



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS  
ALIMENTOS**

Ana Paula Aguiar Prudêncio

**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 submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin

Florianópolis  
2011



Folha assinatura



*Aos meus pais Regina e Luiz,  
Ao meu irmão Lucas,  
Agradeço por fazerem parte da minha vida.*



## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos aos que contribuíram para a realização deste trabalho:

À professora Dra. Elane Schwinden Prudêncio, minha orientadora, pela confiança, incentivo, ensinamentos, amizade e oportunidade concedida ao desenvolvimento deste trabalho;

Ao professor Dr. Marcelo Maraschin, meu co-orientador, sempre disposto a ajudar com as análises de cromatografia, além das excelentes idéias voltadas ao projeto;

À professora Dra. Edna Regina Amante, sempre acolhedora e prestativa, por dividir seus conhecimentos sobre enzimas e disponibilizar seu laboratório para grande parte das análises do trabalho;

À professora Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, por disponibilizar a utilização da matéria prima para este estudo, pelas idéias compartilhadas durante todo o período de mestrado, pelo carinho e amizade;

Ao professor Dr. Paulo José Ogliari, pelos ensinamentos e ajuda com as análises estatísticas;

Ao professor Dr. José Carlos Cunha Petrus, que gentilmente cedeu o laboratório de Processos de Separação por Membranas para a realização da nanofiltração;

Ao grupo do laboratório Leite e Derivados, Laura, André, Juliana, Carlise, Stephanie, Marina, Mariane e Rebecca que participaram da execução do projeto e foram ótimos colegas de trabalho. Em especial agradeço à Ana Cristina por ser mais do que uma colega de trabalho, tornando-se uma grande amizade e à Isabella, minha querida estagiária que participou de todas as etapas do projeto, sempre disposta, animada e prestativa;

À Aureanna que me orientou em todas as análises, sempre disponível para me ajudar no que foi preciso, sendo indispensável na execução do meu trabalho; além de ter se tornado uma amizade para toda a vida;

Ao laboratório Frutas e hortaliças, onde realizei grande parte das análises; ao João que me ajudou nos momentos de dúvida com os equipamentos e à Ângela, pela troca de idéias, opiniões e amizade;

Ao laboratório de morfogênese e bioquímica vegetal, onde foram realizadas as análises de cromatografia líquida e hidrólise enzimática;

Aos amigos do laboratório Processos de Separação com Membranas, Silvia, Léo e Claudimir, sempre prestativos, que me ajudaram na nanofiltração.

Ao Gtec pela disponibilização do Data logger, equipamento utilizado no delineamento experimental;

À minha família linda, indispensável em todos os momentos, pelo carinho, amor, amizade, ensinamentos, conselhos e apoio durante todo o período de mestrado;

Ao meu namorado, Gilberto, que me apoiou desde o processo seletivo da pós-graduação até a defesa, sendo companheiro em todas as horas, inclusive me acompanhando nas análises realizadas durante a noite e nos finais de semana;

À FAPESC pelo apoio financeiro para a concretização desta pesquisa;

Ao programa de pós-graduação e professores, pelas aulas e oportunidade para adquirir novos conhecimentos;

Ao Sérgio Souza pelo apoio burocrático;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), no auxílio bolsa.



*"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muita para ser insignificante"*

*(Charles Chaplin)*



PRUDÊNCIO, Ana Paula Aguiar. **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.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC

## RESUMO

A metodologia de superfície de resposta foi empregada para avaliar diferentes temperaturas e tempos de extração de compostos fenólicos na obtenção de um extrato aquoso da casca do resíduo da erva-mate, com maior teor de compostos fenólicos, denominado de extrato otimizado. O extrato otimizado foi submetido à nanofiltração, resultando em concentrados, coletados em diferentes fatores de redução volumétricos (FRV de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0), bem como nos seus respectivos permeados. O concentrado com maior teor de compostos fenólicos foi submetido à hidrólise enzimática com  $\beta$ -glicosidase. Dos concentrados (diferentes FRV) e permeados, assim como do concentrado hidrolizado foram determinados o perfil de compostos fenólicos e a atividade antioxidante. Os resultados indicaram que um extrato otimizado, ou seja, com maior concentração de compostos fenólicos (1,55 mg equivalente de ácido clorogênico/mL), foi obtido quando utilizada temperatura de  $85 \pm 5$  °C e tempo de extração igual a 1,5 minuto. Os teores de compostos fenólicos totais nos permeados e nos concentrados foram diferentes do encontrado no extrato otimizado. Foi verificado também que o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante tiveram aumento à medida que o FRV aumentou, alcançando a maior porcentagem de retenção de fenólicos, igual a 99,77 %, quando o FRV foi 6,0. Além disso, os compostos majoritários encontrados no extrato otimizado e nos concentrados, dos FRV iguais a 4,0 e 6,0, foram o ácido clorogênico e a epigalocatequina galato. A enzima  $\beta$ -glicosidase foi capaz de catalisar a hidrólise dos glicosídeos fenólicos presentes no concentrado da casca do resíduo da erva-mate, convertendo-os em suas agliconas, além de influenciar na sua atividade antioxidante. As maiores atividades antioxidantes foram de 12,34 EC<sub>50</sub> mg de amostra/gDPPH e 11,31 EC<sub>50</sub> mg de amostra/gDPPH obtidas nos tempos de hidrólise iguais a 3 e 6 horas, respectivamente. Além disso, o maior teor do ácido clorogênico (426,91  $\mu$ g/mL) foi detectado em 3 horas de hidrólise, enquanto a maior

concentração de epigalocatequina galato (3357,68 µg/mL) foi verificada em 6 horas. A análise de componentes principais (ACP) confirmou a relação de ambos os compostos com a atividade antioxidante do concentrado da casca do resíduo da erva-mate e uma baixa relação do ácido ferúlico com esta atividade. Os resultados mostraram que a nanofiltração foi um método eficiente na concentração de compostos fenólicos do extrato aquoso da casca do resíduo da erva-mate.

**Palavras-chave:** *Ilex paraguariensis*. Casca do resíduo da erva-mate. Compostos fenólicos. β-glicosidase. Atividade antioxidante. Nanofiltração.

PRUDÊNCIO, Ana Paula Aguiar. **Phenolic composition and antioxidant activity of mate bark (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) aqueous extract concentrated by nanofiltration.** 2011. Dissertation (Master's in Food Science) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

## ABSTRACT

The response surface methodology was employed to determine the optimum condition for extraction of phenolic compounds from mate bark aqueous extract. The extract obtained from the best condition, denominated optimized extract, was subjected to nanofiltration, resulting on concentrates collected in different reduce volume factor (VRF of 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 4.0; 4.5; 5.0; 5.5 e 6.0), as well as its permeates. The concentrate with the highest total polyphenol content was submitted to enzymatic hydrolysis with  $\beta$ -glucosidase. The identification and quantification of the phenolic compounds, as well as the antioxidant activity were determined on the concentrates (different VRF) and on the optimized extract. The results indicated that the optimized extract, with 1,55 mg chlorogenic acid equivalent/mL, was obtained using temperature of  $85 \pm 5$  °C and time of extraction of 1.5 minutes. The total polyphenol content values in the permeate and in the concentrate collected at different volume reduction factors were different from those detected in the optimized extract. The concentration of phenolic compounds and antioxidant activity increased when VRF was increased, reaching the highest retention percentage (% *R*) of 99.77 % when VRF was 6.0. Moreover, the major compounds detected in optimized mate bark extract and its concentrates (VRF 4.0 and 6.0) were chlorogenic acid and epigallocatechin gallate.  $\beta$ -glucosidase was able to catalyze the hydrolysis of mate bark concentrate phenolic glucosides, and thus convert them into their aglycones. Also, this enzyme affected the antioxidant activity of the sample. The highest antioxidant activities were 12.34 EC<sub>50</sub> – mg sample/g DPPH and 11.31 EC<sub>50</sub> – mg sample/g DPPH after 3 and 6 hours of hydrolysis, respectively. Additionally, the highest concentration of chlorogenic acid (426.91  $\mu$ g/mL) was detected at 3 hours, while the highest concentration of epigallocatechin gallate (3357.68  $\mu$ g/mL) was detected at 6 hours. A principal component analysis (PCA) confirmed the relation of both compounds with the

antioxidant activity of mate bark concentrate and the poor relation of ferulic acid with this activity.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*. Mate bark aqueous extract. Phenolic compounds.  $\beta$ -glucosidase. Antioxidant activity. Nanofiltration.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO 1

<b>Figura 1:</b> Área de ocorrência natural da erva-mate.....	34
<b>Figura 2:</b> Representação das partes da erva-mate aproveitadas e descartadas pela indústria.....	35
<b>Figura 3:</b> Ramos da erva-mate não aproveitados e descartados após a colheita.....	35
<b>Figura 4:</b> Estrutura básica de um composto fenólico.....	36
<b>Figura 5:</b> Estrutura química dos flavonóides presentes na erva-mate.....	37
<b>Figura 6:</b> Estrutura química dos principais ácidos fenólicos presentes na erva-mate.....	38
<b>Figura 7:</b> Esquema ilustrativo dos métodos de filtração pelo processo de separação por membranas.....	41
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática da separação e/ou concentração de partículas nos diferentes procedimentos que empregam membranas.....	41
<b>Figura 9:</b> Representação da estrutura terciária de uma $\beta$ -glicosidase.....	44
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática do mecanismo de ação da $\beta$ -glicosidase na hidrólise enzimática de um substrato, sendo R um resíduo de glicose ou um grupo arila ou alquila.....	46

### CAPITULO 2

<b>Figura 1:</b> Esquema simplificado da unidade de filtração piloto utilizado neste trabalho.....	66
<b>Figura 2:</b> Gráfico dos resíduos versus valores observados para o teor de compostos fenólicos totais do extrato aquoso da casca do resíduo da erva-mate.....	72
<b>Figura 3:</b> Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos totais (mg/mL equivalentes de ácido clorogênico) do extrato aquoso da casca do resíduo da erva-mate em função da temperatura ( $^{\circ}$ C) e do tempo (min) de extração.....	73
<b>Figura 4:</b> Fluxo do permeado (J) durante o tempo (min) de nanofiltração do extrato otimizado.....	74

### CAPITULO 3

<b>Figura 1:</b> Teor de compostos fenólicos do concentrado da casca do resíduo da erva-mate durante a hidrólise enzimática com $\beta$ -glicosidase, a 37 °C.....	<b>99</b>
<b>Figura 2:</b> Análise de componentes principais do EC <sub>50</sub> (mg amostra/gDPPH) e dos compostos fenólicos obtidos do concentrado da casca do resíduo da erva-mate submetido a hidrólise enzimática com $\beta$ -glicosidase nos tempos T0, T3, T6, T9, T12 e T24, ou seja, nos tempos iguais a 0, 3, 6, 12 e 24 horas de hidrólise, respectivamente.....	<b>103</b>



## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 2

<b>Tabela 1:</b> Níveis codificados e valores reais das variáveis independentes utilizadas no delineamento central composto para extração de compostos fenólicos totais da casca do resíduo da erva-mate.....	65
<b>Tabela 2:</b> Composição química da casca do resíduo da <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil. (Base seca).....	69
<b>Tabela 3:</b> Delineamento central composto (DCC) para duas variáveis utilizadas na extração de compostos fenólicos totais da casca do resíduo da erva-mate.....	71
<b>Tabela 4:</b> Análise de variância dos compostos fenólicos totais presentes no extrato aquoso da casca do resíduo da erva-mate.....	71
<b>Tabela 5:</b> Teor de compostos fenólicos totais (mg de equivalente de ácido clorogênico/mL) do extrato otimizado da casca do resíduo da erva-mate, permeados e concentrados; atividade antioxidante ( $EC_{50}$ mg amostra/gDPPH) do extrato otimizado e concentrados; e o coeficiente de retenção (%) em diferentes fatores de redução volumétrico (FRV).....	76
<b>Tabela 6:</b> Compostos fenólicos presentes no extrato aquoso da casca do resíduo da erva-mate e concentrados (FRV 2,0; 4,0 e 6,0).	78

### CAPITULO 3

<b>Tabela 1:</b> Teor dos compostos fenólicos do concentrado da casca do resíduo da erva-mate durante a hidrólise enzimática com $\beta$ -glicosidase, a 37 °C.....	100
<b>Tabela 2:</b> Atividade antioxidante ( $EC_{50}$ mg amostra/gDPPH) do concentrado da casca do resíduo da erva-mate durante a hidrólise enzimática com $\beta$ -glicosidase, a 37 °C.....	102



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACP/ PCA	Análise de componentes principais ( <i>Principal component analysis</i> )
ANOVA	Análise de variância
CAE	<i>Chlorogenic acid equivalent</i>
CLAE/ HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
CFT/ TPC	Compostos fenólicos totais ( <i>Total polyphenol content</i> )
CP	Componentes principais
DCC	Delineamento central composto
Da	Dalton (g/mol)
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazila
EAC	Equivalentes de ácido clorogênico
EC <sub>50</sub>	Concentração eficiente para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH
FRV/ VRF	Fator de redução volumétrica ( <i>Volume reduction factor</i> )
h	hora
<i>J</i>	Fluxo do permeado
MF	Microfiltração
Min	Minuto
MSR/RSM	Metodologia de superfície de resposta ( <i>Response surface methodology</i> )
NF	Nanofiltração ( <i>nanofiltration</i> )
OI	Osmose inversa
PSM	Processos de separação por membranas
RLM	Regressão linear múltipla
rpm	Rotações por minuto
UF	Ultrafiltração
UV	Ultravioleta
Vis	Visível



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>31</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>33</b>
<b>1.1 A erva mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil).....</b>	<b>33</b>
<b>1.2 Os compostos fenólicos da erva mate.....</b>	<b>36</b>
1.2.1 A extração de compostos fenólicos.....	39
<b>1.3 Processos de Separação por Membranas (PSM).....</b>	<b>40</b>
<b>1.4 Hidrólise enzimática e a enzima <math>\beta</math>-glicosidase.....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DO RESÍDUO DA COLHEITA DA ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.) CONCENTRADO POR NANOFILTRAÇÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
2.1 Material.....	63
2.2 Preparo das amostras.....	63
2.3 Composição química da casca do resíduo da erva-mate.	63
2.4 Preparo dos extratos.....	64
2.5 Delineamento experimental.....	64
2.6 Nanofiltração.....	65
2.7 Determinação do teor de compostos fenólicos (CFT).....	67
2.8 Atividade antioxidante.....	67
2.9 Identificação e quantificação de compostos fenólicos.....	67

2.9.1 Preparação da amostra.....	67
2.9.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	68
2.10 Análise estatística.....	68
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
3.1 Composição química da casca do resíduo da erva-mate.	69
3.2 Otimização da extração de compostos fenólicos totais pela superfície de resposta.....	70
3.3 Nanofiltração.....	74
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>

### **CAPÍTULO 3**

<b>ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS GLICOSÍDEOS FENÓLICOS DO CONCENTRADO DA CASCA DO RESÍDUO DA COLHEITA DA ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.) OBTIDOS POR NANOFILTRAÇÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>95</b>
2.1 Material.....	95
2.2 Preparo das amostras.....	95
2.3 Preparo e concentração por membranas do extrato aquoso obtido da casca do resíduo da erva mate.....	95
2.4 Hidrólise enzimática.....	96
2.5 Atividade antioxidante.....	97
2.6 Identificação e quantificação de compostos fenólicos.....	97
2.6.1 Preparação da amostra.....	97
2.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	97
2.7 Análise estatística.....	98
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>99</b>
3.1 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos....	99
3.2 Atividade antioxidante.....	101
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>104</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>105</b>

**CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 109**





## INTRODUÇÃO

O consumo da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) ocorre principalmente nas regiões onde se tem a planta nativa, sob a forma de chimarrão, tererê e chá mate (ANDRADE, 2003). Para a fabricação dessas bebidas utiliza-se a erva que é produzida a partir de ramos contendo até 10 mm de diâmetro, além das folhas (GIULIAN, 2005). Os ramos de maior diâmetro são descartados no solo durante a colheita, gerando toneladas de resíduos sólidos que não são aproveitados pelas indústrias ervateiras (PAGLIOSA, 2009) e praticamente inexplorados em pesquisas (GOLDENBERG, 2002; RAMIREZ-MARES; CHANDRA; MEJIA, 2004; COELHO et al., 2007; GIULIAN et al., 2009). Entretanto, o aproveitamento destes ramos residuais pela indústria alimentícia apresenta-se como promissora alternativa na obtenção de compostos bioativos, como por exemplo, os compostos fenólicos, que de acordo com Pagliosa (2009) apresentam-se em maiores teores na casca dos ramos residuais da colheita da erva-mate do que os nas folhas.

