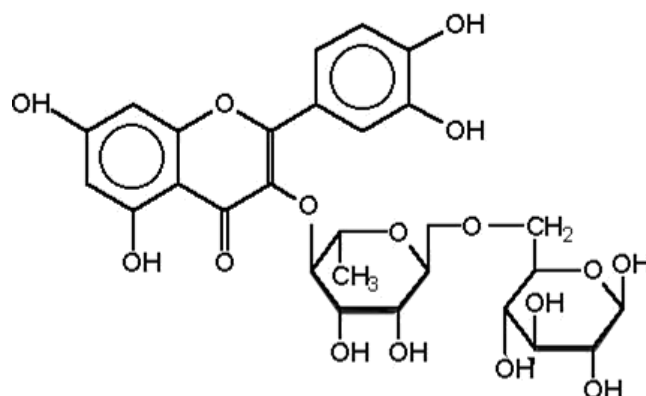


Figura 4. Estrutura química da rutina^[60]

A rutina pode ser associada a proteção das membranas celulares, lipoproteínas e DNA. [2,38]

2.1.4.3 Atividade Antioxidante da erva-mate

A propriedade antioxidante foi estudada e publicada nos anos de 1995 por Gugliucci e Stahl mostrando que os extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* apresentavam a propriedade de inibir a oxidação lipídica.^[61] Em 1998^[41], 2000^[36], 2006^[62,63], 2007^[5], 2010^[40] também foram publicados trabalhos científicos sobre a propriedade antioxidante. Demais propriedades da erva-mate foram estudadas e publicadas: propriedade antiobesidade foi publicada em 2001^[37] antidiabético em 2005^[38], diurético em 2005^[64], estimulante em 1998 e 2000^[30,65], e antimicrobiano nos anos de 1993^[44], 2000^[45], 2007^[42], 2008^[43] e 2011^{[66][32]}

A influência das etapas de processamento da erva-mate pode afetar a concentração de compostos bioativos. Foram publicados trabalhos científicos em que se verificou o aumento das concentrações do ácido clorogênico e seus derivados, cafeína, teobromina e rutina na etapa de sapeco e secagem com relação às folhas verdes.^[39] Somente a cafeína sofre um decréscimo na concentração durante a etapa de secagem. Acredita-se que o aumento da concentração de

cafeína durante o sapeco seja devido às reações de degradação que envolvem os ácidos nucleicos deixando as purinas liberadas para a reação de síntese da cafeína.^[67]

A atividade antioxidante de substâncias naturais tem como fator determinante a solubilidade dos compostos, pois existe uma tendência denominada paradoxo antioxidante em que se observa que os antioxidantes lipofílicos tem melhor eficiência em alimentos com grande concentração de água, enquanto os antioxidantes polares são mais efetivos em óleo.^[68]

A fim de comprovar a atividade antioxidante em substratos orgânicos, alguns métodos são comumente utilizados, como o sequestro do radical 2,2-difenil-14-picril-hidrazil (DPPH) que é um método colorimétrico, ou o sequestro do radical peroxil (ORAC, do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), um método fluorimétrico.^[69]

O método ORAC é baseado na propriedade fluorescente da proteína B-ficoeritrina (B-PE) que foi primeiramente isolada de *Porphyridium cruentum*, e da proteína R-ficoeritrina (R-PE) isolada de algas vermelhas.^[69]

No ensaio, o radical peroxil é gerado pela reação de APPH [dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)] com oxigênio atmosférico. O resultado desta reação é um produto não fluorescente que pode ser medido por espectrofotometria com máxima emissão de fluorescência em 575 nm (B-PE) e 578 nm (R-PE) através do decaimento da fluorescência inicial.^[70] A inibição da oxidação, medida pelo decaimento da fluorescência com adição da substância antioxidante em função do tempo, avaliada pela atividade antioxidante que é determinada pela diferença entre área da amostra e área do branco (amostra sem antioxidante presente).^[69]

Devido a limitações de fotossensibilidade e alta variabilidade na utilização da proteína B-PE (β -ficoeritrina), Ou *et al*^[71](2001) a substituíram por fluoresceína (FL), tornando o ensaio mais barato, reprodutível e robusto (ORACFL).

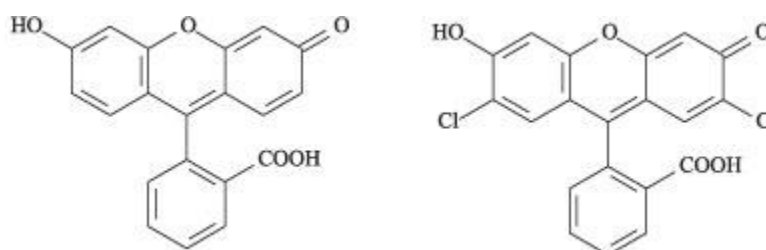


Figura 5. Estrutura da fluoresceína (esquerda) e diclorofluoresceína (direita)^[71]

Para a quantificação utiliza-se Trolox em concentrações conhecidas, que geram uma curva padrão permitindo calcular a atividade ORAC ou equivalentes de Trolox.^[72,73] O método oferece informações sobre a capacidade antioxidante de alimentos, frutas, extratos vegetais e substâncias isoladas.^[74-78]

2.2. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Diversos métodos de extração de polifenóis e metilxantinas em erva-mate foram testados. Em vários estudos foi utilizada a mistura de água e metanol em proporções variadas para extrair estes componentes conforme pode ser observado na **Tabela 5**.

Tabela 4. Extrações de polifenóis e metilxantinas apresentados na literatura

Solvente	Tipo de extração	T (°C)	Tempo de extração (min)	Quantificação	Determinação	Ref
61% etanol	refluxo	71	103	TPC ^a : 31,1+-1,2 mg GAE ^b / mL de extrato	RP-HPLC/UV	[79]
H ₂ O	agitação	95	3	TPC ^a : 1,915 mg GAE ^b / mL de extrato	HPLC	[80]
MeOH:H ₂ O	NI ^c	NI ^c	NI ^c	NI ^c	UPLC-PDA-MS	[23]
H ₂ O 100°C	NI ^c	NI ^c	NI ^c	NI ^c	HPLC	[39]
40%MeOH	NI ^c	NI ^c	NI ^c	3,4 DI-CQA: 81,9 mg/100 g amostra; 3,5 DI-CQA: 145,0 mg/100 g de amostra; 4,5 DI-CQA: 242,8 mg/100 g de amostra.	HPLC/UV e LC/DAD ESI-MS	[52]
H ₂ O	infusão	95	NI ^c	NI ^c	HPLC/UV e LC/DAD ESI-MS	[52]
H ₂ O	refluxo	NI ^c	20	NI ^c	HPLC	[81]
H ₂ O	infusão	98	10	NI ^c	Folin Ciocalteu	[82]
H ₂ O	infusão	85	5	NI ^c	HPLC	[40]
EtOH:H ₂ O(70:30)	maceração	NI ^c	NI ^c	NI ^c	HPLC	[55]
MeOH 70% v/v	soxhlet	NI ^c	20	TPC ^a : 1,7 e de 3 a 3,5%	HPLC	[83]
MeOH 80% v/v	ultrassom	NI ^c	10	TPC ^a : 5,21 g GAE ^b /100g de amostra	HPLC	[40]

^a Concentração total de polifenóis (Total Poliphenol Content); ^b Equivalente de ácido gálico; ^c Não informado

A eficiência na extração de compostos bioativos em plantas depende de vários parâmetros como temperatura, tempo, polaridade do solvente, pH, entre outros, e seus efeitos podem ser independentes ou interativos^[84].

Como métodos comumente utilizados para extração de compostos bioativos pode-se citar os convencionais: extração por soxhlet e maceração; e os métodos mais recentes: extração por micro-ondas e extração assistida por ultrassom.

A extração convencional, que foi usada por muitos anos, é normalmente feita com refluxo a 90 °C por muitas horas ou maceração com solvente por dias a temperatura ambiente. Esses métodos são demorados além de necessitarem de grandes quantidades de solvente. Recentemente os métodos de extração assistida por ultrassom e extração por micro-ondas vêm sendo utilizados para compostos fenólicos.^[85] Um exemplo disso é a extração de uma variedade de classes de compostos fenólicos de diferentes matrizes com a utilização do micro-ondas como: bagaço de maçã^[86], framboesa^[87], folhas de chá verde^[88], semente de uva^[89], farelo de trigo.^[90] Esta técnica também pode ser utilizada sem solvente^[91], no caso de óleos essenciais, e também com micro-ondas portátil.^[92]

O ultrassom começou a ser utilizado para a extração de polissacarídeos de plantas em 1995. Depois disso, houve um aumento de publicações utilizando o ultrassom para a extração de princípios ativos de plantas e compostos orgânicos de diferentes matrizes, sendo possível a redução do tempo de extração de 3 a 10 vezes.^[93] Como exemplo de extrações em diversas matrizes podem ser citados: compostos fenólicos em cremes cosméticos, ácidos orgânicos em uvas, polifenóis em morangos, isoflavonas em soja, capseicínoides de pimenta.^[88,94–96] A técnica promove a diminuição do tempo e o incremento na eficiência de extração, reduzindo as quantidades de solventes, tempo e energia, tornando-a uma técnica de extração ambientalmente amigável.^[97]

Abaixo podem ser observados alguns trabalhos que foram realizados utilizando a extração assistida por ultrassom em matrizes de plantas:

Qu *et al*^[71] desenvolveram um método utilizando ultrassom e metanol em comparação ao método por soxhlet, para a extração de sulfonato de alquilbenzeno linear (LAS) em tecidos de plantas (caules e folhas de arroz). As suas vantagens em relação à extração de Soxhlet foram velocidade, o consumo de menos solvente, e exigência de menor quantidade de amostra.^[98]

Utilizando a extração assistida por ultrassom (EAU) para extrair compostos fenólicos e antocianinas do bagaço da produção de vinho de mirtilo, houve um acréscimo no rendimento da extração comparado ao método de extração convencional por solvente. Com as condições da UAE otimizadas em 61,03 °C, 23,67 min e razão solvente/sólido de 21,7 mL . g⁻¹ de bagaço, foi possível obter a melhor concentração das substâncias: 4,11 mg C3G (cianidina-3-o-glucosídeo) . g⁻¹ de bagaço e 16,01 mg GAE (equivalente ácido gálico) . g⁻¹ de bagaço contra a extração convencional que obteve apenas 1,72 mg C3G . g⁻¹ de bagaço e 5,08 mg GAE . g⁻¹ de bagaço.^[99]

Para extrair ácido clorogênico da alcachofra, o método de EAU pode ser considerado comparável ao método de refluxo, sendo utilizada para EAU a temperatura ambiente por 15 minutos, enquanto a extração por refluxo é feita por 30 minutos. A concentração de ácido clorogênico extraída fica em torno de 7 mg de ácido clorogênico . g⁻¹ de folhas secas.^[53]

A extração assistida por ultrassom também foi utilizada para extrair compostos fenólicos e antocianinas de melão de beterraba, sendo obtidas as melhores condições de extração com temperatura entre 41 e 48 °C, tempo de extração entre 66 e 73 min e solução extrativa de 57 a 63 % de etanol v/v acidificado com 1,55 a 1,72 mol.L⁻¹ de HCl. Com estas condições foram obtidos concentrações de 17,36 mg GAE (equivalente ácido gálico) . 100 mL⁻¹ de extrato de melão; 16,66 mg TE (equivalente trolox) . g⁻¹ de extrato de melão e 31,81 mg C3G (cianidina-3-o-glucosídeo) . 100 mL⁻¹ de extrato de melão.^[100]

Oito compostos bioativos foram extraídos de flores de crisântemo secas utilizando ultrassom, sendo as condições de extração otimizadas para uma solução extrativa 65,24% metanol, tempo de extração de 21,93 min e razão líquido/sólido de 30,44 mL . g⁻¹. Entre os compostos extraídos encontram-se o 5-CQA e o 3,5-DI-CQA.^[101]

O ultrassom também foi utilizado na extração de capseicínides de pimenta, obtendo melhores condições de extração utilizando metanol como solvente por 10 min a 50 °C e razão líquido/ sólido de 25 mL . g⁻¹ de pimenta.^[102]

2.3. MÉTODOS DE ANÁLISE DE COMPOSTOS BIOATIVOS

As cromatografia líquida de alta eficiência é amplamente utilizada para a determinação de compostos bioativos presentes em matrizes complexas, com alto grau de resolução mesmo em extratos contendo grande número de compostos bioativos e termicamente instáveis.^[51,103,104]

Como exemplo da utilização desta técnica, pode-se citar a determinação de capsaicinoides em pimenta^[102], compostos bioativos em flores de crisântemo^[101], compostos fenólicos em produtos feitos com maçã^[105], compostos bioativos em café^[106]. A fragmentação de dezoito ácidos clorogênicos em extrato metanólico de café foi realizada utilizando a técnica de LC-MSⁿ.^[50]

A composição bioativa da erva-mate em diferentes condições de crescimento, tratamento, cultivo (a pleno sol e a plena sombra) e envelhecimento foi realizada utilizando a técnica de HPLC, na maioria das vezes a técnica foi utilizada de forma hifenada a espectrometria de massas.^[23,82,107,108]

Dartora *et al*^[23] avaliaram a composição de compostos bioativos da erva-mate com diferentes condições de crescimento, tratamento e envelhecimento utilizando a técnica de HPLC acoplada a espectrômetro de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometer*). Neste estudo, foram identificados as massas e fragmentos dos compostos presentes nas amostras com o espectrômetro de massas, e a separação dos compostos foi feita por HPLC e a quantificação com curva de calibração.

Heck *et al*^[82] também utilizaram a técnica de HPLC para determinar a composição bioativa da erva-mate em diferentes condições de crescimento e secagem.

Dugo *et al*^[108] utilizaram técnica de HPLC bidimensional acoplada a espectrômetro de massas para identificar os biocompostos presentes na erva-mate.

Assim como na erva-mate, no café também são encontrados compostos bioativos, e estes também são determinados por HPLC. Rodrigues e Bragagnolo^[106] identificaram e quantificaram estes compostos utilizando a técnica de HPLC-DAD-MSⁿ.

Clifford *et al*^[50] identificaram o comportamento da fragmentação de dezoito ácidos clorogênicos em extrato metanólico de café utilizando a técnica de LC-MSⁿ.

Riachi *et al*^[107] utilizaram HPLC para determinar a composição bioativa em diferentes amostras de cultivo (pleno sol e sombra) e processamento (secagem, sapeco e tostagem) da erva-mate.

Devido às características acima citadas e aos trabalhos realizados e publicados por outros grupos, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido considerada convencional para a determinação de compostos bioativos da erva-mate.^[108–110]

2.4 FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

O uso de ferramentas quimiométricas é reconhecido desde a década de 60^[111], e, em ciência e tecnologia de alimentos, essas ferramentas podem ser consideradas novas.^[112–115] Apesar disso, o planejamento de experimentos em conjunto com análise estatística apropriada dos dados é de suma importância para verificar tendências e associações entre nutrição, biologia, farmacologia, propriedades funcionais e os componentes químicos e extratos de plantas e alimentos.^[116]

2.4.1 Análise por componentes principais (PCA)

Em quimiometria, a análise por componentes principais (PCA, do inglês *principal components analysis*) é considerada uma das mais importantes ferramentas.^[117]

É uma análise exploratória não supervisionada que permite a verificação de diferenças entre amostras, formação de conjuntos de amostras por comportamento e também caso haja amostras que não se enquadram em nenhum conjunto. Isto é possível, visto que reduz o número de variáveis envolvidas através de combinações lineares das respostas originais, deixando somente a informação mais relevante, formando um novo conjunto de variáveis que passam a ser chamadas de componentes principais (PC) do inglês *principal components*.^[118,119] As PC's são ortogonais umas às outras, sendo calculadas a partir da maior variação, de forma que PC1 explica maior variação que PC2, e assim sucessivamente, sendo este o

motivo pelo qual poucos PC's explicam a maioria da variância dos dados.^[116] As PC's são obtidas de acordo com a **Equação 1**.^[115]

$$X = TL^T + E$$

Equação 1. Matriz de dados

Onde T é a matriz de escores, são os elementos que correspondem aos valores que as amostras assumem na componente principal. Essa matriz mostra as similaridades e diferenças entre as amostras;

L é a matriz de *loadings* ou matriz de pesos, são os coeficientes resultantes da transformação linear dos eixos originais em PCs. Evidencia as variáveis responsáveis pelas similaridades e diferenças entre as amostras. E E corresponde à matriz de resíduos.

Se o objetivo principal é verificar a associação entre compostos bioativos e propriedades funcionais, assim como se existem numerosas amostras e respostas no estudo, o PCA é indicado.^[115]

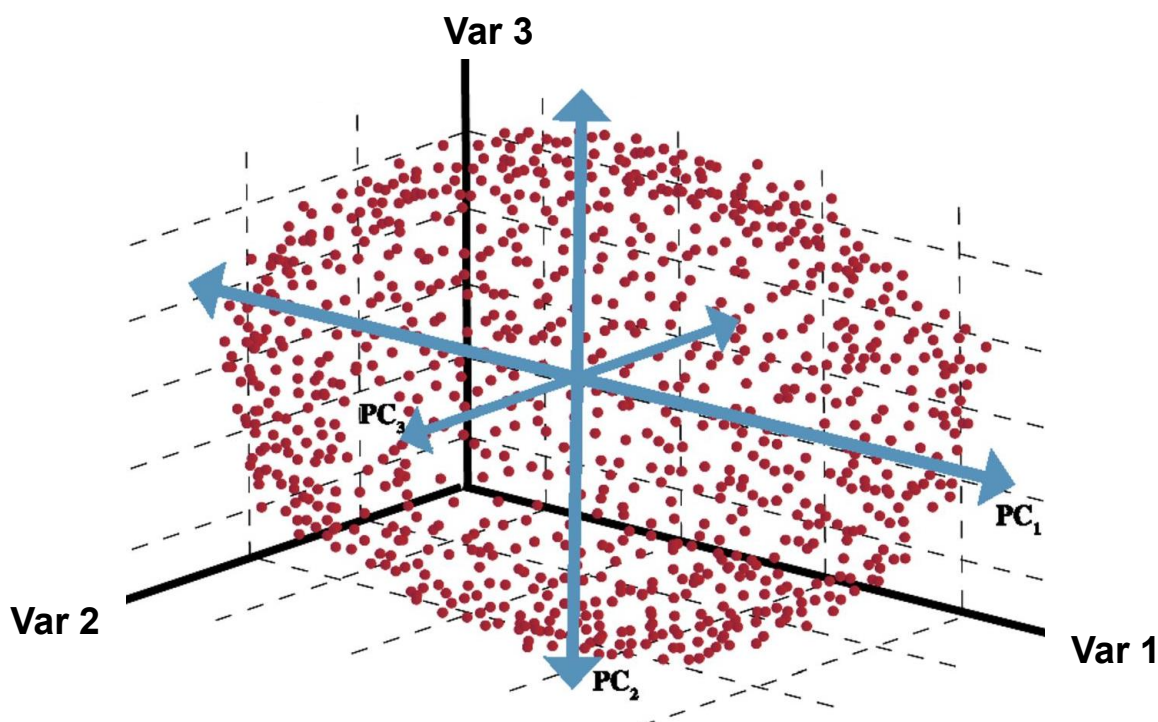


Figura 6. Diagrama variâncias e PC's adaptado de E. M. Humston, R. E. Synovec, 2011.^[120]

Dos Santos *et al* (2017) quantificaram 13 compostos fenólicos em 96 polpas de goiaba (*Psidium guajava* L.) por HPLC, incluindo ácido clorogênico e rutina. O

PCA foi capaz de explicar 60% da variabilidade dos dados em 2 componentes principais e foi clara a separação entre os tipos branca e vermelha.^[121]

Fraige *et al* (2014) utilizaram PCA para estudar o perfil das antocianinas analisadas por HPLC-DAD-MS em 11 tipos de uvas de diferentes variedades e origem geográfica. Os resultados mostraram as uvas híbridas separadas do grupo de uvas viníferas. No grupo de uvas viníferas foi possível discriminar os diferentes tipos de uvas, mas não foi verificada diferença com relação à origem geográfica.^[122]

Para Riachi *et al* 2018 ^[107] a PCA não indicou distinção entre amostras de erva-mate cultivadas a pleno sol e à sombra em relação à composição fenólica, sugerindo que a exposição do erval durante o cultivo não influencia na composição fenólica. Em compensação a cafeína mostrou aumento de concentração significativa nas amostras cultivadas à sombra em comparação às amostras cultivadas a pleno sol. Além da comparação de exposição do erval durante o cultivo, também foram avaliados os efeitos das etapas de processo sapeco, secagem e tostagem, e a temperatura de tostagem mostrou-se o fator mais importante no que diz respeito à composição fenólica.

