

**DOUGLAS PRADO MARCOS**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL  
DOS EXTRATOS BRUTO E SUPERCRÍTICO DA *Ilex*  
*paraguariensis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas - Modalidade a Distância, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Rozangela Curi Pedrosa

FLORIANOPOLIS

2013

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

Marcos, Douglas Prado

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
ANTITUMORAL DOS EXTRATOS BRUTO E SUPERCRÍTICO  
DA *Ilex paraguariensis* /  
Douglas Prado Marcos ; orientadora, Rozangela  
Curi Pedrosa - Florianópolis, SC, 2013.  
63 p.

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

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Atividade  
antioxidante. 3. *Ilex paraguariensis*. 4. erva-  
mate. 5. benefícios erva-mate. I. Curi  
Pedrosa, Rozangela. II. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Graduação em Ciências  
Biológicas. III. Título.

## **DOUGLAS PRADO MARCOS**

Estudo da atividade antioxidante e antitumoral dos extratos bruto e supercrítico da *Ilex paraguariensis*

Este trabalho foi julgado e aprovado em sua forma final pelos membros da banca examinadora, como pré-requisito parcial para a obtenção de grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Florianópolis, 20 de junho de 2013.

---

Profa. Dra. Maria Marcia Imenes Ishida  
(Coordenadora do Curso)

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rozangela Curi Pedrosa.  
(Orientadora)

---

Doutoranda Valdelúcia M.A.S. Grinevicius (UFSC)

---

Doutoranda Fabiana Ourique (UFSC)



Dedico este trabalho à minha querida esposa, pelo apoio e dedicação.



## AGRADECIMENTOS

À todas as pessoas que me ajudaram na elaboração do presente trabalho, aos professores, equipes de pesquisa, aos meus amigos da turma do polo de Canoinhas.

Agradeço por ter a oportunidade de conhecer pessoas que me ensinaram, tiveram paciência e dedicação, e que almejam os mesmos sonhos de fazer um mundo melhor ajudando sempre com o que é possível.

Agradeço à minha família que tanto me ajuda a cada dia a vencer obstáculos que surgem em minha vida, em especial minha esposa Flaviana, que sempre me auxilia, a meus pais Fernando e Dircéia e meu irmão Guilherme, que me deram a oportunidade de continuar estudando e me dedicando, à família de minha esposa, Wilmar, Alba e Flamarion, que me apoiaram em momentos difíceis deste trabalho.

As pessoas que trabalham no polo de apoio presencial de Canoinhas, a coordenadora Sonia, a Simone Rodrigues, Simone Wendt, Tatiana, Rosicler, ao João, enfim a todos que auxiliaram em nossa longa jornada do curso.

À professora Rozangela Curi Pedrosa pelas orientações e disponibilidade de transmitir seus conhecimentos, pela prontidão em responder meus questionamentos.

Ao professor Jacir Dal Magro da Unochapecó, Jaqueline, Fernanda, Melanie, que com sua esforçada equipe auxiliou na extração dos compostos da erva mate.

Ao especialista Dorli Mario Dacroce da EPAGRI de Chapecó, pelo apoio de campo.

À equipe de pesquisa da professora Rozangela, Valdelúcia, Fabiana, João Francisco, Maicon, Karina, Eduardo, em especial a Nádia que me auxiliou nos experimentos no laboratório LABIOEX, na UFSC.

Aos amigos Elizandra, Anderson e Melizza, que me apoiaram em vários momentos que levaram ao término deste trabalho.

E a todos que fazem parte da história do curso de Ciências Biológicas na modalidade à distância da Universidade Federal de Santa Catarina.





## RESUMO

A utilização de plantas medicinais tem se difundido pelo mundo como alternativa para tratamentos médicos na prevenção de doenças. Dentre os produtos utilizados temos a espécie *Ilex paraguariensis* que é uma planta nativa utilizada para vários fins, como para a produção de chá-mate e chimarrão, que estão inseridos no mercado de produtos naturais e possui vários usos terapêuticos na medicina popular. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as propriedades antitumoral e antioxidante dos extratos bruto e supercrítico das folhas de *Ilex paraguariensis*, em modelos *in vitro*. Inicialmente foram coletadas e preparadas as folhas para a extração supercrítica (ESC) e obtenção do extrato bruto. Para avaliação da atividade antitumoral foi realizado o ensaio do sal de 3-(4,5-dimetil -2-tiazol)2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT) sobre células tumorais MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e para atividade antioxidante *in vitro* os ensaios 2,2-difenil-2-picril hidrazil (DPPH<sup>•</sup>) e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Os resultados obtidos demonstraram que tanto o extrato bruto quanto ESC não apresentaram citotoxicidade significativa (CI<sub>50</sub> superior a 1000 µg/mL). Entretanto obtiveram-se resultados importantes com relação às atividades antioxidantes, pois confirmam dados da literatura, os extratos estudados apresentaram atividade antioxidante importante tanto no ensaio de DPPH quanto de ERO. Os resultados demonstraram que quanto maior a concentração dos extratos (bruto e ESC), maior a atividade antioxidante. Portanto, os resultados obtidos nos permitem concluir que os extratos testados não apresentaram atividade antitumoral no modelo utilizado, mas tiveram importante atividade antioxidante mesmo em concentrações relativamente baixas dos extratos testados (1µg/mL).

**Palavras chave:** *Ilex paraguariensis*, extrato supercrítico, atividade antitumoral, atividade antioxidante, ERO, DPPH.



## ABSTRACT

The use of medicinal plants has spread around the world as an alternative to medical treatments for disease prevention and highlighting among medicinal plants can be point out *Ilex paraguariensis* for multiple purposes such as for the production of tea-mate. That is inserted in the natural products market and has various therapeutic uses in folk medicine. The aim of this study was to evaluate the antitumor and antioxidant properties of supercritical and crude extracts from the leaves of *Ilex paraguariensis*, observed through *in vitro* models. The leaves were initially collected and prepared to the supercritical extraction (ESC) and ethanolic crude extract. To evaluation the antitumor activity was used the 3-salt (4.5-dimethyl-2-thiazole ring) 2.5-diphenyl tetrazólio bromide (MTT) and tumor cells line MCF-7 (breast tumor) also to test antioxidant activity (radical scavenging activity) against 2.2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and generation of reactive oxygen species (ROS). The obtained results demonstrated that both the crude and ESC extract showed no significant cytotoxicity ( $IC_{50}$  up 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). However we obtained important results regarding to antioxidant activities where the studied extracts showed significant antioxidant activity both in DPPH and ERO test and these results confirm the literature data. Besides, the results showed that the higher the concentration of extracts (crude and ESC) the higher the antioxidant activity. Therefore, obtained data allows us to conclude that the extracts tested did not show antitumor activity in model used but have important antioxidant activity even at relatively low concentrations (1  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Keywords:** supercritical extract, *Ilex paraguariensis*, antitumor activity, antioxidant activity, ROS, DPPH.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Erva mate in situ, remanescente de Floresta Estacional Decidual da região, em transição com a Floresta Ombrófila Mista situada em Chapecó - Santa Catarina (APREMAVI, 2013).....	23
Figura 2: Folhas in natura à esquerda e desidratadas (secas)à direita, remanescente de Floresta Decidual da região, em transição com a Floresta Ombrófila Mista situada em Chapecó - Santa Catarina (APREMAVI, 2013). .....	24
Figura 3: Estrutura química da cafeína e da teobromina .....	31
Figura 4: Estruturas químicas dos flavonoides quercetina e rutina .....	32
Figura 5: Regiões estruturais dos flavonoides com atividade de sequestro de radicais livres.....	32
Figura 6: Diagrama esquemático do equipamento de Extração Supercrítica.....	34
Figura 7: Equipamento utilizado na Extração Supercrítica .....	44
Figura 8: Poços na placa multiwell, 1, 10, 100 e 1000 µg/ml de ESC ...	47
Figura 9: Reações de oxidação que levam a formação de composto fluorescente (DCF).....	51
Figura 10: Efeito citotóxico dos extratos EB e ESC de <i>Ilex paraguariensis</i> nas diferentes concentrações testadas (0-1000 µg/mL para EB e ESC) (24 h de incubação) sobre a viabilidade das células MCF-7. (a) representa diferença estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle negativo (CN) .....	57
Figura 11: Efeito citotóxico dos extratos EB e ESC de <i>Ilex paraguariensis</i> nas diferentes concentrações testadas (0-1000 µg/mL para EB e ESC) (48 h de incubação) sobre a viabilidade das células MCF-7. (a) representa diferença estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle negativo (CN).....	57

Figura 12: Efeito citotóxico dos extratos EB e ESC de <i>Ilex paraguariensis</i> nas diferentes concentrações testadas (0-1000 µg/mL para EB e ESC) (72 h de incubação) sobre a viabilidade das células MCF-7. (a) representa diferença estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle negativo (CN) .....	58
Figura 13: Atividade antioxidante in vitro de <i>Ilex paraguariensis</i> medido pelo método de DPPH.....	60
Figura 14: Inibição da geração de ERO em células MCF-7 pelo tratamento com concentrações crescentes de ESC da <i>Ilex paraguariensis</i> durante 3 hs .....	61
Figura 15: Inibição da geração de ERO em células MCF-7 pelo tratamento com concentrações crescentes de extrato bruto da <i>Ilex paraguariensis</i> durante 3 hs .....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos sobre os efeitos biológicos de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) .....	27
Tabela 2: Exemplos de radicais livres .....	38
Tabela 3: Distribuição das concentrações dos extratos testados em placa multipoços, concentrações estabelecidas com base em Kwiecinski et al. (2007) para a avaliação da citotoxicidade in vitro.....	47
Tabela 4: Concentrações e volumes dos extratos e dos reagentes utilizados na determinação da atividade antioxidante in vitro através do radical DPPH• .....	49
Tabela 5: Rendimento do extrato bruto obtido no rotaevaporador .....	53
Tabela 6: Parâmetros médios empregados na operação do equipamento de extração supercrítica para efetuar a ESC de folhas desidratadas e fragmentadas de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	53
Tabela 7: Rendimento da extração supercrítica obtida em pressão de 250 bar a 40°C.....	54





## LISTA DE ABREVIATURAS

CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EB	Extrato Bruto
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESC	Extração Supercrítica
EtOH	Extrato etanólico
HBSS	Solução tampão de Hank
INCA	Instituto Nacional do Câncer.
LABIOEX	Laboratório de Bioquímica Experimental
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão salina)
RL	Radicais Livres
RNA	Ácido ribonucléico
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Ultravioleta.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
2.1	Caracterização botânica da <i>Ilex paraguariensis</i> .....	23
2.2	Uso popular e estudos farmacológicos da <i>Ilex paraguariensis</i> .	25
2.3	Estudos fitoquímicos da <i>Ilex paraguariensis</i> .....	31
2.4	Extração supercrítica .....	33
2.5	Câncer .....	35
2.6	Atividade antioxidante .....	36
2.6.1	Radicais livres .....	37
2.6.2	Estresse oxidativo .....	38
2.6.3	Antioxidantes e defesas antioxidantes .....	38
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
3.1	Objetivo geral .....	41
3.2	Objetivos Específicos: .....	41
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>43</b>
4.1	Coleta, caracterização e identificação da planta .....	43
4.2	Preparação do extrato bruto .....	43
4.3	Preparação do extrato supercrítico.....	44
4.4	Cultura das Células MCF-7.....	46
4.5	Avaliação do efeito citotóxico .....	46
4.6	Determinação do radical DPPH' (2,2-difenil-2-picril hidrazil) .	48
4.7	Determinação do conteúdo intracelular de ERO .....	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
5.1	Extração Supercrítica.....	53
5.2	Efeito citotóxico dos extratos bruto e supercrítico da <i>Ilex paraguariensis</i> .....	55
5.3	Efeito antioxidante dos extratos bruto e supercrítico da <i>Ilex paraguariensis</i> .....	59
5.3.1	Conteúdo intracelular de ERO .....	60
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos de origem natural, particularmente de plantas medicinais, vem sendo difundida no Brasil e no mundo, pelo fato de indicarem tratamentos alternativos para enfermidades que afetam a saúde humana, entre eles, certos tipos de câncer.