A obtenção de extratos a partir de folhas (OJEWOLE, 2005; WONG; LEONG; KOH, 2006; WECKESSER et al., 2007; ARABSHAHI-D, S.; DEVI, D. V.; UROOJ, 2007) e resíduos de plantas (MARINOVA; YANISHLIEVA; KOSTOVA, 1994; BOCCO et al., 1998; BONILLA et al., 1999; VISIOLI et al., 1999 ;ADENEYE et al., 2006; NDIAYE et al., 2008) é amplamente estudada. Sabe-se que a maioria dos estudos indica o emprego de água como solvente extrator, pois alegam que estes poderiam ser utilizados em alimentos, já que os solventes orgânicos podem apresentar toxicidade ao consumidor (SONAGLIO et al., 2007). A infusão em água apresenta-se como um bom método de extração necessitando de controle de tempo e temperatura a fim de evitar perdas ou destruição dos compostos bioativos, como os compostos fenólicos (ANDREO; JORGE, 2006).

Por outro lado, alguns autores (LEWICKI, 2006; JESUS et al., 2007) relatam a necessidade do emprego destes extratos em alimentos na forma concentrada, pois desta maneira ter-se-ia a redução de custos com estocagem e transporte, além de aumentar a vida de prateleira. Ao contrário dos processos de separação por membranas, que empregam baixas temperaturas, as operações tradicionais de concentração são resultantes de evaporação térmica, e, portanto utilizam altas temperaturas, acarretando em modificações de compostos

termossensíveis, como os fenólicos (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007; SONAGLIO et al., 2007).

Os compostos fenólicos presentes em extratos de plantas apresentam-se predominantemente na forma de polímeros, ésteres e glicosídeos não sendo completamente absorvidos por administração oral, como mostrado por muitos estudos clínicos e modelos animais (DEL RIO et al., 2010). Desta maneira, é então indicada a hidrólise a fim de quantificar e verificar a biodisponibilidade destes compostos (MACEDO et al., 2011).

Diante deste contexto, é de grande valia concentrar compostos fenólicos provenientes da casca dos ramos residuais da colheita da erva-mate, empregando a nanofiltração, um processo de separação por membranas, visto o reduzido consumo energético do processo bem como a preservação desses compostos devido as baixas temperaturas utilizadas no mesmo. Além disso, é também relevante investigar a influência da hidrólise enzimática sobre a atividade antioxidante dos compostos fenólicos, pois a forma predominante destes compostos em extratos de plantas é a de polímeros, ésteres ou glicosídeos, sendo a forma bioativa destes compostos é a de aglicona.

Este trabalho está apresentado na forma de artigos, divididos nos seguintes capítulos:

- a) capítulo 1: referente à revisão bibliográfica;
- b) capítulo 2: que trata do teor 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;
- c) capítulo 3: onde se verificou a ação da hidrólise enzimática sobre a atividade antioxidante dos glicosídeos fenólicos da casca dos ramos residuais da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) obtidos por nanofiltração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADENEYE, A. A.; AJAGBONNA, O. P.; MOJIMINIYI, F. B. O.; ODIGIE, I. P.; OJOBOR, P. D.; ETARRH, R. R.; ADENEYE, A. K. The hypotensive mechanisms for the aqueous stem bark extract of *Musanga cecropioides* in Sprague-Dawley rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 203–207, 2006.
- ANDRADE, F. M. Exploração, manejo e potencial socioeconômico da erva-mate. In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. **Sustentável Mata Atlântica – a exploração de seus recursos florestais**. 2ª ed atual. São Paulo: Editora Senac, São Paulo, 2003. 19–34p.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: Técnicas de Extração. **B. CEPPA**, v. 24, n. 2, p. 319–336, 2006.
- ARABSHAHI-D, S.; DEVI, D. V.; UROOJ, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1100–1105, 2007.
- BOCCO, A.; CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p.2123–2129, 1998.
- BONILLA, F.; MAYEN, M.; MERIDA, J.; MEDINA, M. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. **Food Chemistry**, v. 66, p.209–215, 1999.
- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In. SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRS/Editora da UFSC, 2007. p.519–535.
- COELHO, G. C.; RACHWAL, M.; DEDECEK, R.A.; CURCIO, G. R. NIETSCHKE, K.; E.; SCHENKEL, E. P. Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p.75–80, 2007.

DEL RIO, D.; COSTA, L. G.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Polyphenols and health: What compounds are involved? **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 20, p.1–6, 2010.

GIULIAN, R. **Estudo da composição elementar da erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2005, 109f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

GIULIAN, R.; SANTOS, C. E. I. dos.; SHUBEITA, S. de M.; SILVA, L.; M.; YONEAMA, M. L.; DIAS, J. F. The study of the influence of industrial processing on the elemental composition of mate tealeaves (*Ilex paraguariensis*) using the PIXE technique. **Food Science and Technology**, v. 42, p.74–80, 2009.

GOLDENBERG, D. Mate: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, v. 38, p.646–649, 2002.

JESUS, D. F.; LEITE, M.F.; SILVA, L.F.M.; MODESTA, R.D.; MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C. Orange (*Citrus sinensis*) juice concentration by reverse osmosis. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p.287–291, 2007.

LEWICKI, P. P. Design of hot air drying for better foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p.153–163, 2006.

MACEDO, J. A.; BATTISTIN, V.; RIBEIRO, M. L.; MACEDO, G. A. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry**, v. 126, p.491–497, 2011.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. I.; KOSTOVA, I. N. Antioxidative action of the ethanolic extract and some hydroxycoumarins of *Fraxinus ornus* bark. **Food Chemistry**, v. 51, p.125–132, 1994.

NDIAYE, M.; DIATTA, W.; SY, A.N.; DIÈYE, A.M.; FAYE, B.; BASSÈNE, E. Antidiabetic properties of aqueous barks extract of *Parinari excelsa* in alloxan-induced diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 79, p.267–270, 2008.

OJEWOLE, J. A.O. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p.13–19, 2005.

PAGLIOSA, C. M. **Caracterização química do resíduo de ervas e folhas “in natura” de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. 2009. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

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

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In. SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRS/Editora da UFSC, 2007. 289–326p.

VISIOLI, F.; ROMANI, A.; MULINACCI, N.; ZARINI, S.; CONTE, D.; VINCIERI, F. F.; GALLI, C. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p.3397–3401, 1999.

WECKESSER, S.; ENGEL, K., SIMON-HAARHAUS, B.; WITTMER, A., PELZ, K.; SCHEMPPA, C.M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine**, v. 14, p.508–516, 2007.

WONG, S. P.; LEONG, L. P.; KOH, J. H. W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry**, v. 99, p.775–783, 2006.



**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



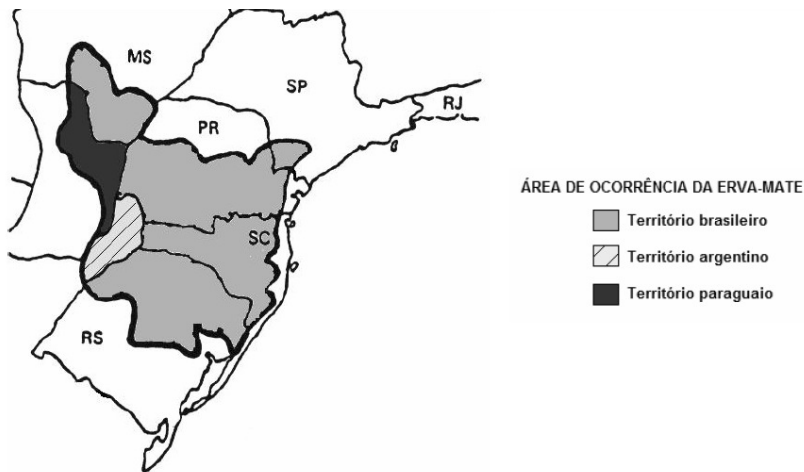


## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil)

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil), espécie arbórea, é uma planta angiosperma pertencente à família das aquifoláceas, que pode apresentar altura de até 15 m, dependendo da idade, mas geralmente não ultrapassa 7 m por decorrência da poda. O caule desta planta apresenta cor acinzentada com diâmetro entre 20 e 25 cm, podendo chegar a 50 cm. Esta planta caracteriza-se por ser uma árvore frutífera, nos meses de março a junho, com floração entre os meses de outubro a novembro. Apesar de ser pouco sensível as variações de temperatura, a erva-mate necessita de um regime anual de chuvas de no mínimo 1200 mm, distribuídos proporcionalmente ao longo de todo um ano (HECK; DE MEDJIA, 2007).

A erva-mate está distribuída naturalmente entre as latitudes 21°S e 30°S e longitude 48°30'W à 56°10'W das regiões subtropicais temperadas da América do Sul. A altitude onde está localizada varia entre 80 e 1.700 m, sendo a maior concentração encontrada entre 500 e 1.000m. Na Figura 1.1 têm-se as áreas de ocorrência natural da erva-mate, que são o nordeste da Argentina, o leste do Paraguai e os Estados brasileiros do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e a Região Sul do Mato Grosso do Sul (OLIVEIRA; ROTTA, 1985). No Brasil a área ocupada pelos ervais corresponde a 5 % do território do País, enquanto na região sul-americana este percentual equivale a 3 %, correspondendo a uma área de 450.000 km<sup>2</sup>. No Estado de Santa Catarina estão presentes em cerca de 140 municípios, sendo o Planalto e a Zona de floresta de Araucária as principais regiões produtoras de erva-mate (DA CROSSE, 2000).



**Figura 1.1: Área de ocorrência natural da erva-mate.**

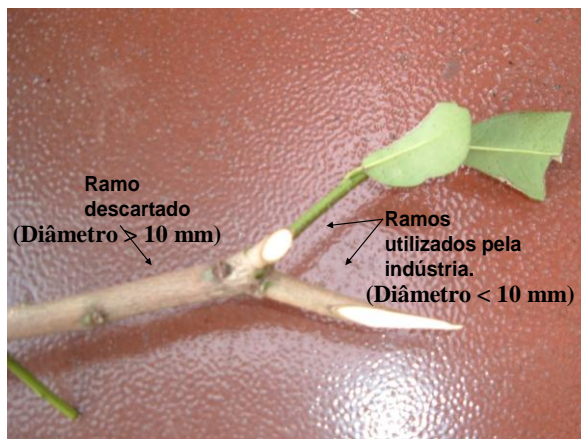
Fonte: Oliveira e Rotta (1985).

No ano de 2009 foram colhidas 218.102 toneladas de folhas de erva-mate o que corresponde a um faturamento de R\$ 86,6 milhões de Reais, sendo que a maior produção, correspondente a 71,8 % do total nacional (156.563 toneladas), é representada pelo Estado do Paraná. Neste contexto, o Estado de Santa Catarina é considerado o segundo maior produtor de erva-mate com uma produção de 36.493 toneladas, sendo os municípios de Canoinhas, Abelardo Luz, Bela Vista do Toldo e Irineópolis os maiores produtores. O restante da produção nacional está distribuído nos Estados do Rio Grande do Sul (11,4 %) e Mato Grosso do Sul (0,13 %) (BRASIL, 2010).

No Brasil existem dois tipos predominantes de cultivo da erva-mate, o extrativismo vegetal e o sistema misto. O primeiro consiste na exploração dos ervais nativos, onde a colheita é feita de forma primitiva e manual, enquanto o segundo corresponde à combinação dos ervais nativos e o cultivo com reposição de mudas (HECK; DE MEDJIA, 2007).

A colheita da erva-mate consiste na retirada dos ramos com seus ramúsculos e folhas para o aproveitamento destes na sua industrialização. Normalmente a poda é realizada em galhos com até 20 mm de diâmetro, garantindo pouco tempo de restauração até a próxima colheita que deve ser feita a cada 2 anos (Figura 1.2). Entretanto, somente os ramos que apresentam cerca de 10 mm de diâmetro são

utilizados juntamente com as folhas, na produção de derivados da erva-mate (GIULIAN, 2005). Os ramos não aproveitados para a industrialização do mate são descartados no local da poda de colheita (Figura 1.3) (PAGLIOSA, 2009).



**Figura 1.2: Representação das partes da erva-mate aproveitadas e descartadas pela indústria.**

Fonte: Pagliosa (2009).



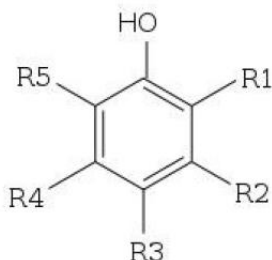
**Figura 1.3: Ramos da erva-mate não aproveitados e descartados após a colheita.**

Fonte: Pagliosa (2009).

Estudos têm sido realizados visando novos aproveitamentos da erva-mate (DE CAMPOS et al., 2007; RACANICCI; DANIELSEN; SKIBSTED, 2008; PAGLIOSA et al., 2010), incluindo os subprodutos da indústria ervateira, como os ramos. O resíduo do processamento das folhas e talos foi empregado com sucesso na produção de balas com alto teor de fibras por Vieira et al. (2008), bem como na elaboração de bebida cujos componentes principais foram as folhas e os ramos desidratados e triturados (CONTRERAS, 2007). O aproveitamento de subprodutos da indústria ervateira é decorrente de sua composição, já que a erva-mate apresenta os seguintes componentes: (a) sais minerais, como o boro, cálcio, cobre, manganês e magnésio (MALIK, et al., 2008); (b) metilxantinas, como a cafeína (0,8 a 0,9 %), teobromina (0,08 a 0,16 %), teofilina (em teores menores do que 0,02 %) (MAZZAFERA, 1994); (c) saponinas triterpênicas (GOSMANN et al., 1995; TAKETA et al., 2004); (d) óleos essenciais (MACHADO et al., 2007); (e) clorofila (MALHEIROS, 2007); (f) compostos fenólicos (BASTOS; TORRES, 2003; PREDIGER et al., 2008), entre outros.

## 1.2 Os compostos fenólicos da erva-mate

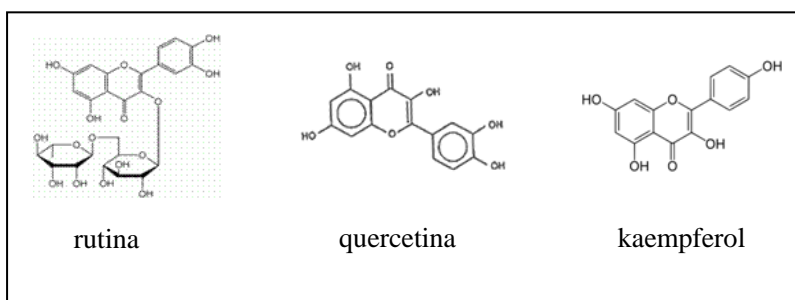
Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que possuem pelo menos um anel aromático em que no mínimo um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (Figura 1.4). A estrutura desses compostos apresenta uma grande diversidade, podendo ser simples ou complexas (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).



**Figura 1.4:** Estrutura básica de um composto fenólico.

Fonte: Mello (2008).

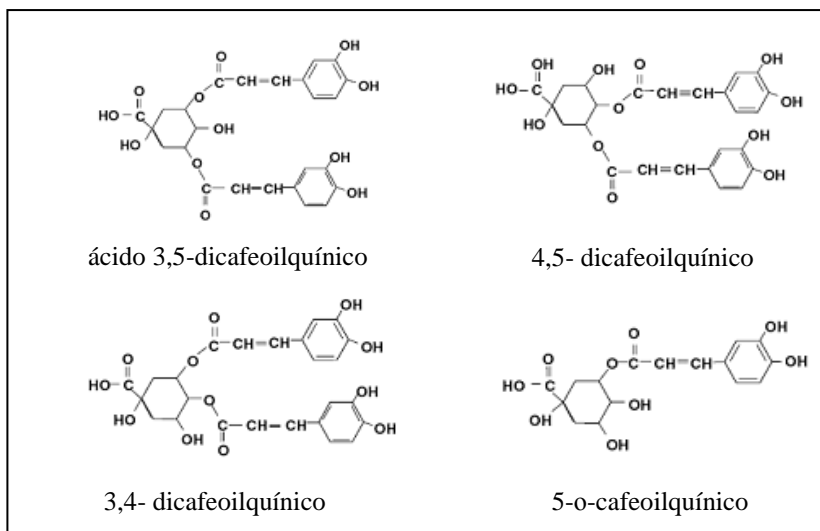
Os grupos fenólicos estão divididos em dois principais, ou seja, os ácidos fenólicos e os flavonóides (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007), sendo que ambos encontram-se na erva-mate. O primeiro grupo, os ácidos fenólicos, representa aproximadamente 90 % dos fenólicos totais (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007), enquanto o segundo, os flavonóides, que apesar de serem os mais diversificados na natureza (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007), encontram-se em menores quantidades na erva-mate (FILIP et al., 2001), e são representados pela rutina, quercetina e kaempferol (HECK; DE MEJIA, 2007) (Figura 1.5).



**Figura 1.5: Estrutura química dos flavonóides presentes na erva-mate.**

Fonte: Sigma-Aldrich (2009).