2.4.2 Análise hierárquica de agrupamentos (HCA)

A análise hierárquica de agrupamentos (HCA, do inglês *hierarchical cluster analysis*) é uma análise exploratória não supervisionada que explora a organização das amostras em grupos e entre os grupos, formando uma hierarquia. Pode ser aglomerativa ou divisiva. No caso de HCA aglomerativo, cada amostra é considerada como um grupo, após, pares de grupos vão sendo unidos. Na HCA divisiva, o algoritmo inicia com um grupo incluindo todas as amostras e partir daí, vão sendo divididos.^[115]

O dendograma é o gráfico bidimensional onde se visualiza os agrupamentos e similaridades entre as amostras. A construção do dendograma é realizada a partir da equação 2

$$S_{ij} = 1 - \frac{d_{ij}}{d_{\max}}$$

Equação 2. Similaridade

Onde S_{ij} é a similaridade ou agrupamento entre duas amostras

d_{ij} é a distância entre as duas amostras

d_{\max} é a distância máxima entre todas as amostras

Para avaliar a associação multivariada entre compostos bioativos e bioatividade em alimentos, bebidas e seus extratos, a HCA e PCA tem sido muito utilizadas em conjunto.^[115]

3. PARTE EXPERIMENTAL

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTES

O solvente orgânico utilizado metanol grau HPLC foi obtido do fabricante JT Baker (Center Valey, PA, EUA) e o Ácido fórmico PA da marca Synth (Diadema, SP). Os padrões utilizados para a identificação dos compostos foram: ácido-5-cafeoilquínico (99,7% de pureza) da marca Fluka (Milwaukee, EUA), rutina (95% de pureza), cafeína (99% de pureza) e teobromina (99% de pureza) da marca Sigma-Aldrich (Milwaukee, EUA). Para todas as preparações foi utilizada água ultrapura obtida por equipamento de Milli-q (Massachusetts, EUA).

3.2. PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram obtidas na ervateira Barão, no município de Barão de Cotegipe (RS). Cada erva-mate foi obtida através do processo específico conforme mostrado nas **figuras 7, 8 e 9**:

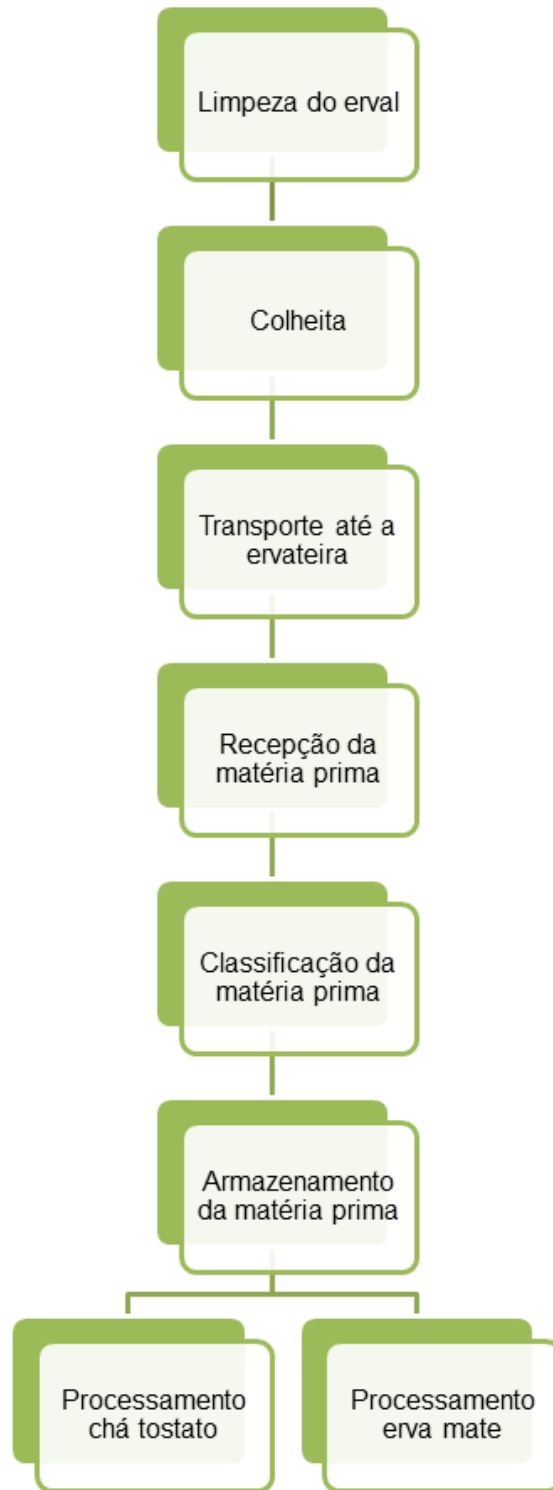


Figura 7. Pré-processamento da matéria-prima.

A limpeza do erval é realizada anualmente por roçadas manuais. A colheita é feita manualmente e a erva-mate é colocada em panos exclusivos para ser transportada. O transporte é realizado por caminhão destinado somente ao

transporte de erva-mate. Na recepção, a matéria-prima é pesada e recebe número de lote. A classificação é feita a fim de atribuir a etapa de secagem adequada a cada qualidade atribuída às ervas. O sapeco é realizado depositando-se a matéria-prima em esteira que passa diretamente nas chamas do fogo para que haja a inativação enzimática e garanta a permanência da coloração verde. Na secagem por processo convencional, a erva-mate passa três vezes pelo secador rotativo com temperatura de aproximadamente 400 °C por 1h30 min. Na secagem por processo brando ocorre a desidratação da erva-mate passando cinco vezes pelo secador de esteiras com temperatura de 120 °C por 6h30 min.

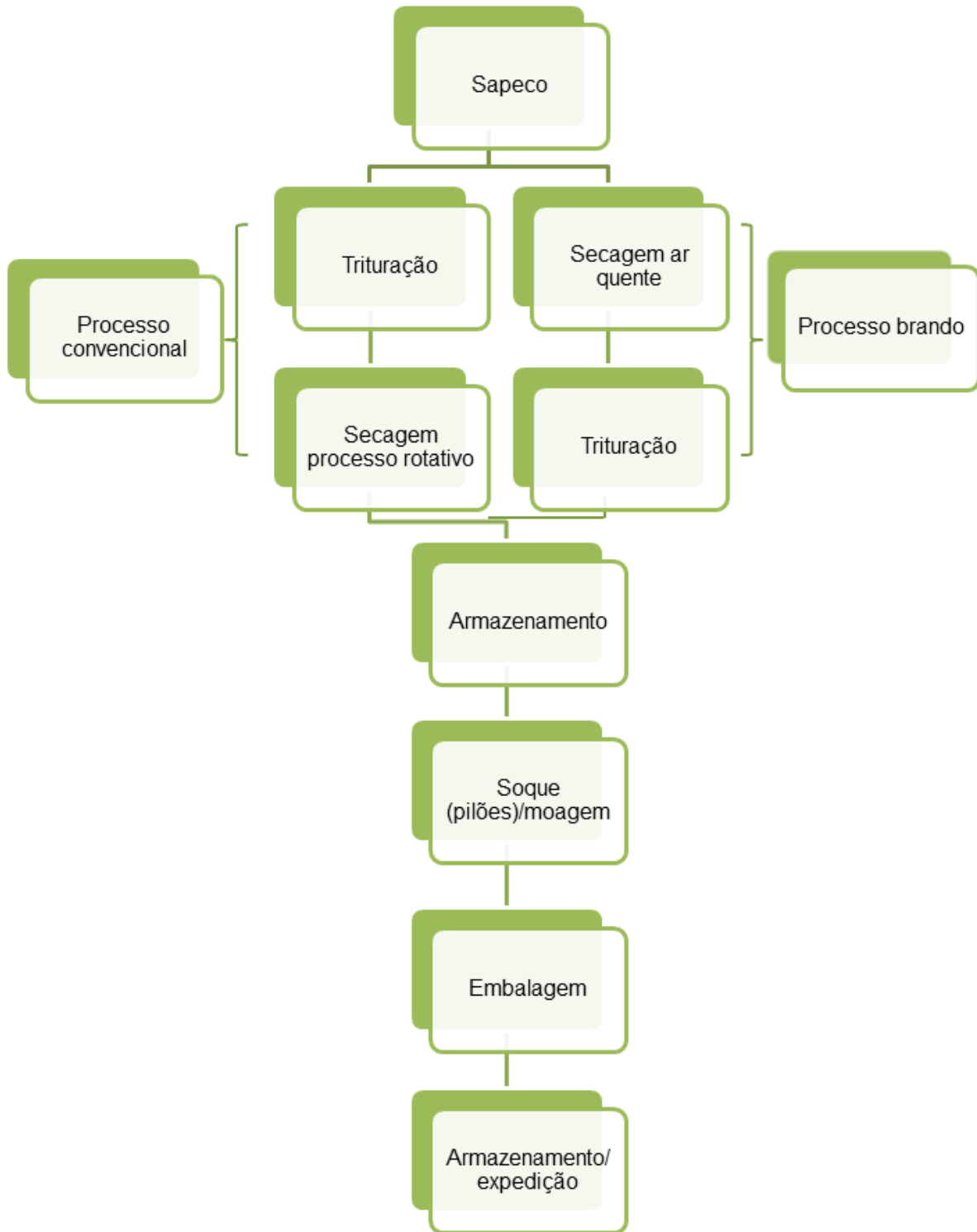


Figura 8. Fluxograma de operações erva-mate da Ervateira Barão.



Figura 9. Fluxograma de operações chá mate tostado da Ervateira Barão.

Três lotes de cada tipo das seguintes ervas-mate vendidos no mercado foram analisados: tradicional, uruguai, premium, tererê natural, cambona embalada a vácuo, pícolo chimarrão, cambona e orgânica.

Posteriormente foram analisados três lotes de chá mate tostado e ervas provenientes de dois tipos diferentes de secadores: nativa – secador esteira sem fumaça e plantada – secador rotativo com fumaça.

Além das amostras citadas acima, foram analisadas misturas de três lotes de ervas verde nativa, verde plantada, sapecada nativa e sapecada plantada.

No total, foram 15 diferentes amostras analisadas.

As características que diferenciam cada tipo de erva são:

Cambona: matéria-prima proveniente de progênie bi-clonal, ou seja, cruzamento controlado da mesma planta masculina e feminina que passa por secagem em evaporador rotativo.

Chá tostado: erva-mate que passou por todo o processamento tradicional, e por fim passa por torra semelhante ao processo do café.

Orgânica: erva-mate plantada e certificada orgânica proveniente de uma área específica e controlada. Neste tipo, a secagem é feita por ar quente.

Pícolo chimarrão: erva-mate de qualidade inferior que passa por secagem tradicional por secador rotativo.

Premium: erva-mate de primeira qualidade, secagem feita com ar quente.

Sapecada: erva-mate plantada que passou apenas pelo processo de sapeco.

Tererê natural: erva-mate tipo tererê com secagem tradicional por secador rotativo.

Tradicional: mistura de erva-mate plantada e nativa, secagem tradicional por secador rotativo e por ar quente.

Uruguai: mistura de erva-mate plantada e nativa estacionada por no mínimo 8 meses, secagem tradicional por secador rotativo e por ar quente.

Verde: folhas in natura

As amostras de folha verde e sapecada foram previamente liofilizadas em um liofilizador Thermo Scientific (Waltham, EUA) e posteriormente trituradas em um cadinho. Todas as amostras foram peneiradas a uma granulometria de 0,84 mm de abertura (20 mesh).

3.3 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO 5-CAFEOILQUÍNICO E DERIVADOS, CAFEÍNA, TEOBROMINA E RUTINA EMPREGANDO EAU

A extração foi realizada em um equipamento de banho de ultrassom Unique (Indaiatuba, Brasil) de frequência 40 kHz, pesando-se cerca de 0,25 g de amostra em balança analítica Ohaus modelo Adventurer (Pine Brook, EUA) utilizando 25 mL de uma solução extrativa metanol:água v/v (80:20) a 60°C, por 10 minutos. Os extratos obtidos foram submetidos à filtração em membrana de acetato de celulose 0,22 µm, diluídos 50 % v/v com a solução extrativa e analisados por cromatografia líquida (HPLC), conforme descrito por Pagliosa *et al*^[40] com modificações.

3.4. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO-5-O-CAFEOILQUÍNICO E DERIVADOS, CAFEÍNA, TEOBROMINA E RUTINA

A separação, identificação e quantificação dos compostos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos acoplada à espectrometria de massa com ionização por eletrospray (HPLC -DAD/ESI-MS).

Para a determinação dos compostos nos extratos foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo 20-AD, com injetor automático, degaseificador de fase móvel DGU-20A3 forno de aquecimento CTO-20A e detector de arranjo de diodos SPD-M-20A acoplado a um espectrômetro de massas Bruker modelo Esquire 6000 íon trap, com fonte de ionização por electrospray (MS-ESI).

Para a separação foi utilizada uma coluna de fase reversa Phenomenex C18 Synergi Hydro-RP 80A (25 cm x 4,6mm x 4 µm).

As condições do método cromatográfico foram vazão de 1 mL.min⁻¹ e temperatura do forno de 30°C. A fase móvel A foi composta de água acidificada com 0,3% de ácido fórmico e a fase móvel B, metanol acidificado com 0,3% de ácido fórmico. O gradiente da análise foi: 0% de fase B em 0 min, 30% de B em 16 min, 35 % de B em 21 min, 40% de B em 25 min, 60 % de B em 41 e mantendo por 2 minutos, retornando à condição inicial em 2 min e mantendo por 7 min.

Os espectros de massas foram adquiridos com um scan range de *m/z* 100 a 1000, e também pelo monitoramento dos íons característicos dos compostos estudados (modo SIM) Os parâmetros do MS foram os seguintes: fonte ESI nos modos de ionização positivo e negativo; voltagem do capilar: 2000 V; *end plate offset*: -500 V; saída do capilar: -110 V; temperatura e vazão do gás de secagem 310 °C e fluxo: 8 L.min⁻¹; pressão do gás nebulizador: 30 psi; o MS² foi realizado no modo automático com a energia de fragmentação variando de 35 a 50 eV.

A identificação positiva dos compostos nas amostras foi realizada pela comparação com os dados cromatográficos (tempo de retenção), espectrofotométricos (espectro de absorção no UV-Vis) e espectrométricos (íons moleculares e fragmentos) dos padrões analíticos. A identificação tentativa dos compostos foi possível através da comparação dos espectros de massas gerados e ordem de eluição dos compostos no sistema com dados da literatura.

Para as análises cromatográficas inicialmente foram utilizadas uma mistura de padrões: cafeína, teobromina, teofilina, e 5-CQA na concentração 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As condições cromatográficas utilizadas foram adaptadas de acordo com Rodrigues *et al.*^[106] com algumas modificações. Os cromatogramas obtidos foram analisados e os picos cromatográficos integrados em três comprimentos de onda máximos: 272 nm (máximo de absorção da cafeína e teobromina), 325 nm (máximo de absorção do 5-CQA) e 353 nm (máximo de absorção da rutina).

A quantificação do 5-CQA, CAF, TEOB e RUT nos extratos foi realizada mediante padronização externa. As curvas de calibração foram preparadas separadamente com faixas de concentração de 0,24 a 78,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para TEOB, de 3,0 a 183,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para CAF, de 2,6 a 108 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para rutina e de 6,5 a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o 5-CQA. Os ácidos derivados do 5-CQA foram quantificados por equivalência ao 5-CQA. A avaliação da linearidade foi realizada mediante injeção de 3 curvas independentes de cada composto, determinando a faixa linear por meio da análise de regressão linear empregando o método dos mínimos quadrados expressos pelo coeficiente de determinação (r^2). A avaliação da repetitividade foi realizada mediante 7 injeções independentes do ponto médio de cada curva, obtendo coeficiente de variação (CV%) menor que 5% para todos os analitos. A recuperação foi avaliada mediante extração exaustiva até que a linha de base não sofresse perturbação dos analitos e então comparada com a extração proposta para verificar a recuperação.

3.5 ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (MÉTODO ORAC)

O ROO[•] (desativação do radical peroxila) foi gerado por decomposição térmica do 2,2'-azobis(2-amidinopropano)di-idrocloro (AAPH) a 37 °C. A capacidade de desativação do ROO[•] foi medida por fluorescência, através do

monitoramento da queda da fluorescência, devido à oxidação da fluoresceína. ^[123] A reação foi realizada com um volume final de 200 μ L, tendo os seguintes reagentes (concentrações finais): AAPH (19,1 mM), fluoresceína (61,2 nM) e extrato em cinco concentrações. As leituras de fluorescência foram realizadas nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 ± 20 nm e 528 ± 20 nm, respectivamente, sob forma de cinética, com intervalos de 1 min, até o valor da fluorescência reduzir a 0,5 % da fluorescência inicial. Os resultados dos extratos foram expressos em equivalente a Trolox, obtidos mediante construção de uma curva de calibração de Trolox (12 – 94 μ M).^[123]

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

Para a identificação e quantificação foi utilizado o software LC Solution da Shimadzu. A identificação dos fragmentos de massas foi feita utilizando o Software Esquire 6000. Os dados foram analisados por componentes principais utilizando o software ChemoStat[®] versão 2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

Na **Figura 11** podem ser observados os cromatogramas com uma boa separação entre os compostos, após algumas modificações realizadas no método cromatográfico.

A identificação foi realizada por meio da injeção de padrões para os compostos teobromina, cafeína, rutina e 5-CQA. Os demais ácidos foram identificados por LC/MSⁿ por meio do espectro de massas e comparação de fragmentos dos analitos do MSⁿ com dados da literatura, conforme a **Tabela 6**.

