

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Avaliação química e biológica do extrato hidroetanólico de erva-mate (*Ilex
paraguariensis* A. St. Hil.)

Adriana Gregory Barlette

Porto Alegre, 2011.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Avaliação química e biológica do extrato hidroetanólico de erva-mate (*Ilex
paraguariensis* A. St. Hil.)

Dissertação apresentada por
Adriana Gregory Barlette
para obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Grace Gosmann
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro

Porto Alegre, 2011.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em Nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.03.2011, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa Dr^a Juliana Alves Macedo
Universidade São Francisco

Profa Dr^a Vera Maria Treis Trindade
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa Dr^a Gilsane Lino Von Poser
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

B257a Barlette, Adriana Gregory
Avaliação química e biológica do extrato hidroetanólico de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) / Adriana Gregory Barlette. – Porto Alegre: UFRGS, 2011. – xxviii, 123 p.: il.

Dissertação(mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Ilex paraguariensis*. 2. Erva-mate. 3. Aquifoliaceae. 4. Atividade antioxidante. 5. Adipogenia. 6. Lipólise. I. Gosmann, Grace. II. Ribeiro, Marcelo Lima. III. Título.

CDU: 547.9:582.766

Os procedimentos experimentais desse trabalho foram realizados no Laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS em Porto Alegre-RS, sob a orientação da Profª Drª Grace Gosmann e na Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia da Universidade São Francisco – USF, campus Bragança Paulista-SP sob a orientação do Profº Dr. Marcelo Lima Ribeiro.

"Amargo doce que eu sorvo
Num beijo em lábios de prata
Tens o perfume da mata
Molhada pelo sereno.
E a cuia, seio moreno,
Que passa de mão em mão
Traduz, no meu chimarrão,
Em sua simplicidade,
A velha hospitalidade
Da gente do meu rincão..."

Glaucus Saraiva

Agradecimentos

À Prof^a Dr^a Grace Gosmann, pela orientação, incentivo, amizade, carinho, pelo exemplo profissional e pessoal e principalmente pela oportunidade e confiança.

Ao Prof^o Dr^o Marcelo Lima Ribeiro pela co-orientação e colaboração nos experimentos biológicos desenvolvidos neste trabalho.

Ao Gustavo Rodrigues, meu noivo, pelo amor, carinho, companheirismo, pela compreensão dos muitos e prolongados momentos de ausência e por sempre acreditar no meu potencial.

Aos meus pais, Maria e Jair, pela vida, incentivo e amor a mim dedicados.

À minha sogra Tânia pelo carinho e incentivo, e ao meu sogro Iseu pelo carinho, incentivo, por me contagiar com seu entusiasmo pela pesquisa com a erva-mate e pela doação da matéria-prima.

À bolsista de iniciação científica Tabitha Dahmer, pela amizade, companheirismo e competência.

Às colegas de laboratório e amigas, Mônica Duarte, por sempre estar disposta a me ajudar, Lucimara Comunello por ser minha bolsista emprestada, e Cristiane Bernardes de Oliveira, por me “emprestar” a Lu e sempre discutir os resultados comigo. A todas pelo coleguismo em todos os momentos, dentro e fora do laboratório, por serem minhas companheiras de congressos, de experimentos, e principalmente pela amizade.

Aos colegas do laboratório de fitoquímica, Cíntia Kiekow, Soraia Lunardelli, Luciana Dalla Vechia, Aline Zimmer, Bianca Leonardi, Laura Vieira, Bruna Casanova, Marina Campana, Andressa Braga, Cedric Graebin, Fernanda de Costa, Anna Yendo, Adrine Innocente, Glória Narjara, Nicole Garcia e a Prof^a Dr^a Simone Gnoatto, pelos momentos que passamos juntos.

Aos colegas da Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia-USF, Eloá Ramalho de Camargo, Simone Acedo, Waldemar Bartchewsky Júnior, Demétrius Arçari e a Prof^a Dr^a Alessandra Gambero, pelo auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, os quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação profissional e pessoal.

Resumo

Ilex paraguariensis A. St.-Hil., conhecida como erva-mate, é uma árvore nativa da América do Sul onde as folhas e pequenos ramos secos são usados para preparar o chimarrão. Possui uma composição química complexa, da qual pode-se vislumbrar muitas aplicações potenciais, que poderiam vir a ampliar o emprego da erva-mate e, conseqüentemente, do mercado para esta matéria-prima. As folhas de *I. paraguariensis* contêm xantinas, flavonóides, derivados do ácido cafeoilquínico e uma quantidade significativa de saponinas triterpenóides (cerca de 10%). Neste estudo foram investigados quimicamente extratos hidroetanólicos de *I. paraguariensis*, de suas frações, e de algumas substâncias de referência, como também os efeitos desses na atividade antioxidante, no acúmulo de gordura (TG) e na atividade lipolítica em cultura de células 3T3-L1. Neste sentido obtivemos extratos brutos hidroetanólicos de folhas verdes (EBV) e secas (EBS) maceradas, os quais foram fracionados originando 8 frações. Ácido ursólico, ácido clorogênico e rutina foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Também foi realizada a determinação de fenóis por catequinas e pela precipitação por proteínas. A fração fenólicos da folha verde apresentou atividade antioxidante superior às substâncias de referência rutina e ácido clorogênico, enquanto que o ácido ascórbico apresentou a melhor atividade. O ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetil)difenil tetrazólio (MTT) demonstrou que os extratos e padrões testados entre 50 µg/mL e 1000 µg/mL não foram citotóxicos para as células 3T3-L1. Dentre as frações testadas para a atividade na adipogênese, a fração resíduo aquoso da folha verde (RAV) apresentou maior inibição (24%) no teor de TG na concentração de 100 µg/mL. Dentre as substâncias de referência testadas, os melhores resultados foram obtidos com o ácido caféico nas concentrações de 300 µg/mL e da rutina na concentração de 100 µg/mL. Em relação à atividade na lipólise, a fração RAV apresentou o melhor resultado nas concentrações de 50 e 75 µg/mL. Entre as substâncias de referência, o ácido gálico apresentou resultado significativo em relação à atividade anti-lipolítica nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL. Para elucidar em qual estágio da adipogênese e da lipólise os extratos, frações e padrões atuam, são necessários a investigação da avaliação da ação desses extratos e frações através de análise de expressão de genes ligados a adipogênese e a atividade lipolítica.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, erva-mate, atividade antioxidante, adipogênese, lipólise.