Neste contexto se insere a *Ilex paraguariensis*, conhecida popularmente como erva-mate, que apresenta potencial protetor à saúde devido principalmente à sua atividade antioxidante, entre outras, conforme demonstrado em diversos estudos. Segundo Souza (2009), a alta concentração de compostos bioativos, como as saponinas, os compostos fenólicos e as metilxantinas respondem, em conjunto, pela atividade biológica dos extratos desta espécie.

Várias denominações são conhecidas para a *Ilex paraguariensis* como, erva-mate, mate hierba, mate, té del Paraguay, Kaha e erva mate para chimarrão (BRACESCO et al., 2010).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta medicinal tradicional da região sul do país, muito utilizada no cotidiano na forma de chimarrão, que é uma infusão com água quente. O consumo do chimarrão de uma maneira bem particular pela população local assume um papel socioeconômico importante, uma vez que, este é a principal forma de consumo da planta no Brasil sendo responsável pela sustentabilidade do setor ervateiro no país (BARLETTE, 2011).

Esse hábito por vezes chamou a atenção de alguns pesquisadores que passaram a avaliar os efeitos do consumo do chimarrão na saúde da população. Observou-se que, em certos casos, pode causar enfermidades no sistema digestivo. Tendo sido implicado como possível causa de câncer do trato digestivo em pessoas na América do Sul, onde elevadas taxas de incidência desta doença são observadas numa área que inclui o sul do Brasil, Uruguai e nordeste da Argentina (JOTZ et al., 2010).

Entretanto, algumas pesquisas demonstraram que o método de utilização da planta é que estaria provocando as enfermidades como, por exemplo, água muito quente que fere as mucosas do esôfago. Por outro lado, as propriedades químicas desta planta foram gradativamente sendo avaliadas e têm sido constatadas possíveis propriedades antitumorais além de muitas outras, que ainda podem ser mais bem investigadas (BARLETTE, 2011; FAGUNDES et al., 2006).

Alguns autores estudaram a relação entre o chimarrão e o câncer de esôfago, tendo sido demonstrado que essa associação está relacionada a contaminantes produzidos no processo de beneficiamento na exposição

ao calor e fumaça, como o benzopireno, e não somente as lesões causadas pela água quente (FAGUNDES, et al., 2006).

Assim, alguns estudos realizados avaliaram as enfermidades causadas pelo chimarrão, e também relacionaram como sendo benéficas algumas das propriedades terapêuticas de seus componentes químicos. No entanto, a maioria dos estudos não é conclusiva deixando uma lacuna no desenvolvimento de estudos científicos da planta. Neste sentido o presente trabalho justifica-se como mais um passo no avanço das pesquisas sobre os efeitos biológicos da *Ilex paraguariensis* e possíveis mecanismos de ação envolvidos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DA *Ilex paraguariensis*

Por volta de 1820, o naturalista francês Auguste Saint Hilaire desembarcou em terras brasileiras e, com base em exemplares coletados em Curitiba, fez a classificação botânica da planta, registrada junto à Academia de Ciências do Instituto da França como *Ilex paraguariensis* (COSTA, 1995; GIRARDI, 2010).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil), espécie arbórea, é uma angiosperma pertencente à família das Aquifoliáceas, que pode apresentar altura de até 15 m, dependendo da idade, mas geralmente não ultrapassa 7 m em decorrência das podas constantes. Possui um caule de cor acinzentada com diâmetro entre 20 e 25 cm, podendo chegar a 50 cm (PRUDÊNCIO, 2011).



**Figura 1:** Erva mate *in situ*, remanescente de Floresta Estacional Decidual da região, em transição com a Floresta Ombrófila Mista situada em Chapecó - Santa Catarina (APREMAVI, 2013).

Fonte: Autor

As folhas são simples, alternadas, geralmente estipuladas, subcoriáceas até coriáceas, glabras verde-escuras na superfície adaxial e mais claras na superfície abaxial, mostram-se estreitas na base e ligeiramente obtusas no vértice, medindo em torno de 5 a 10 cm de comprimento por 3 a 4 cm de largura; margem irregular serrilhada ou dentada no terço da base geralmente lisa; nervuras laterais pouco impressas na superfície adaxial e salientes na superfície abaxial; o

pecíolo é glabro, algumas vezes pubescente, relativamente curto, medindo 7 a 15 mm de comprimento (BRAGAGNOLO, 1980; MAZUCHOWSKI, 1991). As folhas podem apresentar variações no tamanho do pecíolo tanto no comprimento (9 a 16 mm) quanto no diâmetro (0,8 a 1,5 mm) (MATTOS, 1985).

Em relação ao comportamento das flores, pode-se considerar a erva-mate como planta dióica, onde nas plantas femininas encontram-se estames não funcionais e, nas plantas masculinas, o pistilo se deprime e aborta. O florescimento ocorre entre os meses de setembro e dezembro e a frutificação no período de janeiro a março, tendo um período produtivo entre 6 e 30 anos. A polinização da erva-mate é basicamente entomófila, embora alguma transferência de pólen pelo vento não deva ser descartada (FERREIRA et al., 1983).

No Brasil a *Ilex paraguariensis* ocorre principalmente nos estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, e nos estados do sul do país, na Floresta Ombrófila Mista (400-800 m de altitude), onde é particularmente frequente. A árvore é ornamental e pode ser empregada no paisagismo. Seus frutos são avidamente consumidos por várias espécies de pássaros. Também pode ser utilizada no plantio de áreas degradadas destinadas a recomposição da vegetação.

As folhas (figura 2) e os pequenos ramos são utilizados para o consumo após passarem por processos industriais de secagem (MACCARI JUNIOR, 2006). Da matéria-prima seca produz-se o chimarrão e o tererê. Estas são bebidas elaboradas com água quente e fria, respectivamente com as folhas secas e torradas prepara-se o chá mate tostado (MACHADO et al., 2007).



**Figura 2:** Folhas *in natura* à esquerda e desidratadas (secas) à direita, remanescente de Floresta Estacional Decidual da região, em transição com a Floresta Ombrófila Mista situada em Chapecó - Santa Catarina (APREMAVI, 2013).

Fonte: Autor



A figura 1 representa o ambiente onde a espécie em estudo está localizada. Podemos observar uma cobertura de solo no local, com bastante sombra o que afeta a incidência de fatores abióticos entre os quais as radiações solares (ultravioleta e infravermelho termal) (VICKERS et al., 2009). Estes fatores influenciam na fisiologia desta espécie especialmente em condições de estresse que causam alterações na biossíntese de metabólitos os quais podem apresentar atividade antitumoral ou antioxidante.

A erva-mate é considerada como espécie clímax que cresce, preferencialmente, nas associações mais evoluídas dos pinhais. Assim, a mata dos pinhais (Floresta Ombrófila Mista) é considerada como a associação preferencial da erva-mate. A presença de *Araucaria angustifolia* e imbuías (*Ocotea porosa*), em geral, garante maior frequência dessa planta (MEURER, 2012).

## 2.2 USO POPULAR E ESTUDOS FARMACOLÓGICOS DA *Ilex paraguariensis*

O uso popular de plantas no tratamento de várias doenças sofrem influências das culturas indígena, africana e europeia, principalmente portuguesa. Na região do planalto norte catarinense não foi diferente, essas influências foram fundamentais nas diferentes áreas da cultura, sob o aspecto material e espiritual, constituindo a base da medicina popular que, há algum tempo, vem sendo retomada pela medicina natural, dando-lhes caráter científico e integrando-as num conjunto de princípios que não visam apenas curar algumas doenças, mas permitir ao homem uma vida natural (MARTINS et al., 2000).

Na medicina popular, a erva-mate é utilizada para diversos fins terapêuticos, como dor de cabeça, doenças reumáticas, constipação, hemorroidas, fadiga, obesidade, retenção de líquidos, hipertensão, desordens hepáticas e má digestão. Desta forma, esta planta está inserida em importantes farmacopeias, como a *Martingdale* e a *British Herbal Pharmacopeia* (ANESINI; FERRARI; FILIP, 2006), ainda que não tenha sido citada na mais recente farmacopeia brasileira (BRASIL, 2010ab).

Entre as atividades biológicas já observadas se destacam a propriedade quelante de metal de transição (CARINI et al. , 1998; SOUZA, 2009), o sequestro de radicais livres (RICE-EVANS, 1996), inibição da oxidação do colesterol proveniente da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (FILIP et al., 2000; SALAH et al. , 1995; VINSON; DABBAG, 1998), e a melhora de parâmetros do diabetes mellitus tipo 2

em humanos atribuída aos ácidos fenólicos (JOHNSTON et al., 2004). Conforme Souza (2009, p.44), a maioria dos efeitos benéficos da erva mate podem ser atribuídos aos compostos fenólicos presentes na mesma.

O interesse terapêutico com relação à erva-mate é expressivo. Existem evidências, em várias investigações, de que as substâncias contidas na erva tais como distintas xantinas, cafeína, teobromina, substâncias tânicas, flavonoides e vitaminas, exercem ações sobre o sistema cardiovascular, respiratório, tecido muscular, trato gastrointestinal e também apresentam propriedades estimulantes sobre o sistema nervoso central, antirreumática e diurética (CANSIAN et al., 2003, p. 26).

Autores pesquisaram a atividade antioxidante e quimioprotetora de extratos a base de erva-mate, que 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).

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).

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.

A tabela 1 apresenta alguns estudos científicos onde foram observadas importantes atividades biológicas da erva-mate.

Tabela 1: Estudos sobre os efeitos biológicos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

Tipo de preparação (grupo de estudo)	Objetivo	Metodologia	Conclusões	Referência
Erva-mate verde (chimarrão), voluntários saúdáveis	Verificar se o consumo de chimarrão influencia a atividade da enzima antioxidante, paroxonase (PON-1), presente na HDL	Atividade sérica da PON-1	O consumo de chimarrão aumentou atividade da enzima PON-1	Menine et al. (2007)
Erva-mate verde, tostada e chá verde - in vivo	Avaliar atividade antioxidante do chá mate e chá verde em extratos aquoso, alcoólico e etanólico.	Atividade antioxidante por captação do radical livre DPPH e inibição da oxidação por sistema betacaroteno/ácido linoléico.	Elevada atividade antioxidante de diferentes extratos de erva-mate (verde e tostada) e chá verde	Bastos et al. (2007)

Fonte: Adaptado de Matsumoto (2008).

Tabela 1: Continuação

Tipo de preparação (grupo de estudo)	Objetivo	Objetivo	Conclusões	Referência
Erva-mate verde, Ratos Wistar	Avaliar a ação do extrato de erva mate sobre a secreção de enzimas antioxidantes presentes na cavidade oral (peroxidases)	Atividade de secreção de peroxidases em glândulas submandibulares através de métodos espectrofotométricos	Aumento significativo da secreção de peroxidases e potencial de ação quimiopreventiva da cavidade oral.	Filip et al. (2007)
Erva-mate tostada, Ratos machos Swiss	Avaliar a atividade e sua influência no sistema de reparo do DNA.	Ensaio cometa	Aumento da resistência do DNA à oxidação induzida por peróxido de hidrogênio e reparação do DNA em células do fígado, independentemente da dose ingerida.	Miranda et al. (2008)

Fonte: Adaptado de Matsumoto (2008).

Tabela 1: Continuação

Tipo de preparação (grupo de estudo)	Objetivo	Metodologia	Conclusões	Referência
Extratos brutos hidroetanólicos de folhas verdes e secas	Avaliar a atividade antioxidante de <i>I. paraguariensis</i> através do ensaio espectrofotométrico com o radical (DPPH●).	Determinação de fenóis por catequinas e pela precipitação por proteínas.	Os extratos e padrões testados entre 50µg/mL e 1000µg/mL não foram citotóxicos para as células 3T3-L1.	Barlette, (2011)
Extrato aquoso da casca dos ramos residuais da colheita, concentrado por nanofiltração.	Determinar a melhor condição para a obtenção do extrato da casca dos ramos residuais com maior teor de compostos fenólicos e investigar o teor destes compostos e a atividade antioxidante.	Superfície de resposta	O teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante aumentaram à medida que o FRV (fator de redução volumétrico) aumentou, alcançando a maior % de retenção.	Prudêncio, (2011)

Fonte: Adaptado de Matsumoto (2008).