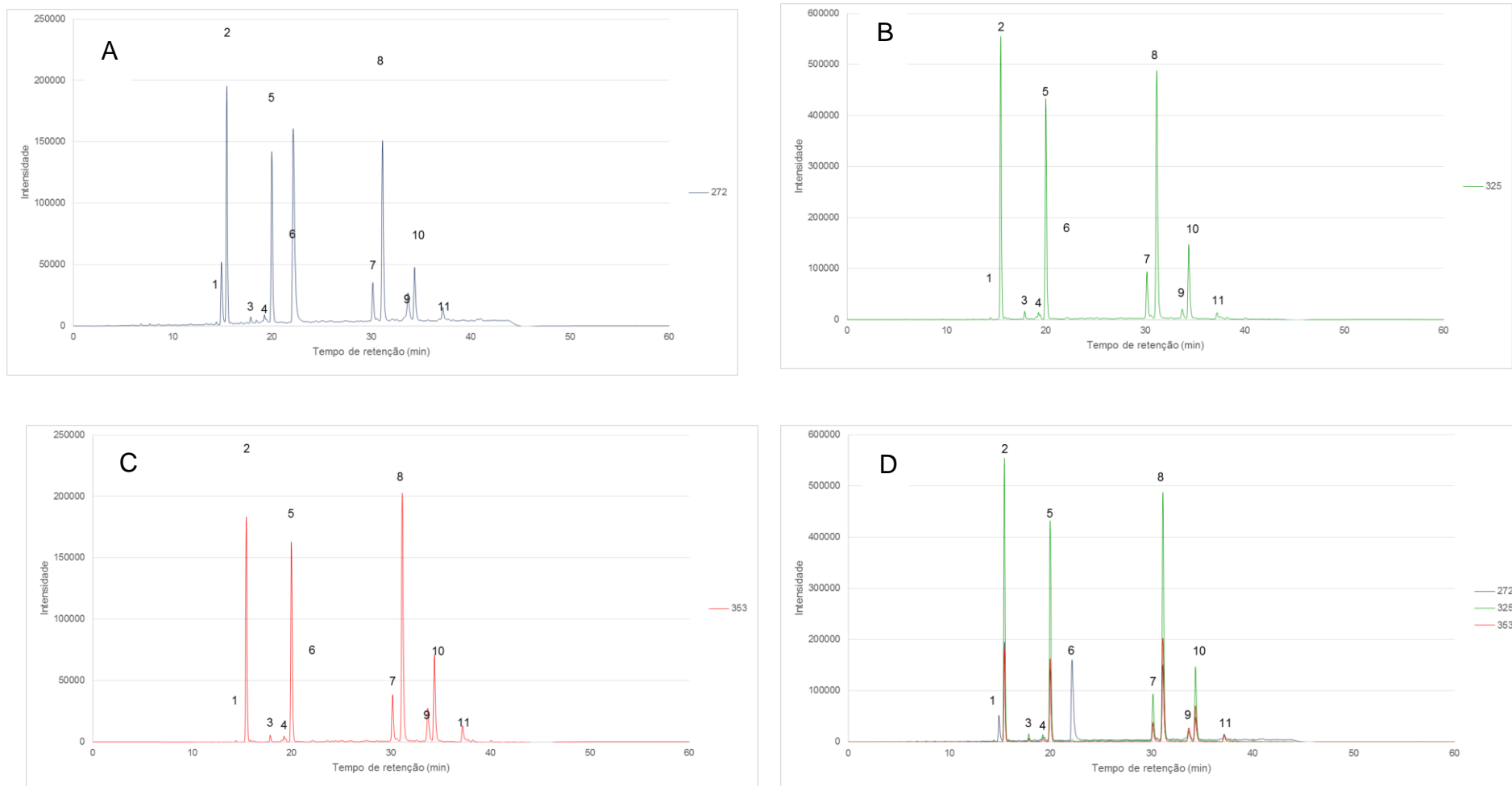


Figura 10. Cromatograma obtido por HPLC-DAD correspondente ao método desenvolvido (amostra premium): A - 272 nm; B – 325 nm; C – 353 nm; D - sobreposição dos três comprimentos de onda, picos: 1 – teobromina; 2 – 3-CQA; 3 - cis-3-CQA ; 4 – 4-CQA ; 5 – 5-CQA; 6 – cafeína, 7 – 3,4-DI-CQA; 8 – 3,5-DI-CQA; 9 – rutina; 10 – 4,5-DI-CQA ; 11 – DI-CQA.

Tabela 5. Compostos identificados positivamente e tentativamente no extrato de amostras de erva-mate obtido por UAE.

Pico	TR	Composto	Modo	Abreviatura	λ máx (nm)	Fragmentos encontrados				Fragmentos literatura			Ref
						MS ¹	MS ²	MS ¹	MS ²	MS ¹	MS ²		
1	14,99	Teobromina	[M-H] ⁺¹	TEOB	272	181 ⁺	163 ⁺ 137 ⁺ 161 ⁺		181 ⁺	163 ⁺ 140 ⁺		[124]	
2	15,23	Ácido-3-cafeoilquínico	[M-H] ⁻¹	3-CQA	325	353	191 179 135 173		353	191 179 135 173		[54]	
3	15,72	Ácido-cis-3-cafeoilquínico	[M-H] ⁻¹	Cis-3-CQA	325	353	191 179 135 153		353	191 179 135 153		[125]	
4	17,67	Ácido-4-cafeoilquínico	[M-H] ⁻¹	4-CQA	325	353	191 179 173 135		353	191 179 173 135		[125]	
5	19,89	Ácido-5-cafeoilquínico	[M-H] ⁻¹	5-CQA	325	353	191 179		353	191 179 135 173		[106]	
6	22,38	Cafeína	[M-H] ⁺¹	CAF	272	195 ⁺			195 ⁺	138 ⁺ 110 ⁺		[124]	
7	29,97	Ácido-3,4-di-cafeoilquínico	[M-H] ⁻¹	3,4-DI-CQA	325	515	353 335 173 179		515	179 191 353 1031		[34]	
8	30,98	Ácido-3,5-di-cafeoilquínico	[M-H] ⁻¹	3,5-DI-CQA	325	515	353		515	179 191 353 1031		[34]	
9	33,59	Rutina	[M-H] ⁻¹	RUT	353	609	301		611	300 722		[34]	
10	34,2	Ácido-4,5-di-cafeoilquínico	[M-H] ⁻¹	4,5-DI-CQA	325	515	353 335 299 255 203 427		515	353 335 299 255 203 427		[34]	
11	37,05	Ácido-di-cafeoilquínico	[M-H] ⁻¹	DI-CQA	325	515	353 203 179		515	353 335 299 255 203 427		[34]	

Condições cromatográficas descritas na seção 3.4 da Parte Experimental.

4.2.1 Metilxantinas

Os picos cromatográficos 1 e 6 da **Figura 11** são correspondentes a teobromina e cafeína, respectivamente, presentes nos extratos de erva-mate que foram positivamente identificadas por injeção de padrão e mediante o espectro de massas. Para a teobromina foram gerados os íons característicos protonados MS^1 181 e MS^2 135 que podem ser visualizados na **Figura 12** (A e B). [23]

A cafeína, formada a partir da metilação da teobromina^[50], foi identificada por observação dos íons protonados característicos MS^1 195 e MS^2 138 **Figura 13** (A e B).

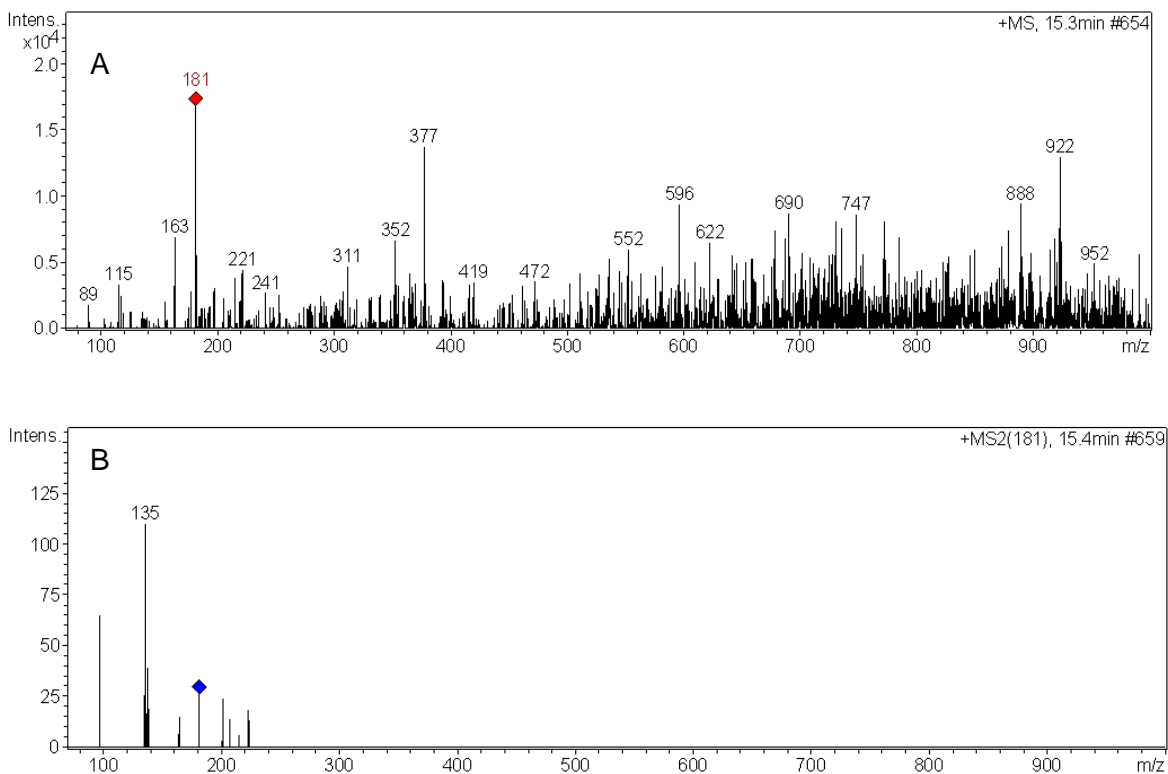


Figura 11. Espectro de Massas do composto positivamente identificado (pico 1): A) MS^1 teobromina; B) MS^2 teobromina (a identificação dos compostos está detalhada na **Tabela 6**)

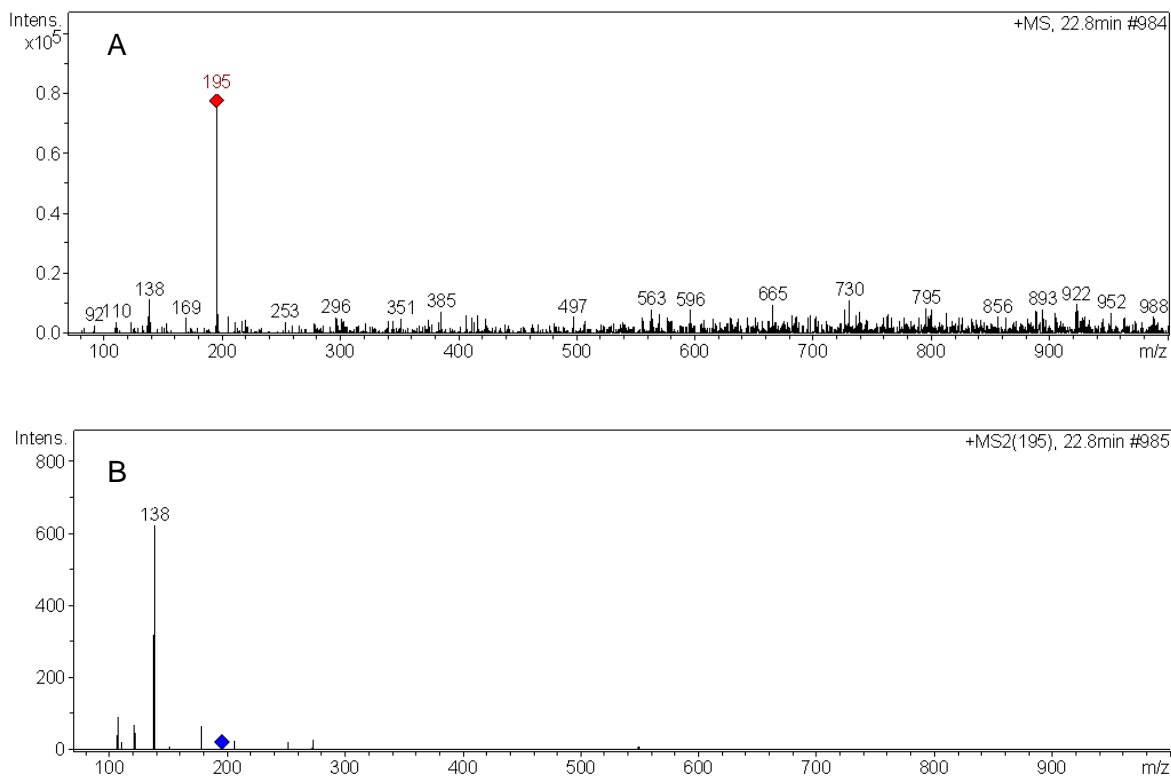


Figura 12. Espectro de massas do composto positivamente identificado (pico 6): A) MS cafeína; B) MS² cafeína (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6)

Nove compostos foram identificados mediante injeção de padrão e espectro de massas em extrato hidroetanólico de erva-mate. Dentre os compostos identificados encontravam-se a cafeína e a teobromina.^[126]

Pequenas concentrações de teofilina foram identificadas em extratos de erva-mate.^[9] Este analito é difícil de ser identificado pois trata-se de um intermediário no catabolismo da cafeína ao transformar-se em teobromina.^[2] Assim como em outros estudos,^[10,108,126] neste trabalho a teofilina também não foi identificada.

4.2.2 Ácidos cafeoilquínicos

Os ácidos cafeoilquínicos estão presentes na erva-mate, tendo sido possível identificar 3 isômeros: o 3-CQA, o 4-CQA e o 5-CQA.

Os ácidos cafeoilquínicos foram identificados pelos íons m/z 353, e íon m/z 191 os quais são comuns a todos, sendo o último fragmento correspondente ao ácido quínico desprotonado. O 5-CQA foi identificado positivamente e pelos

fragmentos m/z 179 e 135 correspondentes ao ácido cafeico desprotonado e ácido cafeico descarboxilado, respectivamente, os quais apresentam os isômeros 3-CQA e 4-CQA.^[50,127]

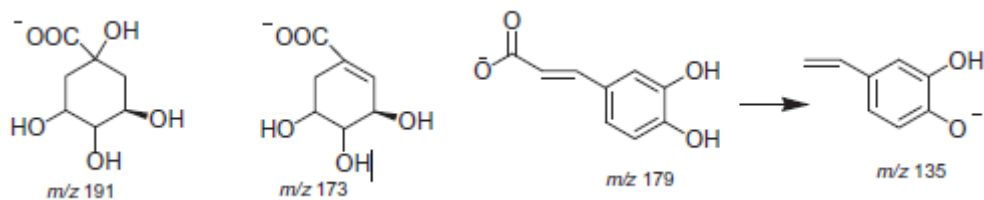


Figura 13. Estrutura das quebras dos ácidos cafeoilquínicos^[50]

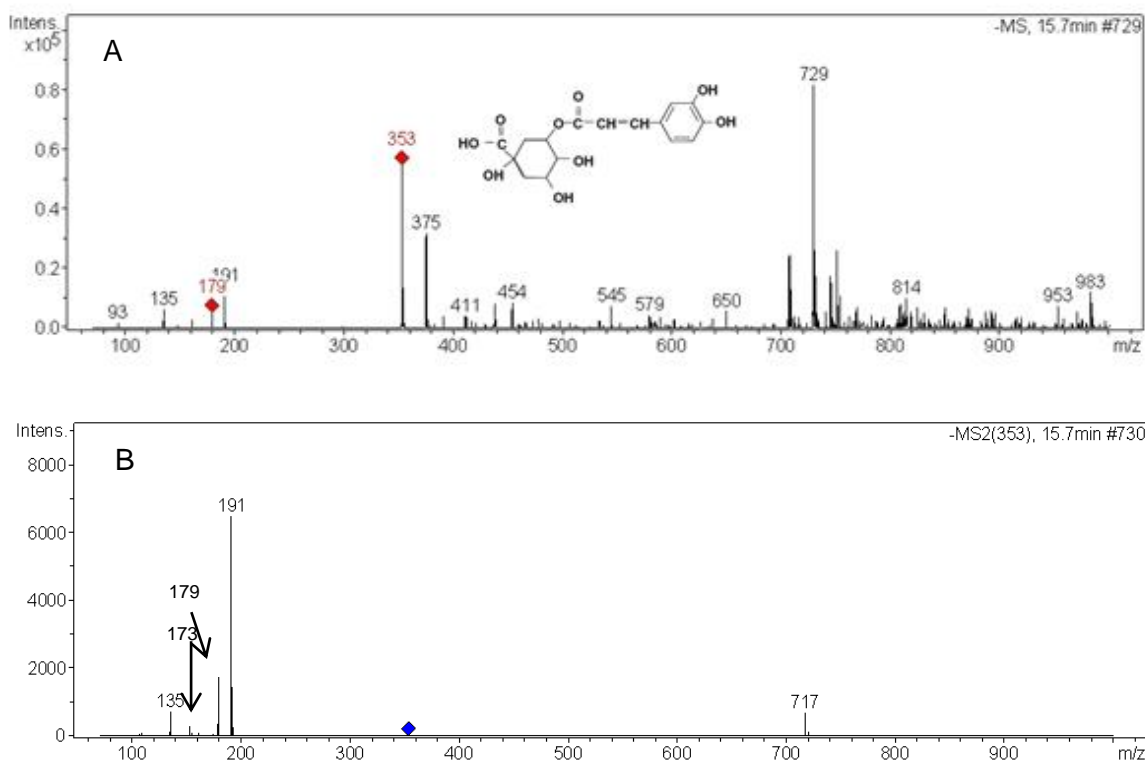


Figura 14. Espectro de massas do composto tentativamente identificado (pico 2): A) MS do 3-CQA; B) MS² do 3-CQA (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6)

O 4-CQA foi identificado tendo seus espectros de massas comparados aos da literatura. Apresentou o pseudo-íon com m/z 353 e as quebras características 191 179 135 153 e 191 179 173 135 respectivamente:

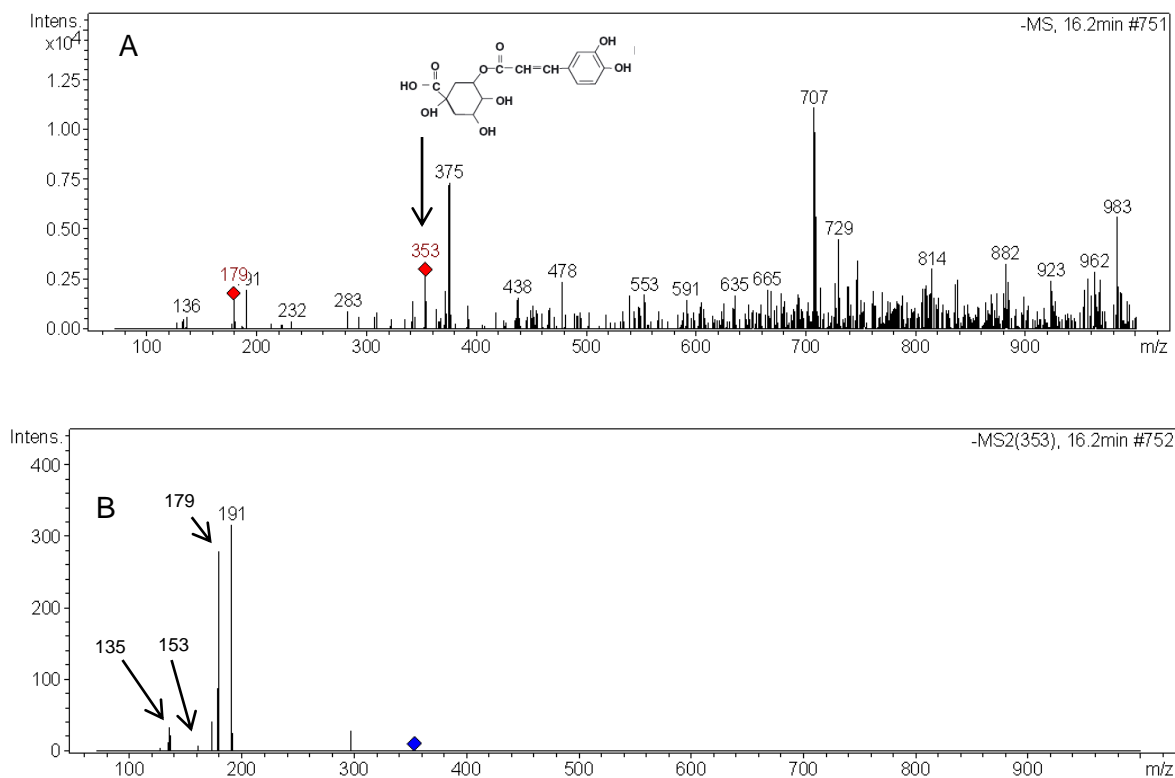


Figura 15. Espectro de massas do composto tentativamente identificado (pico 3): A) MS do *cis*-3-CQA; B) MS² do *cis*-3-CQA (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6)