Dentre os ácidos fenólicos que constituem a erva-mate, os derivados do ácido cafeico são os de maior representatividade, principalmente os ácidos 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico e os ácidos clorogênicos (FILIP et al., 2001) (Figura 1.6). Bravo, Goya e Lecumberri (2007) identificaram na erva-mate os seguintes isômeros do ácido clorogênico: o ácido 3-*o*-cafeoilquínico (ácido neoclorogênico), o ácido 5-*o*-cafeoilquínico (ácido clorogênico) e o ácido 4-*o*-cafeoilquínico (criptoclorogênico).



**Figura 1.6:** Estrutura química dos principais ácidos fenólicos presentes na erva-mate.

Fonte: Sigma-Aldrich (2009).

Os compostos fenólicos presentes na erva-mate têm sido relacionados à sua capacidade antioxidante *in vitro* (FILIP et al., 2000; SCHINELLA et al., 2000; SALDANHA, 2005) e *in vivo* (GUGLIUCCI, 1996; MATSUMOTO, 2008; DA SILVA et al., 2008). Os mecanismos de ação que inibem a oxidação de diversos substratos são relativos à capacidade dos fenólicos em seqüestrarem radicais livres, formados no início do processo de oxidação, bem como da sua atuação como quelantes de metais (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1994). Portanto, Soares (2002) sugere que estes compostos atuam nas etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo, com formação também de produtos intermediários relativamente estáveis, em decorrência da ressonância do anel aromático presente nos compostos fenólicos.

Os compostos químicos presentes na erva-mate têm sido estudados a fim de verificar suas possíveis propriedades biológicas. As bebidas a base de *Ilex paraguariensis* St. Hil. apresentam propriedades digestiva e hepatoprotetora (GORZALCZANY et al., 2001), bem como ação estimulante sobre o sistema nervoso central (MENDES; CARLINI, 2007). Veigas Júnior et al. (2004) e Prediger et al. (2008) sugerem que a erva-mate pode atuar na prevenção de doenças neurodegenerativas.

Estudos *in vivo* mostram também a erva-mate como um potente fator antiobesidade tanto em animais (PANG; CHOI; PARK, 2008; ARÇARI, 2009) quanto em humanos (ANDERSEN; FOGH, 2001), cujo efeito pode ser atribuído à cafeína, que possui atividade estimulante e lipolítica (RATES, 2007), e às saponinas que parecem interferir no metabolismo do colesterol além de retardar a absorção intestinal de gordura, através da inibição da atividade da lipase pancreática (HAN et al., 2002). Já Görge et al. (2005), Schinella, Fantinelli e Mosca (2005) e Schinella et al. (2009) relatam que extratos de erva-mate parecem apresentar efeito cardioprotetor em ratos, e creditam o mesmo à sua atividade antioxidante.

### 1.2.1 A extração de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, em sua maioria, são encontrados na natureza sob a forma de ésteres ou de heterosídeos visto que são bastante instáveis para ocorrer na sua forma livre. Dessa forma, possuem solubilidade em água e em solventes orgânicos polares (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007), variáveis com o grau de polimerização, com a interação de outros compostos da matéria-prima, e com a formação de complexos insolúveis. Desta forma, verifica-se que não há um procedimento de extração capaz de extrair todos os fenólicos ou uma determinada classe destes compostos de uma matéria-prima. Os líquidos mais utilizados na extração desses compostos são o metanol, o etanol, o acetato de etila e a água, assim como as suas misturas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Entretanto, a maior parte dos estudos sobre compostos fenólicos presentes na erva-mate utilizam água quente como agente de extração (FILIP et al., 2001; CARDOZO JR et al., 2007; HECK; SCHMALKO; DE MEJIA, 2008; FURGERI et al., 2009).

O rendimento da extração de compostos solúveis do extrato aquoso da erva-mate, inclusive os fenólicos, depende de diversos fatores como o tempo de contato da erva com a água, temperatura da água, grau de subdivisão da erva e do contato efetivo das fases (GIULIAN, 2005; NACZK; SHAHIDI, 2006).

Uma forma de aumentar o teor de compostos fenólicos de um extrato seria através de uma tecnologia de concentração. A concentração tem como objetivo a eliminação parcial do líquido extrator, levando à obtenção de um produto intermediário concentrado. Existem diversas formas de remoção da fase líquida de extratos, sendo as principais técnicas baseadas na utilização do calor (SONAGLIO et al., 2007). No entanto, sabe-se que devido às altas temperaturas empregadas na

evaporação térmica tradicional mudanças físicas, químicas e biológicas da matéria-prima podem ocorrer, resultando em perda de qualidade do produto (LEWICKI, 2006).

Os compostos fenólicos são sensíveis ao calor (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007), levando os pesquisadores a optar por diferentes métodos de concentração. A tecnologia de membranas tem sido utilizada como alternativa para a concentração de diversos compostos em diferentes matérias primas, visto que não utiliza altas temperaturas (NWUHA, 2000). São diversos os exemplos de aplicação dessa tecnologia na concentração de compostos, como por exemplo, licopeno em goiaba (CLARETO, 2007); proteínas do soro lácteo (BOSCHI, 2006; BALDASSO, 2008) e compostos fenólicos em extratos de sementes de cacau (SARMENTO et al. 2008).

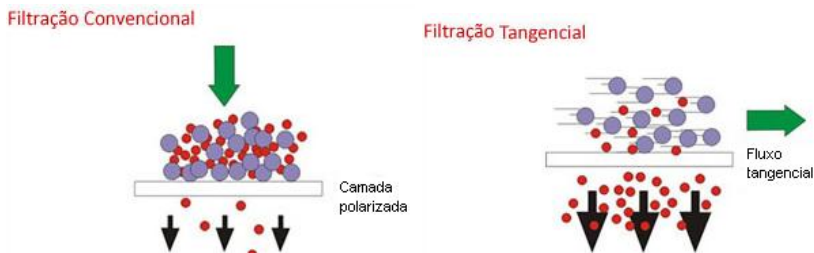
### 1.3 Processos de Separação por Membranas (PSM)

O processo de separação por membranas (PSM) utiliza membrana no fracionamento de misturas, soluções e suspensões envolvendo espécies de tamanho e natureza química diferentes, com intuito de separar misturas, purificar determinado composto, concentrar ou clarificar uma dissolução (GEKAS; BARALLA; FLORES, 1998).

A membrana consiste em uma fase permeável ou semipermeável, sendo frequentemente um sólido polimérico, que restringe o movimento de certas substâncias. Essa fase é essencialmente uma barreira que controla a velocidade relativa de transporte de diversas substâncias através dela mesma, resultando em um líquido, de composição distinta, que ultrapassa a membrana, denominado de permeado; e em outro líquido que não ultrapassa a membrana, definido como concentrado (SCOTT; HUGHES, 1996).

O PSM pode ser realizado por dois métodos distintos, denominados de filtração convencional (*dead end*) e filtração tangencial (*crossflow*) (Figura 1.7). Na filtração tangencial o escoamento do fluido ocorre de forma tangente à membrana. Desta forma, não ocorre a formação de camada na superfície da membrana, possibilitando a continuidade e melhora da eficiência do processo (DZIEZAK, 1990).

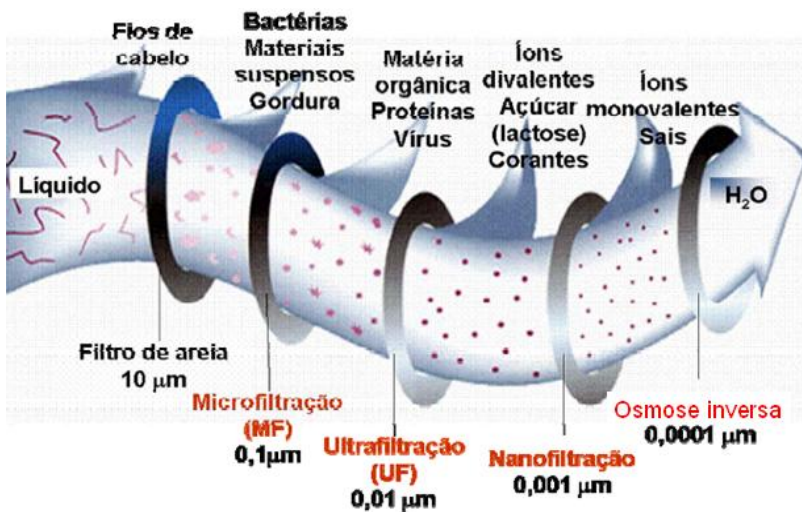




**Figura 1.7:** Esquema ilustrativo dos métodos de filtração pelo processo de separação por membranas.

Fonte: DBD filtros (2009).

Os PSM utilizados na indústria de alimentos utilizam a pressão como força motriz, sendo os principais a osmose inversa (OI), a ultrafiltração (UF), a microfiltração (MF) e a nanofiltração (NF). Esses processos diferem entre si pelas faixas de pressão aplicadas para ocorrer a filtração e pelo tamanho dos poros da membrana (GEKAS; BARALLA; FLORES, 1998) (Figura 1.8).



**Figura 1.8:** Representação esquemática da separação e/ou concentração de partículas nos diferentes procedimentos que empregam membranas.

Fonte: T.I.A. (2009).

Outro fator importante que deve ser considerado na diferenciação dos tipos de PSM é o *cut-off*, que significa a retenção pela membrana de 90 % da massa molar do menor composto presente no fluido (expressa em Daltons ou em g/mol) (GEKAS; BARALLA; FLORES, 1998).

O controle e a eficiência do PSM são realizados de acordo com alguns parâmetros (CHERYAN, 1998), como por exemplo, o fator de redução volumétrico, o cálculo do coeficiente de retenção, o fluxo do permeado, a pressão de entrada, a pressão de saída, entre outros.

O fator de redução volumétrico (FRV), que avalia a redução do volume do fluido alimentado durante o processo, ou seja, a relação entre o volume no início do PSM ( $V_a$ ) (L) e o volume do concentrado ( $V_c$ ) (L) no final do processo, é dado pela Equação 1 (GÖNDER, Z. B.; ARAYICI, S.; BARLAS, 2011).

$$FRV = \frac{V_a}{V_c} \quad \text{Equação 1}$$

Já o coeficiente de retenção indica a fração de um componente solúvel que é retido pela membrana em relação às condições de volume do fluido (Equação 2) (GÖNDER, Z. B.; ARAYICI, S.; BARLAS, 2011).

$$R(\%) = \left( 1 - \frac{C_p}{C_c} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde  $C_p$  representa a concentração do soluto no permeado e  $C_c$  a concentração do soluto no fluido concentrado.

O fluxo do permeado ( $J$ ) ( $L/h.m^2$ ) pode ser obtido através da Equação 3,

$$J = \frac{V_p}{t \cdot A_p} \quad \text{Equação 3}$$

onde  $V_p$  indica o volume do permeado obtido durante o processo,  $A$  a área filtrante útil da membrana e  $t$  o tempo de filtração.

Durante o PSM ocorre uma diminuição de  $J$  com o tempo, sendo essa redução decorrente de fenômenos limitantes do fluxo como a camada de polarização e o *fouling* (CHERYAN, 1998). A camada de

polarização consiste no aumento da concentração dos compostos retidos na superfície da membrana em sistemas de filtração tangencial, sendo que pode ser reduzida através do aumento da velocidade do fluxo tangencial e mantendo constante o fluxo do permeado, porém não é possível eliminar completamente esse fenômeno (GALLAGHER, 1996). Já o *fouling* é um fenômeno consequente da deposição e acúmulo de componentes da alimentação nos poros da membrana, devido à interação entre a membrana e os solutos presentes no fluido (CHERYAN, 1998). Esse fenômeno provoca um declínio irreversível de *J*, implicando na necessidade de encerrar o processo e realizar a limpeza da membrana (VAN DER BRUGGEN; MÄNTTÄRI; NYSTRÖMB, 2008).

Dentre todos os PSM tem-se a nanofiltração (NF). O interesse na NF surgiu primeiramente no tratamento de águas residuais e na produção de água potável, sendo esta a sua maior aplicação quando se considera volume de processo (VAN DER BRUGGEN; MÄNTTÄRI; NYSTRÖMB, 2008). Entretanto, as indústrias farmacêuticas e alimentícias empregam a NF como método de concentração de compostos, já que envolve baixo custo quando comparado aos demais métodos tradicionais, devido ao baixo consumo energético (VAN DER BRUGGEN; MÄNTTÄRI; NYSTRÖMB, 2008).

Na concentração de compostos a NF tem sido utilizada em alguns estudos, como por exemplo, as concentrações de compostos fenólicos de extratos das sementes de cacau (SARMENTO, 2007); de catequinas do chá preto (TODISCO; TALLARICO; GUPTA, 2002); de catequinas e compostos fenólicos do chá-verde (NWUHA, 2000); de compostos fenólicos presentes em extratos aquosos de uva destilada e fermentada (DÍAZ-REINOSO et al., 2009), em extrato de própolis (MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010) e em folhas de erva-mate (MURAKAMI, 2010); de isoflavonas presentes em extrato desengordurado de soja (BENEDETTI et al., 2011).

#### **1.4 Hidrólise enzimática e a enzima $\beta$ -glicosidase**

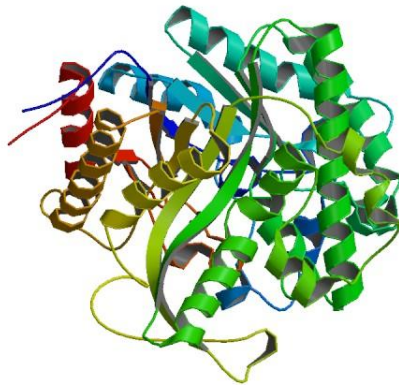
A hidrólise trata-se de uma reação com a quebra de ligações químicas em meio aquoso. Quando os catalisadores para este tipo de reação são enzimas, tem-se a hidrólise enzimática. Ao contrário dos catalisadores comuns, as enzimas apresentam uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação. O mecanismo de ação pelas quais as enzimas catalisam as reações está relacionado com a redução na

energia livre de ativação, bem como pela estabilização do substrato no seu estado de transição devido à especificidade do sítio ativo enzimático (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2005).

Diversos fatores estão relacionados com a atividade das enzimas, como temperatura, pH e concentração do substrato. Vale ressaltar que cada enzima responde diferentemente a alterações destes fatores, sendo que devem ser mantidos na faixa ótima para atividade individual de cada enzima a fim de otimizar a hidrólise (BISSWANGER, 2004).

As enzimas são classificadas em seis grupos conforme com o tipo de reação catalisada, tendo o EC de 1 a 6. O número 1 corresponde às enzimas oxidorreduções, o 2 às transferases, o 3 às hidrolases, o 4 às liases, o 5 às isomerases, e o 6 às ligases. Dentre as enzimas hidrolases, têm-se as que participam da quebra das ligações covalentes em carboidratos, classificadas como glicosilases, recebendo o número 2, seguido do número 3 (hidrolase) na classificação da EC. O terceiro número sistemático da enzima refere-se ao tipo de ligação glicosídica que esta é capaz de clivar, sendo o número 1 correspondente aquelas que clivam ligações *O*- and *S*-glicosídicas (NC-IUBMB, 2011).

As  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21) são um grupo de enzimas presentes em diversos sistemas celulares de plantas e de animais. Estas enzimas são capazes de clivar as ligações  $\beta$ -glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos ou outros conjugados de glicose (HSIEH; GRAHAM, 2001). A figura 1.9 mostra a estrutura tridimensional de uma  $\beta$ -glicosidase.



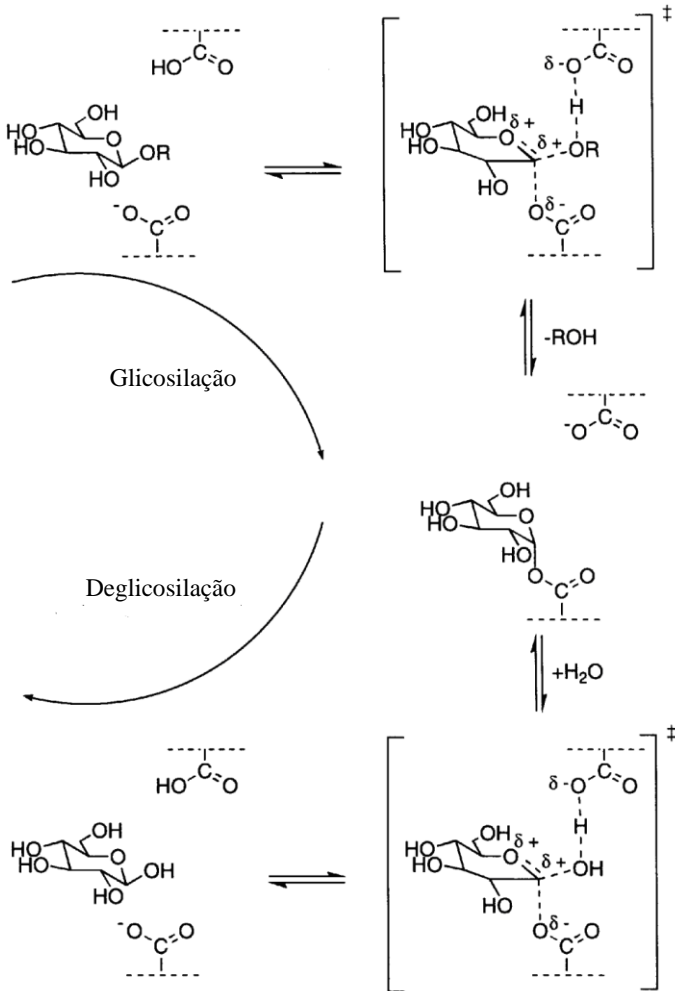
**Figura 1.9: Representação da estrutura terciária de uma  $\beta$ -glicosidase.**

Fonte: Protein Data Bank (2011).