Tabela 1: Continuação

Tipo de preparação (grupo de estudo)	Objetivo	Metodologia	Conclusões	Referência
<p>Extrato aquoso das folhas secas a 90° C por 20 min.</p>	<p>Investigar a influencia da idade das folhas e da luminosidade nos teores de metilxantinas, ácido clorogênico, fenólicos totais e na atividade de captação de radicais livres.</p>	<p>Cromatografia líquida de Alta Eficiência com Detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).</p>	<p>A idade das folhas influenciou nos teores de cafeína, teobromina, ácido clorogênico e fenólicos totais, e na atividade de captação dos RL.</p>	<p>Silva, (2012)</p>
<p>Extrato aquoso das folhas por nanofiltração.</p>	<p>Concentração pelo processo de Nanofiltração (NF), avaliando o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante.</p>	<p>Superfície de resposta</p>	<p>O processo de NF eficiente na concentração de compostos fenólicos do extrato aquoso das folhas de erva-mate.</p>	<p>Murakami, (2010)</p>

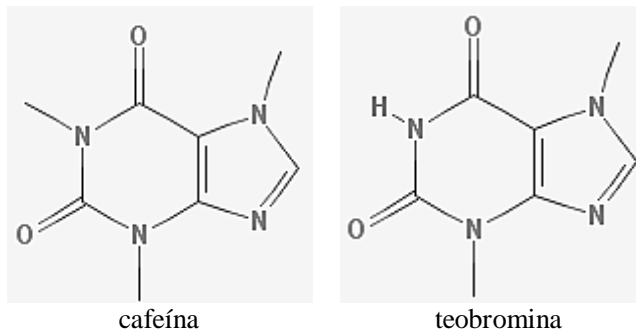
Fonte: Adaptado de Matsumoto (2008).

### 2.3 ESTUDOS FITOQUÍMICOS DA *Ilex paraguariensis*

Estudos com relação à composição fitoquímica da erva-mate demonstram que seus compostos presentes podem variar em termos qualitativos e quantitativos, como o tipo de cultivo, clima, condições agrônomicas, idade da planta, metodologia de análise e processamento industrial (DUTRA, 2009).

A cafeína (1,3,7-trimetil- 1*H*-purino- 2,6(3*H*,7*H*)-diona) também chamada de 1,3,7-trimetilxantina ou metilteobromina (figura 3) é uma substância do grupo das metilxantinas que ocorre naturalmente em folhas, sementes ou frutos de cerca de 60 espécies de plantas em todo mundo. As fontes mais conhecidas de cafeína são o café, cacau, nozes e chás de folhas, como as de erva-mate (GIRARDI, 2010, p. 42).

A teobromina (3,7-Dihidro-3,7-dimetil-1*H*-prine-2,6-diona) (figura 3) é um alcalóide derivado da purina amplamente distribuído na natureza numa variedade de plantas, tais como *Cammelia thea*, *Theobroma cacao*, *Cola acuminata*, *Paullinia cupana*, e várias espécies de *Ilex*, incluindo a *I. paraguariensis* (GIRARDI, 2010, p.44).

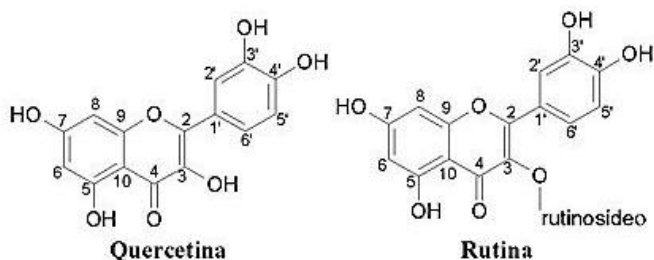


**Figura 3:** Estrutura química da cafeína e da teobromina.

Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2013 a b).

Os flavonoides estão entre os compostos naturais mais disseminados nas plantas e são os mais importantes polifenóis da dieta humana. São consideradas 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 à prevenção de doenças cardiovasculares e inflamatórias, à prevenção do câncer e à inibição da oxidação do colesterol proveniente da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (FILIP

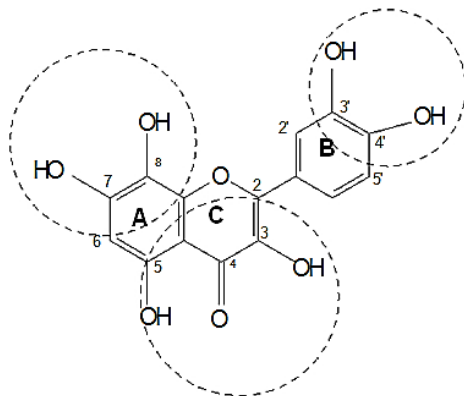
et al., 2000). Segundo Barlette (2011, p.21) entre os compostos fenólicos presentes na erva-mate encontram-se os polifenóis, os flavonoides rutina e quercetina (figura 4) e os derivados cafeoilquínicos como ácido clorogênico.



**Figura 4:** Estruturas químicas dos flavonoides quercetina e rutina.

Fonte: Pedriali et al., (2005).

A atividade de sequestro de radicais livres que é atribuída aos flavonoides se dá pela rápida doação de um átomo de hidrogênio aos radicais e depende da sua estrutura molecular (Figura 5), da substituição feita nos grupos hidroxilas, e da possibilidade de estabilização dos radicais fenoxilas formados via ligação com hidrogênio ou pelo deslocamento expandido de elétrons (PEDRIALI et al., 2005).



**Figura 5:** Regiões estruturais dos flavonoides com atividade de sequestro de radicais livres

Fonte: Pedriali et al, (2005).

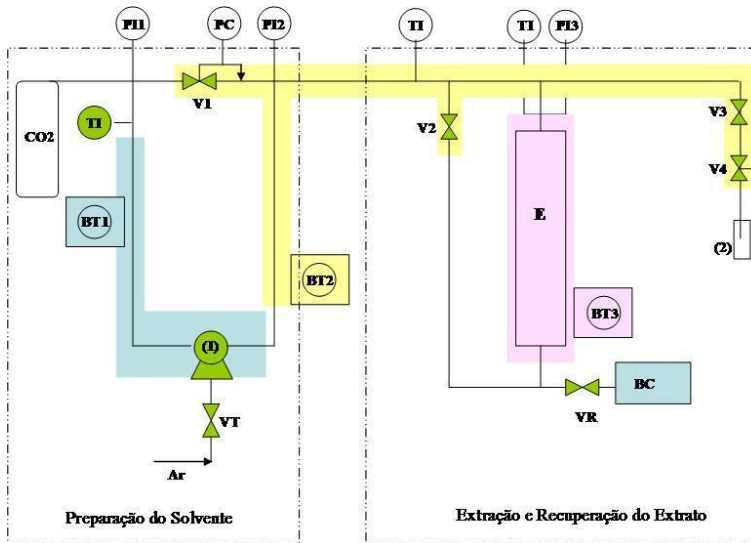


## 2.4 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

Atualmente, existem várias técnicas de extração de compostos de plantas. Dentre elas as mais empregadas são representadas pelos processos convencionais, os quais envolvem o arraste a vapor e extração com solventes orgânicos. Estas operações são responsáveis pela degradação térmica de componentes termolábeis presentes na matéria-prima e pela contaminação do extrato e do meio ambiente com resíduos de solventes, normalmente empregados em grandes quantidades. Uma abordagem inovadora em termos de extração e concentração de compostos ativos é a extração supercrítica (ESC). Esta se destaca por representar uma tecnologia de ponta que minimiza danos ao meio ambiente e que vem se desenvolvendo continuamente nas últimas décadas (KVICINSKI et al., 2011; PARISOTTO, 2011).

A extração supercrítica utiliza gases densos como solventes de extração, o mais utilizado nestes processos é o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) que apresenta natureza apolar e conseqüentemente dissolve preferencialmente compostos apolares. O estado supercrítico de fluídos pode ser definido como o estado no qual líquido e gás são indistinguíveis entre si. Devido a sua baixa viscosidade e alta capacidade de difusão, os fluídos supercríticos apresentam propriedades de transporte melhores que os líquidos, em função de terem maior capacidade de difusão através de materiais sólidos, resultando em melhores rendimentos nas extrações (PARISOTTO, 2011).

A Figura 6 representa um diagrama esquemático do processo de ESC.



**Figura 6:** Diagrama esquemático do equipamento de Extração Supercrítica.

**Fonte:** Maul, Wasicki e Bacchi (1996) modificado por Parisotto (2011).

*Nota:* Onde E: Extrator; VT: Válvula de controle da frequência da bomba; V1: Válvula reguladora de pressão; V2, V3 e V4: Válvulas da entrada, saída e micrométrica do extrator, respectivamente; PI1: Manômetro de controle do cilindro de CO<sub>2</sub> com 99,9 % de pureza; PI2: Manômetro de controle da bomba; PI3: Manômetro de controle do extrator; TI: Controladores de temperatura.

Mais recentemente, a aplicação de ESC no desenvolvimento de novos produtos nas áreas farmacêutica e alimentícia tem despertado grande interesse. Como exemplos comerciais, incluem-se a descafeinização do café, a extração da nicotina do tabaco e a obtenção comercial dos carotenoides da cenoura. Neste contexto, a extração de matérias-primas de plantas medicinais utilizando este método inovador de extração tem sido proposta devido à possibilidade de concentrar e isolar compostos utilizando-se dessa tecnologia (MICHIELIN et al., 2005).

Por outro lado, a extração supercrítica tem sido considerada como um interessante método de concentração diferencial de compostos bioativos em função de ser utilizado como solvente o dióxido de carbono. Este fato representa vantagens por tratar-se de substância não tóxica, não explosiva, facilmente e totalmente removida do extrato ao fim do processo (DANIELSKI et al., 2007).

Desta forma, a extração supercrítica pode selecionar determinados componentes cujos efeitos biológicos sejam mais potentes comparativamente aos obtidos com extratos convencionais das mesmas espécies vegetais como relatados pelo grupo de pesquisa do LABIOEX supervisionado pela professora Dr<sup>a</sup> Rozangela Curi Pedrosa, para ESC de *Cordia verbenácea* e *Bidens pilosa* (KVICINSKI et al., 2007; PARISOTTO, 2011).

## 2.5 CÂNCER

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), do ponto de vista clínico, câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (INCA, 2012).

O câncer é a causa de um grande número de mortes no mundo ocidental, ainda que significativos progressos tenham sido alcançados na medicina. Dentre estes progressos inclui-se o diagnóstico precoce e o desenvolvimento de novos fármacos empregados no tratamento e eventual remissão da doença.

Já do ponto de vista bioquímico, o câncer é considerado uma doença celular caracterizada por um descontrole do ciclo celular, que resulta numa perda progressiva dos processos de diferenciação, proliferação e morte, culminando em uma divisão celular descontrolada e no surgimento de tumores (AUDIC; HARTLEY, 2004; FELIPE, 2010). Ressaltando que as células tumorais apresentam características tais como resistência à apoptose, manutenção da sinalização proliferativa que em conjunto podem ser consideradas como sendo típicas de células imortalizadas (HANAHAN; WEINBERG, 2000; 2011).

A perda do controle sobre o ciclo e sobre a indução de processos de morte celular observados no câncer pode ser associada com as mutações na estrutura do DNA, as quais podem ter sido herdadas ou adquiridas após exposição a um agente mutagênico. Cerca de 80% dos casos de câncer são decorrentes de mutações adquiridas, ou seja, aquelas relacionadas ao meio ambiente (AUDIC; HARTLEY, 2004).

Lichtenthäler (2009) relata que os tumores apresentam uma série de alterações epigenéticas, caracterizadas como modificações na expressão gênica em que são observadas diferentes consequências fenotípicas, sem haver nenhuma mudança na sequência do DNA.