Abstract

Ilex paraguariensis A. St.-Hil., known as maté, is a native tree from South América which leaves and twigs are used to prepare the traditional beverage "chimarrão". It has a complex chemical composition that might have many potential applications in order to increase the use of maté and then, in consequence, increase the market demand of this raw material. Leaves from *I. paraguariensis* have xanthines, flavonoids, cafeoylquinic acid derivatives and triterpenoid saponins (ca. 10%). Herein, it was investigated, both chemically and biologically, the hydroethanolic extracts of leaves from *I. paraguariensis*, its fractions, and some reference substances, as the antioxidant activity, the adipogenesis (TG) and lipolytic activities in 3T3-L1 cell culture. So, it was prepared hydroethanolic extracts of fresh (EBV) and dried leaves (EBS) by maceration, which submitted to further fractionation furnished 8 fractions. Ursolic acid, chlorogenic acid and rutin were determined in these samples by liquid chromatography (HPLC) Also, phenolic constituents were determined using catequines and protein precipitation methods. The phenolic fraction from fresh leaves presented better antioxidant activity than the tested reference substances (rutin and chlorogenic acid), while ascorbic acid presented the best activity. The MTT assay showed that the tested extracts and fractions among 50 µg/mL and 1000 µg/mL did not present citotoxicity to 3T3-L1 cells. Among the tested fractions to adipogenesis, the aqueous residue fraction from fresh leaves (RAV) presented best inhibition (24%) of TG at 100 µg/mL. Among tested reference substances, caffeic acid at 300 µg/mL, and rutin at 100 µg/mL presented the best results. In relation to the lipolytic activity, the RAV fraction presented best results at 50 e 75 µg/mL and, among the tested reference substances, galic acid presented best results at 500 e 1000 µg/mL. In order to understand the mechanism of action of these fractions and reference substances at the adipogenesis and lipolysis further studies will be performed specially those about the influence on the gene expression.

Keywords: *Ilex paraguariensis*, maté, antioxidant activity, adipogenesis, lipolytic activities.

Lista de Figuras

Figura 1: <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. em área cultivada.....	17
Figura 2: Estrutura química do ácido ursólico e oleanólico.....	19
Figura 3: Estrutura química da rutina.....	21
Figura 4: Estrutura química do ácido clorogênico.....	21
Figura 5: Estrutura química da cafeína.....	24

Lista de Tabelas

Os resultados serão divulgados através de publicação em revista indexada.

Lista de ANEXOS

Os resultados serão divulgados através de publicação em revista indexada.

Lista de Abreviaturas

- AA% = percentagem de atividade antioxidante;
- AS = fração acetato de etila das folhas secas;
- AV = fração acetato de etila das folhas verdes;
- BAW = butanol:ácido acético:água;
- BSA = albumina de soro bovino;
- C/EBP α , = (CCAAT-enhancer-binding protein alpha) protein ligadora e aumentadora CCAAT-alfa;
- CCD = cromatografia em camada delgada;
- CE₅₀ = concentração efetiva para obter 50% do máximo da atividade estimada;
- CLAE = Cromatografia líquida de alta eficiência;
- DMEM = (Dulbecco's modified Eagle's medium) Meio modificado Dulbecco Eagle;
- DPPH[•] = 2,2 difenil-1-picril-hidrazila;
- EAT = equivalentes de ácido tânico;
- EBS = extratos brutos hidoretanólicos das folhas secas;
- EBV = extratos brutos hidoretanólicos das folhas verdes;
- EC = equivalentes de catequina;
- FS = fração fenólicos das folhas secas;
- FV = fração fenólicos das folhas verdes;
- IBMX = 3-isobutil-1-metilxantina
- LDL = lipoproteína de baixa densidade;
- MTT = brometo de 3-(4,5-dimetil)difenil tetrazólio;
- p.a = pró-análise;
- PPAR γ = receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas;
- QEAA = quantidade equivalente em ácido ascórbico;
- r² = coeficiente de regressão;
- RAS = fração resíduo aquoso das folhas secas;
- RAV = fração resíduo aquoso das folhas verdes;
- Rf = razão de frente;
- ROS = espécies reativas de oxigênio;
- SDS/TEA = sodiododecilsulfato/trietanolamina;
- SM = síndrome metabólica;

SREBP-1c = proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis;

SS = fração saponinas das folhas secas;

SV = fração saponinas das folhas verdes;

TNF- α , = Fator de Necrose Tumoral α ;

tr = tempo de retenção;

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL.....	03
REFERÊNCIAS.....	07
OBJETIVOS.....	13
Objetivos gerais	13
Objetivos específicos.....	13

CAPÍTULO 1: Revisão bibliográfica de *Ilex paraguariensis*

1. ASPECTOS BOTÂNICOS.....	17
2. ASPECTOS QUÍMICOS.....	18
2.1. Saponinas.....	18
2.2. Compostos fenólicos.....	20
2.3. Xantinas.....	23
3. ASPECTOS BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS.....	24
3.1. Atividade Antioxidante.....	25
3.2. Atividade na obesidade.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

CAPÍTULO 2: Os resultados serão divulgados através de publicação em revista indexada.

CAPÍTULO 3: Os resultados serão divulgados através de publicação em revista indexada.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Ilex paraguariensis A. St.-Hil é uma árvore nativa da América do Sul que pertence a família Aquifoliaceae. As folhas e pequenos ramos secos são usados para preparar o chimarrão, também conhecido como mate ou erva-mate, sendo uma bebida muito consumida em vários países da América do Sul, incluindo Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina.

Neste contexto, a erva-mate assume um papel sócio-econômico importante, uma vez que, o chimarrão (infusão de água quente com erva-mate beneficiada) é a principal forma de consumo do produto no Brasil sendo responsável pela sustentabilidade do setor ervateiro no país. Os demais produtos da erva-mate, como o chá mate e o mate pronto para beber, representam uma pequena parcela do mercado (MACCARI & SANTOS, 2000; DONADUZZI *et al.*, 2003).

No entanto, ainda hoje, o seu consumo apresenta mercado limitado às regiões onde é produzida e na forma de produtos tradicionais. A situação do setor ervateiro, com restrições de preço e mercado, a necessidade de estratégias de marketing que implicam em defender uma exploração sustentável e ecologicamente correta, mostra que esta prática é de risco e pode agravar as dificuldades vividas pelos produtores, que na sua maioria, são compostos por pequenas propriedades rurais (RUCKER, 1996; ESMELINDRO *et al.*, 2002).

Como se trata de uma planta de composição química elaborada pode-se vislumbrar muitas aplicações potenciais, as quais poderiam vir a ampliar o emprego da erva-mate e, conseqüentemente, do mercado para esta matéria-prima. As folhas de *I. paraguariensis* contem xantinas (como cafeína), flavonóides glicosídicos (como rutina), derivados do ácido cafeoilquínico (ácido clorogênico) e uma quantidade significativa de saponinas triterpenóides (cerca de 10%) tendo o ácido ursólico como principal aglicona (SCHENKEL *et al.*, 1997; HECK & MEJIA, 2007).

Há muito tempo as espécies de *Ilex* estão sendo estudadas pelo nosso grupo de pesquisa (SCHENKEL *et al.*, 1997). Mais recentemente iniciamos estudos para elucidar a relação entre a estrutura química das saponinas e sua

atividade biológica, como por exemplo, a atividade antimalárica (GNOATTO *et al.*, 2008).