Algumas famílias das  $\beta$ -glicosidasases possuem massa molar entre 55 a 65 kDa. Todas as  $\beta$ -glicosidasases isoladas de animais e plantas dicotiledôneas são glicosiladas e, portanto possuem massa molar maior do que o estimado pela sequência de suas cadeias peptídicas. Este grupo de enzimas é estável na faixa de pH de 4 a 10 nas temperaturas entre 0 °C e 4 °C. Com relação à estabilidade térmica, as  $\beta$ -glicosidasases mesofílicas são inativadas irreversivelmente acima de 50-55 °C, porém existem as provenientes de bactérias termofílicas que possuem temperatura ótima de aproximadamente 85 °C (ESEN, 2003).

As  $\beta$ -glicosidasases são chamadas de enzimas de ‘retenção’, já que a configuração anomérica da glicona do produto ( $\beta$ -D-glicose, por exemplo) é a mesma do substrato ( $\beta$ -D-glicosídeo). A hidrólise do substrato envolve dois passos, glicosilação e deglicosilação, envolvendo dois resíduos de ácido glutâmico específicos do sítio ativo (Figura 1.10). Na glicosilação ocorre formação de um intermediário covalente de enzima-substrato com a liberação da aglicona devido à protonação do oxigênio glicosídico por um resíduo de ácido glutâmico. Já na deglicosilação, ocorre remoção de um próton da água pelo segundo resíduo de ácido glutâmico, resultando em um grupamento hidroxila que ataca a ligação covalente entre a glicona e a enzima, regenerando o resíduo glutâmico enzimático (ESEN, 2003).

Este grupo de enzimas tem sido foco de muitos estudos recentes devido a sua importância em diversos processos biotecnológicos. Wie et al. (2007) verificaram a ação da  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus niger* na modificação de glicosídeos de saponinas de *Platycodon grandiflorum*, resultando no aumento da atividade biológica destes compostos. A  $\beta$ -glicosidase é utilizada, em conjunto com outras enzimas glicosídicas, para produção de etanol da cana-de-açúcar, minimizando o preço mínimo de venda deste álcool (SAAD, 2010). Além disso, as  $\beta$ -glicosidasases têm sido utilizadas com sucesso em estudos de hidrólise de glicosídeos fenólicos, como por exemplo, os presentes em óleo de oliva (VIERHUIS et al., 2001) e em vinhos (LA TORRE et al., 2004; TODARO et al., 2008).



**Figura 1.10: Representação esquemática do mecanismo de ação da  $\beta$ -glicosidase na hidrólise enzimática de um substrato, sendo R um resíduo de glicose ou um grupo arila ou alquila.**

Fonte: Lawson, Warren e Withers (1998).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 14, p.243–250, 2001.

ARÇARI, D. P. **Efeitos biológicos do consumo de chá-mate (*Ilex paraguariensis*) frente à obesidade em camundongos. 2009.** 74f. Dissertação (Mestrado em Nutrição em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas, 2008.** 163f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

BENEDETTI, S., PRUDENCIO, E. S., MANDARINO, J. M. G., REZZADORI, K. PETRUS, J. C. C. Concentration of soybean isoflavones by nanofiltration and the effects of thermal treatments on the concentrate, *Food Research International* (2011), doi:10.1016/j.foodres.2011.04.032.

BISSWANGER, H. **Practical enzymology.** Wiley-vch: Alemanha, 2004. p. 260.

BOSCHI, J.R. **Concentração e purificação das proteínas do soro de queijo por ultrafiltração, 2006.** 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2009, 2010. In: banco de dados agregados, sistema IBGE de recuperação automática SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 05 de setembro de 2011.

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

CARDOZO JR, E. L.; FERRARESE-FILHO, O.; CARDOZO-FILHO, L.; FERRARESE, M. L.; DONADUZZIA, C. M.; STURION, J.A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p.553–558, 2007.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In. SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRS/Editora da UFSC, 2007. p.519-535.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. 3ª Ed. Artmed: São Paulo, 2005, p. 522.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**, Technomic Publishing Company, Lancaster, PA, 1998, 527p.

CLARETO, S. S. **Estudo da concentração de licopeno da polpa de goiaba utilizando o processo de microfiltração**, 2007. 149f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

CONTRERAS, P. D. **Desenvolvimento de bebida à base de subprodutos da indústria da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e verificação de sua atividade antioxidante**. 2007. 82f. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de alimentos da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

DA CROCE, D. M. **Cadeias produtivas do estado de Santa Catarina: erva-mate**. Epagri, Boletim Técnico n. 112, Florianópolis, SC, 2000. 41p.



DA SILVA, E. L.; NEIVA, T. J. C.; SHIRAI, M.; TERÃO, J.; ABDALLA, D. S. P. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, p. 973–979, 2008.

DBD FILTROS. **Membranas de ultrafiltração: processo tangencial**. Disponível em: < [http://www.dbdfiltros.com.br/ultrafiltracao\\_processo.htm](http://www.dbdfiltros.com.br/ultrafiltracao_processo.htm)>. Acesso em: 20 nov 2009.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Ultra and nanofiltration of aqueous extracts from distilled fermented grape pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p.587–593, 2009.

DZIEZAK, J. D. Membrane separation technology offers processors unlimited potential. **Food technology**, v. 44, n. 9, p.108-113, 1990.

ESEN, A.  $\beta$ -glucosidase. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A.G.J.; WONG, D. W. S. **Handbook of food enzymology**. New York/Basel: Marcel Dekker, INC.2003. 791–803p.

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

FILIP, R.; LOTITO, S. B.; FERRARO, G.; FRAGA C. G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, V. 20, n. 10, p. 1437–1446, 2000.

FURGERI, C.; NUNES T.C.F.; FANARO, G.B.; SOUZA, M.F.F.; BASTOS, D.H.M.; VILLAVICENCIO A.L.C.H. Evaluation of phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) processed by gamma radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, p. 639–641, 2009.

GALLAGHER, P. Applications of cross-flow membrane processes. In: SCOTT, K.; HUGHES, R. **Industrial membrane separation technology**. 1. ed. Glasgow: Blackie academic & professional, 1996. p.8–31.

GEKAS, V.; BARALLA, G; FLORES, V. Applications of membrane technology in the food industry. **Food Science and Technology International**, v. 4, n.5, p.311–328, 1998.

GIULIAN, R. **Estudo da composição elementar da erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2005, 109f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

GÖNDER, Z. B.; ARAYICI, S.; BARLAS, H. Advanced treatment of pulp and paper mill wastewater by nanofiltration process: Effects of operating conditions on membrane fouling. **Separation and Purification Technology**, v. 76, p.292–302, 2011.

GORZALCZANY, S.; FILIP, R.; ALONSO, M. R.; MINÕ, J.; FERRARO, G. E.; ACEVEDO, C. Choleric effect and intestinal propulsion of ‘mate’ (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p.291–294, 2001.

GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A. T.C.; SCHENKEL, E. P. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 3, p.438–441, 1995.

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

HAN, L.K., ZHENG, Y.N., XU, B., OKUDA, H., KIMURA, Y. Saponins from *platycodi radix* ameliorate high fat diet-induced obesity in mice. **Journal of Nutrition**, v. 132, p.2241–2245, 2002.

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

HECK, C.; SCHMALKO M.; DE MEJIA, E. G. Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p.8394–8403, 2008.

HSIEH, M. C.; GRAHAM, T. L. Partial purification and characterization of a soybean  $\beta$ -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. **Phytochemistry**, v. 58, p.995–1005, 2001.

LA TORRE, G. L.; LAGANÀ, G.; BELLOCCO, E.; VILASI, F.; SALVO, F.; DUGO, G. Improvement on enzymatic hydrolysis of resveratrol glucosides in wine. **Food Chemistry**, v. 85, p.259–266, 2004.

LAWSON, S. L.; WARREN, R. A. J.; WITHERS, S. G. Mechanistic consequences of replacing the active-site nucleophile Glu-358 in *Agrobacterium* sp.  $\beta$ -glucosidase with a cysteine residue. **Biochemistry Journal**, v. 330, p.203–209, 1998.

LEWICKI, P. P. Design of hot air drying for better foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p.153–163, 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.

MALHEIROS, G. C. **Estudo da alteração da cor e degradação da clorofila durante armazenagem de erva-mate tipo chimarrão**. 2007, 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2007.

MALIK, J.; SZAKOVA, J.; DRABEK, O.; BALIK, J.; KOKOSKA, L. Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions. **Food Chemistry**, v.111, p.520–525, 2008.

MATSUMOTO, R. L. T. **Atividade antioxidante do chá-mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2008. 103f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

MAZZAFERA, P. Caffeine, Theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 6, n. 2, p.149 – 151, 1994.

MELLO, B.C.B.S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p.533–539, 2010.

MENDES, R. F., CARLINI, E. A., Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 493–500, 2007.

MURAKAMI, Aureanna Nairne Negrão. **Concentração de compostos fenólicos de extrato aquoso de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1/2, p.95-111, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1523–1542, 2006.

NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY - NC-IUBMB. **Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of the enzymes by the reactions they catalyse**. 2011. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: março de 2011.

NWUHA, V. Novel studies on membrane extraction of bioactive components of green tea in organic solvents: part I. **Journal of Food Engineering**, v. 44, p.233–238, 2000.

OLIVEIRA, Y. M. M. de; ROTTA, E. Área de distribuição geográfica nativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10.; Silvicultura da erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1983, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1985. p.17–36. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 15).

PAGLIOSA, C. M. **Caracterização química do resíduo de ervais e folhas “in natura” de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. 2009. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

PAGLIOSA, C. M.; SIMAS, K. N.; AMBONI, R. D. M. C.; MURAKAMI, A. N. N.; PETKOWICZ, C. L. O.; MEDEIROS, J. D.; RODRIGUES, A. C.; AMANTE, E. R. Characterization of the bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Industrial Crops and Products**, v. 32, p.428–433, 2010.

PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, p.178–185, 2008.

PREDIGER, R. D. S.; FERNANDES, M. S.; WOPEREIS, D. R. S.; PEREIRA, V. S.; BOSSE, T. S.; SILVA, C. B. Da.; CARRADORE, R. S.; MACHADO, M. S.; CECHINEL-FILHO, V.; COSTA-CAMPOS, L. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p.465–473, 2008.

PROTEIN DATA BANK.  **$\beta$ -glicosidase da *Thermotoga marítima***. Disponível: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em: 02 de Maio de 2011.

RATES, S. M. K. Metilxantinas. In. SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRS/Editora da UFSC, 2007. 885–901p.

SAAD, M. B. W. **Avaliação técnica e econômica preliminar da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 138 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

SALDANHA, L. A. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*)**. 2005. 120f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.

SARMENTO, L. A.V.; MACHADO, R.A.F.; PETRUS, J. C.C.; TAMANINI, T. R.; BOLZAN, A. Extraction of polyphenols from cocoa seeds and concentration through polymeric membranes. **Journal of Supercritical Fluids**, v.45, p.64–69, 2008.

SARMENTO, L. A. V. **Obtenção e separação de polifenóis de sementes de cacau por extração supercrítica associada a membranas**. 2007. 91 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

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

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; TOURNIER, H.; PRIETO, J. M.; SPEGAZZINI, DEBENEDETTI, S.; MOSCA, S. M. Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex brasiliensis*: A comparative study with *Ilex paraguariensis* (yerba mate). **Food Research International**, v. 42, p.1403–1409, 2009.

SCHINELLA, G. R.; TROIANI, G.; DAVILA, V.; DE BUSCHIAZZO, P. M.; TOURNIER, H. A. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p.357–360, 2000.

SCOTT, K.; HUGHES, R. Introduction to industrial membrane processes. In: SCOTT, K.; HUGHES, R. **Industrial membrane separation technology**. 1. ed. Glasgow: Blackie academic & professional, 1996. p.1–7.

SIGMA-ALDRICH. **Products**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 22 de setembro de 2009.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição Campinas**, v. 15, n.1, p.71–81, 2002.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In. SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRS/Editora da UFSC, 2007. 289–326p.

TAKETA, A T. C.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G., PIRES, V. S.; SCHENKEL, E. P.; GUILLAUME D. Triterpenoids from Brazilian *Ilex* Species and Their in Vitro Antitrypanosomal Activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, p.1697–1700, 2004.

T.I.A. **Techniques Industrielles Appliquees**. Bollene, France. Disponível em:<[www.tia.fr](http://www.tia.fr)>. Acesso em 24 de novembro de 2009.

TODARO, A.; PALMERI, R.; BARBAGALLO, R. N.; PIFFERI, P. G.; SPAGNA, G. Increase of trans-resveratrol in typical Sicilian wine using  $\beta$ -Glucosidase from various sources. **Food Chemistry**, v. 107, p.1570–1575, 2008.

TODISCO, S.; TALLARICO, P.; GUPTA, B. B. Mass transfer and polyphenols retention in the clarification of black tea with ceramic membranes. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v. 3, p.255–262, 2002.

VAN DER BRUGGEN, B.; MÄNTTÄRI, M.; NYSTRÖMB, M. Drawbacks of applying nanofiltration and how to avoid them: A review. **Separation and Purification Technology**, v. 63, p.251–263, 2008.

VEIGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. DA S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos Naturais como Candidatos a Fármacos Úteis no Tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p.655–660, 2004.

VIEIRA, M. A.; ROVARIS, A. A.; MARASCHIN, M.; SIMAS, K. N.; PAGLIOSA, C. M.; PODESTÁ, R.; AMBONI, R. D. M. C.; PEDRO L. M. BARRETO, P. L. B.; AMANTE, E. R. Chemical Characterization of Candy Made of Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) Residue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p.4637–4642, 2008.

VIERHUIS, E.; SERVILI, M.; BALDIOLI, M.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J.; MONTEDORO G. Effect of Enzyme Treatment during Mechanical Extraction of Olive Oil on Phenolic Compounds and Polysaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p.1218-1223, 2001.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Stabilization of canola oil with flavonoids. **Food Chemistry**, v. 50, p.393–396, 1994.

WIE, H. J.; ZHAO, H. L.; CHANG, J. H.; KIM, Y. S.; HWANG, I. K.; JI, G. E. Enzymatic Modification of Saponins from *Platycodon grandiflorum* with *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.8908–8913, 2007.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In. SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRS/Editora da UFSC, 2007. p.577–614.



## **CAPÍTULO 2**

### **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**

Parte deste trabalho foi apresentada na forma de dois resumos no *VI Congresso Internacional de Nutrição Clínica Funcional*, São Paulo, Brasil, setembro de 2010.

Parte deste trabalho foi apresentada na forma de resumo no *XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Salvador, Brasil, novembro de 2010.

Artigo submetido à publicação na *Plant Foods for Human Nutrition* (ISSN: 0921-9668).



## 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

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a melhor condição para a obtenção do extrato aquoso da casca dos ramos residuais com maior teor de compostos fenólicos e investigar o teor destes compostos e a atividade antioxidante do concentrado obtido a partir da nanofiltração. A metodologia de superfície de resposta foi empregada para avaliar diferentes temperaturas e tempos de extração de compostos fenólicos durante a obtenção do extrato aquoso da casca dos ramos residuais da colheita da erva-mate. Um extrato otimizado, ou seja, com maior concentração de compostos fenólicos (1,55 mg equivalente de ácido clorogênico/mL) obtido quando utilizada temperatura de  $85 \pm 5$  °C e tempo de extração igual a 1,5 minuto, foi submetido a nanofiltração. Os teores de compostos fenólicos totais nos permeados e nos concentrados coletados em diferentes fatores de redução volumétricos (FRV de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0) foram diferentes do encontrado no extrato otimizado. Foi verificado também que o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante tiveram aumento à medida que o FRV aumentou, alcançando a maior porcentagem de retenção, igual a 99,77%, quando o FRV foi 6,0. Além disso, os compostos majoritários encontrados no extrato otimizado e nos concentrados (FRV 4,0 e 6,0) foram o ácido clorogênico e a epigalocatequina galato, os quais podem ser relacionados com a alta atividade antioxidante do extrato aquoso da casca dos ramos residuais da erva-mate.