De uma forma geral a origem do câncer envolve alterações de um processo em uma população inicial de células, descendentes de uma única mutante, que evolui para sucessivos ciclos de mutação e seleção natural. Essa enfermidade divide-se em estágios nos quais uma célula adquire uma mutação adicional com uma vantagem seletiva sobre sua vizinhança, se tornando mais apta a prosperar em seu ambiente.

Ocorre uma adaptação e a célula descendente bem adaptada irá continuar a se dividir e se tornará o clone dominante no tumor. Então, assim que mutações favoráveis adicionais aumentam e as células se distinguem em vantagem, o tumor se torna cada vez mais adaptado. (LICHTENTHÄLER, 2009).

O INCA, que faz o monitoramento dos casos de câncer de mama no Brasil indica em seu banco de dados que esta é a neoplasia mais incidente na população feminina, com estimativa de 49 casos novos a cada 100 mil mulheres em 2010.

O mesmo se dá também na região Sudeste, onde este é o tipo mais prevalente (65/100 mil), seguida das regiões Sul (64/100 mil), Centro-Oeste (38/100 mil) e Nordeste (30/100 mil). O câncer de mama é também o primeiro em mortalidade por câncer em mulheres, com taxa bruta de 11,49 a cada 100 mil, em 2007 (INCA, 2010).

## 2.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade oxidante ocorre devido à ação dos radicais de oxigênio (radicais hidroxila e peroxila) e do ânion superóxido, os quais têm um papel importante nas reações bioquímicas/fisiológicas do corpo humano. No entanto, se houver produção excessiva destes radicais e do ânion superóxido durante os processos patofisiológicos ou devido a fatores ambientais adversos e, adicionalmente, se não houver um ação antioxidante satisfatória e inerente ao organismo, poderão causar danos oxidativos profundos nos tecidos adjacentes (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Os antioxidantes são substâncias que retardam ou inibem as reações de oxidação. Estes devem estar disponíveis *in vivo*, para que previnam doenças e danos profundos aos tecidos. Essas substâncias quando presentes em concentrações baixas, comparativamente às concentrações do seu substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem reações de oxidação do mesmo (SOUZA et al., 2007).

A disponibilidade de antioxidantes *in vivo* está relacionada, principalmente, à dieta. Alguns destes compostos estão presentes em diversas plantas, entre elas, a *Ilex paraguariensis*. Conforme Dartora

(2010), folhas cancheadas (que passaram por processamento industrial) de *Ilex paraguariensis* apresentaram um decréscimo na concentração de xantinas, enquanto que as oxidadas (folhas *in natura* que permaneceram muito tempo no campo após serem cortadas) apresentaram uma menor concentração de compostos fenólicos, quando comparadas com folhas verdes (*in natura*).

Entre os compostos fitoquímicos aos quais se atribui atividade antioxidante, destacam-se os compostos fenólicos tais como ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonoides (FURLONG et al., 2003).

### 2.6.1 Radicais livres

As camadas eletrônicas de um elemento químico são denominadas como K, L, M e N, e seus subníveis, s, p, d, f. De maneira simples, o termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não emparelhamento de elétrons na última camada que confere alta reatividade aos átomos ou moléculas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Assim, os radicais livres (RL) são definidos como qualquer espécie de existência independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados. A formação destas moléculas ocorre naturalmente no organismo de todos os seres vivos, devido à exposição ao oxigênio molecular (SANTOS; CRUZ, 2001).

Algumas espécies de radicais livres observadas na tabela 2, podem ser geradas no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação. Com relação à capacidade de oxidação, entre as principais formas reativas de oxigênio o  $\text{OH}^\bullet$  apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o  $\text{O}_2^\bullet$  mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  não é considerado um radical livre verdadeiro e apresenta a capacidade de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contém um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres e seu acúmulo em determinados tecidos podem levar ao estresse oxidativo, com consequente dano celular (HALLIWELL, 1994). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e

quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

**Tabela 2:** Exemplos de radicais livres

Símbolo	Nome
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido
$\text{OH}^{\cdot}$	Radical hidroxila
$\text{NO}^{\cdot}$	Óxido nítrico
$\text{ONOO}^{\cdot}$	Peroxinitrito
$\text{Q}^{\cdot}$	Radical semiquinona

Fonte: Bianchi e Antunes (2009).

### 2.6.2 Estresse oxidativo

Para Barbosa (2010), o estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de radicais livres e/ou espécies reativas dos não radicais é resultante do metabolismo de oxigênio e nitrogênio.

Para Sies (1993) citado por Matsumoto (2008), o conjunto de condições intra e extracelulares que leva à geração exacerbada de ERO é denominado como "estresse oxidativo".

### 2.6.3 Antioxidantes e defesas antioxidantes

Morais et al. (2009), relatam que os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis. Tais antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos, sendo exemplos o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), o  $\beta$ -caroteno, o ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonoides) (SOUSA et al., 2007).

Algumas espécies químicas também instáveis podem-se formar a partir dos radicais livres, que embora, não tenham elétrons desemparelhados, possuem instabilidade estrutural similar a dos radicais livres. Assim, para designar as espécies reativas na forma de radical livre e na forma não radical se utiliza o termo ERO (CARDOSO; LEITE; PELUZIO, 2011).

A ação dos antioxidantes ocorre em três linhas de defesa orgânica contra as ERO. A primeira linha, de prevenção, se caracteriza pela proteção contra a formação das substâncias agressoras. A segunda linha,

de captação, onde os antioxidantes precisam captar as ERO, as quais uma vez formadas podem atuar oxidando outras moléculas e causando danos às mesmas. E a última linha que é a de reparo, ocorre quando a prevenção e a interceptação não foram completamente efetivas e os produtos da destruição pelos radicais livres estão sendo continuamente formados em baixas quantidades e, desta forma, podem se acumular no organismo (SANTOS; CRUZ, 2001).

Conforme Matsumoto (2008), para prevenir ou reduzir os efeitos do estresse oxidativo, o organismo está equipado com diversos mecanismos de defesa antioxidante, tais como a presença dos antioxidantes não enzimáticos ( $\beta$ -caroteno, selênio,  $\alpha$ -tocoferol, vitamina C, compostos fenólicos, etc.), obtidos da dieta, e os antioxidantes enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPX) que neutralizam ou reduzem a ação das ERO.

O sistema antioxidante enzimático constitui a primeira defesa endógena a agir aos ataques das espécies reativas de oxigênio, impedindo sua formação ou sequestrando-as de forma a impedir sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar, onde as ERO são formadas a partir da reação de moléculas de lipídeos com o oxigênio ( $O_2$ ) na presença de algum agente catalisador, como a luz, calor, ou íons metálicos. Ao sofrer ataque das ERO, a cadeia poliinsaturada perde um átomo de hidrogênio, formando assim um radical livre. Ou seja, o processo é iniciado quando o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) captura um átomo de hidrogênio do carbono metileno na cadeia do ácido graxo, que se torna radical alquil (MATSUMOTO, 2008).





### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades antitumoral e antioxidante dos extratos bruto e supercrítico das folhas de *Ilex paraguariensis* utilizando modelos *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar o efeito citotóxico *in vitro* dos extratos bruto e supercrítico de *Ilex paraguariensis* sobre a linhagem tumoral MCF-7 através do ensaio de MTT.
- Avaliar atividade antioxidante dos extratos bruto e supercrítico através da inibição da geração do radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picril hidrazil).
- Avaliar atividade antioxidante *in vitro* dos extratos bruto e supercrítico através da inibição da geração de espécies reativas ao oxigênio (ERO) em células MCF-7.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 COLETA, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA

A coleta do material vegetal foi realizada no oeste catarinense, na cidade de Chapecó na sede da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural), sob a responsabilidade do pesquisador Dorli Mario Da Croce, especialista em erva-mate. Uma exsicata da planta foi depositada como material de estudo científico no herbário FLOR da Universidade Federal de Santa Catarina sob o número FLOR 41015, registro em 06/09/2012.

Este preparo do material vegetal coletado foi realizado em conjunto com o grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Jacir Dal Magro, da UNOCHAPECÓ (Universidade Comunitária Regional de Chapecó).

### 4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

Todo o material coletado (folhas) foi limpo, lavado e seco por 48 horas a 40°C em estufa. Posteriormente este material foi fragmentado em moinho de facas e armazenado em temperatura ambiente até o momento de sua utilização.

As partes vegetais coletadas foram pesadas visando inicialmente determinar a massa fresca (MF); depois de terem sido desidratadas em estufa (40°C; 48h) as folhas foram em seguida trituradas em moinho de facas. Após ter-se determinado a massa seca (MS), esta foi destinada à maceração química etanólica estática. Após filtração, o solvente foi evaporado para concentração do extrato bruto etanólico (EtOH) de *I. paraguariensis*, este extrato bruto foi pesado e armazenado. Os resultados obtidos foram expressos através da média  $\pm$  desvio padrão (massas) ou em percentagem (rendimentos).

Parte do processo de extração do extrato bruto etanólico da *Ilex paraguariensis* foi realizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Jacir Dal Magro no Laboratório de Análise Instrumental da UNOCHAPECÓ. As partes aéreas da planta selecionada foram secas, moídas e submetidas à maceração com etanol a frio por 3 dias, três vezes consecutivas. Em seguida a equipe de pesquisa da Prof. Dra. Rozangela Curi Pedrosa, efetuou a concentração do extrato evaporando o solvente sob pressão reduzida em rotaevaporador (evaporador rotativo Rampolph), obtendo-se o extrato bruto etanólico (EtOH).

Para a obtenção do extrato bruto foi utilizado álcool etílico a 95% na maceração das folhas fragmentadas, durante 3 dias em percolador agitando manualmente no intervalo de 24 horas.

### 4.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO SUPERCRÍTICO

Após a colheita as folhas estas foram limpas e secas em estufa por 48 horas a 40° C, em seguida foram processadas em moinho de rolo, pesadas e reservadas para preparação do extrato supercrítico.

O extrato supercrítico foi obtido das folhas de *Ilex paraguariensis* no Laboratório de Análise Instrumental, coordenado pelo Prof. Dr. Jacir Dal Magro, Departamento de Química da UNOCHAPECÓ.

Foi realizado o acompanhamento da extração supercrítica no que se refere ao controle de temperatura, pressão, mantendo-se um monitoramento do processo por um mecanismo não mecanizado envolvendo um controle manual.

Para a obtenção do extrato supercrítico foi utilizado o equipamento de extração supercrítica (Figura 7), tendo sido empregadas distintas condições de extração de maneira a obter as condições de maior eficiência e rendimento.

A ESC é um processo dependente da pressão e da temperatura empregadas e que garante maior solubilidade e seletividade na extração de compostos fitoquímicos, além de aumentar o rendimento de acordo com a densidade do solvente CO<sub>2</sub> (MICHIELIN et al., 2005).

A cada extração conjunto foi mantido sob pressão constante visando garantir a uniformidade do fluxo de CO<sub>2</sub> supercrítico e, em uma temperatura constante (40°C) em banho termostatizado (Microquímica, modelo MQBTZ99-20, SC, Brasil).

Durante a extração o solvente (CO<sub>2</sub> supercrítico) flui através de uma bobina (2 m, tubo de aço inoxidável 18), de onde segue para o extrator composto por uma coluna de aço inoxidável de jaqueta (40 cm comprimento x 2,1 cm diâmetro interno-Suprilab, SP, Brasil), onde se encontra o leito fixo onde são colocadas as folhas fragmentadas. A jusante do extrator existe uma válvula (Autoclave Engineers, modelo 30VRMM4812, PA, EUA) que permite controlar a expansão de solvente.



**Figura 7:** Equipamento utilizado na Extração Supercrítica.

Fonte: Autor

*Nota:* (a) Sistema de Extração Supercrítica a seta aponta o banco termostatzado empregado na obtenção do extrato supercrítico, (b) ponto de coleta do extrato supercrítico e (c) manômetro através do qual foi monitorada a variação da pressão do fluido supercrítico permitindo o seu controle na obtenção do extrato supercrítico.