Também, alguns estudos estão sendo realizados com o intuito de conhecer as saponinas presentes nos frutos da erva-mate a fim de utilizar essa matéria-prima como fonte de saponinas. A literatura apresenta o isolamento e a identificação de um novo glicosídeo triterpenóide, o ácido 3 β -O- α -L-arabinopiranosil-rotúndico, chamado de matesídeo, e os triterpenos conhecidos como ácido ursólico, acetilursólico, ácido 23-hidroxiursólico, a saponina ziyuglicosídeo I e o ilexosídeo II a partir de frutos de *Ilex paraguariensis* (TAKETA *et al.*, 2004).

Popularmente, *I. paraguariensis* é utilizada para diversas enfermidades como fadiga, digestão lenta e doenças hepáticas (BASTOS AL AL., 2007).

Trabalhos publicados apontam algumas ações da *I. paraguariensis* e sugerem alguns efeitos farmacológicos. Vários grupos de pesquisa verificaram algumas possíveis atividades da *I. paraguariensis*. Entre elas estão: atividade quimiopreventivas (prevenção de dano celular causado por doenças crônicas) (RAMIREZ-MARES *et al.*, 2004), inibição da glicação (LUNCEFORD & GUGLIUCCI, 2005), inibição do estresse oxidativo (GUGLIUCCI, 1996; GUGLIUCCI & MENINI, 2002), efeito colerético e propulsão intestinal (GORZALCZANY *et al.*, 2001) e efeito vasodilatador (BAISCH *et al.*, 1998).

Segundo FILIP e colaboradores (2000) a *I. paraguariensis* é rica em compostos bioativos, entre eles os polifenóis, flavonóides e catequinas, que são absorvidos pelo organismo e podem atuar como antioxidantes ou como anti-radicais livres.

Já foi demonstrado que extratos de *I. paraguariensis* causaram uma diminuição na oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana, tanto *in vitro* (GUGLIUCCI & STAHL, 1995) como *in vivo* (GUGLIUCCI, 1996). É possível que a erva-mate possa proporcionar uma quantidade importante de antioxidantes para o organismo através do fornecimento de derivados cafeoilquínicos e outros polifenóis (FILIP *et al.*, 2000).

Publicações recentes, também, evidenciaram alguns efeitos benéficos de *I. paraguariensis*, que incluem a atividade antioxidante (MIRANDA *et al.*, 2008), efeito protetor contra danos induzidos ao DNA (MIRANDA *et al.*, 2008) e efeitos antiobesidade (ARÇARI *et al.*, 2009; ARÇARI *et al.*, 2011).

A obesidade é uma condição complexa de dimensões sociais, biológicas e psicossociais consideráveis e segundo RÖSSNER (2002) já é apontada como a epidemia do século XXI. O estilo de vida sedentário e uma dieta hipercalórica que caracterizam a sociedade dos países ocidentais parecem ser os fatores mais importantes do desenvolvimento da obesidade (SANTOS *et al.*, 2005).

As comorbidades associadas à obesidade são graves, tanto do ponto de vista psicossocial (ex: estigmatização social; perturbações emocionais), quanto do ponto de vista biológico (SANTOS *et al.*, 2005).

A Síndrome Metabólica (SM) é uma dessas comorbidades. Esta é descrita como um conjunto de anormalidades metabólicas e hemodinâmicas, frequentemente presentes no indivíduo obeso (REAVEN, 1994).

O tecido adiposo é o maior reservatório energético do organismo. Este é composto por adipócitos, por uma matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes (leucócitos e macrófagos), fibroblastos e pré-adipócitos (células adiposas indiferenciadas) (AHIMA & FLIER, 2000).

Os adipócitos são células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilgliceróis (moléculas compostas por ácidos graxos e glicerol), e dispõe do conjunto de enzimas e proteínas responsáveis pela síntese, armazenamento e mobilização de ácidos graxos, em resposta a alterações na demanda fisiológica. Esses processos são altamente regulados por fatores genéticos, nutricionais, hormonais e parácrinos (AHIMA & FLIER, 2000).

Mudanças no número de adipócitos ocorrem mediante um complexo arranjo de eventos que envolvem proliferação e diferenciação de pré-adipócitos. Além disso, os adipócitos produzem uma variedade de moléculas biologicamente ativas conhecidas como adipocinas, as quais estão envolvidas na patogenicidade da síndrome metabólica (SM) (FURUKAWA *et al.*, 2004).

O acúmulo de gordura é determinado pelo balanço entre a síntese de lipídios (lipogênese) e a sua degradação (lipólise), que é a oxidação dos ácidos graxos (LAFONTAN & LANGIN, 2009). A lipólise é um processo catabólico realizado pelos adipócitos durante os períodos de carência de nutrientes, no qual os TG são hidrolizados e ácidos graxos liberados da célula (LANGIN, 2006)

A lipólise é controlada por sistema neural e hormonal, com ação de numerosas proteínas que implicam significativamente na enzima lípase hormônio sensível (LSH). As catecolaminas (noraepinefrina e epinefrina) são responsáveis pela estimulação do metabolismo lipídico através dos receptores β -adrenérgicos (LANGIN, 2006; LAFONTAN & LANGIN, 2009)

Por outro lado, alguns trabalhos têm demonstrado que a insulina pode induzir uma atividade anti-lipolítica atuando como inibidor fisiológico da lipólise induzida pelas catecolaminas (LANGIN, 2006; LAFONTAN & LANGIN, 2009)

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando, especialmente com a flora do Rio Grande do Sul, na busca de moléculas ativas que possam ser utilizadas como protótipos em estudos de química medicinal visando o desenvolvimento de um fármaco.

Neste contexto, considerando o potencial terapêutico dos componentes químicos da erva-mate na obesidade e como antioxidante, o presente trabalho teve como objetivo a análise fitoquímica e a determinação da quantificação de compostos fenólicos totais e de ácido ursólico de extratos brutos hidroetanólicos de folhas verdes e secas de *I. paraguariensis*. Também a avaliação da atividade antioxidante de *I. paraguariensis* através do ensaio espectrofotométrico com o radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]) e avaliação da ação dos extratos brutos hidroetanólicos e respectivas frações de folhas verdes e secas de *I. paraguariensis* na redução da adipogênese e na atividade lipolítica em cultura de células 3T3-L1, visando a identificação do grupo de substâncias (fração) responsável pela atividade biológica ensaiada.

O presente trabalho foi estruturado em 3 capítulos:

Capítulo 1: Revisão bibliográfica de *Ilex paraguariensis*.

Capítulo 2: Análise fitoquímica e estudo da atividade antioxidante de *Ilex paraguariensis* através do método do 2,2 difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]).

Capítulo 3: Avaliação de *I. paraguariensis* na redução da adipogênese e na atividade lipolítica em cultura de células 3T3-L1.

REFERÊNCIAS:

AHIMA R.S.; FLIER J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11(8):327-332, 2000.

ARÇARI D.P.; BARTCHEWSKY W.; DOS SANTOS T.W.; OLIVEIRA K.; FUNCK A.; PEDRAZZOLI J.; DE SOUZA M.F.F.; SAAD M.J.; BASTOS D.H.M.; GAMBERO A.; CARVALHO P.O.; RIBEIRO M.L. Antiobesity Effects of yerba maté Extract (*Ilex paraguariensis*) in High-fat Diet-induced Obese Mice. *Obesity*. 17:2127-2133, 2009.