*Palavras-chave: Ilex paraguariensis, casca dos ramos residuais da erva-mate, compostos fenólicos, concentrado, atividade antioxidante, nanofiltração.*

## **PHENOLIC COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE AQUEOUS EXTRACT OF BARK FROM RESIDUES FROM MATE TREE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) HARVESTING CONCENTRATED BY NANOFILTRATION**

### **ABSTRACT**

The goal of this study was to determine the best condition to obtain the highest total polyphenol content from mate bark aqueous extract and investigate the phenolic composition and antioxidant activity of the concentrate obtained during nanofiltration. The Response Surface Methodology was employed to determine the optimum condition for extraction of phenolic compounds from mate bark aqueous extract. The extract obtained from the best condition, which was at temperature of  $85 \pm 5$  °C and with extraction time of 1.5 minutes and approximately 1.55 mg chlorogenic acid equivalent/mL, was subjected to nanofiltration. The total polyphenol content values in the permeates and in the concentrates collected at different volume reduction factors (VRF of 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, and 6.0) were different from those detected in the optimized extract. The concentration of phenolic compounds and antioxidant activity increased when VRF was increased, reaching the highest retention percentage (% *R*) of 99.77 % when VRF was 6.0. Moreover, the major compounds detected in optimized mate bark extract and its concentrates (VRF 4.0 and 6.0) were chlorogenic acid and epigallocatechin gallate, which can be related to the high antioxidant activity of mate bark aqueous extract.

*Keywords: Ilex paraguariensis; mate bark aqueous extract; phenolic compounds; concentrate; antioxidant activity; nanofiltration.*

## 1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a sustentabilidade do meio ambiente tem incentivado muitos estudos a utilizar resíduos como uma importante fonte de compostos bioativos (FRADINHO et al., 2002; VÁZQUEZ et al., 2008; DE VASCONCELOS et al., 2010; ŞEN et al. 2010). Pagliosa et al. (2010a) estudaram a casca dos ramos residuais (diâmetro maior de 10 mm) da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) que eram descartados no solo durante a colheita, gerando aproximadamente 5 toneladas de resíduos sólidos por hectare. Estes autores revelaram maiores concentrações de compostos fenólicos neste resíduo quando comparado com as folhas da mesma planta.

A produção de extratos a partir de resíduos tem sido estudada (MARINOVA; YANISHLIEVA; KOSTOVA, 1994; BOCCO et al., 1998; BONILLA et al., 1999; VISIOLI et al., 1999; ADENEYE et al., 2006; NDIAYE et al., 2008) e na maioria deles o solvente extrator utilizado é a água. A infusão aquosa é considerada um bom método de extração, no entanto é necessário o controle de temperatura e tempo a fim de prevenir perdas e/ou destruição de compostos bioativos (ANDREO; JORGE, 2006). Destacam-se como compostos bioativos da erva-mate, os compostos fenólicos, que de acordo com Filip et al. (2001) possuem propriedades funcionais. Por outro lado, alguns autores (LEWICKI, 2006; JESUS et al., 2007) relataram a necessidade da utilização de extratos em alimentos na forma concentrada com intuito de aumentar o conteúdo de compostos bioativos (VINCZE; VATAI, 2004; XU; WANG, 2005; GILEWICZ-LUKASIK; KOTER; KURZAWA, 2007).

Ao contrário dos métodos tradicionais de concentração, o uso dos processos de concentração por membranas tem crescido por apresentarem diversas vantagens como baixas temperaturas e baixo consumo energético (MATTA; MORETTI; CABRAL, 2004). Esses processos são baseados no princípio de permeação seletiva de solutos através de membranas semipermeáveis. O líquido que é retido pela membrana é denominado concentrado e o líquido que passa através da membrana é denominado permeado. Na maioria dos processos de separação por membranas, como microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa, a força motriz para transferência de massa pela membrana é a pressão mecânica (MAROULIS; SARAVACOS, 2003). A nanofiltração é uma operação unitária que permite muitas aplicações como concentração e purificação de extratos (TSUI; CHERYAN, 2007), concentração de vinhos (BANVOLGYI et

al., 2006) bem como de sucos (VINCZE; STEFANOVITS-BÁNYAIB; VATAI, 2006) na indústria de alimentos.

O objetivo deste trabalho foi utilizar diferentes temperaturas e tempos de extração na obtenção do extrato aquoso da casca dos ramos residuais da colheita da erva-mate visando o maior teor de compostos fenólicos. Após, submeteu-se o extrato otimizado à nanofiltração a fim de obter a maior concentração destes compostos, sendo verificadas também as suas atividades antioxidantes.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

O reagente Folin-Ciocalteu foi obtido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila; (DPPH<sup>•</sup>) foi obtido pela Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). O carbonato de sódio foi adquirido da Vetec Química Fina Ltd. (Duque de Caxias, RJ, Brazil). Para as análises foram utilizados os padrões de ácido gálico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, epigallocatequina galato (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e ácido 4,5 dicafeoilquínico (Chengdy Biopurify Phytochemicals Ltd.). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico.

### **2.2 Preparo das amostras**

Ramos com diâmetro maior de 10 mm foram coletados aleatoriamente de árvores de *Ilex paraguariensis* St. Hil. com vinte anos de idade, plantadas em erval adensado em área de sub-bosque de floresta de araucárias, da cidade de Catanduvas, no Estado de Santa Catarina (27°S, 51°40'W, altitude 925 m).

O preparo das amostras consistiu na secagem das cascas do resíduo da erva-mate em estufa com circulação de ar (50 °C por 24h) e trituradas em moinho de martelo (Marconi, MA-580, Piracicaba, Brazil), após o tecido das cascas terem sido manualmente removidos dos ramos. As amostras desidratadas foram embaladas a vácuo em sacos de polietileno de alta densidade (embaladora a vácuo Selovac, modelo 200 B, São Paulo, SP, Brasil), submetidas a congelamento rápido em congelador de placas a  $-40 \pm 2^\circ \text{C}$  (Frigostrella, modelo PF-5, Cotia, SP, Brasil) e armazenadas em freezer a  $-18 \pm 2^\circ \text{C}$  até momento das análises.

### **2.3 Composição química da casca dos ramos residuais da erva-mate**

A umidade da casca do resíduo da erva-mate foi determinada através da secagem das amostras em estufa ( $105 \pm 2^\circ \text{C}$ ) até o peso constante e o resíduo mineral fixo foi resultante da incineração das amostras em forno mufla à  $550 \pm 1^\circ \text{C}$  e posterior pesagem das mesmas. Os teores de fibras alimentares total, solúveis e insolúveis foram determinados pelo método enzimático-gravimétrico. A dosagem de nitrogênio total determinada pelo método Kjeldahl foi utilizada para o cálculo do teor de proteína (nitrogênio x 6,25). Lipídios totais foram

extraídos com éter no sistema Soxhlet. Os teores dos minerais foram determinados por digestão ácida seguida de espectrofotometria de absorção atômica utilizando espectrofotômetro Perkin-Elmer Analyst 300 (Manasquan, New Jersey, USA) e por fotometria de chama (B262 Micronal São Paulo, Brasil) com escala de leitura de 0 to 150 mg/L. Padrões de metais foram utilizados para curvas de calibração. Todas as análises foram realizadas em triplicata utilizando os métodos da AOAC (2005).

## **2.4 Preparo dos extratos**

Os extratos foram preparados com 1 g da casca dos ramos residuais da erva-mate desidratada e triturada e 100 mL de água destilada, de acordo com Bastos et al. (2006), com modificações. As temperaturas de extração foram controladas com termopar tipo K posicionado dentro dos extratos, que foi conectado a unidade de aquisição de dados 34970A (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA). Após o procedimento de extração, os extratos foram filtrados com filtro de papel (12,5 cm diâmetro e 25  $\mu$ m tamanho do poro) por meio de uma bomba de vácuo (Primatec, 131, Itu, Brazil) e os volumes foram completados a 100 mL (1% m/v).

## **2.5 Delineamento experimental**

A metodologia superfície de resposta (MSR) foi utilizada para otimizar a extração de compostos fenólicos do extrato aquoso da casca do resíduo da erva-mate. O delineamento central composto (DCC) para duas variáveis independentes foi utilizado neste estudo. As variáveis codificadas (Temperatura –  $X_1$  e Tempo –  $X_2$ ) e seus valores reais estão apresentadas na Tabela 2.1. O delineamento experimental foi composto de 13 ensaios; quatro fatoriais (combinação dos níveis -1 e +1), quatro axiais (uma variável no nível  $\pm \alpha$  e a outra em zero) e cinco repetições no ponto central (duas variáveis no nível zero). As repetições no centro do delineamento foram realizadas para estimar o erro puro. Devido a erros sistemáticos, todos os experimentos foram realizados de forma aleatória a fim de minimizar o efeito da variabilidade inexplicável sobre as respostas observadas. A variável dependente (resposta) foi o teor de compostos fenólicos totais (CFT). A condição otimizada determinada pelo delineamento experimental foi utilizada para preparar o extrato, denominado extrato otimizado, que foi submetido à nanofiltração.



**Tabela 2.1: Níveis codificados e valores reais das variáveis independentes utilizadas no delineamento central composto para extração de compostos fenólicos totais da casca do resíduo da erva-mate.**

Variáveis independentes	Níveis codificados				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Temperatura (°C)	64,82	70,00	82,50	95,00	100,20
Tempo (min)	1,50	3,00	6,50	10,00	11,50

$\alpha = \pm 1.41421$  para duas variáveis independentes.

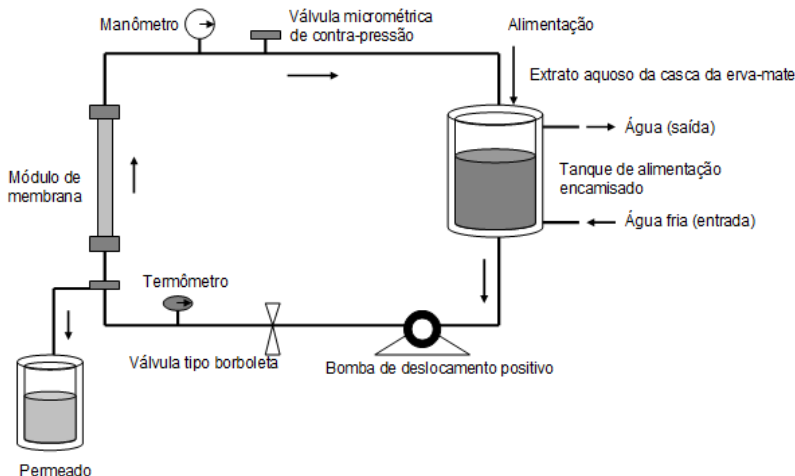
## 2.6 Nanofiltração

A nanofiltração do extrato otimizado foi realizada em uma unidade de filtração piloto operando com fluxo tangencial (Figura 2.1). Utilizou-se uma membrana orgânica de polifluoreto de vinilideno com *cut off* de 150-300 Da e área filtrante útil de 0,9 m<sup>2</sup> (Osmonics membranes, HL2521TF, Minnesota, USA). Os parâmetros de operação controlados durante o processo foram temperatura de  $22 \pm 1$  °C, a qual é apropriada para preservar os compostos fenólicos e pressão de 6 bar. Durante a nanofiltração, o fluxo do permeado ( $J$ ) foi determinado de acordo com a Equação 1:

$$J = \frac{V_p}{t \cdot A_p} \quad (\text{L/h.m}^2) \quad \text{Equação 1,}$$

onde  $V_p$  (L) é o volume do permeado coletado durante o intervalo de tempo  $t$  (h) e  $A_p$  (m<sup>2</sup>) é a área de superfície de permeação da membrana.

O experimento de concentração foi realizado com reciclagem contínua do concentrado e remoção do permeado. O fator de redução volumétrico (FRV) foi calculado pela razão entre o volume alimentado inicial (L) e o volume do concentrado remanescente (L) após o tempo de processo. Amostras do permeado e concentrado foram coletadas em diversos tempos de processo, bem como em diferentes FRV (1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0).



**Figura 2.1: Esquema simplificado da unidade de filtração piloto utilizado neste trabalho.**

Fonte: Acervo do autor (2011).

Foi considerado o melhor processo de filtração o concentrado com maior teor de compostos fenólicos totais (CFT). A eficiência do processo foi também avaliada utilizando a porcentagem de retenção, que resulta da relação entre o teor de compostos de interesse no permeado e nas soluções concentradas, e indica a habilidade da membrana de reter estes compostos dentro das condições experimentais. A porcentagem de retenção foi calculada de acordo com a Equação 2:

$$R(\%) = \left( 1 - \frac{C_p}{C_c} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2,}$$

onde  $C_p$  (mg/mL) é a concentração de compostos fenólicos totais no permeado e  $C_c$  (mg/mL) é a concentração de compostos fenólicos totais no concentrado.

Antes e após a nanofiltração a membrana foi higienizada com solução alcalina, de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante.

A atividade antioxidante bem como a identificação e quantificação dos compostos fenólicos foram determinados no extrato otimizado e concentrado em diferentes FRVs que apresentaram

diferenças entre seus valores de CFT, representando desta forma, o comportamento destes compostos durante a nanofiltração.

## **2.7 Determinação do teor de compostos fenólicos (CFT)**

Os teores de compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos, permeados e concentrados foram determinados seguindo a metodologia modificada de Folin–Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Diluições apropriadas dos extratos foram oxidadas com o reagente Folin-Ciocalteu e a reação neutralizada com carbonato de sódio. A absorbância da cor azul resultante foi medida após 60 min em espectrofotômetro UV-visível (Hitachi modelo U-1800) a 725 nm. O teor de CFT foi expresso como equivalentes de ácido clorogênico em miligramas por 1 mL de extrato (mg EAC/mL).

## **2.8 Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante do extrato otimizado e dos concentrados foi determinada utilizando o radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) conforme o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) modificado por Sanchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998). A cem micro litros de cada amostra foram adicionados 3,9 mL de solução metanólica de DPPH<sup>•</sup> (60 µM) e transferidos para uma cubeta de quartzo. A mudança de coloração de violeta para amarela e sua redução da absorbância foi determinada a 515 nm utilizando espectrofotômetro UV – VIS (Hitachi model U–1800) a cada 5 minutos por 15 minutos e a cada 15 minutos até a estabilização da reação. Os resultados foram expressos em EC<sub>50</sub> (mg amostra/gDPPH), calculado a partir da concentração de compostos fenólicos necessária para sequestrar 50 % do radical DPPH inicial.

## **2.9 Identificação e quantificação de compostos fenólicos**

### **2.9.1 Preparação da amostra**

Cinquenta mililitros de cada extrato otimizado e concentrado foram misturados com 150 mL de acetato de etila (1:3; v/v), mantidos a  $10 \pm 1$  °C, sem a presença de luz por 12 h. A fase orgânica foi coletada e o acetato de etila foi removido por evaporação, tendo o nitrogênio como gás de arraste. O resíduo final foi redissolvido em 500 µL de metanol e

centrifugado a 3000 rpm/min. O extrato resultante foi armazenado à  $-20 \pm 2$  °C até o momento da análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com Schuldt et al. (2005).

### 2.9.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises de cromatografia foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu LC-10), equipado com uma coluna de fase reversa (Nucleosil C<sub>18</sub>, 4.6 mm Ø x 250 mm), na temperatura de 40 °C e detector UV – Vis (Shimadzu SPD 10A,  $\lambda = 280$  nm). Os analitos foram eluídos isocraticamente, com fluxo de 1 mL/min, utilizando como fase móvel uma mistura de água: ácido acético: *n*-butanol (350:1:10, v/v/v). O volume de injeção foi de 5 µL por amostra.

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos padrões com os das amostras de extrato otimizado e concentrado. A quantificação dos compostos fenólicos foi baseada nas áreas dos picos das curvas de calibração construídas para cada composto identificado nas amostras. As curvas mostraram boa linearidade e seguiram a lei de Beer ( $R^2 = 0,99$ ).

## 2.10 Análise estatística

Os coeficientes de regressão para os termos linear, quadrático e interação entre os termos foram determinados usando regressão linear múltipla (RLM). A significância de cada de coeficiente de regressão foi julgada estatisticamente computando o valor de *t* do erro puro obtido das replicatas do ponto central deste experimento. A análise de variância (ANOVA) foi empregada para validar o modelo. Os coeficientes de regressão foram então utilizados para gerar superfícies de resposta. Quando necessário, os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, seguido pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para verificar diferenças significativas. Diferenças foram consideradas quando  $p < 0,05$ . Todos os cálculos e figuras foram realizados utilizando o software STATISTICA versão 6.0 (2001) (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Composição química da casca dos ramos residuais da erva-mate

Os resultados obtidos para os teores de proteínas, lipídios e fibras totais (Tabela 2.2) foram semelhantes aos encontrados por Pagliosa et al. (2010a) ao estudar a casca dos ramos residuais da erva-mate. O teor de fibras totais indica que estes ramos podem ser considerados importante fonte de fibras alimentares, principalmente de fibras insolúveis, já que estão em altos teores nesta matéria-prima quando comparado a erva-mate comercial (21,89 %) ou em folhas de erva-mate (39,81 %), segundo Esmelindro et al. (2002) e Pagliosa et al. (2010a), respectivamente. O teor de resíduo mineral fixo (Tabela 2.2) mostrou-se semelhante ao encontrado por Vieira et al. (2008) em pó de mate, gerado pela moagem de resíduos de folhas e galhos da erva-mate.