O soluto (extrato supercrítico) foi coletado em frascos âmbar, colocado no final da linha de processo e conectado a um medidor calibrado onde foi monitorada a vazão e a quantidade de CO<sub>2</sub> medido (MICHIELIN et al., 2005)

A técnica de extração supercrítica utilizada foi realizada segundo apresentado por Michelin et al. (2005).

A condição de extração selecionada para a obtenção dos extratos empregados nos ensaios *in vitro* empregando CO<sub>2</sub> foi de 250 bar e 40°C, com uma taxa de fluxo de  $0,30 \pm 0,03$  g/ kg/h. Utilizou-se no processo o CO<sub>2</sub> (99,9% de pureza), que foi entregue na pressão de 250 bar. O procedimento experimental consistiu na utilização de 29 g de partículas das folhas secas e moídas para formar o leito fixo para a extração supercrítica. As amostras foram coletadas em intervalos de 90 min de extração e foram pesadas em balança analítica, para determinação da eficiência do processo de extração supercrítica.

#### 4.4 CULTURA DAS CÉLULAS MCF-7

As células MCF-7 (adenocarcinoma de mama), provenientes do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mg/mL). As células foram mantidas em densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL e em condições ideais de temperatura, atmosfera e umidade (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 100%, respectivamente) (DEJEANS, et al.; 2010).

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO

A citotoxicidade potencial dos extratos bruto e supercrítico da *Ilex paraguariensis*, foi inicialmente avaliada em nível de viabilidade mitocondrial, através do método que emprega o sal de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983). Para o ensaio, primeiro as células foram plaqueadas em placas *multiwell* de 96 poços, sendo  $10^6$  células foram semeadas por poço seguido de uma incubação de 24h para permitir a aderência celular. Depois, o meio de cultura foi substituído por outro (200µL) contendo os extratos em estudo nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/ml, para os dois extratos. Então, se procedeu com uma nova incubação (24,48 e 72 horas), sendo feita a incubação do controle negativo somente com meio de cultura fresco. Na sequência, o meio juntamente com os extratos foram retirados, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) a 37°C, sendo 100 µL de MTT (1mg/mL) adicionado neste momento. Permitiram-se mais 2 horas de incubação sob as mesmas condições citadas acima.

Em seguida o meio contendo o MTT foi removido, sendo imediatamente adicionados 100 µl de dimetilsulfóxido - DMSO (1%) com o objetivo de solubilizar os cristais de formazan formados por ação enzimática que ocorreu durante a incubação. Após a agitação por 10 minutos em agitador de placas multipoços (CIENITEC, modelo Kline CT 150), foi efetuada a leitura com auxílio de um leitor de placas (TECAN, *Infini* M 200) no Laboratório Multiusuário do CCB da UFSC, foi realizada a avaliação espectrofotométrica das placas para determinar a viabilidade celular medida em 540 nm, a 27 ° C (MOSMANN, 1983).

Os dados obtidos foram expressos em percentual de células viáveis em relação ao controle negativo, empregando o método de

análise de variância ANOVA, complementada por Tukey-Kramer e com o teste de Barlett, quando necessário, admitindo-se um nível de significância de, no mínimo  $p < 0,05$ .

A disposição da solução de ESC e EB na placa *multiwell* com cultura de células MCF-7, observadas na figura 8 e mostradas na tabela 3.

**Tabela 3:** Distribuição das concentrações dos extratos testados em placa multi-poços, estas concentrações foram estabelecidas com base em Kwiecinski *et al.* (2007) para a avaliação da citotoxicidade *in vitro*.

	1	2	3	4	5	6	7
A	CN	1µg/ml	10	100	1000	Ø	Ø
B	CN	1	10	100	1000	Ø	Ø
C	CN	1	10	100	1000	Ø	Ø
D	CN	1	10	100	1000	Ø	Ø

Fonte: autor.



**Figura 8:** Poços na placa *multiwell*, 1, 10, 100 e 1000 µg/ml de ESC.

Fonte: Autor.

Na figura 8 pode-se perceber a coloração decorrente da ação de enzimas mitocondriais que causou a redução do MTT formando cristais de formazan que apresentam coloração roxa, indicadora de viabilidade celular, ou seja, o composto testado apresentou baixa citotoxicidade (MOSSMAN, 1983).

Após contagem hemocitômetro ou câmara de Neubauer das células tripsinizadas sendo que a viabilidade celular foi confirmada através do corante azul de tripan, efetuou-se a contagem e determinação da densidade de células viáveis por poço foi calculada empregando a equação abaixo (DAGLI, 1989; FRESHNEY, 1999).

Número médio de Células/área do hemocitômetro ----- 1000 mL  
 volume de suspensão celular  $5 \times 10^6$  células densidade celular desejada  
 ----- V  $\mu$ mL

Onde:

V $\mu$ mL = volume de suspensão celular para plaqueamento no qual a densidade celular é fixa ( $5 \times 10^6$ ) para cada poçinho da placa multipoços.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DO RADICAL DPPH<sup>\*</sup> (2,2-DIFENIL-2-PICRIL HIDRAZIL)

O radical DPPH<sup>\*</sup> é considerado um radical estável e tem sua absorção máxima em 517 nm, no entanto quando este composto recebe um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar um composto mais estável sua absorção diminui (MENSOR et al., 2001). Assim, este processo de transferência de elétron ou hidrogênio pode ser:

a) Processo direto  $\text{DPPH}^* + \text{RXH} \rightarrow \text{DPPHH} + \text{RX}$  (processo direto, separação do átomo).

b) Processo indireto  $\text{DPPH}^* + \text{RXH} \rightarrow \text{DPPH}^* + \text{RXH} +$   
 $\rightarrow \text{DPPHH} + \text{RX}^*$  (processo de transferência de elétron).

A técnica constituiu na reação por 30 minutos, à temperatura ambiente, de diferentes concentrações dos extratos bruto e supercrítico em análise, diluídas em uma solução etanólica de DPPH<sup>\*</sup> (0,3 mM), com posterior leitura da absorbância em UV – ELISA 517nm.

Inibição dos extratos testados sobre os radicais DPPH<sup>\*</sup> foi calculada convertendo-se em percentual de atividade antioxidante (AA) pela utilização da fórmula:

$$\text{AA \%} = 100 - \{[(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100] / \text{Abs}_{\text{controle}}\}$$

Após o cálculo da AA% para cada concentração da amostra, foi calculada a concentração eficaz (CE<sub>50</sub>) por regressão linear. As concentrações e volumes utilizados nos ensaios foram apresentados na tabela 4.



**Tabela 4:** Concentrações e volumes dos extratos e dos reagentes utilizados na determinação da atividade antioxidante *in vitro* através do radical DPPH'

Concentração do extrato ( $\mu\text{L/mL}$ )	Volume do branco (B) e da amostra (A) (mL)	Volume de etanol (mL)	Volume de DPPH' (mL)
250	(B) 0,4375	1,3125	--
	(A) 0,4375	0,8125	0,5
125	(B) 0,2188	1,5313	--
	(A) 0,2188	1,0313	0,5
50	(B) 0,0875	1,6625	--
	(A) 0,0875	1,1625	0,5
25	(B) 0,0438	1,7062	--
	(A) 0,0438	1,2062	0,5
10	(B) 0,0175	1,7325	--
	(A) 0,0175	1,2325	0,5
5	(B) 0,0088	1,7413	--
	(A) 0,0088	1,2413	0,5
Controle	---	1,25	0,5
Branco	---	1,75	--

Fonte: Protocolo LABIOEX – UFSC.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE ERO

O conteúdo de EROs intracelular foi avaliado de acordo com metodologia proposta por Glorieux et al. (2011) utilizando diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) que é um reagente que permeia as células. No compartimento intracelular ele sofre a ação de esterases, sendo convertido a diclorofluoresceína reduzida (DCFH) e assim fica mantido compartimentalizado. O DCFH é oxidado pelas ERO, especialmente o peróxido de hidrogênio, celulares produzindo diclorofluoresceína fluorescente. Assim, a fluorescência mensurada será proporcional ao conteúdo de ERO intracelular.

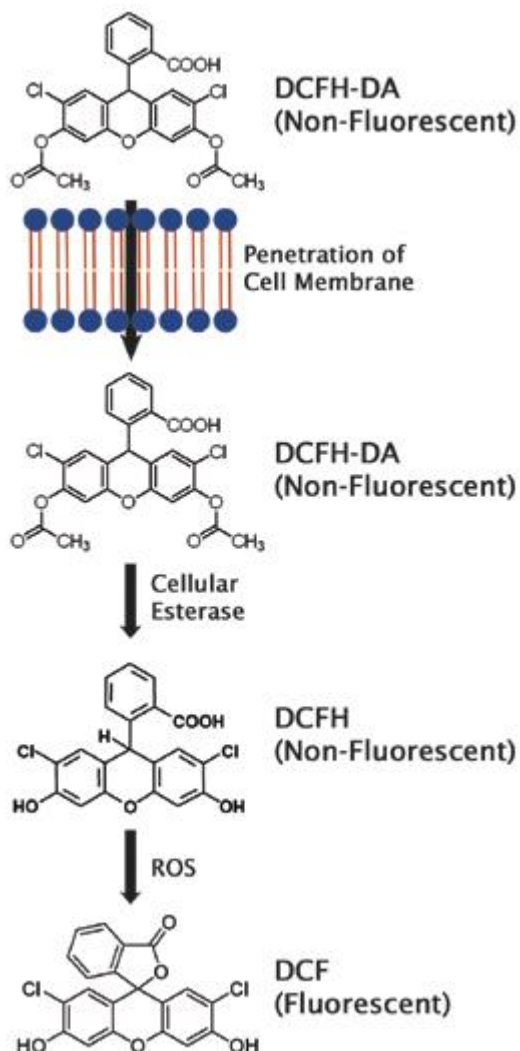
Para essa determinação inicialmente, 15.000 células aderidas foram incubadas com uma solução de DCFH-DA ( $10\mu\text{M}$ ) em solução tampão de Hank (HBSS) a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min. Após este tempo, a intensidade da fluorescência foi medida em um leitor de microplacas (Victor™ X2, Perkin Elmer) empregando filtro de excitação em 485 nm e de emissão em 530 nm.

Para avaliar a alteração dos níveis de ERO, o excesso de DCFH-DA foi removido por lavagem com HBSS fresco, as células foram então incubadas com os extratos bruto e supercrítico da erva mate por 2h. Na sequência, as células foram submetidas a mais uma lavagem dupla com HBSS e, finalmente, mais 100 µL de HBSS foram adicionados por poço na placa de cultura celular de 96 poços. As fluorescências foram determinadas através da equação:

$$\Delta F = (F - F_0) / F_0$$

Onde F representa a fluorescência média do teste registrada a cada intervalo de 30 min e F<sub>0</sub> a fluorescência média do controle.

Neste ensaio, as esterases endógenas hidrolisam (esterificam) o DCFH-DA (composto não fluorescente) em DCFH (composto não fluorescente) e as espécies reativas de oxigênio, principalmente os hidroperóxidos, oxidam DCFH em um composto altamente fluorescente o DCF, conforme esquema apresentado na figura 9, considerando algumas das reações de oxidação associadas com a ação das ERO sobre outras moléculas (PARISOTTO, 2011).



**Figura 9:** Reações de oxidação que levam a formação de composto fluorescente (DCF).

Fonte: <http://www.cellbiolabs.com/reactive-oxygen-species-ros-assay>

Este ensaio foi realizado no LAMEB - CCB- MIP, Universidade Federal de Santa Catarina.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EXTRATO BRUTO

Os rendimentos foram calculados e apresentados em termos de %, conforme exemplo no trabalho de Mendes et al. (2006) (Tabela 5).

Exemplo:

500 g ----> 100%

0,857 g -----> x %

x = 5,83 % de rendimento

**Tabela 5:** Rendimento do extrato bruto obtido no rotaevaporador .

Experimento	Massa de Folhas (g)	Massa do Extrato Bruto (g)	Rendimento da Extrato Bruto (%)
Único	500	0,857	5,83

Fonte: Autor

### 5.2 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

Conforme descrito anteriormente, a ESC foi realizada com equipamento que permitia um controle manual de pressão de CO<sub>2</sub>, temperatura, pressão de ar comprimido, e tempo de extração. As condições otimizadas para melhor obtenção do extrato supercrítico da *Ilex paraguariensis* estão apresentadas na tabela 6.