ARÇARI D.P.; BARTCHEWSKY W.; DOS SANTOS T.W.; OLIVEIRA K, OLIVEIRA C., GOTARDO E., PEDRAZZOLI J., GAMBERO A., FERRAZ L.F.C., CARVALHO P.O., RIBEIRO M.L. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity *Molecular and Cellular Endocrinology*. 335(2):110-115, 2011.

BAISCH A.L.M.; JOHNSTON F.L.; STEIN P. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 60:133-139, 1998.

BASTOS D.H.M.; OLIVEIRA D.M.; MATSUMOTO R.L.T.; CARVALHO P.O.; RIBEIRO M.L. Yerba Mate: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 1(1):37-46, 2007.

DONADUZZI C.M., CARDOZO J.R., DONADUZZI E.M., SILVA M.M., STURION J.A., CORREA G. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. ST.-HILL) cultivadas em três municípios do Paraná. *Arquivo de Ciências da Saúde Unipar*. 7(2):129-133, 2003.

ESMELINDRO M.C., TONIAZZO G., WANZUK A., DARIVA C., OLIVEIRA D. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 22(2):193-204, 2002.

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

FURUKAWA S., FUJITA T., SHIMABUKURO M., IWAKI M., YAMADA Y., NAKAJIMA Y., NAKAYAMA O., MAKISHIMA., SHIMOMURA I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*. 114:1752-1761, 2004.

GNOATTO S.; SUSPLUGAS S.; VECCHIA L.D.; FERREIRA T.B.; DASSONVILLE-KLIMPT A.; ZIMMER K.R.; DEMAILLY C.; DA NASCIMENTO S.; GUILLON J.; GRELLIER P.; VERLI H.; GOSMANN G.; SONNET P. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: Design, synthesis and biological evaluation of novel N-{3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl}-3-

O-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16: 771-782, 2008.

GORZALCZANY S.; FILIP R.; ALONSO M.R. Choloretic effect and intestinal propulsion of "mate" (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *Journal of Ethnopharmacology*. 75:291-294, 2001.

GUGLIUCCI A.; STAHL A.J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochemistry and Molecular Biology International*; 35:47-56, 1995.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decrease oxidability of human LDL *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2:338-344, 1996.

GUGLIUCCI A.; MENINI T. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. *Life Sciences*. 72:279-292, 2002.

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

LAFONTAN M., LANGIN D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research*. 48:275-297, 2009.

LANGIN D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacological Research*. 53:482-491, 2006.

LUNCEFORD N.; GUGLIUCCI A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia*. 76: 419-427, 2005.

MACCARI A.J., SANTOS A.P.R. Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. *MCT/CNPq/PADCT*, Curitiba, PR, 2000.

MIRANDA D.D.; ARÇARI D.M.; PEDRAZZOLI Jr J.; CARVALHO P.O.; CERUTTI S.M.; BASTOS D.H.M.; RIBEIRO M.L. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and repair in mice. *Mutagenesis*. 23:261-265, 2008.

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

REAVEN G.M. Syndrome X: 6 years later. *Journal of Internal Medicine*. 736:13-22, 1994.

RÖSSNER, S. Obesity: the disease of the twenty-first century. *International Journal of Obesity*. 26:S2-S4, Supplement 4, 2002.

RUCKER N.G.A. Análise do agronegócio da erva-mate Curitiba: SEAB/DERAL, 1996. 38p.

SANTOS I.S, MATIJASEVICH A., VALLE N.C.J. Mate drinking during pregnancy and risk of preterm and small for gestational age birth. *Journal of Nutrition*. 135:1120-1123, 2005.

SANTOS R., NUNES A., RIBEIRO J.C., SANTOS P., DUARTE J.A.R., MOTA J. Obesidade, síndrome metabólica e atividade física: estudo exploratório realizado com adultos de ambos os sexos, da Ilha de S. Miguel, Região Autónoma dos Açores, Portugal. *Revista Brasileira de Educação Física Especial*. 19(4):317-328, 2005.

SCHENKEL E.P., GOSMANN G., MONTANHA J.A., HEIZMANN B.M., ATHAYDE M. L., TAKETA A.T.C., PIRES V.S., GUILLAUME D. Saponins from maté (*Ilex paraguariensis*) and other South American *Ilex* species: Ten years research on *Ilex* saponins. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*. 49:359-363, 1997.

TAKETA A., BREITMAIER E., SCHENKEL E.P. Triterpenes and Triterpenoidal Glycosides from the Fruits of *Ilex paraguariensis* (Maté). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 15:205-211, 2004.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

1. Realizar a análise fitoquímica e determinar a quantificação de compostos fenólicos totais e de ácido ursólico dos extratos brutos hidroetanólicos de folhas verdes e secas de *I. paraguariensis*.
2. Avaliar a atividade antioxidante de *I. paraguariensis* através do ensaio espectrofotométrico com o radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]).
3. Verificar a ação dos extratos brutos hidroetanólicos de folhas verdes e secas de *I. paraguariensis* na redução da adipogênese e na lipólise em cultura de células 3T3-L1.

Objetivos específicos

1. Realizar análise fitoquímica através de cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos brutos hidroetanólicos das folhas verdes e secas (EBV, EBS) e de suas respectivas frações: saponinas (SV, SS), frações fenólicos (FV, FS), frações acetato de etila (AV, AS) e frações resíduo aquoso (RAV, RAS).
2. Realizar a quantificação de fenóis totais através dos métodos de precipitação com proteínas, equivalente de catequinas e pela análise em CLAE dos extratos brutos hidroetanólicos das folhas verdes e secas (EBV, EBS).
3. Realizar quantificação de ácido ursólico através de análise por CLAE dos extratos brutos hidroetanólicos das folhas verdes e secas (EBV, EBS).
4. Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos brutos hidroetanólicos das folhas verdes e secas (EBV, EBS) e de suas respectivas frações saponinas (SV, SS), frações fenólicos (FV, FS), frações acetato de etila (AV, AS), frações resíduo aquoso (RAV, RAS) e das substâncias de referência rutina e ácido clorogênico através do ensaio espectrofotométrico com o radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]).

5. Avaliar a ação *in vitro* na redução da adipogênese em cultura de células 3T3-L1 dos extratos brutos hidroetanólicos das folhas verdes e secas (EBV, EBS) e de suas respectivas frações saponinas (SV, SS), frações fenólicos (FV, FS), frações acetato de etila (AV, AS), frações resíduo aquoso (RAV, RAS) e das substâncias de referência rutina, matessaponina 4, ácido gálico, ácido caféico, ácido ursólico.
6. Avaliar a ação *in vitro* na lipólise em cultura de células 3T3-L1 dos extratos brutos hidroetanólicos das folhas verde e secas (EBV, EBS) e de suas respectivas frações saponinas (SV, SS), frações fenólicos (FV, FS), frações acetato de etila (AV, AS), frações resíduo aquoso (RAV, RAS) e das substâncias de referência rutina, matessaponina 4, ácido gálico, ácido caféico, ácido ursólico.
7. Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos e frações ativas na redução da adipogênese pelo método de redução do sal MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil)difenil tetrazólio).