**Tabela 2.2: Composição química da casca dos ramos residuais da *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Base seca).**

Composição	Teores*
Umidade (g/100 g)	7,68 ± 0,09
Resíduo mineral fixo (g/100 g)	6,11 ± 0,06
Zinco (mg/100 g)	9,18 ± 0,01
Ferro (mg/100 g)	17,52 ± 0,01
Magnésio (mg/100 g)	434,66 ± 0,01
Manganês (mg/100 g)	36,17 ± 0,01
Cálcio (mg/100 g)	1045,00 ± 0,01
Sódio (mg/100 g)	63,45 ± 0,01
Potássio (mg/100 g)	1658,90 ± 0,01
Fósforo (mg/100 g)	62,77 ± 0,01
Proteína (g/100 g)	8,04 ± 0,05
Lipídios (g/100 g)	2,65 ± 0,33
Fibra alimentar total (g/100 g)	56,03 ± 0,94
Fibra insolúvel (g/100 g)	52,05 ± 0,51
Fibra solúvel (g/100 g)	3,98 ± 0,43

\*Valores médios ± desvio padrão das análises realizadas em triplicata.

Os teores dos minerais presentes na casca dos ramos residuais da erva-mate (Tabela 2.2) foram semelhantes ao encontrado por Malik et al. (2008) e Giulian et al. (2009), também para *Ilex paraguariensis*, porém superiores ao encontrado em outras plantas estimulantes como café (GREMBECKA; MALINOWSKA; SZEFER, 2007) e chá preto (ÖZCAN et al., 2008). Entretanto, algumas diferenças foram verificadas quando comparados aos resultados de Pagliosa et al. (2010a), que para a casca dos ramos residuais da erva-mate obtiveram 11,34 mg/100g para ferro e 10,74 mg/100g para sódio. Além disso, Pagliosa et al. (2010a) relataram a presença de cobre mas não de magnésio ou fósforo, diferente deste estudo (Tabela 2.2). Por outro lado, os minerais com quantidades mais elevadas em ambos os estudos foram cálcio e potássio. De acordo com Özcan et al. (2008) as diferenças encontradas no teor de minerais podem ser atribuídas ao tempo de colheita, propriedades do solo e diferenças climáticas.

### **3.2 Otimização da extração de compostos fenólicos totais pela superfície de resposta**

O delineamento experimental consistiu em 13 ensaios, apresentados na Tabela 2.3 juntamente com os valores experimentais para o teor de compostos fenólicos totais (CFT). A tabela 2.4 mostra a análise de variância dos compostos fenólicos extraídos da casca dos ramos residuais da erva-mate resultante deste delineamento. O teste *t* para o modelo foi significativo ( $p < 0,05$ ) para o termo quadrático da temperatura, indicando que apenas essa variável pode explicar a variação observada para o teor de compostos fenólicos totais dos extratos aquosos da casca dos ramos residuais da erva-mate dentro dos níveis estudados neste trabalho. Desta forma, o termo linear e o termo quadrático para o tempo de extração não apresentaram nenhuma influência ( $p > 0,05$ ) na extração de compostos fenólicos da casca de *I. paraguariensis*. De acordo com Silva, Rogez e Larondelle (2007), Spigno, Tramelli e De Faveri (2007) e Thoo et al. (2010) a temperatura é uma variável que possui influência direta na extração de compostos fenólicos. No entanto, esses estudos indicam que o tempo também é um fator que favorece a extração fenólica, ao contrário do encontrado no presente trabalho. Possivelmente, essa diferença foi devido a matriz estrutural da casca do resíduo da erva-mate ser diferente das matrizes estudadas por esses autores, assim como sugerido por Jerez et al. (2006) que constataram que o rendimento da extração de fenólicos da casca do pinheiro foi somente influenciado pela temperatura, e não pelo tempo.

**Tabela 2.3: Delineamento central composto (DCC) para duas variáveis utilizadas na extração de compostos fenólicos totais da casca dos ramos residuais da erva-mate.**

Ensaio	Valores codificados		Valores reais		CFT (mg EAC/mL) <sup>a</sup>
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Temperatura (°C)	Tempo (min)	
1	-1	-1	70,00	3,00	1,39
2	+1	-1	95,00	3,00	1,53
3	-1	+1	70,00	10,00	1,35
4	+1	+1	95,00	10,00	1,48
5	-α	0	64,82	6,50	1,28
6	+α	0	100,20	6,50	1,30
7	0	-α	82,50	1,50	1,49
8	0	+α	82,50	11,50	1,53
9	0	0	82,50	6,50	1,53
10	0	0	82,50	6,50	1,56
11	0	0	82,50	6,50	1,52
12	0	0	82,50	6,50	1,58
13	0	0	82,50	6,50	1,52

<sup>a</sup>Valores médios.

CFT = compostos fenólicos totais.

EAC = equivalentes de ácido clorogênico.

**Tabela 2.4: Análise de variância dos compostos fenólicos totais presentes no extrato aquoso da casca dos ramos residuais da erva-mate.**

Variáveis	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	<i>t</i>	Valor <i>p</i>
<b>Linear</b>					
Temperatura - X <sub>1</sub>	0,011361	1	0,011361	5,10855	0,058313
Tempo - X <sub>2</sub>	0,000104	1	0,000104	0,04686	0,834790
<b>Quadrático</b>					
Temperatura - X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,094101	1	0,094101	42,31371	0,000333*
Tempo - X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,000334	1	0,000334	0,15011	0,709944
<b>Interação</b>					
Temperatura.Tempo - X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,000049	1	0,000049	0,02196	0,886361
Erro	0,15567	7	0,002224		
Total	0,121663	12			

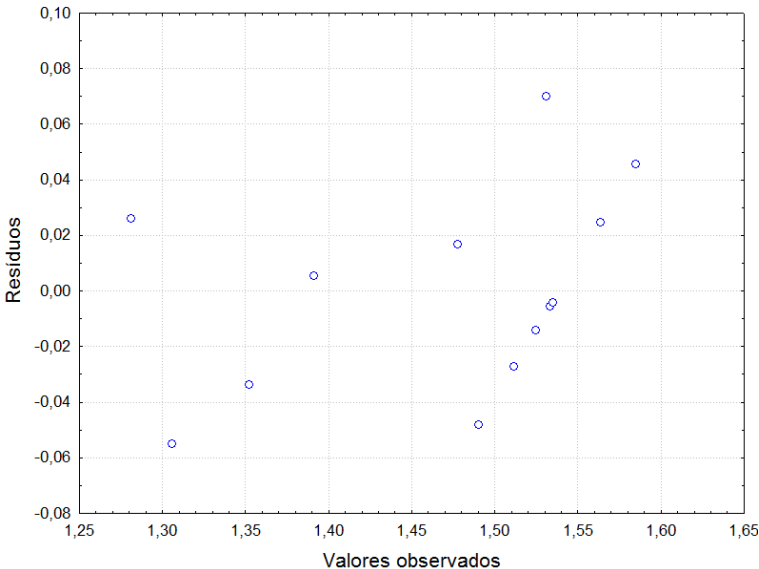
\*Valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). GL = graus de liberdade.

Foi realizada análise de regressão linear múltipla nos dados experimentais para calcular os coeficientes da equação polinomial de segunda ordem, mostrados na equação 3:

$$Y = -3,73300 + 0,12479X_1 - 0,00074X_1^2 \quad \text{Equação 3,}$$

onde  $Y$  corresponde ao teor de compostos fenólicos totais (mg EAC/mL),  $X_1$  ao termo linear de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e  $X_1^2$  ao termo quadrático de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

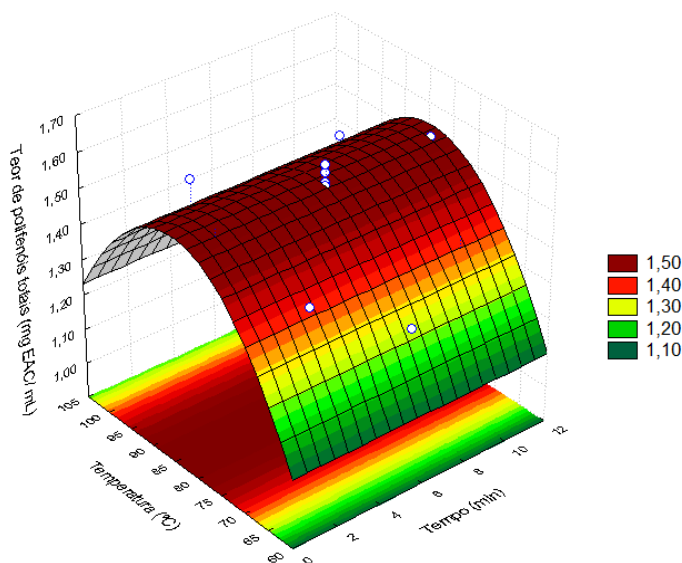
A qualidade do ajuste para essa equação foi verificada utilizando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), que foi de 0,87 para o teor de compostos fenólicos totais, indicando relação linear entre as respostas previstas e as observadas. O gráfico dos resíduos versus os valores observados (Figura 2.2) mostra que a suposição de aleatoriedade dos resíduos foi satisfeita. Deste modo, devido ao comportamento linear entre as respostas observadas e previstas e à aleatoriedade dos resíduos, o modelo pode ser considerado preditivo.



**Figura 2.2:** Gráfico dos resíduos versus valores observados para o teor de compostos fenólicos totais do extrato aquoso da casca dos ramos residuais da erva-mate.



A fim de facilitar a visualização dos fatores significantes derivados da análise estatística, foi construído o gráfico de superfície de resposta (Figura 2.3). Esta figura indica que o máximo de extração dos compostos fenólicos ocorreu entre a faixa de temperatura de 80 °C e 90 °C, independente do tempo de extração empregado. Posteriores aumentos na temperatura levaram a uma redução da extração fenólica. O mesmo comportamento foi encontrado em folhas de *Inga edulis*, *Salvia Officinalis* e frutas de *Gardenia jasminoides* Ellis por Silva, Rogez e Larondelle (2007), Durling et al. (2007) e Yang, Liu e Gao (2009), respectivamente. Estes autores verificaram que o aumento da temperatura parece aumentar o rendimento da extração de compostos fenólicos. De acordo com Al-Farsi e Lee (2008) o aumento da temperatura promove extração por solventes por melhorar os coeficientes de difusão, e, portanto a solubilidade dos compostos fenólicos. Nwuha (2000) afirma que alguns compostos fenólicos são termossensíveis; e desta forma, Silva, Rogez e Larondelle (2007) ressaltam a importância de mantê-los numa temperatura de extração considerada adequada, a fim de não apresentar uma diminuição significativa nos seus teores.

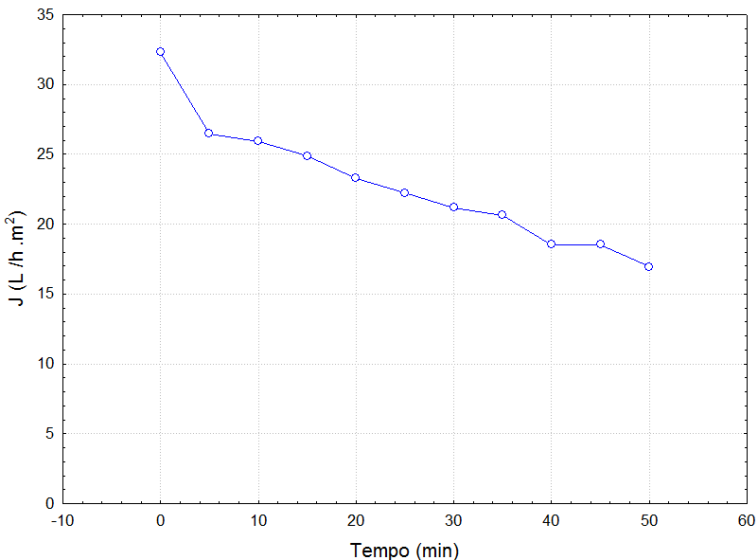


**Figura 2.3:** Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos totais (mg/mL equivalentes de ácido clorogênico) do extrato aquoso da casca dos ramos residuais da erva-mate em função da temperatura (°C) e do tempo (min) de extração.

Com base nos dados obtidos no presente estudo, a condição ótima de extração de compostos fenólicos totais da casca dos ramos residuais da erva-mate foi através da temperatura de  $85 \pm 5$  °C e tempo de extração de 1,5 minutos, onde foram obtidos valores em torno de 1,55 mg EAC/mL.

### 3.3 Nanofiltração

O extrato otimizado obtido a partir do delineamento experimental foi submetido à nanofiltração. Foi observada uma redução do fluxo do permeado (J) ao longo do tempo de filtração (Figura 2.4). Isto pode ser atribuído à camada de polarização e ao *fouling* da membrana, sendo o mesmo comportamento relatado por Díaz-Reinoso et al. (2009) na nanofiltração de extrato aquoso bagaço de uva fermentado.



**Figura 2.4:** Fluxo do permeado (J) durante o tempo (min) de nanofiltração do extrato otimizado.

O J médio foi de 22,81 L/h.m<sup>2</sup>, estando de acordo com Banvolgyi et al. (2006) e Mello, Petrus e Hubinger (2010) que submeteram vinho tinto e extrato de própolis à nanofiltração e obtiveram valores de J de 20 L/h.m<sup>2</sup> e 25 L/h.m<sup>2</sup>, respectivamente. Verificou-se que os parâmetros de

operação utilizados no presente trabalho foram suficientes para executar o procedimento de concentração do extrato otimizado.

Os teores de compostos fenólicos totais do permeado e concentrado nos diferentes FRVs e o coeficiente de retenção estão apresentados na Tabela 2.5. Verificou-se que não houve diferença entre os valores de compostos fenólicos totais ( $p > 0,05$ ) do permeado em nenhum dos FRVs analisados. Com o aumento do FRV, observou-se aumento dos compostos fenólicos no concentrado, sendo o maior coeficiente de retenção, igual a 99,77% quando o FRV foi 6,0. Este resultado foi superior do obtido por Sarmiento et al. (2008) e Tylkowski et al. (2010), que concentraram polifenóis de sementes de cacau (~ 90 %) e extrato de própolis (95 %) por nanofiltração, respectivamente. Al-Malack e Anderson (1997) atribuíram aos diferentes comportamentos nos processos de separação por membranas, como por exemplo, variações dos valores no coeficiente de retenção, aos diferentes parâmetros operacionais empregados, como pressão, temperatura, tipo da membrana e tamanho dos poros.

Concentrados em três diferentes FRVs (2,0; 4,0 e 6,0), bem como o extrato otimizado foram escolhidos para determinação da atividade antioxidante e para identificação e quantificação de compostos fenólicos devido às diferenças observadas entre seus valores de compostos fenólicos totais (Tabela 2.5). Assim como o teor de compostos fenólicos totais, a atividade antioxidante nos concentrados aumentou com o aumento do FRV, que foi também diferente do extrato otimizado (Tabela 2.5). Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Bravo, Goya e Lecumberri (2007), Heck, Schimalko e Mejia (2008) e Ranilla et al. (2010), que também sugerem que o alto teor de polifenóis está relacionado com o aumento da atividade antioxidante da erva-mate.

Em relação ao perfil de compostos fenólicos, apenas o permeado obtido no FRV 6,0 foi analisado, pois nenhuma diferença foi encontrada entre os valores de compostos fenólicos totais nos FRVs avaliados. No entanto, não foi possível identificar ou quantificar os compostos fenólicos devido às concentrações destes serem muito baixas.