**Tabela 6:** Parâmetros médios empregados na operação do equipamento de extração supercrítica para efetuar a ESC de folhas desidratadas e fragmentadas de *Ilex paraguariensis*, foram realizadas 9 extrações.

Parâmetro	Valor médio
Massa (g)	29,46
Pressão CO <sub>2</sub> (bar)	247,78
Temperatura (°C)	40,42
Pressão Ar (lbs)	8,44
Tempo (min)	89,98

Fonte: Autor

A temperatura ótima obtida para a extração supercrítica da *Ilex paraguariensis* foi aproximadamente 40°C devido provavelmente ao

fato de que a solubilidade do fluido supercrítico é afetada pela pressão e temperatura de operação e esta aumenta com a pressão de operação a uma temperatura constante. Porém, o efeito da temperatura é mais complexo, pois surge o fenômeno de retrogradação relativo a inversão das isotermas de solubilidade, e é representada pela influenciada pela pressão de vapor do soluto e da densidade do solvente que afetam a solubilidade do soluto no fluido supercrítico (MICHIELIN et al., 2005).

O rendimento alcançado com essas extrações, demonstrado na tabela 7, foi expresso pela quantidade produzida em cada extração com a média de massa 29,457 gramas produzindo em média 0,16 gramas de ESC. Este pode ser considerado um bom rendimento uma vez que estamos trabalhando com um método de extração utilizando um arraste pelo CO<sub>2</sub> ao invés de uma extração convencional através de solventes orgânicos.

**Tabela 7:** Rendimento da extração supercrítica obtida em pressão de 250 bar a 40°C.

<b>Experimento</b>	<b>Massa de Folhas (g)</b>	<b>Massa do Extrato Supercrítico (g)</b>	<b>Rendimento da Extração Supercrítica (%)</b>
Experimento1	29,502	0,13	0,44
Experimento2	29,337	0,19	0,65
Experimento3	29,254	0,14	0,48
Experimento4	29,770	0,12	0,40
Experimento5	29,810	0,10	0,34
Experimento6	29,265	0,24	0,82
Experimento7	29,557	0,22	0,74
Experimento8	29,292	0,15	0,51
Experimento 9	29,330	0,14	0,48
Valor Médio	29,457	0,16	0,54

Fonte: Autor.

Os rendimentos foram calculados e apresentados em termos de %, conforme exemplo no trabalho de Mendes et al. ( 2006).

Exemplo:

29,502 g ----> 100%

0,13 g -----> x %

x = 0,44 % de rendimento

A utilização da ESC estabelece parâmetros satisfatórios com relação aos compostos extraídos, obtendo-se produtos de alta qualidade e pureza, evitando a contaminação por solventes orgânicos e a degradação dos compostos termolábeis (MICIC et al., 2011).

Várias vantagens podem ser observadas com relação à extração supercrítica. Entre elas destaca-se o poder de dissolução do fluido supercrítico que pode ser controlado pela pressão e/ou temperatura; o CO<sub>2</sub> supercrítico é facilmente recuperável após a extração já que se trata de um solvente atóxico que não deixa nenhum resíduo prejudicial; as substâncias que apresentam ponto de ebulição elevados podem ser extraídas por ESC em temperaturas relativamente baixas o que permite que os compostos termicamente instáveis podem ser extraídos com danos mínimos de uma vez que baixas temperaturas podem ser empregadas na extração (MICIC et al., 2011).

Podemos observar que o extrato bruto apresentou maior eficiência na extração comparativamente ao ESC, onde o rendimento, expresso em porcentagem, é de 5,83% para o extrato bruto contra menos de 1% em média do ESC.

### 5.3 EFEITO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS BRUTO E SUPERCRÍTICO DA *Ilex paraguariensis*

Inicialmente, os extratos, bruto e ESC, foram testados com respeito à citotoxicidade sobre células MCF-7 através do ensaio do MTT, uma vez que se pretendia avaliar comparativamente o efeito antitumoral destes dois tipos de extratos. Os resultados estão apresentados nas figuras 10, 11 e 12. Pode-se observar, que sob a incubação de 24, 48 e 72h, ambos os extratos não apresentaram citotoxicidade, houve diminuição para o EB em 72 hs. Porém essa diminuição não foi significativa de acordo com o IC<sub>50</sub>, tendo sido observada uma diminuição progressiva nos níveis de viabilidade celular, em comparação ao controle negativo, proporcional ao aumento da concentração de cada extrato.

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através da análise de variância ANOVA, complementada por Tukey-Kramer, e o teste de Barlett quando necessário, admitindo-se um nível de significância de, no mínimo,  $p < 0,05$ .

Os resultados da avaliação de citotoxicidade indicam que a  $CI_{50}$  dos dois extratos da *Ilex paraguariensis* estão acima de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , ou seja, praticamente nas concentrações testadas não houve citotoxicidade para a linhagem tumoral MCF-7. É importante ressaltar que para um composto ser considerado biologicamente ativo, com respeito à atividade antitumoral, este deve apresentar a capacidade de induzir citotoxicidade com  $CI_{50}$  menor que 200  $\mu\text{g/mL}$  (SUFFINES; PEZZUTO, 1990).

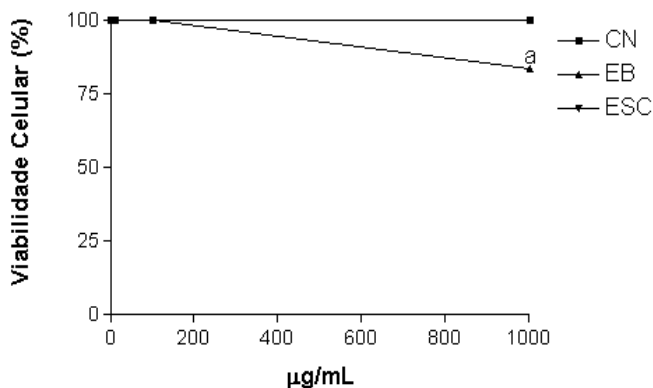
Portanto, a partir dos resultados obtidos podemos supor que tanto o extrato bruto quanto o supercrítico da *Ilex paraguariensis* nas concentrações testadas não apresentam atividade antitumoral sobre a linhagem celular MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Entretanto, outros ensaios para avaliação de atividade antitumoral *in vitro* bem como o ensaio MTT em outras linhagens tumorais devem ser realizados para confirmar os resultados obtidos no presente estudo.

Por outro lado, os resultados obtidos *in vitro* sugerem que esta espécie vegetal representa reduzidos riscos de toxicidade para o consumo humano uma vez que praticamente não foi observada citotoxicidade para células MCF-7 quando da incubação com os extratos em estudo (bruto e ESC) mesmo em concentrações elevadas (até 1000 $\mu\text{g/mL}$ ) (Figuras 10 – 12). O resultado do MTT de 24 h, para o ESC foi igual ao controle negativo, sendo que, no gráfico as linhas referentes ao CN e ESC estão sobrepostas.



### Citotoxicidade de *Ilex paraguariensis*

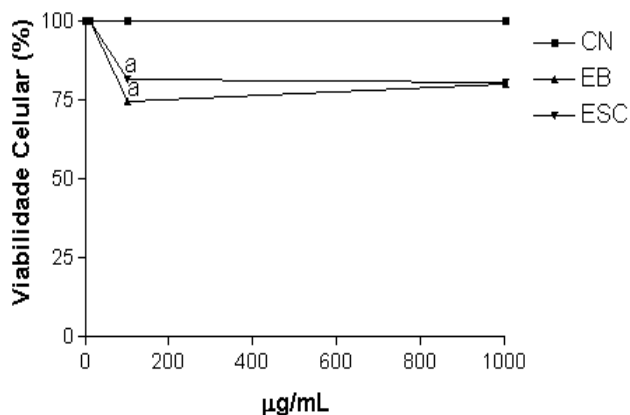
(24 h)



**Figura 10:** Efeito citotóxico dos extratos EB e ESC de *Ilex paraguariensis* nas diferentes concentrações testadas (0-1000 µg/mL para EB e ESC) (24 h de incubação) sobre a viabilidade das células MCF-7. (a) representa diferença estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle negativo (CN).

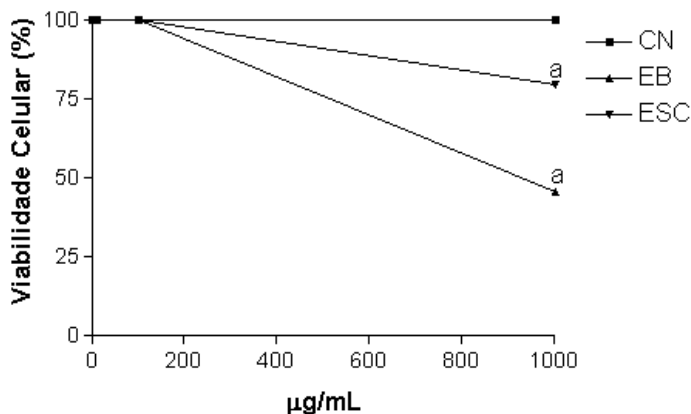
### Citotoxicidade de *Ilex paraguariensis*

(48 h)



**Figura 11:** Efeito citotóxico dos extratos EB e ESC de *Ilex paraguariensis* nas diferentes concentrações testadas (0-1000 µg/mL para EB e ESC) (48 h de incubação) sobre a viabilidade das células MCF-7. (a) representa diferença estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle negativo (CN).

**Citotoxicidade de *Ilex paraguariensis***  
(72 h)



**Figura 12:** Efeito citotóxico dos extratos EB e ESC de *Ilex paraguariensis* nas diferentes concentrações testadas (0-1000 µg/mL para EB e ESC) (72 h de incubação) sobre a viabilidade das células MCF-7. (a) representa diferença estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle negativo (CN).

Os resultados obtidos refletem a composição fitoquímica dos extratos que, por sua vez, depende da ação de fatores que alteram a composição de metabólitos secundários nas plantas como no caso da sazonalidade, da idade da árvore e das folhas, do clima, do período em que foi realizada a colheita, do sistema de cultivo (nativa ou cultivada), do tipo de solo, da região produtora e da forma de estocagem. Ressalta-se que a época de colheita da erva-mate exerce uma importante contribuição na composição fitoquímica da mesma (MEURER, 2012).

Schubert et al. (2006) demonstraram que a época de colheita tem influência decisiva nos teores de metilxantinas totais (cafeína e teobromina) das folhas de erva-mate nos municípios gaúchos de Santa Maria e Ijuí. Em ambos os municípios, os teores de metilxantinas decresceram no final do outono e todo o inverno. No caso deste trabalho a colheita foi realizada no oeste catarinense no mês de julho.

Os teores de metilxantinas e saponinas foram observados em quatro populações (RS, SC, PR e MS) de *I. paraguariensis*, na primavera e verão. Nestes estudos foi verificado que para as coletas de verão, as plantas da população de Mato Grosso do Sul apresentou os

maiores teores médio de cafeína sem diferença quanto ao teor de teobromina. Nas coletas de primavera não houve diferenças significativas para cafeína e as populações do Rio Grande do Sul e Paraná apresentaram os maiores teores para teobromina (ATHAYDE; SCHENKEL, 2000).

Na produção de compostos fenólicos e cafeína, o monocultivo (onde existe maior incidência de luz) apresentou as maiores concentrações tanto para folhas jovens como para folhas maduras. A maior concentração de teobromina foi encontrada no erval nativo (onde ocorre maior sombreamento). As folhas jovens foram caracterizadas como as que apresentaram as maiores concentrações dos compostos secundários (STRASSMANN et al., 2008). Enquanto Pagliosa (2008) obteve resultados diferentes, nos quais as concentrações de cafeína foram maiores nas plantas nativas em relação às plantas cultivadas por períodos entre 5 e 15 anos.