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1: Revisão bibliográfica de *Ilex paraguariensis*.

1. ASPECTOS BOTÂNICOS:

A erva-mate recebeu o nome científico de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Figura 1) em 1822, pelo francês August de Saint-Hilaire (EDWIN & REITZ, 1967; www.mobot.org), cuja classificação botânica é:

- Divisão: Angiosperma
- Classe: Dicotiledônea
- Sub-classe: Archichlamydeae
- Família: *Aquifoliaceae*
- Gênero: *Ilex*
- Espécie: *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.



Figura 1: *Ilex paraguariensis* em área cultivada.

A *I. paraguariensis* é uma árvore perene que pode chegar a 15 metros de altura. É nativa da América do Sul e é encontrada no Brasil (principalmente nos estados do Sul), Argentina, Paraguai e Uruguai. É popularmente conhecida como erva-mate, mate, chá mate, entre outras denominações (EDWIN & REITZ, 1967; www.mobot.org).

A árvore de *I. paraguariensis* possui folhas com margens irregulares serreados-crenadas alternadas e simples, subcoriáceas até coriáceas de 5 a 8

cm de comprimento, com 3 a 4 cm de largura. Possuem inflorescências geralmente fasciculadas e axilares nas folhas. Florescem de setembro a dezembro e frutificam de dezembro a abril. (EDWIN & REITZ, 1967; CARVALHO, 1994; GIBERTI, 1994).

2. ASPECTOS QUÍMICOS:

A composição química das folhas de *I. paraguariensis* é muito complexa. Vários compostos químicos já foram identificados como saponinas (GOSMANN *et al.*, 1989; GOSMANN *et al.*, 1995), metilxantinas (FILIP *et al.*, 1998), taninos, compostos fenólicos (FILIP *et al.*, 2001), componentes minerais, entre outros (ALIKARIDIS, 1987; VALDUGA *et al.*, 1997).

A variação da composição química da erva-mate pode estar relacionada a alguns aspectos como o estágio evolutivo da planta, à época da colheita, às características climáticas, às condições do solo e do clima (VALDUGA *et al.*, 1997). As etapas do processamento industrial (ESMELINDRO *et al.*, 2002) e os métodos de extração utilizados (GNOATTO *et al.*, 2007), também, podem influenciar nos teores de compostos presentes na erva-mate.

2.1. Saponinas:

As saponinas são, em geral, caracterizadas por formar espuma persistente e abundante, por serem amargas e por possuírem alta solubilidade em água (SIMÕES *et al.*, 2007). Baseadas na aglicona, as saponinas podem ser classificadas como saponinas esteroidais, encontradas principalmente em monocotiledôneas, e saponinas triterpênicas, que são mais comuns em dicotiledôneas (SPARG *et al.*, 2004).

Possuem na sua estrutura cadeias hidrofílicas-hidrofóbicas (anfipáticas), que lhes confere uma ação detergente, emulsionante, formadora de micelas e a capacidade de reduzir a tensão superficial de uma solução aquosa formando espuma mediante agitação (GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ & MAZZA, 2007).

Quimicamente, as saponinas podem ser subdivididas em duas classes de compostos. Um esqueleto lipofílico que pode ser do tipo esteroidal (C 27) e/ou do tipo triterpênico (C 30), e uma porção hidrofílica que possui diferentes açúcares e /ou ácidos urônicos relacionados. As sapogeninas, que são obtidas

por hidrólise ácida, são extraídas com solventes orgânicos e são insolúveis em água (SIMÕES *et al.*, 2007).

As saponinas possuem elevada massa molecular (600 a 2000 g mol⁻¹), podem possuir cadeia linear ou ramificada, ocorrendo geralmente como misturas complexas devido à presença concomitante de estruturas com número variável de açúcares (SCHENKEL *et al.*, 2007).

Uma característica que permite diferenciar as saponinas de *I. paraguariensis* das outras espécies do gênero *Ilex*, é o fato de que as saponinas encontradas nas folhas de *I. paraguariensis* apresentam somente agliconas derivadas do ácido ursólico (Figura 2) e oleanólico (PIRES *et al.*, 1997).

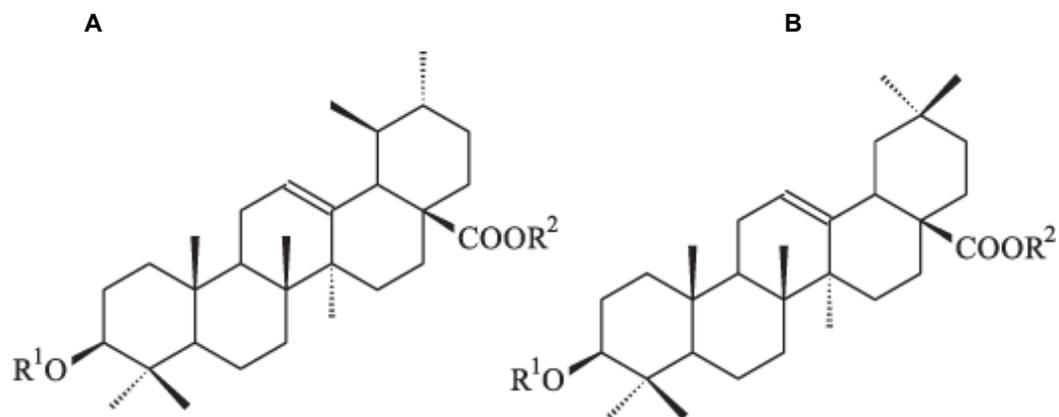


Figura 2: Estrutura química do ácido ursólico (A) e ácido oleanólico (B).

Para se extrair as saponinas de plantas, pode-se utilizar maceração, percolação ou extração exaustiva sob refluxo, utilizando-se soluções alcoólicas ou também misturas hidroalcoólicas, já que a solubilidade das saponinas em água permite preparar um extrato aquoso isento de lipídios e clorofila (SCHENKEL *et al.*, 2007). Após a eliminação do álcool, pode-se purificar as saponinas submetendo o extrato aquoso proveniente da eliminação do álcool a partição com solventes pouco polares, como diclorometano e clorofórmio, com o objetivo de retirar os compostos apolares. Em seguida, realiza-se outra partição com butanol visando a retirada de açúcares livres, aminoácidos e ácidos orgânicos, entre outros compostos hidrofílicos que tendem a

permanecer na fase aquosa. Com isso espera-se obter uma fração purificada de saponinas na fase butanólica (SIMÕES *et al.*, 2007).

Outros métodos de purificação incluem os métodos cromatográficos com gel de sílica ou géis de exclusão molecular e resinas sintéticas (SCHENKEL *et al.*, 2007).

A detecção de saponinas pode ser realizada através de testes qualitativos e/ou quantitativos, a partir de suas propriedades químicas e/ou físicas. Para isso utilizam-se ácidos minerais, aldeídos aromáticos ou sais de metais, que ao reagirem com as saponinas podem formar compostos corados, causarem diminuição da tensão superficial e/ou ação hemolítica (SIMÕES *et al.*, 2007).