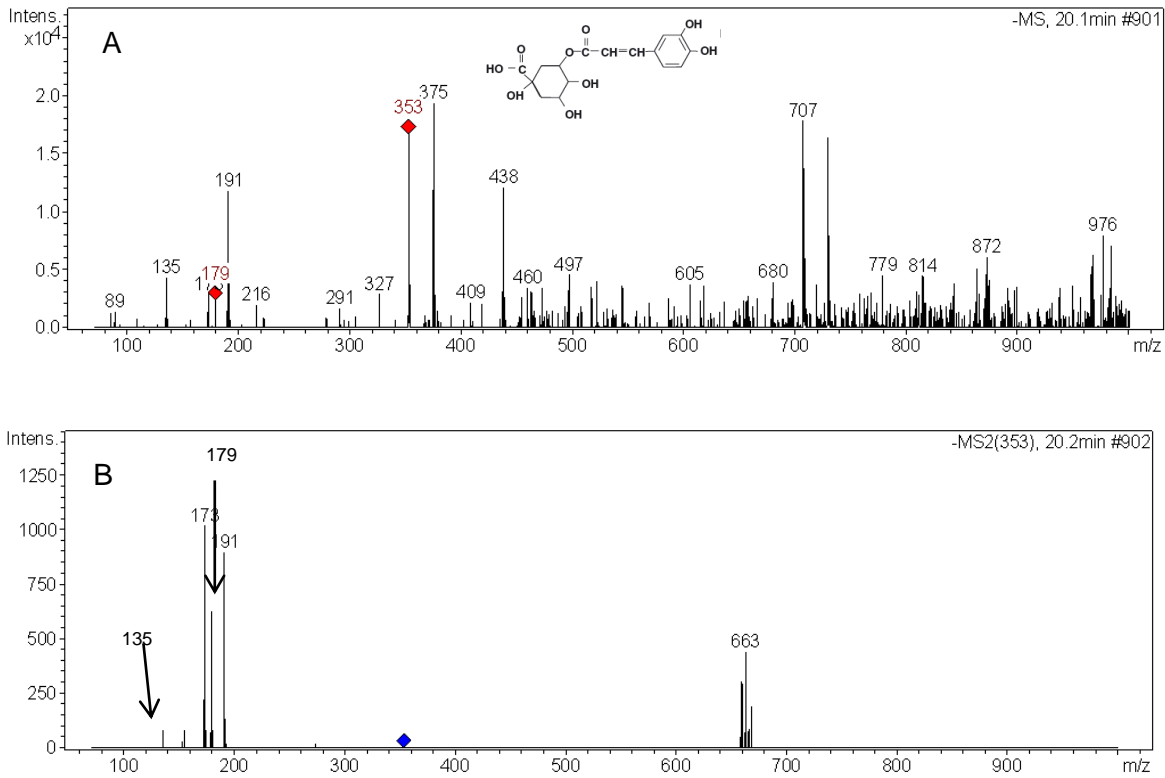


Figura 16. Espectro de massas do composto tentativamente identificado (Pico 4):A) MS do 4-CQA; B) MS² do 4-CQA (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6)

O 5-CQA foi identificado positivamente por meio de injeção de padrão. O espectro de massas apresentado correspondeu ao descrito na literatura, sendo o íon pseudo molecular com m/z 353 e as quebras características 191 179 135 173.^[23,50,51,54,127]

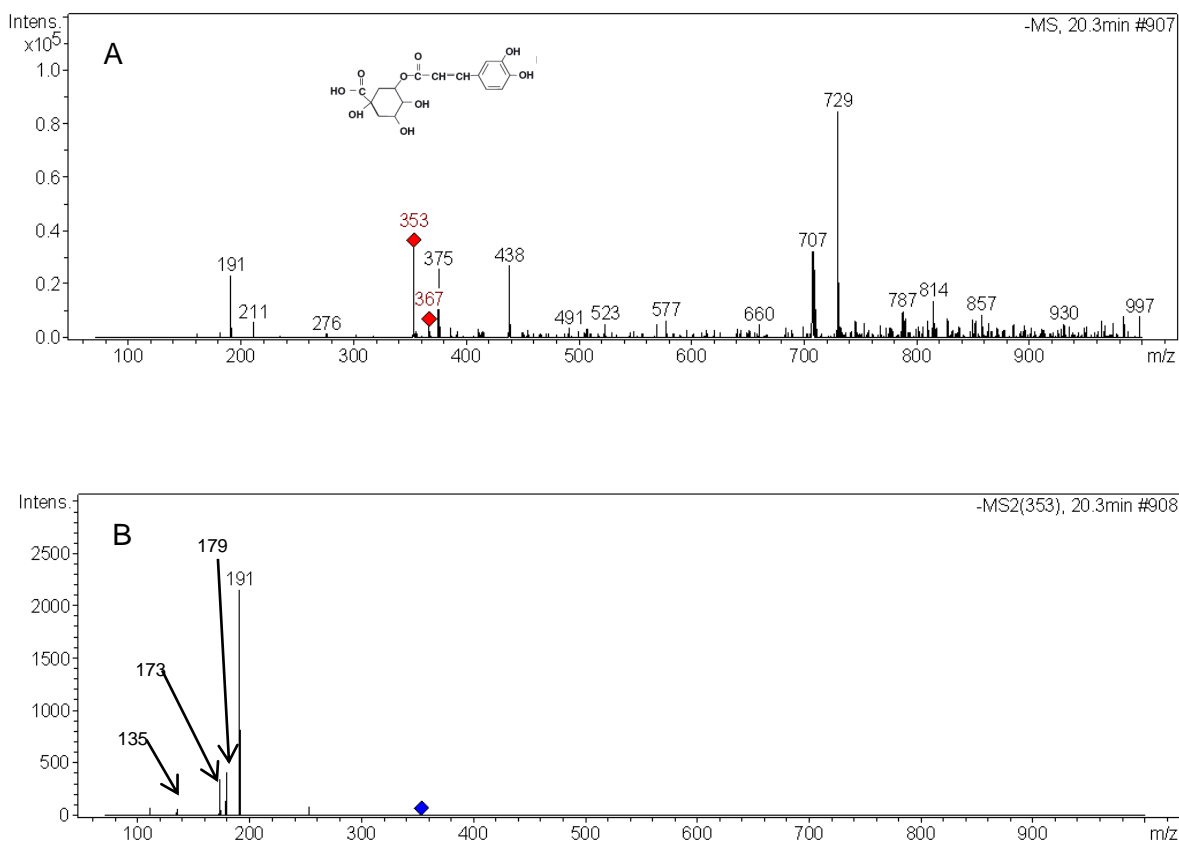


Figura 17. Espectro de massas do composto tentativamente identificado (pico 5): A) MS 5-CQA; B) MS² 5-CQA(a identificação dos compostos está detalhada na **Tabela 6**)

Os isômeros do 5-CQA foram identificados como compostos majoritários no extrato ácido metanólico de erva-mate.^[34]

Nove compostos foram identificados mediante injeção de padrão e espectro de massas em extrato hidroetanólico de erva-mate. Os compostos 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,4-DI-CQA, 3,5-DI-CQA e 4,5-DI-CQA estavam entre os compostos identificados.^[126]

O 3,4-DI-CQA e 3,5-DI-CQA são formados pela reação de esterificação entre um resíduo de ácido quínico e dois resíduos de ácido cafeico. Estes ácidos produzem o pseudo-íon m/z 515 e gera um m/z 353 no MS² que representa a perda de um grupo cafeoil. O fragmento m/z 335 corresponde a desidratação do fragmento m/z 353. As demais fragmentações são idênticas aos ácidos cafeoilquínicos. Estes compostos foram identificados comparando-se os espectros de massas obtidos com os da literatura.^[23,50,106,127]

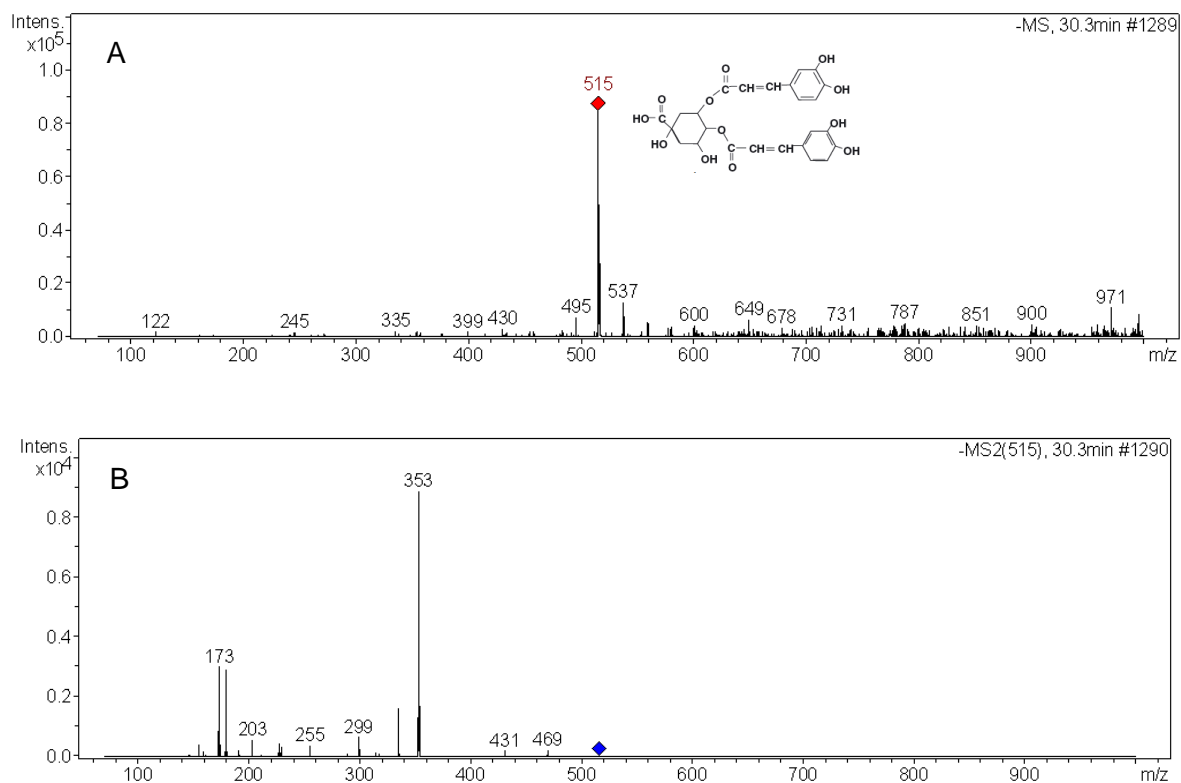


Figura 18. Espectro de massas do composto tentativamente identificado (pico 7): A) MS do 3,4-DI-CQA; B) MS² do 3,4-DI-CQA (a identificação dos compostos está detalhada na **Tabela 6**)

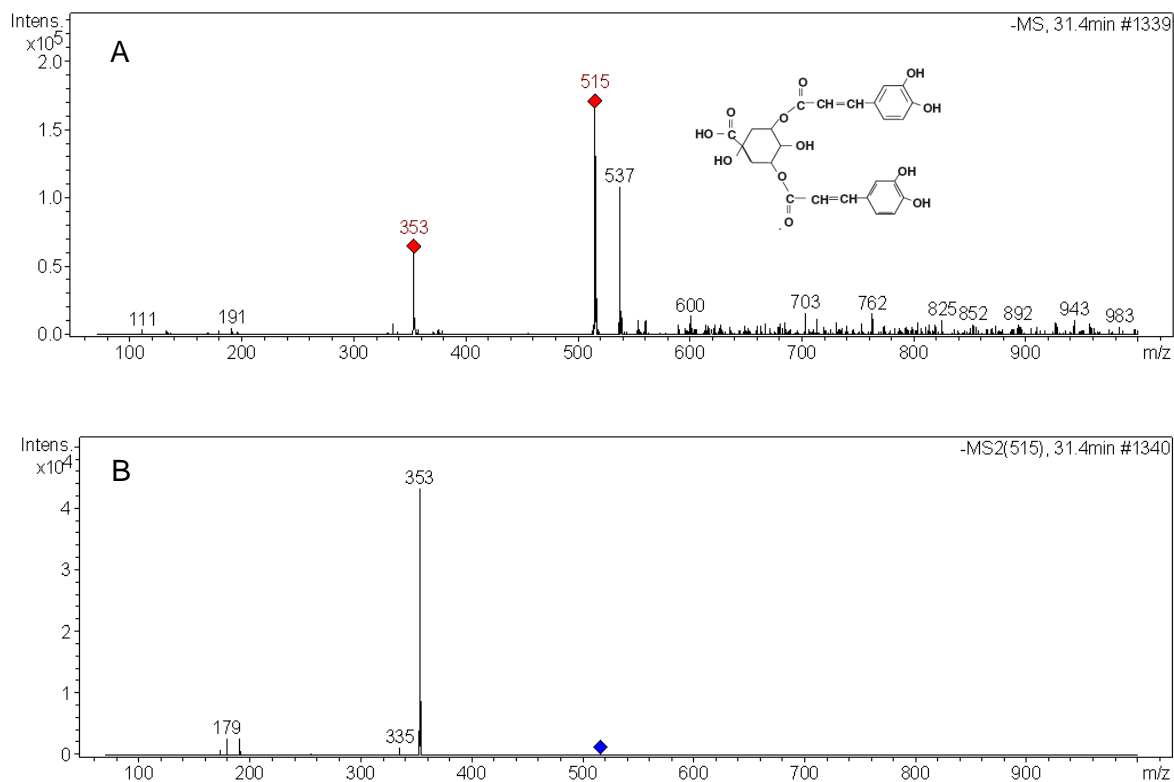


Figura 19. Espectro de massas do composto tentativamente identificado(pico 8): A) MS do 3,5-DI-CQA ; B) MS² do 3,5-DI-CQA (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6)

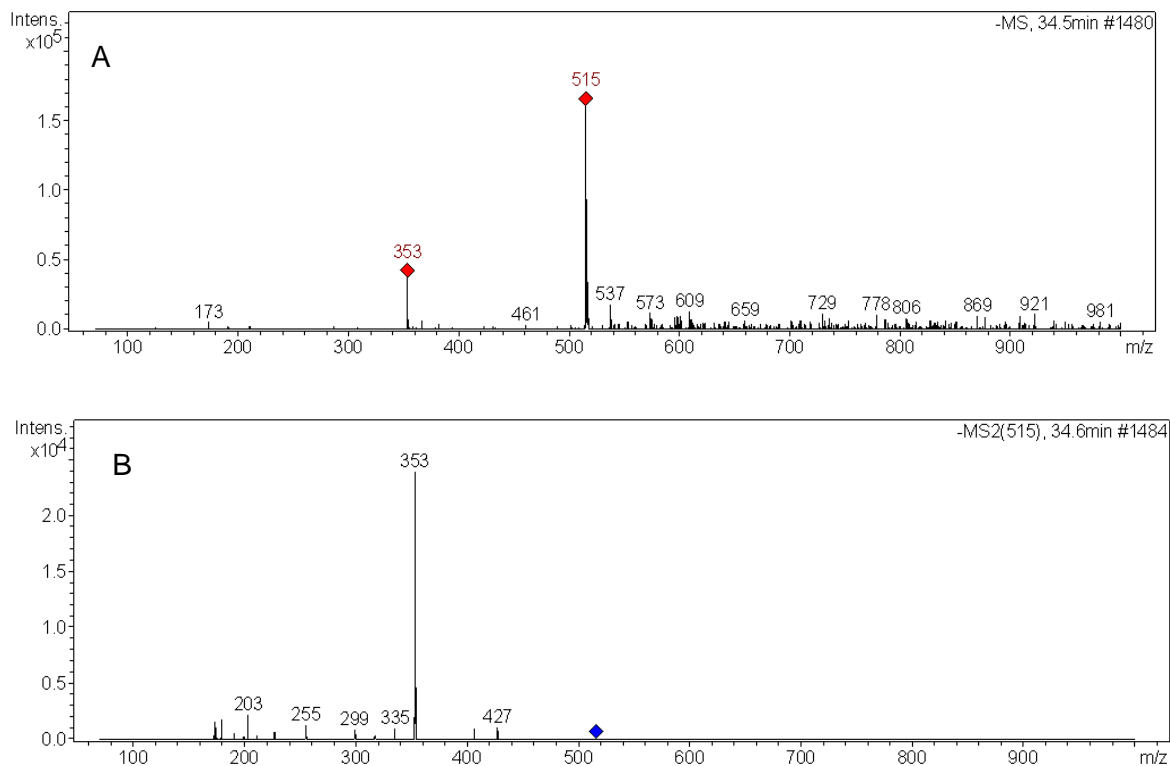


Figura 20. Espectro de massas do composto tentativamente identificado (pico 10): A) MS do 4,5-DI-CQA ; B) MS² do 4,5-DI-CQA (a identificação dos compostos está detalhada na **Tabela 6**)

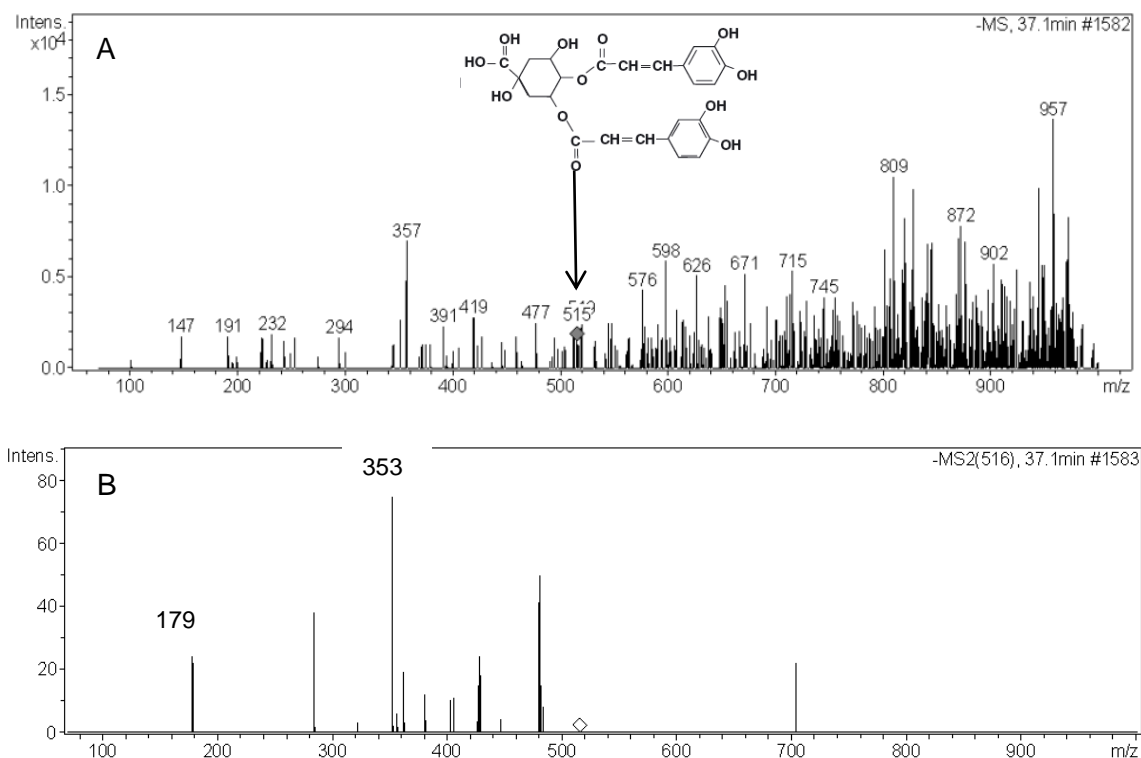


Figura 21. Espectro de massas do composto tentativamente identificado (pico 11): A) MS do DI-CQA; B) MS² do DI-CQA (a identificação dos compostos está detalhada na Tabela 6)

O pico 11 não apresentou fragmentação do íon precursor igual aos demais isômeros di-cafeoilquínicos, dificultando a identificação deste pico. Este composto também foi assim reportado por Clifford *et al* e Mateos *et al*.^[50,127]

4.2.3 Rutina

A rutina foi identificada positivamente e de acordo com os espectros de massas descritos na literatura, com o íon precursor m/z 609, fragmento m/z 465 e fragmento base m/z 301, sendo este último derivado da perda de uma unidade de açúcar, correspondendo à quercetina desprotonada.^[127]

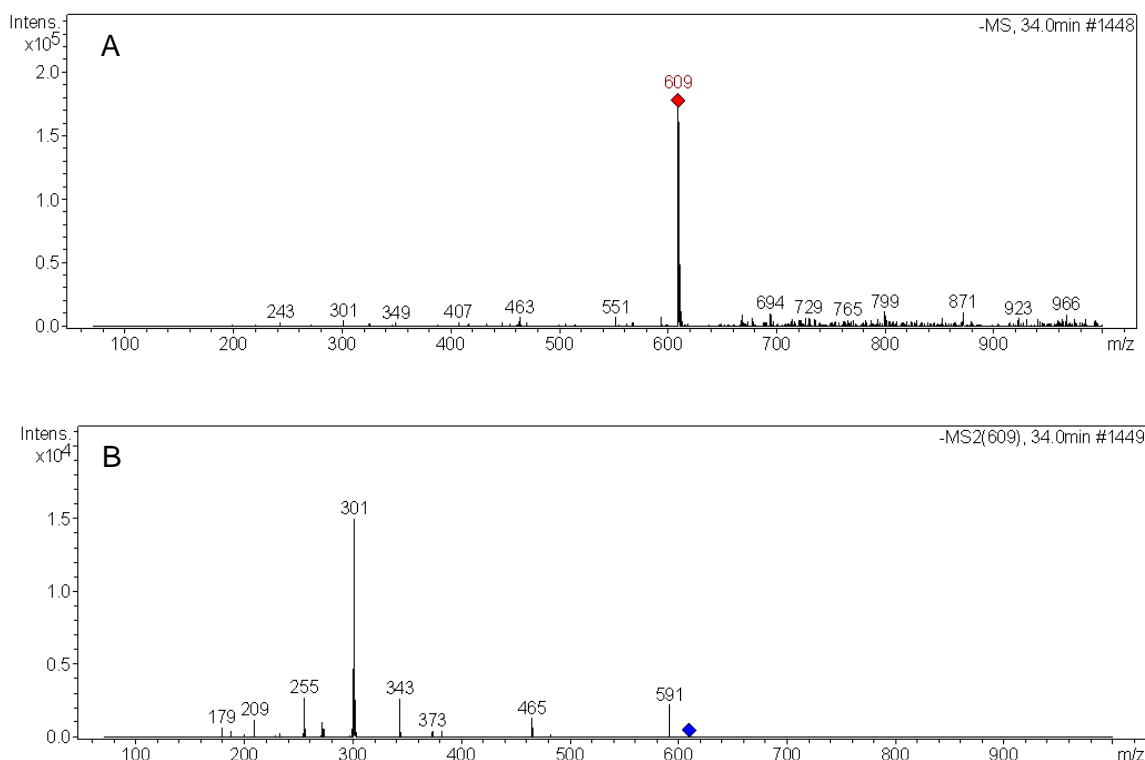


Figura 22. Espectro de massas do composto positivamente identificado (Pico 9 :A) MS rotina; B) MS² rotina (a identificação dos compostos está detalhada na **Tabela 6**)

Blum-Silva *et al.*^[126] identificaram nove compostos através de injeção de padrões e comparação com os espectros de massas em extrato hidroetanólico de erva-mate. Dentre os compostos identificados, a rutina estava presente.