A cafeína e ácido gálico destacam-se entre os compostos encontrados na população de erva-mate de Santa Catarina que apresentou níveis superiores para catequinas. Os estudos de Rachwal et al. (2002), apontam resultados similares aos encontrados por Streit et al. (2007) os quais observaram que plantas em locais de menor luminosidade apresentaram os maiores teores para cafeína e a soma de cafeína e teobromina, porém a teobromina não apresentou diferenças significativas em função da variação da luminosidade.

#### 5.4 EFEITO ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS BRUTO E SUPERCRÍTICO DA *Ilex paraguariensis*

Na presença de antioxidante, o radical DPPH<sup>•</sup> recebe um elétron do hidrogênio, tornando-se um composto mais estável, assim, sua absorvância diminui. Esse processo pode ser notado visualmente pela descoloração da solução de DPPH quando em contato com o extrato e através da utilização de um espectrofotômetro pode-se quantificar a intensidade desta descoloração que é proporcional a concentração do extrato (bruto e ESC) presente na solução.

Na figura 13 estão apresentadas as concentrações dos extratos (bruto e ESC) e as atividades antioxidantes calculadas.

A concentração de 1 µg/mL revelou uma atividade antioxidante de 32,85% para o extrato bruto e 39,42% para o ESC. Observou-se que quanto maior a concentração dos extratos maior atividade antioxidante, atingindo 98,59% no extrato bruto e 95,26% no ESC para a concentração de 1000 µg/mL. Não tendo sido observadas diferenças

significativas na atividade antioxidante entre o extrato bruto e supercrítico nas concentrações testadas exceto na concentração de 100 µg/mL.

Desta forma, podemos observar que quanto maior concentração, tanto do extrato bruto quanto do ESC, maior foi o potencial antioxidante para os extratos estudados.

Então observando a figura 13, percebe-se como nossos resultados foram relevantes com relação à atividade antioxidante, pois confirmam os dados da literatura que apresentam a *Ilex paraguariensis* como sendo rica em flavonoides e outros compostos antioxidantes, o que explica a boa atividade antioxidante encontrada no presente estudo, mesmo na menor dose testada ela já causou mais de 30% de inibição da geração de radicais livres.

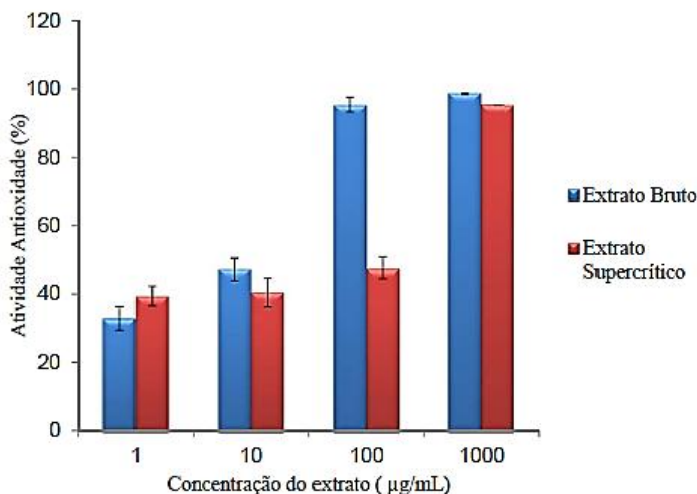


Figura 13: Atividade antioxidante *in vitro* de *Ilex paraguariensis* medido pelo método de DPPH.

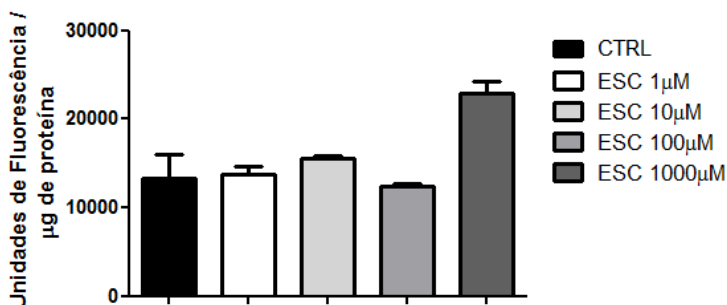
Embora os compostos fenólicos sejam os principais responsáveis pela atividade antioxidante de produtos naturais, não caracterizam completamente essa atividade, a qual pode ser devida a algum composto que reage em sinergismo com outros compostos presentes nos extratos (ROGINSKY; LISSI, 2005).

#### 5.4.1 CONTEÚDO INTRACELULAR DE EROS

O conteúdo de espécies reativas de oxigênio foi determinado pela incubação das células MCF-7 com concentrações crescentes dos extratos (bruto e ESC) na presença de um agente oxidante gerador de estresse oxidativo (peróxido de oxigênio).

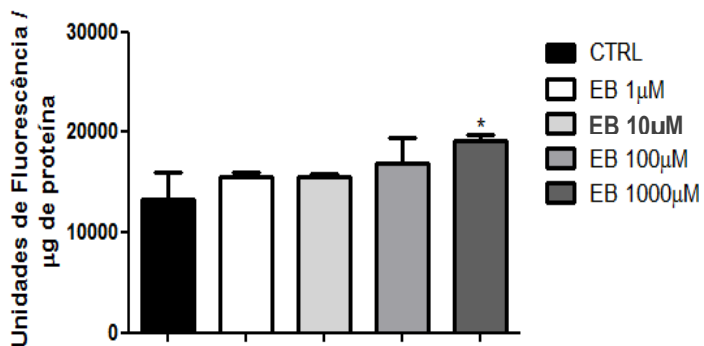
Após os tratamentos das células MCF-7 com os extratos bruto e ESC, como pode ser observado nas figuras 14 e 15, não houve elevação de ERO, exceto no caso de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Este resultado sugere que estes extratos apresentam atividade antioxidante na maior concentração testada. Não havendo diferença significativa entre os dois tratamentos e o controle negativo exceto na maior concentração testadas. É importante notar que esta inibição da geração de ERO foi observada mesmo em concentrações dos extratos bruto e supercrítico relativamente baixas, como 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Nas figuras 14 e 15 as unidades de fluorescência por microgramas de proteína associadas ao tratamento das células com os extratos em estudo.



**Figura 14:** Inibição da geração de ERO em células MCF-7 pelo tratamento com concentrações crescentes de ESC da *Ilex paraguariensis* durante 3 hs.

Segundo dados da literatura o consumo de chá mate solúvel influenciou positivamente os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo de mulheres saudáveis, associados com a diminuição da peroxidação lipídica do plasma e no aumento da expressão gênica de enzimas antioxidantes (glutathiona peroxidase, superóxido dismutase e catalase), indicando que seu consumo regular melhora a defesa antioxidante por múltiplos mecanismos conforme ressaltado por Matsumoto (2009, p.20).



**Figura 15:** Inibição da geração de ERO em células MCF-7 pelo tratamento com concentrações crescentes de extrato bruto da *Ilex paraguariensis* durante 3 hs.

## 6 CONCLUSÃO:

A avaliação da citotoxicidade da *Ilex paraguariensis* realizadas pelo ensaio do MTT indicou uma baixa atividade antitumoral dos extratos bruto e supercrítico desta planta, que pode ser explicado pelos tipos de componentes fitoquímicos publicados por autores que variam devido a diferentes fatores como, época de colheita, sombreamento, idade das folhas, que podem influenciar diretamente nos resultados.

Para o extrato bruto etanólico, devemos considerar o sinergismo entre os compostos polares existentes e suas concentrações em situações diferentes de cultivo e tratamento. Enquanto que os compostos apolares extraídos através da ESC apresentaram menor efeito antitumoral.

Também pode-se evidenciar que o consumo desta espécie vegetal estaria associado a baixo risco de toxicidade para consumo humano.

Os benefícios do consumo da erva-mate foram evidenciados através dos resultados obtidos com relação à atividade antioxidante, pois foi possível confirmar que os extratos em estudo (bruto e ESC) da *Ilex paraguariensis* foram capazes de inibir a geração de radicais livres.

Na obtenção dos extratos, utilizando a ESC, ficou evidenciado que nas condições de extração propostas neste trabalho (250 bar e 40 °C) foram extraídos compostos com atividade antioxidante. Desta forma, consideramos que a obtenção de compostos com atividade antitumoral seriam necessárias condições de um controle de temperatura e pressão, adequadas ao tipo de massa utilizado.





## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANESINI, C.; FERRARO, G; FILIP, R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. **Food Chemistry**. v. 97, n.3, p. 459-464, 2006.
- APREMAVI (Chapecó SC). **Floresta Nacional de Chapecó**: Unidades de Conservação Envolvidas. Elaborada por APREMAVI- Associação de Preservação do Meio Ambiente e da Vida. . Disponível em: <<http://www.apremavi.org.br/gestao-participativa-em-ucs/ucs-envolvidas-no-projeto/floresta-nacional-de-chapeco/>>. Acesso em: 23 jun. 2013.
- ATHAYDE, M. L., SCHENKEL, E. P. **Metilxantinas e saponinas em quatro populações de *Ilex paraguariensis* St. Hil.** In: Anais Do 2º Congresso Sul-Americano Da Erva-Mate, 2000, Encantado, RS, Brazil, 121-124.
- AUDIC, Y.; HARTLEY, R. S. Post-transcriptional regulation in cancer – Review. **Biology of the Cell**, v. 96, p. 479–498, 2004.
- BASTOS, D.H.M., FORNARI A.C., Queiroz Y.S. **The chlorogenic acid and caffeine content of yerba mate (*Ilex Paraguariensis*) beverages.** Acta Farm. Bonaerense 2005; 24(1): 91-5.
- BASTOS D.H.M., ISSHIMOTO E, MARQUES M.O.M., FERNANDO F.A., TORRES E.A.F.S.. **Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex Paraguariensis*) infusions.** Journal of food and Analysis 2006; 19(6-7): 538- 543.
- BARBOSA, K. B. F. et al . Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n. 4, p.82, 2010.

BARLETTE, A. G.. **Avaliação química e biológica do extrato hidroetanólico de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2011.

BIANCHI, M. L.P., ANTUNES, L. M. G.. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta**. *Rev. Nutr.*, v. 12, n. 2, p. 123-130,1999.

BRAGAGNOLO, N; PAN, W; FILHO, L. K. **Manual Técnico da erva-mate**,

EMATER-Paraná: Curitiba, Brasil, 1980. 40p.

BRACESCO, N. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal Of Ethnopharmacology**, California, 26 jun. 2010. p. 378-384. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)>. Acesso em: 01 jul. 2013.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 5 ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p. (a)

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, volume 2 - monografias. 5 ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 904p. (b)

BRACESCO N, Dell MRA, Behtash S, Glugliucci A *et al.* Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **J Altern Complement Méd** 2003; 9(3):379-387

- 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.
- CANSIAN, R. L. . **VARIABILIDADE GENÉTICA E DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS EM POPULAÇÕES NATIVAS DE *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) DO BRASIL, VISANDO A CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE.** Tese (Doutorado), Departamento de Centro De Ciências Biológicas E Da Saúde, UFSCAR, São Carlos, 2003, 96f.
- CARDOSO, L. M. ; LEITE, J. P. V.; PELUZIO, M. do C.G.. Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. **Revista Colombiana de Ciências Químicas e Farmacêuticas**, Viçosa, MG, v. 01, n. 40, p.116-138, 30 maio 2011. Disponível em: <[www.farmacia.unal.edu.co](http://www.farmacia.unal.edu.co)>. Acesso em: 01 jul. 2013.
- CARINI M, FACINO RM, ALDINI G, CALLONI M, COLOMBO L. Characterization of phenolic antioxidants from maté (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/Tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom** 1998; 12: 1813-1819.
- COSTA, S. G. **A erva-mate**. Coleção Farol do Saber. Curitiba, PR, 132p. 1995.
- DANIELSKI, L. **Extraction and Fractionation of natural Organic Compounds from Plant Materials with Supercritical Carbon Dioxide.** Tese de Doutorado, Technische Universität Hamburg-Harburg, Hamburg, Alemanha, 2007.
- DARTORA, N. **Avaliação dos polissacarídeos e metabolitos secundários das folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em diferentes estados fisiológicos e de processamento.** Dissertação

(Mestrado)-Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós Graduação em Bioquímica, 2010.