**Tabela 2.5: Teor de compostos fenólicos totais (mg EAC/mL) do extrato otimizado da casca dos ramos residuais da erva-mate, permeados e concentrados; atividade antioxidante ( $EC_{50}$  mg amostra/gDPPH) do extrato otimizado e concentrados; e o coeficiente de retenção (%) em diferentes fatores de redução volumétrico (FRV).**

Extrato otimizado	Teor de polifenóis totais (mg EAC/mL)		Atividade Antioxidante ( $EC_{50}$ mg amostra /gDPPH)	Coeficiente de Retenção (%)
	Permeado	Concentrado	Concentrado	
		<b>1,57±0,17<sup>a</sup></b>	<b>120,70±2,18<sup>d</sup></b>	
FRV	Permeado	Concentrado	Concentrado	
1,5	ND	2,62 ± 0,01 <sup>a</sup>	-	-
<b>2,0</b>	<b>0,0219 ± 0,0003<sup>a</sup></b>	<b>4,31 ± 0,05<sup>b</sup></b>	<b>33,55 ± 0,33<sup>c</sup></b>	99,49 ± 0,01 <sup>b</sup>
2,5	0,0220 ± 0,0006 <sup>a</sup>	4,35 ± 0,21 <sup>b</sup>	-	99,49 ± 0,03 <sup>b</sup>
3,0	0,0243 ± 0,0011 <sup>a</sup>	4,19 ± 0,07 <sup>b</sup>	-	99,42 ± 0,03 <sup>a</sup>
3,5	0,0233 ± 0,0009 <sup>a</sup>	5,38 ± 0,30 <sup>c</sup>	-	99,57 ± 0,01 <sup>c</sup>
<b>4,0</b>	<b>0,0225 ± 0,0007<sup>a</sup></b>	<b>6,14 ± 0,08<sup>d</sup></b>	<b>24,60 ± 0,14<sup>b</sup></b>	99,63 ± 0,01 <sup>d</sup>
4,5	0,0230 ± 0,0007 <sup>a</sup>	6,13 ± 0,07 <sup>d</sup>	-	99,63 ± 0,02 <sup>d</sup>
5,0	0,0234 ± 0,0002 <sup>a</sup>	6,84 ± 0,10 <sup>e</sup>	-	99,66 ± 0,01 <sup>d</sup>
5,5	0,0238 ± 0,0007 <sup>a</sup>	9,37 ± 0,34 <sup>f</sup>	-	99,75 ± 0,01 <sup>e</sup>
<b>6,0</b>	<b>0,0249 ± 0,0013<sup>a</sup></b>	<b>10,90 ± 0,14<sup>g</sup></b>	<b>14,26 ± 0,82<sup>a</sup></b>	99,77 ± 0,01 <sup>e</sup>

EAC = equivalente de ácido clorogênico

Valores médios ± DP de determinações em triplicata.

Valores médios na mesma coluna seguidos de letras diferentes são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). EAC = equivalente de ácido clorogênico. ND = Não detectado.

Por outro lado, no extrato otimizado e nos concentrados (FRV 4,0 e 6,0), três ácidos fenólicos e uma catequina foram identificados e quantificados (Tabela 6). Entre os ácidos fenólicos, o ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) apresentou-se em maior teor, estando de acordo com o relatado por Filip et al. (2001), Cardozo Jr. et al. (2007) e Marques e Farah (2009) para folhas de erva-mate bem como por Pagliosa et al. (2010b) para casca dos ramos ressecados da erva-mate. Embora Pagliosa et al. (2010b) não tenha relatado a presença de epigalocatequina galato na casca dos ramos ressecados da erva-mate, no presente estudo foi o composto fenólico que esteve em maior teor. Bracesco et al. (2010) mostrou que entre os compostos presentes em extratos de *I. paraguariensis*, 26% são catequinas. Além disso, Streit et al. (2007) também detectou catequina como o composto majoritário em amostras de infusões de *I. paraguariensis*. Ambos esses compostos podem ser relacionados com a alta atividade antioxidante da erva-mate, já que os ácidos clorogênicos e as catequinas são sequestradores de radicais livres segundo Marques e Farah (2009) e Rusak et al. (2008), respectivamente.

No concentrado de VRF 2,0, os teores de ácidos gálico e clorogênico foram significativamente menores que os encontrados do extrato otimizado ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2.6). O mesmo comportamento foi relatado por Mello, Petrus e Hubinger (2010) quando realizada a nanofiltração em extrato aquoso de própolis. Esses autores observaram menores teores de ácido cumárico no concentrado do que no extrato inicial e atribuíram tal fato à baixa capacidade da membrana em reter este tipo de composto, em decorrência de sua baixa massa molar. Portanto, a passagem dos ácidos gálico e clorogênico através da membrana pode ter ocorrido devido à massa molar destes compostos, 170 e 354 Da, respectivamente, serem próximos ao *cut-off* da membrana (150-300 Da), bem como em função da interação entre as cargas dos solutos com as cargas da membrana. Vale ressaltar que, segundo a Pinelo, Jonsson e Meyer (2009), a pressão normalmente utilizada para esse tipo de processo de concentração pode intervir na passagem dos compostos com massa molar semelhante a da membrana.

**Tabela 2.6: Compostos fenólicos presentes no extrato aquoso da casca dos ramos residuais da erva-mate e concentrados (FRV 2,0; 4,0 e 6,0).**

Compostos fenólicos	Tempo de retenção (min)	Concentração (µg/mL)			
		Extrato otimizado	Concentrado		
			FRV 2,0	FRV 4,0	FRV 6,0
Acido gálico	5,28	12,583 ± 0,520 <sup>b</sup>	9,680 ± 0,183 <sup>a</sup>	15,871 ± 1,519 <sup>cd</sup>	15,689 ± 0,588 <sup>d</sup>
Acido clorogênico	8,49	65,599 ± 1,494 <sup>b</sup>	50,242 ± 2,638 <sup>a</sup>	81,054 ± 1,342 <sup>c</sup>	101,369 ± 7,721 <sup>d</sup>
Epigallocatequina galato	13,56	223,965 ± 25,287 <sup>a</sup>	302,665 ± 18,847 <sup>b</sup>	527,631 ± 11,873 <sup>c</sup>	882,504 ± 42,149 <sup>d</sup>
Acido ferúlico	25,24	ND	ND	ND	ND
Acido 4,5-Dicafeoilquinico	47,20	0,033 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,047 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,037 ± 0,006 <sup>bc</sup>	0,096 ± 0,030 <sup>d</sup>

Valores médios ± DP de determinações em triplicata.

Valores médios na mesma linha seguidos de letras diferentes são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

ND = Não detectado.

Versari et al. (2003), Gilewicz-Lukasik, Koter e Kurzawa (2007) e Peshev et al. (2010) obtiveram concentrados de compostos bioativos por meio de nanofiltração a partir de mosto de uva, frutos de aronia e extratos de alecrim, respectivamente, da mesma forma obtida no presente trabalho para compostos fenólicos da casca do resíduo da erva-mate. Foi possível também verificar que nos FRVs 4,0 e 6,0, o teor de compostos fenólicos foram maiores do que no extrato otimizado ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6). Nghiem e Hawkes (2007) e Wang et al. (2010) indicaram que o aumento de compostos no concentrado durante o processo de concentração por membranas pode ser explicado por alguns fatores, como a redução do tamanho do poro da membrana, adsorção de solutos, camada de polarização e *fouling*. Schäfer et al. (2010) sugerem que a matéria orgânica de algumas matrizes pode apresentar interações com alguns compostos, principalmente entre a celulose e a hidroxila dos fenólicos, resultando em maior retenção da aglicona.

Os resultados mostraram que a concentração por membrana foi capaz de reter grande quantidade de compostos fenólicos do extrato aquoso da casca dos ramos residuais da erva-mate, indicando que a nanofiltração é um método eficiente que pode permitir a indústria de alimentos a concentrar compostos fenólicos deste resíduo.

## 4 CONCLUSÃO

Por meio da metodologia de superfície de resposta foi possível determinar a condição ótima para extração de compostos fenólicos da casca dos ramos residuais da erva-mate. A nanofiltração mostrou-se como uma alternativa eficaz para a concentração de compostos fenólicos do extrato aquoso da casca destes ramos, já que alcançou um coeficiente de retenção de 99,77%, quando o FRV foi igual a 6,0. Os compostos majoritários detectados no extrato otimizado da casca dos ramos da erva-mate e nos seus concentrados (FRV 4,0 e 6,0) foram o ácido clorogênico e a epigalocatequina galato, ambos relacionados à alta atividade antioxidante da erva-mate.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENEYE, A.A.; AJAGBONNA, O.P.; MOJIMINIYI, F.B.O.; ODIGIE, I.P; OJOBOR P.D.; ETARRH, R.R.; ADENEYE, A.K. The hypotensive mechanisms for the aqueous stem bark extract of *Musanga cecropioides* in Sprague-Dawley rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p.203–207, 2006.

AL-FARSI, M. A.; LEE, C. Y. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. **Food Chemistry**, v. 108, p.977–985, 2008.

AL-MALACK, M. H.; ANDERSON, G. K. Crossflow microfiltration with dynamic membranes. **Water Research**, v. 31, p.1969–1979, 1997.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: Técnicas de Extração. **B. CEPPA**, v. 24, n. 2, p.319–336, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18<sup>th</sup> Edition. Maryland, USA, 2005.

BANVOLGYI, S.; KISS, I.; BEKASSY-MOLNAR, E.; VATAI, G. Concentration of red wine by nanofiltration. **Desalination**, v. 198, p.8–15, 2006.

BASTOS, D. H. M.; ISHIMOTO, E. Y.; MARQUES, M. O. M.; FERRI, A. F.; TORRES, E. A. F. S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p.538–543, 2006.

BOCCO, A.; CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p.2123–2129, 1998.

BONILLA, F.; MAYEN, M.; MERIDA, J.; MEDINA, M. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. **Food Chemistry**, v. 66, p.209–215, 1999.

BRACESCO, N., et al., Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology* (2010), doi:10.1016/j.jep.2010.06.032.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p.25–30, 1995.

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

CARDOZO JR, E. L.; FERRARESE-FILHO, O.; CARDOZO FILHO, L.; FERRARESE, M. DE L. L.; DONADUZZI, C. M.; STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p.553–558, 2007.

DE VASCONCELOS, M. C. B. M., BENNETT, R. N., QUIDEAU, S., JACQUET, R., ROSA, E. A. S., FERREIRA-CARDOSO, J. V. Evaluating the potential of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) fruit pericarp and integument as a source of tocopherols, pigments and polyphenols. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p.301–311, 2010.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Ultra- and nanofiltration of aqueous extracts from distilled fermented grape pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p.587–593, 2009.

DURLING, N. E.; CATCHPOLE, O. J.; GREY, J. B.; WEBBY, R. F.; MITCHELL, K. A.; FOO, L. Y. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. **Food Chemistry**, v. 101, p.1417–1424, 2007.

ESMELINDRO, M.C.; TONIAZZO, G.; WACZU, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas de processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p.193–204, 2002.

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

FRADINHO, D.M.; NETO, C. P.; EVTUGUIN, D.; JORGE, F.C.; IRLE, M.A.; GIL, M.H.; PEDROSA DE JESUS, J. Chemical characterisation of bark and of alkaline bark extracts from maritime pine grown in Portugal. **Industrial Crops and Products**, v. 16, p.23–32, 2002.

GILEWICZ-ŁUKASIK, B.; KOTER, S.; KURZAWA, J. Concentration of anthocyanins by the membrane filtration. **Separation and Purification Technology**, v. 57, p.418–424, 2007.

GIULIAN, R.; SANTOS, C. E. I.; SHUBEITA, S. DE M.; DA SILVA, L. M.; YONEAMA, M. L.; DIAS, J. F. The study of the influence of industrial processing on the elemental composition of mate tealeaves (*Ilex paraguariensis*) using the PIXE technique. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p.74–80, 2009.

GREMBECKA, M.; MALINOWSKA, E.; SZEFER, P. Differentiation of market coffee and its infusions in view of their mineral composition. **Science of the Total Environment**, v. 383, p.59–69, 2007.

HECK, C.; SCHIMALKO M.; MEJIA, E. G. Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p.8394–8403, 2008.

JEREZ, M.; PINELO, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. **Food Chemistry**, v. 94, p.406–414, 2006.

JESUS, D. F.; LEITE, M.F.; SILVA, L.F.M.; MODESTA, R.D.; MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C. Orange (*Citrus sinensis*) juice concentration by reverse osmosis. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p.287–291, 2007.

LEWICKI, P. P. Design of hot air drying for better foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p.153–163, 2006.

MALIK, J.; SZAKOVA, J.; DRABEK, O.; BALIK, J.; KOKOSKA, L. Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions. **Food Chemistry**, v. 111, p.520–525, 2008.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N.V.I.; KOSTOVA, I. N. Antioxidative action of the ethanolic extract and some hydroxycoumarins of *Fraxinus ornus* bark. **Food Chemistry**, v. 51, p.125–132, 1994.

MAROULIS, Z.B.; SARAVACOS, G.D., **Food Process Design**. 1. ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, Inc., 2003. 536p.

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

MATTA, V.M.; MORETTI, R.H.; CABRAL, L.M.C. Microfiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of acerola juice. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p.477–482, 2004.

MELLO, B.C.B.S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p.533–539, 2010.

NDIAYE, M.; DIATTA, W.; SY, A.N.; DIÈYE, A.M.; FAYE, B.; BASSÈNE, E. Antidiabetic properties of aqueous barks extract of *Parinari excelsa* in alloxan-induced diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 79, p.267–270, 2008.

NGHIEM, L. D.; HAWKES, S. Effects of membrane fouling on the nanofiltration of pharmaceutically active compounds (PhACs): Mechanisms and role of membrane pore size. **Separation and Purification Technology**, v. 57, p.176–184, 2007.

NWUHA, V. Novel studies on membrane extraction of bioactive components of green tea in organic solvents: part I. **Journal of Food Engineering**, v. 44, p.233–238, 2000.

ÖZCAN, M. M.; ÜNVER, A.; UÇAR, T.; ARSLAN, D. Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction. **Food Chemistry**, v. 106, p.1120–1127, 2008.

PAGLIOSA, C. M.; SIMAS, K. N.; AMBONI, R. D. M. C.; MURAKAMI, A. N. N.; PETKOWICZ, C. L. O.; MEDEIROS, J. D.; RODRIGUES, A. C.; AMANTE, E. R. Characterization of the bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Industrial Crops and Products**, v. 32, p.428–433, 2010a.

PAGLIOSA, C.M.; VIEIRA, M. A.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A. L. B.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v. 122, p.173–178, 2010b.

PESHEV, D. et al. Application of organic solvent nanofiltration for concentration of antioxidant extracts of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Chem Eng Res Des* (2010), doi:10.1016/j.cherd.2010.07.002.

PINELO, M.; JONSSON, G.; MEYER, A. S. Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance. **Separation and Purification Technology**, v. 70, p.1–11, 2009.

RANILLA, L. G.; KWON, Y.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresource Technology**, v. 101, p.4676–4689, 2010.

RUSAK, G.; KOMES, D.; LIKIĆ, S.; HORŽIĆ, D.; KOVAČ, M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food Chemistry**, v. 110, p.852–858, 2008.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the Antiradical Efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 76, p.270–276, 1998.

SARMENTO, L. A.V.; MACHADO, R. A.F.; PETRUS, J. C.C.; TAMANINI, T. R.; BOLZAN, A. Extraction of polyphenols from cocoa seeds and concentration through polymeric membranes. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 45, p.64–69, 2008.

SCHÄFER, A. I.; NGHIEM, L. D.; MEIER, A.; NEALE, P. A. Impact of organic matrix compounds on the retention of steroid hormone estrone by a ‘loose’ nanofiltration membrane. **Separation and Purification Technology**, v. 73, p.179–187, 2010.

SCHULDT, E. Z.; BET, A. C.; HORT, M. A.; IANSEN, C.; MARASCHIN, M.; CKLESS, K.; RIBEIRO-VALLE, R. M. An ethyl acetate fraction obtained from a southern Brazilian red wine relaxes rat mesenteric arterial bed through hyperpolarization and NO-cGMP pathway. **Vascular Pharmacology**, v. 43, p.62–68, 2005.

SILVA, E.M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 55, p.381–387, 2007.

SINGLETON, V.L.; ROSSI JR., J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p.144–158, 1965.

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

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 Chemistry**, v. 102, p.560–564, 2007.

ŞEN, A.; MIRANDA, I.; SANTOS, S.; GRAÇA, J.; PEREIRA, H. The chemical composition of cork and phloem in the rhytidome of *Quercus cerris* bark. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p.417–422, 2010.

THOO, Y. Y.; HOA, S. K.; LIANG, J. Y.; HOB, C. W.; TAN, C. P. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). **Food Chemistry**, v. 120, p.290–295, 2010.

TSUI, E.M.; CHERYAN, M. Membrane processing of xanthophylls in ethanol extracts of corn. **Journal of Food Engineering**, v. 83, p.590–595, 2007.

TYLKOWSKI, B; TRUSHEVA B.; BANKOVA, V.; GIAMBERINI, M.; PEEV, G.; NIKOLOVA, A. Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 348, p.124–130, 2010.

VÁZQUEZ, G.; FONTENLA, E.; SANTOS, J.; FREIRE M.S.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J.; ANTORRENA, G. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p.279–285, 2008.

VERSARI, A.; FERRARINI, R.; PARPINELLO G.P.; GALASSI, S. Concentration of grape must by nanofiltration membranes. **Trans IChemE**, v. 81, p.275-278, 2003.

VIEIRA, M.A.; ROVARIS, A.A.; MARASCHIN,M.; SIMAS,K.N.; PAGLIOSA,C.M.; PODESTÁ,R.; AMBONI, R.D.M.C.; BARRETO,P.L.M.; AMANTE,E.R. Chemical characterization of candy made of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A St.Hil.) residue. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p.4637–4642, 2008.

VINCZE, I.; VATAI, G. Application of nanofiltration for coffee extract concentration. **Desalination**, v. 162, p.287–294, 2004.

VINCZE, I.; STEFANOVITS-BÁNYAIB, E.; VATAI, G. Using nanofiltration and reverse osmosis for the concentration of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) juice. **Desalination**, v. 200, p.528–530, 2006.