4.3. QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

Os parâmetros de seletividade, curva de calibração, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, e exatidão dos analitos cafeína, teobromina, rutina e ácido clorogênico foram avaliados para que pudessem ser quantificados por meio de padronização externa.

O parâmetro de **seletividade** foi comprovado mediante injeção de soluções padrão dos quatro analitos identificados, sem coeluição com outros compostos presentes na matriz.

Os intervalos de concentração avaliados para os analitos apresentaram linearidade, uma vez que, os incrementos de concentração utilizados na construção da curva padrão, obtiveram áreas cromatográficas diretamente proporcionais, com

coeficiente de determinação (r^2) superiores a 0,99. A **Tabela 7** apresenta os intervalos de concentração avaliados para cada analito, com suas respectivas equações e coeficientes de correlação.

Os resultados obtidos para **limite de detecção e quantificação** foram obtidos a partir da curva analítica e estão apresentados na **Tabela 7**, são adequados para a determinação dos compostos nas amostras estudadas, pois as concentrações encontradas nas amostras avaliadas são superiores aos limites determinados.

Tabela 6. Resultados dos ensaios de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Composto	Intervalo linear ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	r^2	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	$y = ax+b$
Teobromina	5,7-78,4	0,9999	1,89	5,74	$y=32886,4x+436,6$
Cafeína	3,0-183,4	0,9971	0,99	2,99	$y=29674,4x+61909,1$
Rutina	2,6-108	0,9901	0,86	2,61	$y=36853,9x-159377$
Ácido clorogênico	6,5-250	0,9996	2,15	6,51	$y=31474,6x-15593$

Para o cálculo da **repetitividade (ou precisão)** foram analisadas sete soluções com a concentração correspondente ao ponto médio da curva, obtendo-se valores de coeficiente de variação % entre 2,73 e 4,9%. Estes valores comprovam a precisão instrumental, pois não excederam a 5% de variação, conforme apresentado na **Tabela 8**.

Tabela 7. Repetitividade instrumental (Precisão)

Amostra (n=7)	Teobromina	Cafeína	Ácido	Rutina
Média (mg.g ⁻¹)	5,58	45,47	30,47	14,07
Desvio padrão	0,28	2,25	0,83	0,52
CV (%)	4,9	4,9	2,73	3,72

Para avaliar a **recuperação**, foi realizada uma extração exaustiva da amostra, onde foram necessárias 15 extrações sequenciais até que a linha de base do cromatograma não apresentasse nenhum pico dos componentes da amostra.

A eficiência da extração foi obtida conforme apresentado na **Tabela 9**.

Tabela 8. Recuperação do método de extração

Composto	N (número de extrações)	Conc (mg.g ⁻¹) exaustiva	Conc (mg.g ⁻¹) UAE	Recuperação (%)
Teobromina	8	2,72	2,39	87,9
Cafeína	15	12,88	12,61	97,9
Ácido clorogênico	15	15,75	13,73	87,2
Rutina	7	7,86	7,55	96,2

UAE – Extração assistida por ultrassom

A partir do método estabelecido no presente trabalho, as concentrações dos compostos foram obtidas e estão apresentadas nas **Tabelas 10 e 11**.

Tabela 9. Concentração das metilxantinas e rutina (mg.g^{-1}) nas diferentes amostras de erva-mate.

Amostra	Teobromina		Cafeína		Rutina	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Erva-mate nativa secador esteira sem fumaça	2,89 ± 0,58		20,89 ± 2,65		3,56 ± 0,77	
Erva-mate plantada secador rotativo com fumaça	2,40 ± 0,32		19,48 ± 4,65		4,13 ± 0,93	
Tradicional	2,71 ± 0,12		17,92 ± 0,33		4,10 ± 0,16	
Uruguai	1,86 ± 0,17		10,30 ± 0,81		3,04 ± 0,22	
Premium	2,73 ± 0,55		14,22 ± 1,73		2,94 ± 0,09	
Tererê natural	2,11 ± 0,41		12,86 ± 0,52		5,54 ± 0,36	
Cambona vácuo	2,45 ± 0,37		14,14 ± 4,08		3,88 ± 0,25	
Pícolo chimarrão	2,34 ± 0,42		15,66 ± 2,04		4,29 ± 1,01	
Cambona	1,90 ± 0,21		11,03 ± 1,55		4,19 ± 0,58	
Orgânica	2,53 ± 0,11		14,40 ± 0,45		2,95 ± 0,14	
Chá mate tostado	1,47 ± 0,09		6,12 ± 0,36		1,07 ± 0,03	
Erva mate verde nativa	3,09 ± 0,18		21,98 ± 0,66		1,19 ± 0,08	
Erva mate verde plantada	1,12 ± 0,02		26,22 ± 0,90		1,44 ± 0,07	
Erva-mate sapecada nativa	3,02 ± 0,09		28,99 ± 0,77		3,31 ± 0,11	
Erva-mate sapecada plantada	2,89 ± 0,02		19,59 ± 0,02		2,24 ± 0,04	

DP-desvio padrão. Os resultados desta tabela não foram corrigidos pela recuperação obtida.

Tabela 10. Concentração dos ácidos cafeoilquínicos (mg. g⁻¹) nas diferentes amostras de erva-mate.

Amostra	4-CQA Média ± DP	3-CQA Média ± DP	5-CQA Média ± DP	3,4-DI-CQA Média ± DP	3,5-DI-CQA Média ± DP	4,5-DI-CQA Média ± DP
Erva-mate nativa secador esteira sem fumaça	0,74 ± 0,07	36,61 ± 1,19	21,04 ± 3,94	6,28 ± 0,30	57,81 ± 6,16	19,77 ± 3,03
Erva-mate plantada secador rotativo com fumaça	0,66 ± 0,21	35,18 ± 2,81	30,52 ± 0,75	6,40 ± 0,53	50,07 ± 3,09	24,75 ± 0,87
Tradicional	0,69 ± 0,04	37,00 ± 1,64	28,18 ± 0,84	5,92 ± 0,20	55,33 ± 5,01	20,77 ± 0,77
Uruguai	0,72 ± 0,10	22,74 ± 1,82	25,61 ± 1,56	4,68 ± 0,46	31,64 ± 2,61	14,98 ± 2,31
Premium	0,94 ± 0,13	27,25 ± 3,03	25,11 ± 5,45	5,83 ± 1,40	34,52 ± 3,68	11,78 ± 1,68
Tererê natural	0,73 ± 0,04	34,98 ± 0,53	30,97 ± 0,72	4,68 ± 0,26	44,52 ± 2,35	13,72 ± 1,53
Cambona vácuo	0,66 ± 0,11	32,26 ± 7,04	25,79 ± 5,06	4,98 ± 1,72	41,05 ± 8,42	14,09 ± 4,30
Pícolo chimarrão	0,71 ± 0,04	36,63 ± 2,49	32,09 ± 2,49	6,11 ± 0,08	47,97 ± 1,46	18,29 ± 2,23
Cambona	0,73 ± 0,16	29,04 ± 0,66	30,63 ± 5,28	6,35 ± 1,87	39,52 ± 2,85	16,17 ± 2,98
Orgânica	0,94 ± 0,17	28,51 ± 1,81	32,38 ± 1,70	6,74 ± 1,21	33,96 ± 1,40	13,87 ± 1,91
Chá mate tostado	0,17 ± 0,02	4,08 ± 0,24	14,04 ± 1,86	1,49 ± 0,15	3,14 ± 0,22	3,58 ± 0,59
Erva mate verde nativa	0,11 ± 0,00	5,20 ± 0,49	5,60 ± 0,67	1,08 ± 0,24	3,46 ± 0,08	1,09 ± 0,18
Erva mate verde plantada	0,12 ± 0,00	6,34 ± 0,32	7,85 ± 0,86	0,96 ± 0,12	6,22 ± 0,27	1,15 ± 0,07
Erva-mate sapecada nativa	1,07 ± 0,00	43,16 ± 1,63	33,14 ± 1,09	8,92 ± 0,50	53,88 ± 2,29	18,52 ± 0,67
Erva-mate sapecada plantada	1,85 ± 0,05	34,01 ± 0,20	29,25 ± 1,07	6,29 ± 0,12	40,87 ± 0,91	14,98 ± 0,59

DP = Desvio Padrão. Os resultados desta tabela não foram corrigidos pela recuperação obtida.

Na **Tabela 10** são apresentados os valores de concentrações de metilxantinas encontrados nas amostras analisadas que foi entre 1,12 e 3,09 mg.g⁻¹ para a teobromina e 6,12 e 28,99 mg.g⁻¹ para a cafeína. Nesta tabela pode ser observado que os maiores conteúdos de metilxantinas foram encontrados nas etapas de sapeco, seguido pelas amostras verdes e as demais etapas do processo. O aumento da concentração de teobromina e cafeína na etapa de sapeco é devido às reações de degradação que ocorrem favorecendo a síntese da cafeína.^[67]

As concentrações de rutina encontradas nas amostras analisadas variaram de 1,07 mg.g⁻¹ a 5,54 mg.g⁻¹, sendo as maiores concentrações encontradas na amostra tererê natural.

Na **Tabela 11** são apresentados os valores de concentração dos ácidos cafeoilquínicos encontrados nas amostras. A etapa de sapeco foi a que apresentou as maiores concentrações, sendo todos os derivados cafeoilquínicos quantificados por equivalência ao 5-CQA. A concentração destes compostos nas amostras de erva-mate apresentou uma variação de 4,08 e 43,16 mg.g⁻¹ para o 3-CQA, 0,11 a 1,85 mg.g⁻¹ para o 4-CQA, 5,6 a 33,14 mg.g⁻¹ para o 5-CQA, de 0,96 a 8,92 mg.g⁻¹ para o 3,4-DI-CQA, de 3,14 a 53,88 mg.g⁻¹ para o 3,5-DI-CQA e 1,09 a 24,75 mg.g⁻¹ para o 4,5-DI-CQA. Na etapa de sapeco ocorre à desativação enzimática e conseqüentemente a concentração de ácidos cafeoilquínicos aumenta significativamente após esta etapa.^[39]

A amostra que apresentou o maior conteúdo em termos de concentração de metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos foi a erva-mate sapecada nativa. Como mencionado anteriormente, esse comportamento provavelmente é devido à inativação enzimática que ocorre na etapa de sapeco, aumentando a concentração dos ácidos, somado ao fato das degradações que ocorrem favorecendo a síntese da cafeína.

O flavonóide rutina foi encontrado em maior concentração na amostra de erva-mate tererê natural. O produto tererê natural é direcionado para o mercado externo, em que há preferência pelo produto estacionado, tornando mais intenso o aroma,^[82] esta etapa sugere que a maior concentração de rutina seja encontrada nesta amostra.

Outros trabalhos realizaram a quantificação dos compostos bioativos da erva-mate, em diferentes tipos de extratos, amostras e etapas de processo, conforme descrito a seguir:

- Dartora *et al.*^[23] analisaram o extrato aquoso de erva-mate de diferentes etapas do processo de diferentes regiões. O teor de teobromina encontrado foi entre 1,63 e 4,61 mg.g⁻¹; cafeína entre 4,68 e 18,9 mg.g⁻¹ e rutina entre 1,21 e 5,73 mg.g⁻¹ de amostra. As maiores concentrações de metilxantinas foram encontradas nas amostras *in natura* em comparação com as amostras após o sapeco e secagem, diferente do resultado encontrado nesta pesquisa.

- Mateos *et al.*^[127] analisaram o extrato de acetona: água (50:50 v/v) das amostras de erva-mate comerciais os quais apresentaram resultados entre 0,95 a 1,16 mg.g⁻¹ de teobromina, de 7,16 a 8,95 mg.g⁻¹ de cafeína e de 5,6 a 6,7 mg.g⁻¹ de rutina.^[127] Os resultados para teobromina e cafeína foram menores do que os encontrados neste trabalho. Com relação à concentração de rutina, os resultados foram maiores do que os encontrados nesta pesquisa. A diferença dos resultados pode ser devido ao solvente de extração utilizado.

- Dartora *et al.*^[23] determinaram os ácidos cafeoilquínicos em diferentes etapas do processamento da erva-mate apresentando resultados para o 3-CQA entre 3,16 e 11,82 mg.g⁻¹, para o 5-CQA entre 3,03 e 14,42 mg.g⁻¹ e 3,12 a 16,95 mg.g⁻¹ para o 4-CQA. As maiores concentrações de ácidos cafeoilquínicos foram encontradas após o sapeco e secagem em comparação às amostras *in natura* ou verdes,^[23,39] reafirmando a mesma tendência de aumento de concentração dos CQA's a partir da etapa de sapeco observadas neste trabalho. Com relação à quantificação dos ácidos, observa-se que os teores encontrados foram menores em relação aos extratos metanólicos por EAU obtidos neste trabalho, provavelmente devido a diferença de solvente e tipo de extração.

- A concentração total encontrada por Mateos *et al.*^[127] de CQA's de 48 a 54 mg.g⁻¹ e de DI-CQA's de 13 a 16 mg.g⁻¹ em extratos de erva-mate foram menores do que as concentrações totais desses compostos determinados neste trabalho.

O trabalho de Butiuk *et al.*^[128] foi o único que determinou maior concentração de ácidos cafeoilquínicos nas amostras de erva-mate verde.

4.4 ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) E ANÁLISE HIERÁRQUICA DE AGRUPAMENTOS (HCA)

Para realizar a HCA e PCA foi atribuído um código para cada amostra conforme **Tabela 12**.

Tabela 11. Códigos das amostras de erva-mate na PCA

Código	Amostra
VerNat	Verde Nativa
VerPlan	Verde Plantada
SapNat	Sapitada Nativa
SapPlan	Sapitada Plantada
NatSF	Nativa secador esteira Sem Fumaça
PlanCF	Planta secador rotativo Com Fumaça
Cha	Chá mate tostado
Org	Orgânica
Camb	Cambona
Uru	Uruguai
Ter	Tererê
Prem	Premium
PicTer	Pícolo Tererê
Trad	Tradicional
CambV	Cambona embalada à Vácuo
Pic	Pícolo

A **Figura 23** apresenta o dendograma de todas as amostras analisadas, mostrando o agrupamento entre as amostras por similaridade.

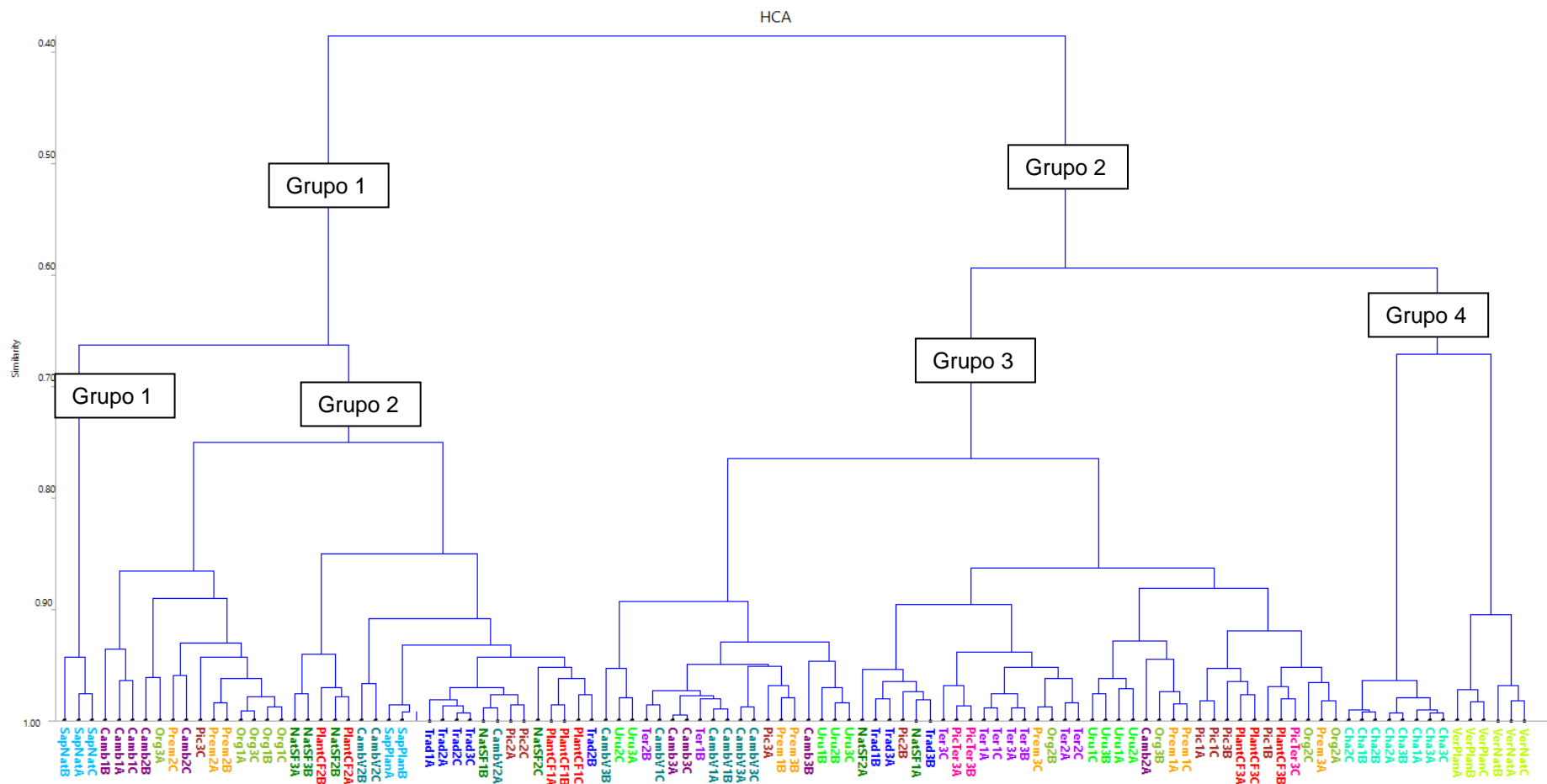


Figura 23. Dendrograma de todas as amostras de erva-mate analisadas

No dendograma observa-se que todas as amostras possuem em torno de 40% de diferença entre os dois grupos principais.