Alguns métodos para quantificação de saponinas em *I. paraguariensis* foram desenvolvidos e validados nos últimos anos. GNOATTO e colaboradores (2005) utilizaram a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada ao detector de ultravioleta (UV) para a quantificar as saponinas presentes nas folhas de erva-mate. Para isso, as saponinas foram extraídas por decocção, hidrolisadas e então quantificadas por CLAE, sendo o resultado expresso em concentração de ácido ursólico.

Outro método validado foi o método desenvolvido por PAVEI e colaboradores (2007) para detecção e quantificação de saponinas dos frutos de erva-mate também utilizando CLAE.

Para o isolamento de uma saponina empregam-se diversos métodos cromatográficos, sendo este um processo bastante trabalhoso, considerando que estas são misturas complexas com variações nas agliconas e açúcares presentes. No que diz respeito à determinação estrutural são utilizados métodos espectrofotométricos, tais como espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (SCHENKEL *et al.*, 2007).

Em uma revisão, SPARG e colaboradores (2004) descrevem algumas das propriedades biológicas e farmacológicas descritas para saponinas. Entre elas, atividade hemolítica, molusquicida, antiinflamatória, antifúngica, antibacteriana, antimicrobiana, antiparasitária, citotóxica e antitumoral, antiviral entre outras.

2.2. Compostos fenólicos:

Compostos fenólicos ou também chamados de polifenóis são encontrados com frequência no reino vegetal e possivelmente desempenham diversos

papéis na fisiologia da planta. São substâncias que possuem estruturas químicas diversificadas, que podem ser simples ou complexas, onde são compostas por um grupamento aromático comum, possuindo número de grupamento hidroxila variável (DONADUZZI *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2007).

Na erva-mate encontram-se diversos polifenóis como os flavonóides rutina (Figura 3) e quercetina e os derivados cafeoilquínicos como o ácido clorogênico (Figura 4) (FILIP *et al.*, 2001).

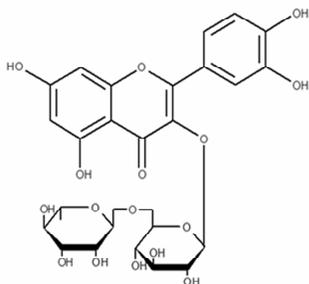


Figura 3: Estrutura química da rutina.

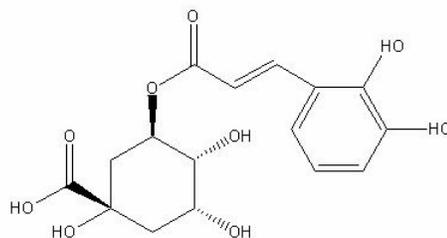


Figura 4: Estrutura química do ácido clorogênico

Os compostos fenólicos são encontrados em maior parte na natureza sob a forma de ésteres ou de heterosídeos. Nas plantas, os compostos fenólicos estão relacionados às funções alelopáticas, protegendo-as da radiação UV, protegendo contra insetos, herbívoros e patógenos (DONADUZZI *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2007).

Diversos processos metabólicos essenciais à planta são influenciados pelos polifenóis, tais como o crescimento vegetal, germinação das sementes entre outros. DONADUZZI e colaboradores (2003) avaliaram amostras de erva-mate cultivadas em diferentes localidades do Paraná, observando diferenças significativas nos teores de polifenóis totais de cada local. Com isso, acredita-se que devido às variáveis ambientais possa ocorrer variação na concentração desses compostos.

Os polifenóis são compostos que além de influenciarem na qualidade sensorial dos alimentos de origem vegetal, como sabor, odor, cor e estabilidade oxidativa, também têm importantes papéis nos processos de morfogênese

(floração e frutificação, por exemplo) e na defesa da planta (CANSIAN *et al.* 2008).

Para extrair os polifenóis de plantas pode-se preparar um extrato etanólico com o material fresco ou seco. Para visualização dos compostos fenólicos pode-se fazer uma CCD e visualizar em luz UV e exposição a vapores de amônia ou ainda através de reagentes cromogênicos (CARVALHO *et al.*, 2007).

Na separação e identificação de diversos polifenóis utiliza-se a cromatografia bidimensional em papel/celulose ou em gel de sílica, sendo associada a outros elementos como valor de R_f, coloração da fluorescência sob luz UV e coloração com reagentes químicos. Pode-se realizar a identificação desses compostos comparando-os com as características de amostras autênticas (HARBORNE, 1984; HARBORNE, 1989).

A CLAE em fase reversa utilizando como eluentes misturas de água, acetonitrila ou álcoois em soluções ácidas para evitar ionização também é utilizada para a separação e identificação de compostos fenólicos. Através de métodos espectroscópicos, utilizando soluções etanólicas antes e após alcalinização, observando deslocamentos característicos no espectro no ultravioleta, pode-se confirmar a identificação desses compostos. Os polifenóis podem ser definidos em diferentes classes, como ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, antocianinas, cumarinas e antraquinonas (HARBORNE, 1984; HARBORNE, 1989; CARVALHO *et al.*, 2007).

Os flavonóides estão entre os compostos naturais mais disseminados nas plantas e são os mais importantes polifenóis da dieta humana. São considerados substâncias antioxidantes, pois atuam como agentes redutores. Juntamente com outras substâncias antioxidantes como vitamina E, vitamina C e carotenóides atuam como protetores contra o estresse oxidativo. Devido a estas atividades, os polifenóis estão associados a prevenção de doenças cardiovasculares e inflamatórias, a prevenção do câncer e a inibição da oxidação do colesterol proveniente da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (FILIP *et al.*, 2000).

FILIP e colaboradores (2000) relataram que a *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. apresentou maior atividade antioxidante quando comparada a outras espécies do gênero *Ilex*, tais como a *Ilex. theezans* Mart. ex Reissek, *Ilex*.

dumosa Reissek, *Ilex argentina* Lillo, *Ilex breviscuspis* Reissek, e *Ilex pseudobuxus* Reissek.

2.3. Xantinas

As xantinas ou também conhecidas como metilxantinas são substâncias orgânicas de origem vegetal que contem uma função amina. Pertencem a uma classe de alcalóides purínicos encontrados em diversas plantas, entre elas a erva-mate. Possuem caráter anfótero, dependendo do pH comportam-se como ácidos ou bases (RATES *et al.*, 2007).

A solubilidade das xantinas aumenta em solventes orgânicos clorados, em soluções alcalinas, em soluções aquosas ácidas a quente, em etanol a quente, sendo que em águas são parcialmente solúveis. A temperatura de sublimação, a faixa de fusão e a solubilidade são características que podem ser utilizados para diferenciar a cafeína, a teobromina e a teofilina (SIMÕES *et al.*, 2007).

Como as metilxantinas são bases muito fracas e seus sais dissociam-se muito facilmente em água, para serem extraídas devem-se utilizar solventes clorados em meio amoniacal ou também com solventes clorados diretamente de suas soluções aquosas ácidas. Também podem ser extraídas pelos métodos de sublimação e de extração com fluído supercrítico, enquanto que o método clássico para extração de alcalóides permite a obtenção de maior grau de pureza (RATES *et al.*, 2007).