DASANAYAKE, A. P.; SILVERMAN, A. J.; WARNAKULASURIYA, S. Maté Drinking and Oral and Oro-Pharyngeal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Oral Oncology**. v. 46, n. 2, p. 82–86, 2010.

DEJEANS N, TAJEDDINE N, BECK R, VERRAX J, TAPER H, GAILLY P, CALDERON PB. Endoplasmic reticulum calcium release potentiates the ER stress and cell death caused by an oxidative stress in MCF-7 cells. **Biochem Pharmacol**. 2010 May1;79(9):1221-30. Do.

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.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•1. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. Campinas, Campinas, v. 26, p.446-452, 28, 2006.

DUTRA, F. L. G. **Compostos fenólicos e metilxantinas em erva-mate armazenada em sistemas de estacionamento natural e acelerado**. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós - Graduação em Tecnologia de Alimentos, Departamento de Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FAGUNDES R.B., ABNET C.C., STRICKLAND P.T., KAMANGAR F., ROTH M.J., TAYLOR P.R., DAWSEY S.M. Higher urine I-hydroxy pyrene glucuronide (I-OHPG) is associated with

tobacco smoke exposure and drinking mate in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. **BMC Câncer**. 6:139-145, 2006.

FELIPE, K. B. **Estudo da atividade antitumoral do extrato bruto e frações de *Casearia sylvestris***. 2010. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, UFSC, Florianópolis, 2010.

FERREIRA, ALA; MATSUBARA, LS. Radicais livres: Conceitos, Doenças relacionadas, o Sistema de Defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Chem. Bras.**, São Paulo, v 43, n. 1, 1997.

FERREIRA, A.G.; KASPARY, R.; FERREIRA, H.B.; ROSA, L.M., 1983. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hill. [mate]. **Brasil Florestal**, Brasil, 01 jan. 1983. p. 29-33.. 2013.

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, SEBASTIAN T, Ferraro G, Anesini C. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibulary glands. **Food Chem Toxicol**. 2007; 45(4):649-55.

FURLONG, E. B., COLLA, E., BAISCH, A. L. M. Avaliação do potencial de compostos fenólico sem tecidos vegetais. **Vetor**, v.106, n. 13, 105-114, 2003.

FLORES, J. L. A. **A utilização do mate (*Ilex paraguariensis* ST. Hill), um antioxidante natural como estratégia para a promoção da saúde: um estudo da hipercolesterolemia experimental induzida pela dieta**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-

Graduação em Enfermagem da Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande 2007.

FRESHNEY, R. I. **Freshney's Culture of animal cell- a multimedia guide**. New York, 1999. CD-ROOM

GIRARDI, J. dos S. **AValiação DA INFLUÊNCIA DAS CONdições DE CULTIVO SOBRE OS TEORES DE COMPOSTOS DE INTERESSE PRESENTES NOS EXTRATOS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) OBTIDOS POR CO<sub>2</sub> A ALTAS PRESSÕES**: Revisão Bibliográfica. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Ufsc, Florianópolis, 2010. 35 f.

GLORIEUX, C. Catalase over expression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], p. 1384-1390. 13 jun. 2011.

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) **Química Nova**. 30(2):304-307, 2007.

GLUGLIUCCI A , MENINI T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureoides*. **Life Sci** 2002; (71): 693-705.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57 - 70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646 - 674, 2011.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

INCA. **Cancro da mama: prevenção, genética, causas**. Disponível em:<http://www.cancer.gov/cancertopics/prevention-genetics-causes/breast>. Acesso 13/11/12.

INCA. **Risco de câncer de mama**. Disponível em:<http://www.cancer.gov/bcrisktool/breast-cancer-risk.aspx>. Acesso em 16/11/2012.

JOHNSTON K, SHARP P, CLIFFORD M, MORGAN L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. **FEBS Letters**. 2004;579:1653-1657.

JOTZ, G. P., MENEZES H. S., ZETTLER C. G., ALVES R. J. V., CHACUR R., BUZZATTI C., OLIVEIRA M. D., MONTES T. H. M., HÜBNER M., ZETTLER E. W. Estudo experimental da erva mate (*Ilex paraguariensis*) como agente etiológico de neoplasia do trato aéreo-digestivo. **Arq. Int. Otorrinolaringol. / Intl. Arch. Otorhinolaryngol.**, v.10, n.4, p. 306-311, 2006.

KVIECINSKI, M. R. **Avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidroetanólico e frações de *Bidens pilosa l.(asteraceae)***. Dissertação (Mestrado).Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia, 2007.

- LICHTENTHÄLER, A. L. **Efeito comparativo de dietas ricas em linhaça marrom e dourada no câncer de mama: Introdução e objetivos.** 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição em Saúde Pública, USP, São Paulo, 2009.
- LORENZI H. **Árvores brasileiras** – Manual de identificação e cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil vol. 1. Nova Odessa. São Paulo:2000.
- MACCARI JÚNIOR, A.; QUEIROZ, M. R. de; MACCARI, L. D. B. R.; RÜCKER, N.G. A.; Indústria ervateira no estado do Paraná II – Fornecimento de matéria-prima. **Revista Acadêmica**, v. 4, p 63-70, 2006.
- MACHADO, C. C. B.; BASTOS, D. H. M.; JANZANTTI, N. S.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O. M.; FRANCO, M. R. B. Determinação do perfil de compostos voláteis e avaliação do sabor e aroma de bebidas produzidas a partir da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Química Nova**, v. 30, p. 513-518, 2007.
- MARTINS, E.R., *et al.* **Plantas medicinais**. Viçosa: Ed. Universidade Federal de Viçosa, 2000. 220 p..
- MATTOS, N. F.; Revisão taxonômica da erva-mate – *Ilex paraguayensis* St. Hil. In: X SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS - SILVICULTURA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 15, 1983, Curitiba. **Anais**. Curitiba: EMBRAPA/CNPQ, 1985. p. 37-46.
- MATSUMOTO, R. L. T. **Atividade antioxidante do chá mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2008. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de



Saúde Pública, Departamento de Faculdade de Saúde Pública,  
USP, São Paulo, 2008

MAZUCHOWISKI, J. Z. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill)**. 2<sup>a</sup> ed, EMATER–Paraná: Curitiba, Brasil, 1991. 104p.

MENDES, B. G.; MACHADO, M. J.; FALKENBERG, M. Triagem de glicolipídios em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 4, p. 568-575, 2006.

MENSOR L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; dos SANTOS, T. C.; COUBE, C. S. e LEITÃO, S. G. Screenig of Brazilian Plant Extracts for antioxidant Activity by thev Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v. 15, pp.127 – 130, 2001

MEURER, A. Z. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E CLIMÁTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE ERVA-MATE (ILEX PARAGUARIENSIS ST. HILL) NO PLANALTO NORTE CATARINENSE**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa De Pós-graduação Em Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Fitotecnia, UFSC, Florianópolis, 2012.

MICIC V., NOVAKOVIC D., LEPOJEVIC Ž., JOTANOVIC M., PEJOVIC B., DUGIE P., PETROVIC Z. Supercritical fluid extraction with carbon dioxide at different pressures. **Contemporary Materials II**, v.1, p.84-87, 2011.

MICHELIN, E.M.Z.; BRESCIANI, L.F.V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R.A.; FERREIRA, S.R.S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 131 – 138, 2005.

- MIRANDA DD, ARÇARI DP, PEDRAZZOLI J Jr, CARVALHO PD, CERUTTI SM, BASTOS DH, RIBEIRO ML. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**. 2008; 24(4):375- 81.
- MOSIMANN ALP, WILHELM-FILHO D, SILVA EL Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol. **BioFactors** 2006; 26(1):59-70.
- MORAIS, S. M. , CAVALCANTI E. S. B., COSTA, S. M. O., AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19(1B): 315-320, 2009.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 16, p. 55-63, 1983.
- MURAKAMI, A. N. N.. **CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. 2010. 156 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Dos Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, UFSC, Florianópolis, 2010.
- NEGREIROS, C.N.; SILVEIRA, T.T.S.; RIEDER. A.; FERNANDES, R.S. Rendimento de extrato bruto metanólico de cana-do-brejo (*Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe), com base na biomassa foliar fresca e desidratada de plantas coletadas em Cáceres, Mato Grosso (MT). Brasil. **O Biológico**, São Paulo, v.70, n.2, p.175, jul./dez., 2008
- PAGLIOSA, C. M.. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO RESÍDUO DE ERVAIS E FOLHAS "IN NATURA" DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**: Revisão Bibliográfica. 2009. 28 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de

Ciências Dos Alimentos, Departamento de Ciência E Tecnologia De Alimentos, UFSC, Florianópolis, 2009.

PARISOTTO, E. B.. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO BRUTO E SUPERCRÍTICO DE *Cordia verbenacea***. 2011. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Departamento de Centro de Ciências Biológicas, Ufsc, Florianópolis, 2011.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. USP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), 2005. (Dissertação - Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

PRUDÊNCIO, A. P. A. **Perfil de compostos fenólicos e Atividade Antioxidante do Extrato Aquoso da Casca dos ramos residuais da colheita da Erva-Mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hil.) concentrado por nanofiltração**. Dissertação (Mestrado) - UFSC, Florianópolis, 2011.

RACHWAL, M.F.G.; COELHO, G.C.; DEDECEK, R.A.; CURCIO, G.R.; SCHENKEL, E.P.; **Influencia da Luminosidade Sobre a Produção de Massa Foliar e Teores de Macronutrientes, Fenóis Totais, Cafeína e Teobromina em Folhas de Erva-mate**. Comunicado Técnico nº 81. Embrapa. Colombo, PR. 2002.

**Rede Agronex**. Fluido Supercrítico. Disponível em: <http://www.agronex.ufba.br/fluido.html>. Acesso em 08/05/2012.

RICE-EVANS CA, MILLER NJ, PAGANGA G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic Biol Med**. 1996; 20(7): 933-956.

- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.
- SALAH N, MILLER NJ, PAGANGA G, TIJBURG L, BOLWELL GP, RICE-EVANS C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. **Arch Biochem Biophys**. 1995; 322(2):339-46.
- SILVA, C. H. B. da. **Influência da idade das folhas e da luminosidade nos teores de metilxantinas, ácido clorogênico, fenólicos totais e na atividade de captação de radicais livres de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hilaire.** 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Centro de Ciências da Saúde, UFSC, Florianópolis, 2012.
- SOUZA, C. M. M. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Mediciniais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.351-355, 2007.
- SOUZA, M. F. F. **Chá mate (*Ilex paraguariensis*): compostos bioativos e relação com atividade biológica.** Dissertação (Mestrado em Nutrição em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, USP, São Paulo, 2009.
- SANTOS, H. S., CRUZ, W. M. de S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2001, v.47(3): 303-08.
- STEFANUTO, A. **Efeito hipocolesterolêmico da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), associada ou não ao aconselhamento nutricional, em indivíduos dislipidêmicos em uso ou não de estatinas.** 2010. 35 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, Departamento de Centro de Ciências da Saúde, UFSC, Florianópolis, 2010.

- SCHUBERT,A; ZANIN,F. F.; PEREIRA,D.F.; ATHAYDE,M.L.  
Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* a. St. - hil. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, Vol. 29, No. 6, 1233-1236, 2006.
- STRASSMANN, B.B.; VIEIRA, A.R.; PEDROTTI, E.L.; MORAIS, H.N.F.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 56, p. 8348–8353, 2008.
- STREIT, N.M., HECKTHEUER, L.H.R., DO CANTO, M.W., MALLMANN, C.A., STRECK, L., PARODI, T.V.; CANTERLE, L.P. Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Chem.** 102, 560– 564. 2007.
- SUFFINESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in Plant Biochemistry.:Assays Bioactivity**, v.6, p.71-133,1990.
- VICKERS,C.E.; GERSHENZON, J.; LERDAU, M.T.; LORETO, F. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. **Nature Chemical Biology.** v. 5, n. 5, p. 283-291, may, 2009.
- VINSON JA e DABBAG YA. Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. **Nutr Res** 1998; 18:1067-107.