A PCA mostrou que as três primeiras componentes foram capazes de explicar 89% da variância entre os resultados. Os diagramas das três componentes principais são mostrados a seguir:

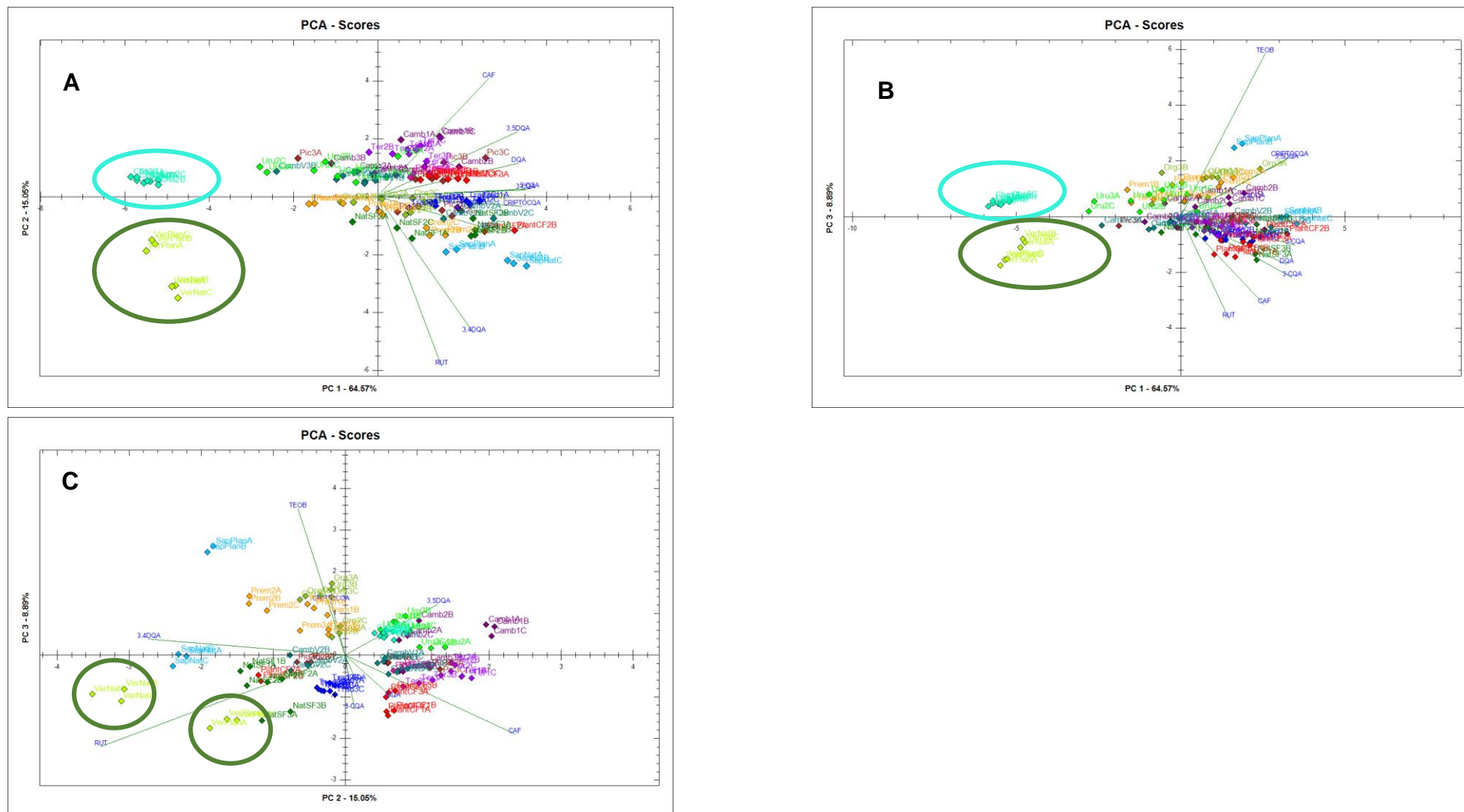


Figura 24. A) PC1 x PC2 de todas as amostras analisadas; **B)** PC1 x PC3 de todas as amostras analisadas; **C)** PC2 x PC3 de todas as amostras analisadas

Na **Figura 24 A** observa-se que quanto maior o valor positivo atribuído aos coeficientes relacionados à concentração dos compostos na componente principal 1, maior a concentração dos compostos nas amostras, e valores negativos dos coeficientes na componente principal estão relacionados à menor concentração destes compostos nas amostras. Na PC2, quanto mais negativos os valores atribuídos, maior é a concentração do componente, como por exemplo rutina e 3,4-DI-CQA. Devido aos grupos de chá e erva verde estarem distantes das retas que representam os coeficientes atribuídos aos compostos, observa-se que estas amostras tem a menor concentração de compostos bioativos comparando com as demais.

Na **Figura 24 C** percebe-se que as amostras não se encontram tão visivelmente discriminadas em agrupamentos quanto nas **Figuras 24 A e B**. O leve afastamento das ervas sapecadas e nativas juntamente com a erva-verde e chá das demais ervas prontas para o consumo é observado. Por este motivo, a análise dos grupos de ervas prontas para o consumo, e ervas durante o processamento, ou seja, as ervas que ainda não estão prontas para serem comercializadas, foi realizada separadamente.

O grupo de amostras de ervas durante o processamento foi analisado e obteve-se explicação de mais de 90% da variância em três componentes principais. Na **Figura 25** observa-se que a primeira componente principal é responsável por 70% da variância total entre as amostras, a segunda componente por mais de 10% e a terceira por 10% da variância total.

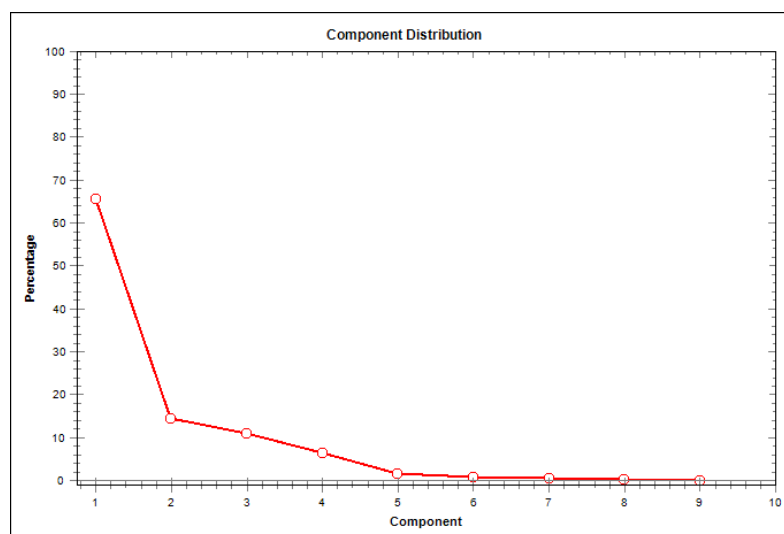


Figura 25. Distribuição de componentes x variância

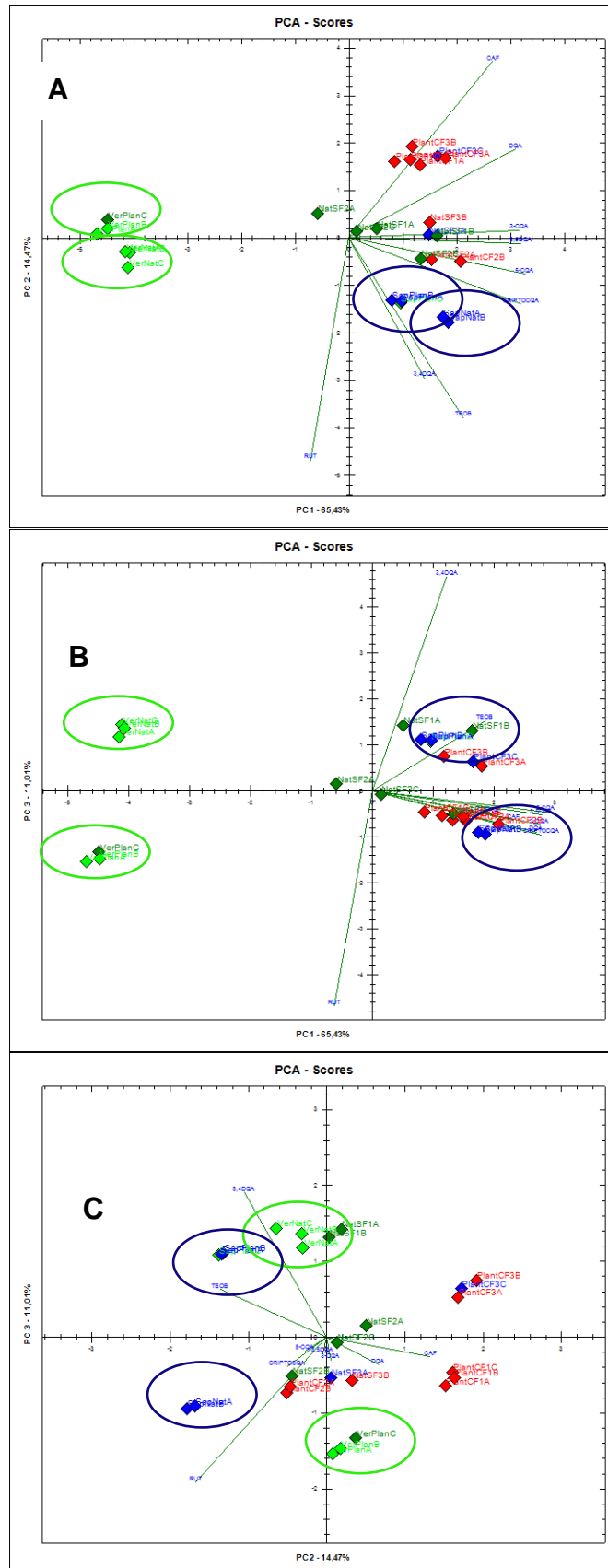


Figura 26. A) PC1 x PC2 amostras de erva-mate durante o processamento B) PC1 x PC3 amostras de erva-mate durante o processamento C) PC2 x PC3 amostras de erva-mate durante o processamento

Na **Figura 26 A**, observa-se a separação das ervas-mate verde. Formou-se um grupo com as ervas verde nativas e outro grupo com as ervas verdes plantadas, mostrando que em termos de composição, o tipo de cultivo pode ter influência na composição dos compostos bioativos.

A menor concentração dos compostos bioativos nas amostras verdes foi observada em outros trabalhos, com relação aos ácidos cafeoilquínicos. A menor concentração é devido à presença das enzimas que promovem a oxidação.^[23,39,127]

No trabalho publicado por Riachi *et al*^[107] não foi verificada diferença entre amostras cultivadas ao pleno sol e à sombra utilizando PCA. Este resultado foi diferente do observado neste trabalho, visto que a erva-mate nativa pode ser comparada à cultivada à sombra no trabalho de Riachi *et al*, pois neste caso ela cresce sob a sombra de árvores maiores; enquanto a plantada cresce a pleno sol.

A exposição à luz do sol tem sido reportada como influência no aumento da produção de compostos fenólicos em plantas a fim de proteger a planta da exposição à radiação UV.^[3,9,46,82]

Com relação às ervas processadas, observa-se um grupo de erva-mate sapecada nativa e plantada na **Figura 26 A** próximos um ao outro, porém distintos. A diferença entre elas é o tipo de cultivo e mais uma vez verifica-se a influência desta etapa de processamento da erva-mate. As ervas nativas após passarem pelo processo de secagem em esteira sem fumaça e erva mate plantada após passar pelo processo de secagem em secador rotativo com fumaça não apresentam proximidade na **Figura 26**, são diferentes tanto pela forma de cultivo quanto pela etapa de secagem, mostrando-se diferentes também na PCA.

O comportamento observado nas **Figura 26 A** e **Figura 26 B**, mostra diferenças entre as ervas verdes plantada e nativa, a partir do processo de sapeco pois ocorre um aumento na concentração de compostos bioativos. Isolabella *et al* reportaram o aumento na concentração de princípios ativos na erva-mate processada em comparação com as folhas verdes.^[39] Há publicações que relatam que o aumento na concentração de cafeína é devido às reações de degradação que envolvem ácidos nucleicos durante o sapeco, visto que neste processo as purinas são liberadas, facilitando a síntese da cafeína.^[67] Esta observação está de acordo com outros grupos de pesquisa que também observaram aumento na concentração

de polifenóis após a etapa de sapeco em comparação com as ervas-mate verde. [23,39,62,107]

Na **Figura 26 C** observa-se novamente a diferença entre as ervas verdes nativa e plantada. Um dado importante que não havia sido notado nos diagramas anteriores é a separação dos grupos de erva-mate que passaram pelo secador rotativo com fumaça do grupo que passou no secador esteira sem fumaça, que mostra que o tipo de secagem também influencia na composição da erva-mate.

Isolabella *et al*^[39] observaram que a erva-mate após o processo de sapeco contém maior concentração de compostos bioativos em comparação às amostras de erva-mate verde, e dependendo do composto, pode sofrer um leve decréscimo da concentração no processo de secagem. No entanto, não são encontrados relatos na literatura sobre diferentes processos de secagem industrial.

A **Figura 27** apresenta o grupo de amostras de erva-mate prontas para o consumo no qual cerca de 92% da variância explicada em três componentes principais.

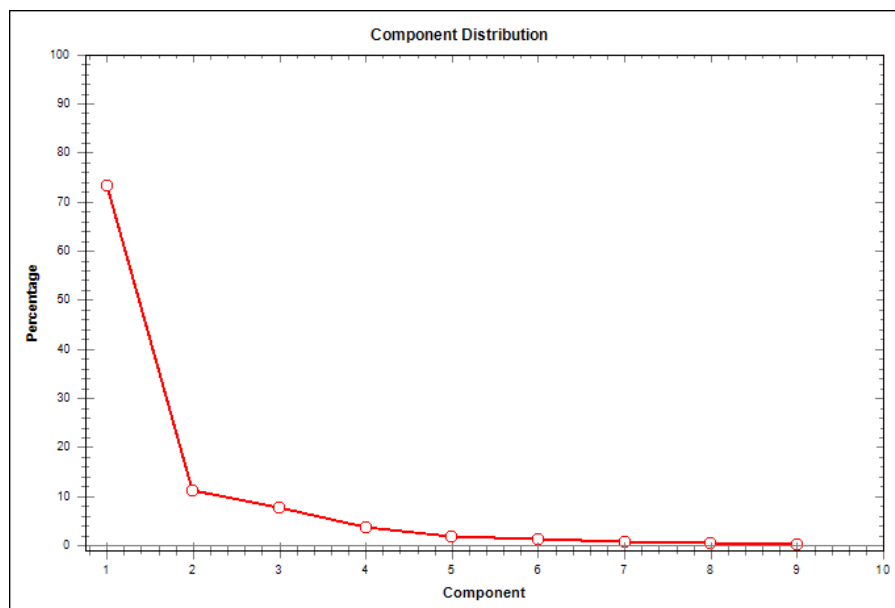


Figura 27. Componentes principais x variância

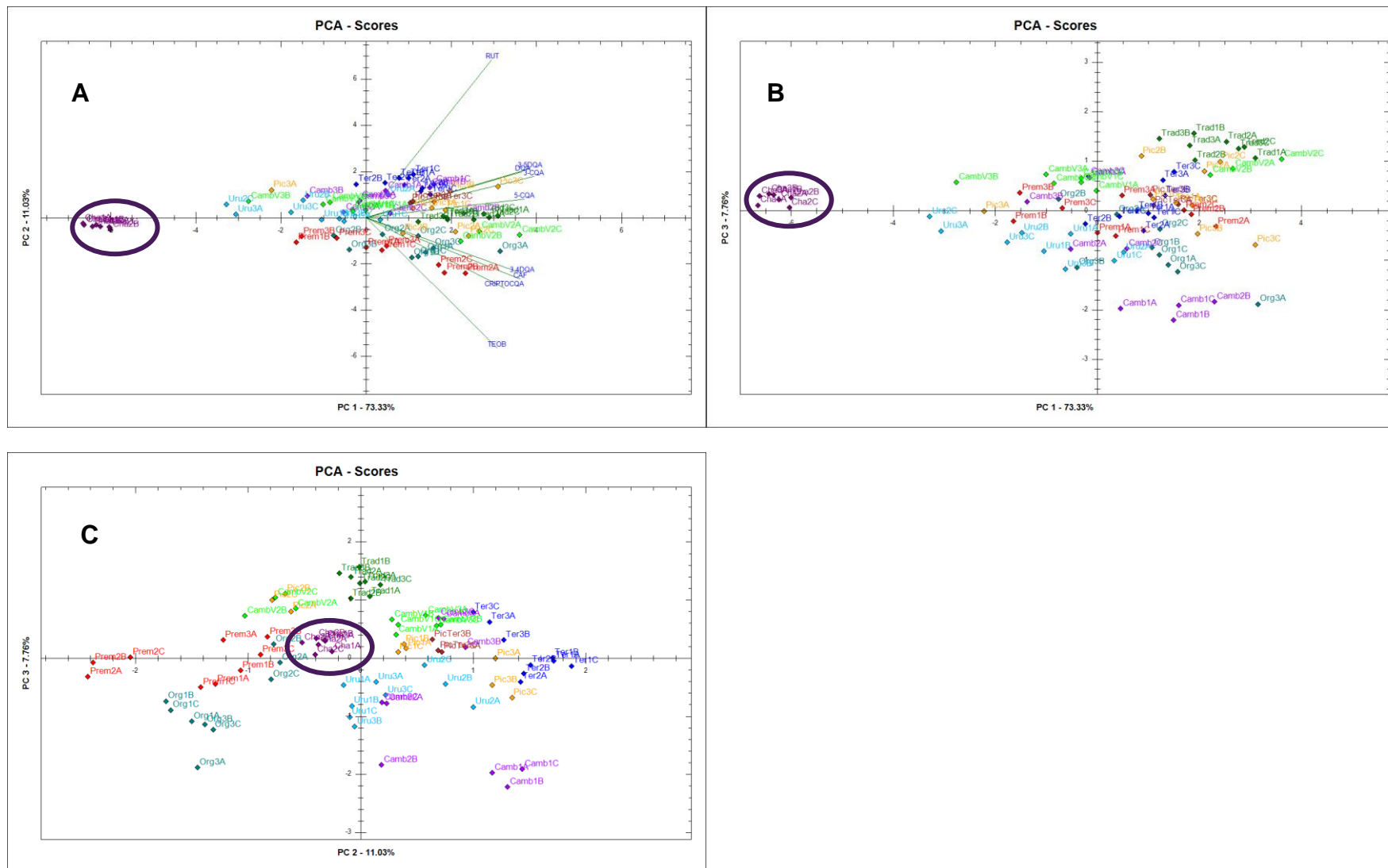


Figura 28. A) PC1 x PC2 Ervas-mate prontas para consumo; **B)** PC1 x PC3 Ervas-mate prontas para consumo; **C)** PC2 x PC3 Ervas-mate prontas para consumo

Ao analisar as **Figura 28 A e B** das amostras de erva-mate prontas para o consumo observa-se a discriminação do grupo do chá tostado frente às demais, sendo a concentração de compostos bioativos tão baixa quanto as amostras verdes, assim como reportado por Marques e Farah^[52], e diferenciando-se das demais amostras prontas para consumo.