Para a caracterização utiliza-se geralmente CCD com gel de sílica GF₂₅₄ impregnada com vapores de amônia e como sistema eluente clorofórmio ou diclorometano e etanol ou metanol até 5%. São empregados reveladores a base de iodo em meio ácido (RATES *et al.*, 2007).

Os métodos de doseamento empregados são espectrofotometria no UV, métodos cromatográficos como CLAE, gravimetria e iodometria (RATES *et al.*, 2007).

Devido ao seu alto conteúdo de compostos purínicos, atribui-se a erva-mate os efeitos biológicos de depurativo, diurético e estimulante, podendo ser uma fonte primária de metilxantinas na dieta (RATES *et al.*, 2007).

Entre as xantinas encontradas na erva-mate, podemos citar a teofilina (1,3 dimetilxantina), teobromina (3,7 dimetilxantina) e cafeína (1,3,7-trimetilxantina) (Figura 5). Dessas, a cafeína é encontrada em maior concentração, seguida

pela teobromina, sendo que as folhas possuem maior concentração desses compostos. A teofilina, que é um isômero da teobromina, aparece em pequenas quantidades (HECK & MEJIA, 2007).

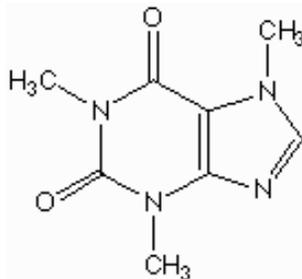


Figura 5: Estrutura química da cafeína

I. paraguariensis tem maiores quantidades de cafeína e teobromina em relação a outras variedades (FILIP *et al.*, 1998). Com isso podem-se identificar adulterações na erva-mate, utilizando-se o teor de cafeína como auxiliar na caracterização (REGINATTO *et al.*, 1999)

Acredita-se que as xantinas sejam os estimulantes mais antigos da história humana, sendo a cafeína um dos mais potentes (BRENELLI, 2003). Entre os efeitos físicos descritos pela cafeína podemos citar a insônia, irritabilidade, náuseas e ansiedade (ALTIMARI *et al.*, 2001).

3. ASPECTOS BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS:

A erva-mate é utilizada como estimulante, ativador da circulação e também para o tratamento da hiperlipidemia. Quando consumida na forma de chá ou chimarrão, pode ser uma provável fonte de vitaminas e minerais (ALIKARIDIS, 1987).

Uma correlação linear entre o conteúdo de substâncias bioativas e de sólidos solúveis foi encontrada por BASTOS e colaboradores (2006), os quais atribuíram a indicação de que a erva-mate é uma importante fonte de compostos fenólicos, podendo proteger os sistemas biológicos contra processos oxidativos.

A espécie *I. paraguariensis* tem sido utilizada na medicina popular para fadiga, digestão lenta e doenças hepáticas (BASTOS *et al.*, 2007). As folhas da

erva-mate são utilizadas na forma de chimarrão, tererê, mate solúvel e chá mate.

Alguns autores estudaram a relação entre o chimarrão e o câncer de esôfago. FAGUNDES e colaboradores (2006) relataram que essa associação está relacionada a contaminantes produzidos no processo de beneficiamento, como o benzopireno, e não somente a lesões causadas pela água quente. O benzopireno também foi associado ao câncer de esôfago relacionado ao fumo.

Por outro lado, DE MEJIA e colaboradores (2005) demonstraram que extratos de *I. paraguariensis* inibiram em 50% o crescimento de células de linhagens pré-malignas, sugerindo que compostos da erva-mate podem inibir a proliferação de células que causam câncer bucal.

3.1 Atividade antioxidante:

Para SIES e STAHL (1995), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada a do substrato oxidável, retarda ou evita a oxidação desse substrato de maneira efetiva.

Uma vez que os componentes celulares do corpo humano não estão totalmente protegidos por antioxidantes endógenos, compostos funcionais quando presentes em um alimento, de forma equilibrada podem contribuir para uma menor incidência de doenças crônicas como câncer, arteriosclerose e diabetes, principalmente devido aos efeitos antioxidantes (FILIP *et al.*, 2000).

Vários autores pesquisaram a atividade antioxidante e quimioprotetora de extratos a base de erva-mate. Esta é rica em compostos bioativos, entre eles os polifenóis, flavonóides e catequinas, que são absorvidos pelo organismo e podem atuar como antioxidantes ou como anti-radicais livres (FILIP *et al.*, 2000).

Dentre as espécies de *Ilex*, *I. paraguariensis* foi a que demonstrou a maior atividade antioxidante. O consumo de bebidas a base de erva-mate contribui para a ingestão de antioxidantes em geral e tem sido correlacionada positivamente com a concentração de derivados cafeoilquínicos, que possuem efeitos benéficos para a saúde humana (FILIP *et al.*, 2000; BRAVO *et al.*, 2007).

O extrato de erva-mate tem sido considerado um inibidor potente do estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente no fígado e coração (SCHINELLA *et al.*, 2005).

Já foi demonstrado que extratos de *I. paraguariensis* causaram uma diminuição na oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana, tanto *in vitro* (GUGLIUCCI & STAHL, 1995) como *in vivo* (GUGLIUCCI, 1996). É possível que a erva-mate possa proporcionar uma quantidade importante de antioxidantes para o corpo através do fornecimento de derivados caféicos e outros polifenóis (FILIP *et al.*, 2000).

BRACESCO e colaboradores (2003) evidenciaram em estudos *in vitro* que *I. paraguariensis* possui a capacidade de inibir a propagação da oxidação do LDL através da inibição da peroxidação de lipídios, bem como a oxidação do DNA. Em comparação com a rutina e quercetina, o ácido clorogênico é o composto que tem maior atividade antioxidante (FILIP *et al.*, 2001).

3.2 Atividade na obesidade:

A obesidade é uma preocupação crescente a cada dia em muitos países desenvolvidos e segundo ROSSNER (2002) está sendo considerada uma epidemia do século XXI. Neste intuito, muitas pesquisas estão sendo direcionadas para encontrar uma alternativa de diminuir avanço e os danos causados pela obesidade (HECK & MEJIA, 2007).

O estilo de vida sedentário e uma dieta hipercalórica que caracterizam a sociedade dos países ocidentais parecem ser os fatores mais importantes no desenvolvimento da obesidade. Comorbidades associadas à obesidade são graves, tanto em termos psicossocial (por exemplo, o estigma social, distúrbios emocionais), como o ponto de vista biológico, em que vários problemas metabólicos podem ocorrer (SANTOS *et al.*, 2005).

A síndrome metabólica (SM) é uma dessas co-morbidades. Isso é descrito como um conjunto de anormalidades metabólicas e hemodinâmicas, frequentemente presentes em indivíduos obesos (REAVEN, 1994).