A **Figura 28 C** apresenta uma certa aglomeração por tipo de erva comercial ainda incompreendida nesta figura. Como nas amostras durante o processamento foi possível verificar a influência do tipo de cultivo e do tipo de secagem, as amostras comerciais foram divididas entre aquelas que foram cultivadas do forma nativa ou plantação num primeiro momento. No segundo momento foram divididas entre aquelas que passaram por secador esteira sem fumaça e secador rotativo com fumaça, a fim de verificar se o mesmo comportamento verificado nas amostras durante o processamento seria observado nas amostras comerciais, explicando as aglomerações visualizadas na **Figura 28 C**.

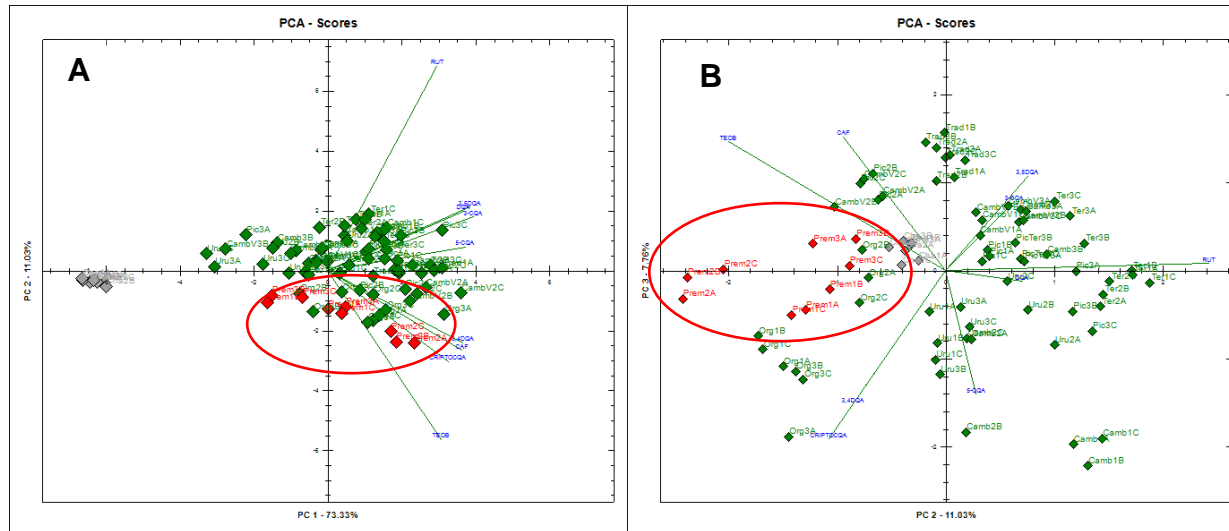


Figura 29. A) PC1 x PC2 das amostras de erva-mate prontas para consumo por tipo de cultivo nativa (em vermelho) vs. plantada (em verde) **B)** PC2 x PC3 das amostras de erva-mate prontas para consumo por tipo de cultivo nativa (em vermelho) vs. plantada (em verde) das amostras de erva-mate prontas para o consumo.

As **Figuras 29 A e B** mostram a separação das amostras de erva-mate nativa e plantada.

Ao avaliar a **Figura 29 A** pode-se observar a aglomeração do grupo de ervas nativas com relação a PC2, demonstrando maior concentração de teobromina e 3,4-DI-CQA, e menor concentração dos demais compostos em relação às amostras plantadas. Esta observação confirma que no produto final também é observada a influência do tipo de plantio na composição bioativa, como observado anteriormente nas amostras durante o processamento industrial, e que a incidência da radiação UV favorece o aumento da concentração de alguns compostos que protegem a planta desse tipo de estresse^[3,52,82]. Esta observação foi comprovada em outros estudos como o de Riachi *et al* no ano de 2018.^[107]

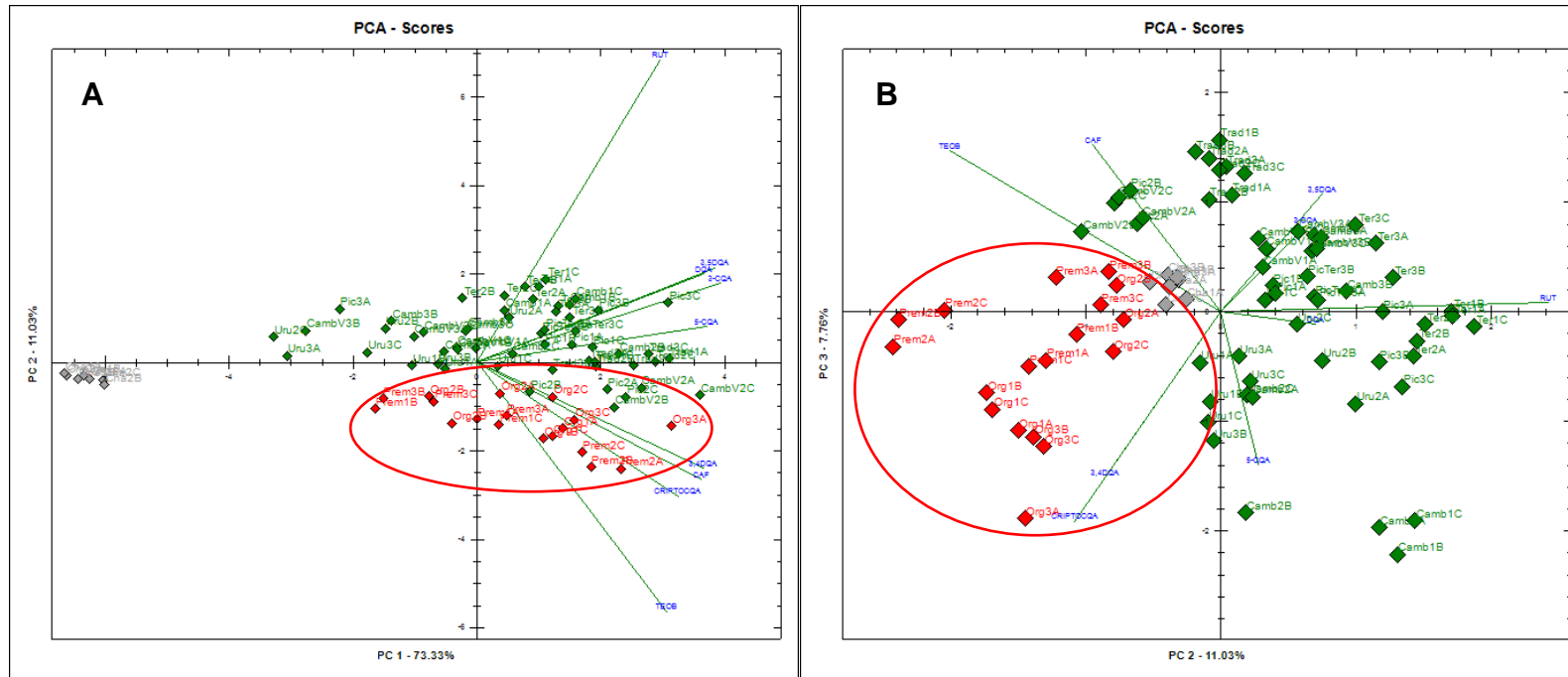


Figura 30. A) PC1 x PC2 das amostras de erva-mate prontas para o consumo divididas por tipo de secador o qual foram submetidas: secador rotativo com fumaça (em vermelho) vs. secador em esteira sem fumaça (em verde) **B)** PC2 x das amostras de erva-mate prontas para o consumo divididas por tipo de secador o qual foram submetidas: secador rotativo com fumaça (em vermelho) vs. secador em esteira sem fumaça (em verde).

Na **Figura 30**, assim como foi observado nas ervas durante o processamento, no produto final também fica visível que o tipo de secador influencia na composição bioativa. Não existem estudos que mostrem a influência por tipo de secador industrial publicados. Em comparação aos estudos em diferentes temperaturas de tostagem promovido por Riachi *et al*^[107], quanto mais agressivas as condições, menores as concentrações de compostos bioativos devido a pirólise e degradação dos compostos fenólicos e possível sublimação da cafeína. Sendo o secador rotativo com fumaça a condição mais agressiva de secagem neste estudo, as amostras que passam por este secador possuem menores e mais variadas concentrações de compostos bioativos.

As amostras premium e orgânica, representadas em vermelho, que utilizaram secador rotativo com fumaça no processamento, ficaram mais aglomeradas em relação às amostras destacadas em verde, que passam por secador em esteira sem fumaça e possuem uma concentração total de ácidos cafeoilquínicos ligeiramente menor que as demais amostras.

O tipo de plantio e o processo de secagem influenciam na composição bioativa do produto. As amostras plantadas, são cultivadas ao sol, o que favorece o aumento da concentração de ácidos cafeoilquínicos para proteger a planta da radiação UV, enquanto as amostras nativas, que são cultivadas na sombra, tem a concentração dos compostos nitrogenados, ou seja, alcaloides, favorecidas. O processo de secagem industrial pode ser realizado de duas maneiras, onde a forma mais branda não promove a degradação dos compostos bioativos apresentando uma concentração ligeiramente maior em comparação com o processo de secagem rotativo com fumaça. Desta forma observou-se diferença entre as amostras que foram cultivadas de diferentes formas tanto durante o processamento quanto no produto final. Foi observada diferença também do tipo de processo de secagem tanto nas amostras que foram coletadas durante as etapas de processamento quanto as coletadas no produto final.

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A **Tabela 13** apresenta a concentração total dos ácidos analisados e a atividade antioxidante medida.

Tabela 12. Concentração total de ácidos cafeoilquínicos e atividade antioxidante

Amostra	Total ácidos (%)	mM eq. trolox
Tradicional	14,79	14,5±0,5
Pícolo chimarrão	14,18	15,7±1,0
Tererê natural	12,96	13,4±0,6
Erva-mate sapecada plantada (liofilizada)	12,73	11,6±0,3
Cambona	12,24	12,1±1,5
Orgânica	11,64	11,7±0,2
Premium	10,54	14,9±0,7
Uruguai	10,04	12,9±1,1
Chá mate tostado	2,65	5,3±0,8
Erva mate verde plantada (liofilizada)	2,26	1,4±0,1

Das amostras analisadas por HPLC, 12 foram também analisadas pelo método ORAC a fim de verificar suas atividades antioxidante.

A **Tabela 13** apresenta uma tendência entre a quantidade de ácidos cafeoilquínicos e atividade antioxidante, quanto maior a quantidade de ácidos, maior a atividade antioxidante. Essa tendência é observada na tabela acima, e que pode ser verificada e validada mediante HCA e PCA.

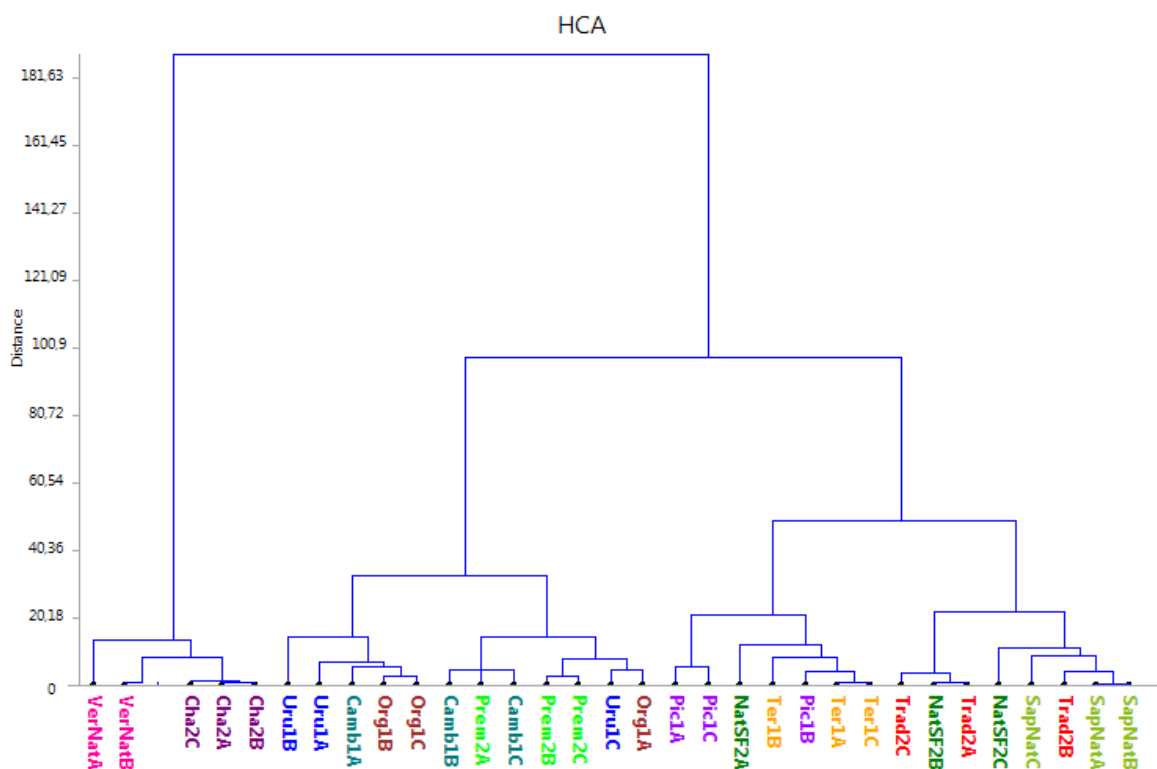


Figura 31. Dendrograma com resultados de atividade antioxidante

Na **Tabela 13** observa-se que a atividade antioxidante foi menor nas amostras com menor quantidade de CQA's (verde e chá), e as demais amostras, que apresentaram maior quantidade de CQA's, também apresentaram maior atividade antioxidante. No dendrograma apresentado na **Figura 31** fica clara a divisão das amostras em dois grandes grupos: o grupo que apresentou menor atividade antioxidante e menor quantidade de CQA's e o grupo com maior atividade antioxidante e maior quantidade de CQA's, comprovando o que havia sido observado na **Tabela 13**.

Na PCA, PC1 e PC2 correspondem a 85% da variância entre os dados.

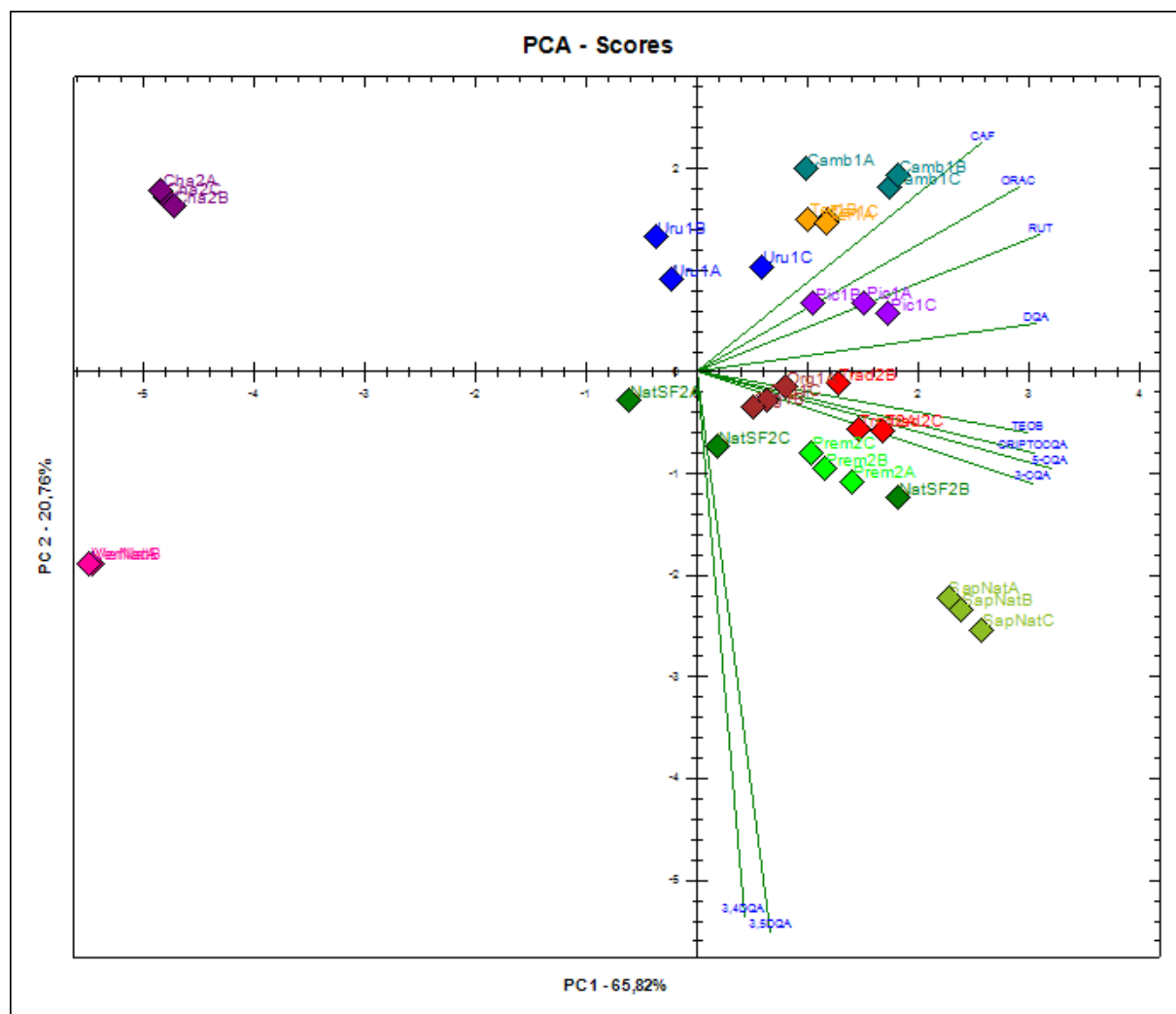


Figura 32. PC1 X PC2 concentração de ácidos cafeoilquínicos e atividade antioxidante

Na **Figura 32** podemos observar que a atividade antioxidante tem influência no eixo positivo nas duas PCs, onde a erva verde e o chá ficam isolados do restante das amostras, comprovando o que foi observado na tabela. O comportamento de isolamento das amostras verdes e do chá tostado é devido à concentração de compostos bioativos ser menor do que nas demais amostras. A erva verde tem o conteúdo de ácidos cafeoilquínicos menor devido à presença das enzimas que promovem a oxidação. Já o chá mate tostado tem a concentração menor pelo fato de ter passado por um processo agressivo de temperatura, promovendo a degradação dos compostos fenólicos que são sensíveis à luz. [23,82,107,108]

Assim como descrito na literatura [35,51,58,78], a quantidade de ácidos cafeoilquínicos, está diretamente relacionada à atividade antioxidante, como observado neste trabalho.

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

A técnica de extração assistida por ultrassom mostrou-se eficiente para extrair os CQA's, metilxantinas e rutina das amostras de erva-mate em diferentes etapas do processamento e no produto pronto para consumo como chimarrão.

Utilizando a técnica de HPLC-DAD-MSⁿ foi possível identificar 11 e quantificar 8 dos compostos bioativos no extrato metanólico das amostras, mostrando que existe potencial para utilizar o produto em diferentes etapas do processamento para finalidades como indústria de alimentos e cosméticos onde o interesse maior é na composição bioativa.

Utilizando o método de sequestro do radical peroxil (ORAC) foi possível determinar a atividade antioxidante das amostras. A atividade antioxidante foi correlacionada ao teor total de CQA's encontrado e verificou-se que quanto maior a concentração desses compostos, maior foi a atividade antioxidante. Isso comprova o que vinha sendo mencionado na literatura de que estes compostos são os maiores responsáveis pela atividade antioxidante.

Mediante análise por componentes principais, foi possível identificar um grupo composto pelo chá mate tostado, um grupo composto pelas ervas-mates verdes nativa e plantada, e um grupo composto pelo restante das amostras analisadas.

Analisando as ervas-mates, foi possível observar que o tipo de plantio influenciou na composição bioativa, distinguindo as amostras que foram plantadas das amostras provenientes de cultura nativa.

Na etapa de sapeco percebe-se um aumento da concentração de compostos bioativos em relação às amostras verdes. A etapa de secagem também influencia na composição bioativa, sendo possível distinguir amostras que passaram pelo secador rotativo com fumaça das amostras que passaram por secador esteira sem fumaça.

Ao analisar as ervas-mate comerciais também foi possível observar, apesar da grande similaridade entre elas, que o tipo de plantio influencia até a etapa final de processo, visto que erva-mate nativa e plantada ficam aglomeradas entre si nos diagramas das PCs. A etapa de secagem também tem influência até o produto final, pois nos diagramas de PCs foi observada a aglomeração por etapa de secagem.

O chá mate tostado ficou isolado das demais amostras, o que indica que a etapa de tostagem ao final do processo também influencia na composição da amostra com relação aos compostos bioativos.

A amostra mais rica em metilxantina e ácidos cafeoilquínicos foi a erva-mate nativa sapecada, e a amostra mais rica no flavonoide rutina foi a amostra pronta para consumo de tererê natural.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] “Atlas Socio Economico Rio Grande do Sul,” can be found under http://www.atlassocioeconomico.rs.gov.br/conteudo.asp?cod_menu_filho=819&cod_menu=817&tipo_menu=ECONOMIA&cod_conteudo=1598, **n.d.**
- [2] C. I. Heck, E. G. De Mejia, *J. Food Sci.* **2007**, *72*, R138–R151.
- [3] R. A. Jacques, Caracterização Química Da Erva-Mate (*Ilex Paraguariensis*): Aplicação de Diferentes Processos de Extração E Influência Das Condições de Plantio Sobre a Composição Química., Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2005**.
- [4] E. Valduga, *Caracterização Estrutural E Química Da Erva-Mate (Ilex Paraguariensis St. Hill) E de Espécies Utilizadas Na Adulteração*, Curitiba, **1994**.
- [5] D. H. M. Bastos, L. A. Saldanha, R. R. Catharino, A. C. H. F. Sawaya, I. B. S. Cunha, P. O. Carvalho, M. N. Eberlin, *Molecules* **2007**, *12*, 423–432.
- [6] X. W. Yang, N. Wang, W. Li, W. Xu, S. Wu, *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *55*, 297–303.
- [7] S. H. Mosele, A Governança Na Cadeia Agroindustrial Da Erva-Mate Na Região Do Alto Uruguai Rio-Grandense, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2002**.
- [8] G. Gosmann, Saponinas de *Ilex Paraguariensis* de St. Hil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **1989**.
- [9] P. Mazzafera, D. M. Yamaoka-yano, A. Pierre, D. D. F. Vegetal, I. De Biologia, *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **1996**, *8*, 67–74.
- [10] F. H. Reginatto, M. L. Athayde, G. Gosmann, E. P. Schenkel, *J. Braz. Chem. Soc.* **1999**, *10*, 443–446.
- [11] D. M. da Croce, *Ciência Florest.* **2002**, *12*, 107–113.
- [12] M. C. Esmelindro, G. Toniazzo, A. Waczuk, C. Dariva, D. de Oliveira, *Ciência e Tecnol. Aliment.* **2002**, *22*, 199–204.
- [13] C. M. O. Simoes, *Farmacognosia, Da Planta Ao Medicamento.*, **2006**.
- [14] G. C. Gilberti, *Dominguezia* **1989**, *7*, 1–22.
- [15] P. E. . CARVALHO, *Brasília: EMBRAPA* **1994**, 640.
- [16] “Histórico da erva-mate,” can be found under <http://www.museuparanaense.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=62>., **n.d.**
- [17] A. D. Meinhart, C. S. Bizzotto, C. A. Ballus, A. C. P. Rybka, M. R. Sobrinho, R. S. Cerro-Quintana, J. Teixeira-Filho, H. T. Godoy, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 2188–2193.

- [18] K. H. Kraemer, A. T. C. Taketa, E. P. Schenkel, G. Gosmann, D. Guillaume, *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1119–1122.
- [19] J. R. Azzolini, M.; Maccari, *Produtos Alternativos E Desenvolvimento Da Tecnologia Industrial Na Cadeia Produtiva Da Erva-Mate*, Curitiba, **2000**.
- [20] A. Valduga, J. R. D. Finzer, S. H. Mosele, *Processamento de Erva-Mate*, Erechim, **2003**.
- [21] F. L. G. DUTRA, COMPOSTOS FENÓLICOS E METILXANTINAS EM ERVA-MATE ARMAZENADA EM SISTEMAS DE ESTACIONAMENTO NATURAL E ACELERADO, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, **2009**.
- [22] E. L. Cardozo Junior, C. Morand, *J. Funct. Foods* **2016**, *21*, 440–454.
- [23] N. Dartora, L. M. De Souza, A. P. Santana-Filho, M. Iacomini, A. T. Valduga, P. A. J. Gorin, G. L. Sasaki, *Food Chem.* **2011**, *129*, 1453–1461.
- [24] N. F. Mattos, in *Silvic. Da Erva-Mate (Ilex Paraguariensis) An.*, Curitiba, **1985**, pp. 37–46.
- [25] H. Winge, C. Wollheim, S. Cavalli-Molinas, E. M. Assmann, K. L. L. Bassani, M. B. Amaral, G. C. Coelho, A. M. O. Freitas-Sacchet, A. T. Butzke, J. E. A. Mariath, *Variabilidade Genética Em Populações Nativas de Erva-Mate E a Implantação de Bancos de Germoplasma*, Porto Alegre, **1995**.
- [26] A. C. Zampier, Avaliação de Níveis de Nutrientes, Cafeína E Taninos Em Erva-Mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hill), Universidade Federal do Paraná, **2001**.
- [27] S. do E. da A. e do A.-D. de economia Rural, *Produtos Florestais - Erva-Mate*, **2014**.
- [28] IBGE, *Pesquisa Agrícola Municipal*, **2013**.
- [29] M. L. Athayde, Saponinas E Triterpenos Em Algumas Espécies Do Gênero *Ilex*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **1993**.
- [30] M. L. Athayde, Metilxantinas E Saponinas Em Quatro Populações de *Ilex Paraguariensis* A. St. Hill; Triterpenos E Saponinas Em Outras Espécies Do Gênero *Ilex*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2000**.
- [31] R. Cansian, Variabilidade Genética E de Compostos Voláteis E Semi-Voláteis Em Populações Nativas de *Ilex Paraguariensis* (St. Hill) Do Brasil, Visando a Conservação Da Espécie, São Carlos, **2003**.
- [32] K. P. Burris, F. M. Harte, P. Michael Davidson, C. Neal Stewart Jr, S. Zivanovic, *Chil. J. Agric. Res.* **2012**, *72*, 268–275.
- [33] S. Puangpraphant, M. A. Berhow, E. G. de Mejia, *Food Chem.* **2011**, *125*, 1171–1178.
- [34] L. Bravo, L. Goya, E. Lecumberri, *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 393–405.
- [35] K. A. S. Berté, M. R. Beux, P. K. W. D. S. Spada, M. Salvador, R. Hoffmann-Ribani, *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5523–5527.

- [36] R. Filip, S. B. Lotito, G. Ferraro, C. G. Fraga, *Nutr. Res.* **2000**, *20*, 1437–1446.
- [37] T. Andersen, J. Fogh, *J. Hum. Nutr. Diet.* **2001**, *14*, 243–250.
- [38] N. Lunceford, A. Gugliucci, *Fitoterapia* **2005**, *76*, 419–427.
- [39] S. Isolabella, L. Cogoi, P. López, C. Anesini, G. Ferraro, R. Filip, *Food Chem.* **2010**, *122*, 695–699.
- [40] C. M. Pagliosa, M. A. Vieira, R. Podestá, M. Maraschin, A. L. B. Zeni, E. R. Amante, R. D. de M. C. Amboni, *Food Chem.* **2010**, *122*, 173–178.
- [41] M. Carini, R. Maffei Facino, G. Aldini, M. Calloni, L. Colombo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 1813–1819.
- [42] F. Sari, N. Turkmen, G. Polat, Y. S. Velioglu, *Food Sci. Technol. Res.* **2007**, *13*, 265–269.
- [43] T. H. Tsai, T. H. Tsai, Y. C. Chien, C. W. Lee, P. J. Tsai, *Food Chem.* **2008**, *110*, 859–864.
- [44] I. Kubo, H. Muroi, M. Himejima, *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 107–111.
- [45] T. Hongpattarakere, Natural Antimicrobial Components Isolated from Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*) Leaves, Universidade de Wisconsin, **2000**.
- [46] E. Ito, A. Crozier, H. Ashihara, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1997**, *1336*, 323–330.
- [47] J. P. Monteiro, M. G. Alves, P. F. Oliveira, B. M. Silva, **2016**, DOI 10.3390/molecules21080974.
- [48] M. Kolahdouzan, M. J. Hamadeh, **2017**, 272–290.
- [49] L. Mazur, P. G. Peralta-zamora, B. Demczuk, R. Hoffmann, *J. Food Compos. Anal.* **2014**, *35*, 55–60.
- [50] M. N. Clifford, K. L. Johnston, S. Knight, N. Kuhnert, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2900–2911.
- [51] M. Jeszka-Skowron, A. Sentkowska, K. Pyrzyńska, M. P. De Peña, *Eur. Food Res. Technol.* **2016**, *242*, 1403–1409.
- [52] V. Marques, A. Farah, *Food Chem.* **2009**, *113*, 1370–1376.
- [53] I. A. Saleh, M. Vinatoru, T. J. Mason, N. S. Abdel-Azim, E. A. Aboutabl, F. M. Hammouda, *Ultrason. Sonochem.* **2016**, *31*, 330–336.
- [54] R. Jaiswal, N. Kuhnert, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 2283–2294.
- [55] E. L. Cardozo, O. Ferrarese-Filho, L. C. Filho, M. de L. L. Ferrarese, C. M. Donaduzzi, J. A. Sturion, *J. Food Compos. Anal.* **2007**, *20*, 553–558.
- [56] C. A. Bastos De Maria, R. F. A. Moreira, in *Quim. Nova*, **2004**, pp. 586–592.

- [57] J. Valerga, M. Reta, M. C. Lanari, *LWT - Food Sci. Technol.* **2012**, *45*, 28–35.
- [58] N. Turkmen, F. Sari, Y. S. Velioglu, *Food Chem.* **2006**, *99*, 835–841.
- [59] *Eur. J. Biochem.* **1975**, *57*, 1–7.
- [60] A. R. Fontana, A. Antonioli, R. Bottini, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 8987–9003.
- [61] A. Gugliucci, A. J. Stahl, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1995**, *35*, 47–56.
- [62] D. H. M. Bastos, E. Y. Ishimoto, M. Ortiz M. Marques, A. Fernando Ferri, E. A. F. S. Torres, *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 538–543.
- [63] C. Anesini, G. Ferraro, R. Filip, *Food Chem.* **2006**, *97*, 459–464.
- [64] M. Görgen, K. Turatti, A. R. Medeiros, A. Buffon, C. D. Bonan, J. J. F. Sarkis, G. S. Pereira, *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 73–77.
- [65] R. Filip, P. Lopez, J. Coussio, G. Ferraro, *Phyther. Res.* **1998**, *12*, 129–131.
- [66] K. P. Burris, P. M. Davidson, C. N. Stewart Jr., F. M. Harte, *J. Food Sci.* **2011**, *76*, M456-62.
- [67] V. Colombo, R. Nuñez, in *Bibliogr. La Yerba Mate*, Buenos Aires, **1983**, p. 114.
- [68] B. Halliwell, *Lancet* **2000**, *355*, 1179–1180.
- [69] C. Q. Alves, J. M. David, J. P. David, M. V. Bahia, R. M. Aguiar, *Quim. Nova* **2010**, *33*, 2202–2210.
- [70] a N. Glazer, *FASEB J.* **1988**, *2*, 2487–2491.
- [71] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619–4626.
- [72] G. Cao, C. P. Verdon, A. H. B. Wu, H. Wang, R. L. Prior, *Clin. Chem.* **1995**, *41*, 1738–1744.
- [73] G. Cao, H. M. Alessio, R. G. Cutler, *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *14*, 303–311.
- [74] H. Wang, G. Cao, R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 701–705.
- [75] H. Wang, G. Cao, R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 304–309.
- [76] X. Wu, G. R. Beecher, J. M. Holden, D. B. Haytowitz, S. E. Gebhardt, R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4026–4037.
- [77] M. J. Salvador, E. O. Ferreira, S. U. Mertens-Talcott, W. V. De Castro, V. Butterweck, H. Derendorf, D. A. Dias, *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2006**, *61*, 19–25.
- [78] K. Aaby, E. Hvattum, G. Skrede, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4595–4603.
- [79] I. K. Bae, H. M. Ham, M. H. Jeong, D. H. Kim, H. J. Kim, *Food Chem.* **2015**, *172*, 469–475.

- [80] A. N. Negrão Murakami, R. D. De Mello Castanho Amboni, E. S. Prudêncio, E. R. Amante, L. de Moraes Zanotta, M. Maraschin, J. C. Cunha Petrus, R. F. Teófilo, *LWT - Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 2211–2216.
- [81] B. B. Strassmann, A. R. Vieira, E. L. Pedrotti, H. N. F. Morais, P. F. Dias, M. Maraschin, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8348–8353.
- [82] C. I. Heck, M. Schmalko, E. G. De Mejia, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8394–8403.
- [83] E. F. Zanoelo, L. Cardozo-Filho, E. L. Cardozo-JÚNIOR, *J. Food Process Eng.* **2006**, *29*, 253–268.
- [84] M. Naczka, F. Shahidi, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 95–111.
- [85] M. Biesaga, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 2505–2512.
- [86] X. L. Bai, T. L. Yue, Y. H. Yuan, H. W. Zhang, *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 3751–3758.
- [87] Y. Sun, X. Liao, Z. Wang, X. Hu, F. Chen, *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *225*, 511–523.
- [88] Z. Pan, W. Qu, H. Ma, G. G. Atungulu, T. H. McHugh, *Ultrason. Sonochem.* **2012**, *19*, 365–372.
- [89] N. Hong, V. a Yaylayan, G. S. Raghavan, J. R. Paré, J. M. Bélanger, *Nat. Prod. Lett.* **2001**, *15*, 197–204.
- [90] D. S. Oufnac, Z. Xu, T. Sun, C. Sabliov, W. Prinyawiwatkul, J. S. Godber, *Cereal Chem.* **2007**, *84*, 125–129.
- [91] X. J. Li, W. Wang, M. Luo, C. Y. Li, Y. G. Zu, P. S. Mu, Y. J. Fu, *Food Chem.* **2012**, *133*, 437–444.
- [92] S. Perino, E. Petitcolas, M. de la Guardia, F. Chemat, *J. Chromatogr. A* **2013**, *1315*, 200–203.
- [93] A. Ebringerova, Z. Hromadkova, *Cent. Eur. J. Chem.* **2010**, *8*, 243–257.
- [94] F. Chemat, N. Rombaut, A. G. Sicaire, A. Meullemiestre, A. S. Fabiano-Tixier, M. Abert-Vian, *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *34*, 540–560.
- [95] A. C. Kimbaris, N. G. Siatis, D. J. Daferera, P. A. Tarantilis, C. S. Pappas, M. G. Polissiou, *Ultrason. Sonochem.* **2006**, *13*, 54–60.
- [96] K. Ghafoor, Y. H. Choi, J. Y. Jeon, I. H. Jo, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4988–4994.
- [97] J. Xu, W. Wang, H. Liang, Q. Zhang, Q. Li, *Ind. Crops Prod.* **2015**, *76*, 487–493.
- [98] S. Mitra, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, **2003**.
- [99] B. He, L. L. Zhang, X. Y. Yue, J. Liang, J. Jiang, X. L. Gao, P. X. Yue, *Food*

Chem. **2016**, *204*, 70–76.

- [100] M. Chen, Y. Zhao, S. Yu, *Food Chem.* **2015**, *172*, 543–550.
- [101] J. Yuan, J. Huang, G. Wu, J. Tong, G. Xie, J. ao Duan, M. Qin, *Ind. Crops Prod.* **2015**, *74*, 192–199.
- [102] G. F. Barbero, A. Liazid, M. Palma, C. G. Barroso, *Talanta* **2008**, *75*, 1332–1337.
- [103] R. J. Robbins, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2866–2887.
- [104] F. M. Lanças, *Sci. Chromatogr.* **2009**, *5*, 27–46.
- [105] M. Ramirez-Ambrosi, B. Abad-Garcia, M. Vilorio-Bernal, S. Garmon-Lobato, L. A. Berrueta, B. Gallo, *J. Chromatogr. A* **2013**, *1316*, 78–91.
- [106] N. P. Rodrigues, N. Bragagnolo, *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *32*, 105–115.
- [107] L. G. Riachi, D. L. R. Simas, G. C. Coelho, P. S. Marcellini, A. J. R. da Silva, C. A. B. de Maria, *Food Chem.* **2018**, *266*, 317–322.
- [108] P. Dugo, F. Cacciola, P. Donato, R. A. Jacques, E. B. Caramão, L. Mondello, *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7213–7221.
- [109] M. Kivilompolo, T. Hyötyläinen, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1145*, 155–164.
- [110] J. Pól, B. Hohnová, T. Hyötyläinen, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1150*, 85–92.
- [111] R. G. Brereton, *J. Chemom.* **2014**, *28*, 749–760.
- [112] L. F. M. C. Aquino, A. C. O. Silva, M. Q. Freitas, T. L. Felício, A. G. Cruz, C. A. Conte-Junior, *Food Res. Int.* **2014**, *62*, 233–237.
- [113] L. Munck, L. Nørgaard, S. B. Engelsen, R. Bro, C. A. Andersson, in *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **1998**, pp. 31–60.
- [114] E. M. Qannari, *Curr. Opin. Food Sci.* **2017**, *15*, 8–13.
- [115] D. Granato, J. S. Santos, G. B. Escher, B. L. Ferreira, R. M. Maggio, *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *72*, 83–90.
- [116] D. Granato, D. S. Nunes, F. J. Barba, *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *62*, 13–22.
- [117] R. Bro, A. K. Smilde, *Anal. Methods* **2014**, *6*, 2812–2831.
- [118] M. M. C. Ferreira, *Quimiometria Conceitos, Métodos E Aplicações*, Campinas, **2015**.
- [119] C. F. C. Ruschel, *Aplicação de Ferramentas Quimiométricas E Técnicas Espectroscópicas Na Análise de Combustíveis*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2017**.
- [120] L. Mondello, *Comprehensive Chromatography in Combination with Mass Spectrometry*, **2011**.

- [121] W. N. L. dos Santos, M. C. da Silva Sauthier, A. M. P. dos Santos, D. de Andrade Santana, R. S. Almeida Azevedo, J. da Cruz Caldas, *Microchem. J.* **2017**, *133*, 583–592.
- [122] K. Fraige, E. R. Pereira-Filho, E. Carrilho, *Food Chem.* **2014**, *145*, 395–403.
- [123] E. Rodrigues, L. R. B. Mariutti, A. F. Faria, A. Z. Mercadante, *Food Chem.* **2012**, *134*, 704–711.
- [124] A. Serra, A. Macià, M. P. Romero, C. Piñol, M. J. Motilva, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2011**, *879*, 1519–1528.
- [125] H. Zhou, J. Liang, D. Lv, Y. Hu, Y. Zhu, J. Si, S. Wu, *Food Chem.* **2013**, *138*, 2390–2398.
- [126] C. H. Blum-silva, A. Beatriz, G. Luz, M. Vinicius, P. S. Nascimento, B. Matheus, D. C. Facchin, B. Baratto, T. Silvia, L. Pergaud, et al., *Data Br.* **2016**, *8*, 295–299.
- [127] R. Mateos, G. Baeza, B. Sarriá, L. Bravo, *Food Chem.* **2018**, *241*, 232–241.
- [128] A. P. Butiuk, M. A. Martos, O. Adachi, R. A. Hours, *J. Dermatol. Sci.* **2016**, *3*, 27–33.