ARÇARI e colaboradores (2009) relataram que o extrato de erva-mate demonstrou uma atividade antiobesidade em ratos que após submetidos a dieta hiperlipídica receberam extrato aquoso (chá-mate) de *I. paraguariensis* por 8 semanas, além de observar que o tratamento com erva-mate teve um

efeito modulador na expressão de vários genes relacionados com o processo de obesidade.

REFERÊNCIAS:

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

ALTIMARI L.R.; CYRINO E.S.; ZUCAS S.M.; OKANO A.H. Cafeína: ergogênico nutricional no esporte. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*. Brasília, 9:57-64, 2001.

ARÇARI D.P.; BARTCHEWSKY W.; DOS SANTOS T.W.; OLIVEIRA K.; FUNCK A.; PEDRAZZOLI J.; DE SOUZA M.F.F.; SAAD M.J.; BASTOS D.H.M.; GAMBERO A.; CARVALHO P.O.; RIBEIRO M.L. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity*. 17:2127-2133, 2009.

BASTOS D.H.M.; FORNARI A.C.; QUEIROZ Y.S.; TORRES E.A.F.S. Bioactives compounds content of chimarrão infusions related of the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49:399-404, 2006.

BASTOS D.H.M.; OLIVEIRA D.M.; MATSUMOTO R.L.T.; CARVALHO P.O.; RIBEIRO M.L. Yerba Mate: pharmacological properties, research and biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 1(1):37-46, 2007.

BRACESCO N., DELL M., ROCHA A., BEHTASH S., MENINI T., GUGLIUCCU A., NUNES E. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 9(3):379–388, 2003.

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

BRENELLI E.C.S. A extração de cafeína em bebidas estimulantes: uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. *Química Nova*, 26:136-138, 2003.

CANSIAN R.L.; MOSSI A.J.; MAZUTTI M.; OLIVEIRA J.V.; PAROUL N.; DARIVA C.; ECHEVERRIGARAY S. Semi-volatile compounds variation among Brazilian populations of *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51:175–181, 2008.

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

CARVALHO J.C.T.; GOSMANN G.; SCHENKEL E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES C.A.M.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G.; MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 1102 p, 2007.

DE MEJIA E.G., SONG Y.S., RAMIREZ-MARES M.V., KOBAYASHI H. Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea on Topoisomerase Inhibition and Oral Carcinoma Cell Proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:1966-1973, 2005.

DONADUZZI C.M.; CARDOSO JUNIOR E.L.; DONADUZZI E.M.; DA SILVA M.M.; STURION, J.A.; CORREA G. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênies de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) cultivadas em três municípios do Paraná. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*. 7(2):129-134, 2003.

EDWIN G.; REITZ P.R. Aquifoliaceae In: Reitz, P.R., ed. *Flora Ilustrada Catarinense*, Parte I. Fasc. Herbário Barbosa Rodrigues/CNPq; Itajaí, 1967. p. 27-34.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas. 22(2):193-204, 2002.

FAGUNDES R.B., ABNET C.C., STRICKLAND P.T., KAMANGAR F., ROTH M.J., TAYLOR P.R., DAWSEY S.M. Higher urine 1-hydroxy pyrene glucuronide (1-OHPG) is associated with tobacco smoke exposure and drinking mate in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. *BMC Cancer*. 6:139-145, 2006.

FILIP R.; LOPEZ P.; COUSSIO J.; FERRARO G. Mate substitutes or adulterants: study of xanthine content. *Phytotherapy Research*. 12:129-131, 1998.

FILIP R.; LOTITO S.B.; FERRARO G.; FRAGA, C. G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*. 20:1437–1446, 2000.

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

GIBERTI, G.C. Aquifoliaceae. In: R. Spichiger & L. Ramella (eds.). *Flora del Paraguay*. v.24, Saint-Louis, Editions des la Ville de Genève, Chambèsy; Missouri Botanical Garden. Pg.1-34. 1994

GNOATTO S.C.B.; SCHENKEL E.P.; BASSANI V.L. HPLC Method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 16(4):723-726. 2005.

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

GOSMANN G.; SCHENKEL E.P., SELIGMANN O. A new saponin from mate, *Ilex paraguariensis*. *Journal of Natural Products*, 52(6):1367-1370, 1989.

GOSMANN G.; GUILLAUME D.; TAKETA A.T.C.; SCHENKEL E.P. Triterpenoids saponins from *I. paraguariensis*. *Journal of Natural Products*, 58(3):438-441, 1995.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö.; MAZZA, G. Saponins: properties, applications and processing. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 47(3), 2007.

GUGLIUCCI A.; STAHL A.J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 35:47-56, 1995.

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

HARBORNE J.B. Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis. London Chapman and Hall, 288 pg. 1984.

HARBORNE J.B. Methods in plant biochemistry. Plant phenolics. London: Academic, v.1, 1989.

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

PAVEI C.; GUZATTO P.; PETROVICK P.; GOSMANN G.; GONZALEZ-ORTEGA G. Development and validation of an HPLC method for the characterization and assay of the saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hill (Mate) fruits. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 30:87-95. 2007.

PIRES V.S.; GUILLAUME D.; GOSMANN G.; SCHENKEL E.P. Saponins from *Ilex dumosa*, an Erva-maté (*Ilex paraguariensis*) adulterating plant. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45:1027-1031. 1997.

REAVEN G.M. Syndrome X: 6 years later. *Journal of Internal Medicine*. 736:13-22, 1994.

REGINATTO F.H.; ATHAYDE M.L.; GOSMANN G.; SCHENKEL E.P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species – Caffeine and theobromine in erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*.10:443–446, 1999.

RÖSSNER S. Obesity: the disease of the twenty–first century. *International Journal of Obesity*, London. 26:S2-S4, Supplement 4, 2002.

SANTOS R.; NUNES A.; RIBEIRO J.C.; SANTOS P.; DUARTE J.A.R.; MOTA J. Obesidade, síndrome metabólica e atividade física: estudo exploratório realizado com adultos de ambos os sexos, da Ilha de S. Miguel, Região Autónoma dos Açores, Portugal *Revista Brasileira de Educação Física Especial*, São Paulo. 19(4):317-328, 2005.

SCHENKEL E.P.; GOSMANN G.; ATHAYDE M.L. Saponinas. In: SIMÕES C.A.M.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G.; MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 1102 p, 2007.

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

SIES H.; STAHL W. Vitamins E, beta-caroteno and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*. 62:1215S-1321S, 1995.

SIMÕES C.A.M.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G.; MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 1102 p, 2007.

SPARG S.G.; LIGHAT M.E.; VAN STADEN J. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. 94(2-3):219-243, 2004.

RATES S.M.K. Metilxantinas. In: SIMÕES C.A.M.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G.; MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 1102 p, 2007.

VALDUGA E.; FREITAS R.J.S.; REISMANN C.B.; NAKASHIMA T. Caracterização química da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) e de outras espécies utilizadas na adulteração do mate. *Boletim do CEPPA*, Curitiba. 15(1):25-36, 1997.

www.mobot.org. acessado em 18.11.2010.

CAPÍTULO 2

Capítulo 2 e 3: Os resultados serão divulgados através de publicação em revista indexada.