VISIOLI, F.; ROMANI, A.; MULINACCI, N.; ZARINI, S.; CONTE, D.; VINCIERI, F. F.; GALLI, C. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p.3397–3401, 1999.

WANG, Y.; SHU, L.; JEGATHEESAN, V.; GAO, B. Removal and adsorption of diuron through nanofiltration membrane: The effects of ionic environment and operating pressures. **Separation and Purification Technology**, v. 74, p.236–241, 2010.

XU, L.; WANG, S. The Ginkgo biloba extract concentrated by nanofiltration. **Desalination**, v. 184, p.305–313, 2005.

YANG, B.; LIU, X.; GAO, Y. Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from *Gardenia* (*Gardenia jasminoides Ellis*) fruits with response surface methodology. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v. 10, p.610–615, 2009.



### **CAPÍTULO 3**

#### **AÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS GLICOSÍDEOS FENÓLICOS DA CASCA DOS RAMOS RESIDUAIS DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) OBTIDOS POR NANOFILTRAÇÃO**

Artigo submetido à publicação na *Food Research International* (ISSN: 0963-9969).



## **AÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS GLICOSÍDEOS FENÓLICOS DA CASCA DOS RAMOS RESIDUAIS DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) OBTIDOS POR NANOFILTRAÇÃO**

### **RESUMO**

O objetivo do presente trabalho foi quantificar os glicosídeos fenólicos da casca dos ramos residuais da colheita da erva-mate concentrados por nanofiltração e submetidos à hidrólise enzimática com  $\beta$ -glicosidase, bem como determinar a atividade antioxidante em diferentes tempos de hidrólise. A  $\beta$ -glicosidase foi capaz de catalisar a hidrólise dos glicosídeos fenólicos presentes no concentrado da casca dos ramos residuais da erva-mate, convertendo-os em suas agliconas, além de influenciar na sua atividade antioxidante. As maiores atividades antioxidantes foram de 12,34  $EC_{50}$  – mg de amostra/gDPPH e 11,31  $EC_{50}$  – mg de amostra/gDPPH obtidas nos tempos de hidrólise iguais a 3 e 6 horas, respectivamente. Além disso, o maior teor do ácido clorogênico (426,91  $\mu\text{g/mL}$ ) foi detectado em 3 horas de hidrólise, enquanto a maior concentração de epigallocatequina galato (3357,68  $\mu\text{g/mL}$ ) foi verificada em 6 horas. A análise de componentes principais (ACP) confirmou a relação de ambos os compostos com a atividade antioxidante do concentrado da casca dos ramos residuais da erva-mate e uma baixa relação do ácido ferúlico com esta atividade.

*Palavras-chave: Ilex paraguariensis, concentrado da casca dos ramos residuais da erva-mate, compostos fenólicos,  $\beta$ -glicosidase; atividade antioxidante; análise de componentes principais.*

## ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CONCENTRATE MATE BARK PHENOLIC GLUCOSIDES OBTAINED BY NANOFILTRATION

### ABSTRACT

The object of this study was to quantify the phenolic glucosides in mate bark concentrate by nanofiltration submitted to enzymatic hydrolysis with  $\beta$ -glucosidase and also to determine the antioxidant activity at different times of hydrolysis.  $\beta$ -glucosidase was able to catalyze the hydrolysis of mate bark concentrate phenolic glucosides, and thus convert them into their aglycones. Also, this enzyme affected the antioxidant activity of the sample. The highest antioxidant activities were 12.34 EC<sub>50</sub> – mg sample/gDPPH and 11.31 EC<sub>50</sub> – mg sample/gDPPH after 3 and 6 hours of hydrolysis, respectively. Additionally, the highest concentration of chlorogenic acid (426.91  $\mu$ g/mL) was detected at 3 hours, while the highest concentration of epigallocatechin gallate (3357.68  $\mu$ g/mL) was detected at 6 hours. A principal component analysis (PCA) confirmed the relation of both compounds with the antioxidant activity of mate bark concentrate and the poor relation of ferulic acid with this activity.

*Keywords: Ilex paraguariensis; mate bark concentrate; phenolic compounds;  $\beta$ -glucosidase; antioxidant activity; principal component analysis.*

## 1 INTRODUÇÃO

A industrialização da erva-mate é restrita as folhas e pequenos ramos (diâmetro menor que 10 mm), enquanto os ramos maiores são descartados no solo durante a colheita, gerando aproximadamente 5 toneladas de resíduos sólidos por hectare. Pagliosa et al. (2010) detectaram quantidades superiores de compostos fenólicos na casca destes ramos do que os presentes nas folhas.

Os compostos fenólicos presentes na erva-mate têm sido relacionados com sua atividade antioxidante *in vitro* (FILIP et al., 2000; SCHINELLA et al., 2000) e *in vivo* (DA SILVA et al., 2008). Tal atividade é creditada a sua capacidade em sequestrar os radicais livres formados no início do processo de oxidação, bem como atuar como quelantes de metais (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1994).

No intuito de aumentar o teor de compostos bioativos muitos extratos têm sido concentrados (VINCZE; VATAI, 2004; XU; WANG, 2005; GILEWICZ-ŁUKASIK; KOTER; KURZAWA, 2007; TSUI; CHERYAN, 2007). O uso dos processos de concentração por membranas, como a nanofiltração, apresenta vantagens em relação aos métodos tradicionais, como o emprego de baixas temperaturas, ausência de transição de fases e baixo consumo energético (MATTA; MORETTI; CABRAL, 2004). Este processo baseia-se no princípio de permeação seletiva de solutos através de membranas semipermeáveis, cujo líquido obtido é denominado de permeado, enquanto o que não ultrapassa a membrana é designado concentrado.

Muitos estudos clínicos e modelos animais têm mostrado que os compostos fenólicos presentes em extratos de plantas nem sempre são absorvidos por administração oral possivelmente por estes compostos estarem na forma de polímeros, ésteres e glicosídeos nestas matérias primas, sendo então indicada hidrólise enzimática para quantificar e verificar a biodisponibilidade destes compostos (MACEDO et al., 2011). Desta forma, considera-se importante investigar a influência da hidrólise enzimática sobre a atividade antioxidante dos compostos fenólicos.

As  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21), utilizadas com sucesso na hidrólise de glicosídeos fenólicos (LA TORRE et al., 2004), são um grupo de enzimas presentes em diversos sistemas celulares de plantas e animais, capazes de clivar as ligações  $\beta$ -glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos ou outros conjugados de glicose (HSIEH; GRAHAM, 2001).

O objetivo deste trabalho foi realizar a hidrólise enzimática empregando a  $\beta$ -glicosidase na quantificação de glicosídeos fenólicos do concentrado obtido a partir do extrato aquoso da casca dos ramos residuais da erva-mate, em diferentes tempos, verificando a sua atividade antioxidante.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Os ácidos clorogênico, gálico e ferúlico, assim como a epigalocatequina galato foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), enquanto o ácido 4,5-dicafeoilquínico da Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd (Chengdu, China), e o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH<sup>\*</sup>) da Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). A  $\beta$ -D-glicosidase de amêndoas (pó liofilizado), 6U/mg (EC 3.2.1.21), foi obtido da Fluka (St. Louis, MO, USA). Já o carbonato de sódio e o acetato de sódio foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltd. (Duque de Caxias, RJ, Brazil). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico.

### 2.2 Preparo das amostras

Ramos com diâmetro maior de 10 mm foram coletados aleatoriamente de árvores de *Ilex paraguariensis* St. Hil. com vinte anos de idade, plantadas em erval adensado em área de sub-bosque de floresta de araucárias, da cidade de Catanduvas, no Estado de Santa Catarina (27°S, 51°40'W, altitude 925 m).

O preparo das amostras consistiu na secagem das cascas em estufa com circulação de ar (50 °C por 24h) e trituradas em moinho de martelo (Marconi, MA-580, Piracicaba, Brazil), após o tecido das cascas terem sido manualmente removidos dos ramos. As amostras desidratadas foram embaladas a vácuo em sacos de polietileno de alta densidade (embaladora a vácuo Selovac, modelo 200 B, São Paulo, SP, Brasil), submetidas a congelamento rápido em congelador de placas a  $-40 \pm 2^\circ \text{C}$  (Frigostrella, modelo PF-5, Cotia, SP, Brasil) e armazenadas em freezer a  $-18 \pm 2^\circ \text{C}$  até momento das análises.

### 2.3 Preparo e concentração por membranas do extrato aquoso obtido da casca dos ramos residuais da erva-mate

O extrato aquoso obtido da casca dos ramos residuais da erva-mate foi preparado a partir da diluição de 1 g da amostra desidratada em 100 mL de água destilada, de acordo com o proposto por Bastos et al. (2006), com modificações. Na preparação do extrato empregou-se temperatura de  $85 \pm 5^\circ \text{C}$ , que foi monitorada com termopar tipo K conectado a unidade de aquisição de dados 34970A (Agilent

Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA), enquanto o tempo de extração foi de 1,5 minutos. Após o procedimento de extração, os extratos foram filtrados em filtro de papel (12,5 cm diâmetro e 25 µm tamanho do poro) por meio de uma bomba de vácuo (Primatec, 131, Itu, Brasil), sendo que os volumes foram completados a 100 mL (1 % m/v).

A fim de obter um concentrado de compostos fenólicos o extrato foi submetido à nanofiltração. Este processo foi realizado em uma unidade de filtração piloto operando com fluxo tangencial, equipada com uma membrana orgânica de polifluoreto de vinilideno com *cut-off* de 150-300 Da e área filtrante útil de 0,9 m<sup>2</sup> (Osmonics membranes, HL2521TF, Minnetonka, USA). O fator de redução volumétrico (FRV) foi calculado pela razão entre o volume alimentado inicial (L) e o volume do concentrado (L). Os parâmetros de operação controlados durante o processo foram temperatura de 22 ± 1 °C, considerada adequada na preservação dos compostos fenólicos, e pressão de 6 bar, sendo a concentração obtida quando o FRV foi de 6,0. Antes e após a nanofiltração a membrana foi higienizada com solução alcalina, de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante.

## 2.4 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada como proposto por La Torre et al. (2004), com modificações. Antes da hidrólise, o concentrado foi dissolvido em um solução de acetato de sódio trihidratado (0,1 M) para ajustar ao pH 6,0 e então a β-glicosidase foi adicionada até atingir a concentração final de 1 mg/mL. O pH do concentrado foi mensurado com pHmetro Quimis, Q-400A, Diadema, Brazil). A hidrólise ocorreu a 37 °C por 24 horas em um banho termostaticado com agitação modelo DUBNOFF – DI 921 (DIST Indústria, Comércio e Serviços Ltda, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). Em tempos previamente determinados (0, 3, 6, 9, 12 e 24h), conforme La Torre et al. (2004), alíquotas de 1,5 mL foram retiradas a fim de verificar se todos os glicosídeos fenólicos haviam se convertido em suas agliconas. Para cessar a hidrólise, as alíquotas foram imediatamente mergulhadas em água fervente por 1 minuto e então colocadas em banho de gelo pelo mesmo período de tempo. Após isso, foram armazenadas em nitrogênio líquido (- 80 °C) até o momento da análise de atividade antioxidante e de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).



## 2.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do concentrado e das alíquotas submetidas à hidrólise foi determinada utilizando o radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) conforme o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) modificado por Sanchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998). A Cem micro litros de cada amostra foram adicionados 3,9 mL de solução metanólica de DPPH<sup>•</sup> (60 µM) e transferidos para uma cubeta de quartzo. A mudança de coloração de violeta para amarela e sua redução da absorbância foi determinada a 515 nm utilizando espectrofotômetro UV – VIS (Hitachi model U-1800) a cada 5 minutos por 15 minutos e a cada 15 minutos até estabilização da reação. Os resultados foram expressos em EC<sub>50</sub> (mg amostra/gDPPH), calculado a partir da concentração de compostos fenólicos necessária para seqüestrar 50 % do radical DPPH inicial.

## 2.6 Identificação e quantificação de compostos fenólicos

### 2.6.1 Preparação da amostra

Um mililitro do concentrado e de cada alíquota submetida à hidrólise foi misturado com 3 mL de acetato de etila (1:3; v/v), mantidos a  $10 \pm 1$  °C, sem a presença de luz por 12 h. A fase orgânica foi coletada e o acetato de etila foi removido por evaporação, tendo o nitrogênio como gás de arraste. O resíduo final foi redissolvido em 500 µL de metanol e centrifugado a 3000 rpm/ min. O extrato resultante foi armazenado à  $-20 \pm 2$  °C até o momento da análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com Schuldt et al. (2005).

### 2.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises de cromatografia foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu LC-10), equipado com uma coluna de fase reversa (Nucleosil C<sub>18</sub>, 4.6 mm Ø x 250 mm), na temperatura de 40 °C e detector UV – Vis (Shimadzu SPD 10A, λ = 280 nm). Os analitos foram eluídos isocraticamente, com fluxo de 1 mL/min, utilizando como fase móvel uma mistura de água: ácido acético: *n*-butanol (350:1:10, v/v/v). O volume de injeção foi de 10 µL por amostra.

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos padrões com os das amostras do concentrado e cada alíquota submetida à hidrólise. A quantificação dos compostos fenólicos foi baseada nas áreas dos picos das curvas de calibração construídas para cada composto identificado nas amostras. As curvas mostraram boa linearidade e seguiram a lei de Beer ( $R^2 = 0,99$ ).

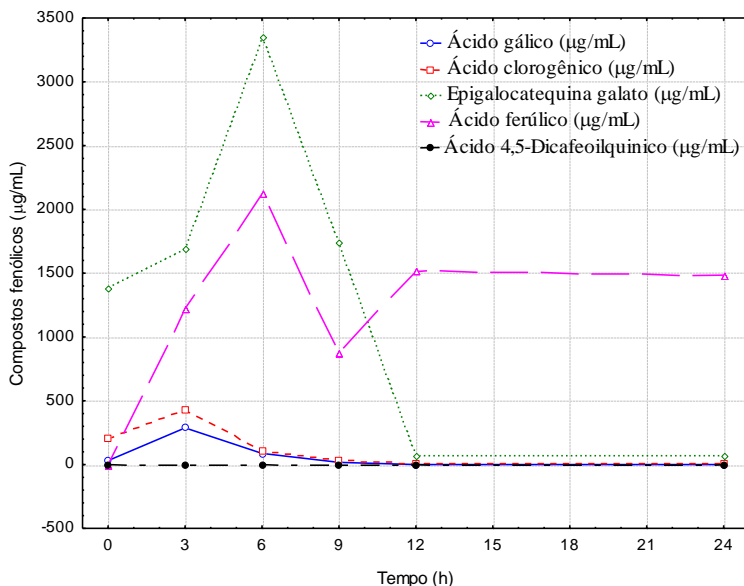
## **2.7 Análise estatística**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, seguido pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para verificar diferenças significativas. Diferenças foram consideradas quando  $p < 0,05$ . Análise de componentes principais (ACP) foi realizada para avaliar as correlações entre os diferentes compostos fenólicos e suas atividades antioxidantes durante a hidrólise enzimática. Todos os cálculos e figuras foram realizados utilizando o software STATISTICA versão 6.0 (2001) (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

A figura 3.1 mostra o teor de compostos fenólicos em relação aos diferentes tempos de hidrólise. Através da cinética enzimática é possível verificar que a  $\beta$ -glucosidase influenciou no teor de compostos fenólicos. No tempo de 3 horas de hidrólise a concentração de todos os compostos aumentou, com exceção do ácido 4,5 dicafeoilquínico (Tabela 1). Este aumento indica que a enzima foi capaz de catalisar a hidrólise das ligações  $\beta$ -*O*-glucosídicas entre os compostos fenólicos e os polissacarídeos da parede celular da casca dos ramos residuais da erva-mate, deixando-os livres para serem quantificados. O teor do ácido 4,5 dicafeoilquínico reduziu após o início da hidrólise possivelmente em decorrência de sua instabilidade na forma livre. De acordo com Maillard e Berset (1995), quando as ligações entre alguns ácidos fenólicos e polissacarídeos de matrizes alimentares, como ligninas e arabinoxilanas são clivadas, pode ocorrer a liberação destes ácidos seguida de degradação térmica dos mesmos.



**Figura 3.1:** Teor de compostos fenólicos do concentrado da casca dos ramos residuais da erva-mate durante a hidrólise enzimática com  $\beta$ -glucosidase, a 37 °C.

**Tabela 3.1: Teor dos compostos fenólicos do concentrado da casca dos ramos residuais da erva-mate durante a hidrólise enzimática com  $\beta$ -glicosidase, a 37 °C.**

Tempo (h)	Ácido gálico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ácido clorogênico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Epigallocatequina galato ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ácido ferúlico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ácido 4,5-Dicafeoilquínico ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	31,38 $\pm$ 1,06 <sup>b</sup>	202,64 $\pm$ 15,44 <sup>c</sup>	1376,73 $\pm$ 102,07 <sup>b</sup>	ND	0,19 $\pm$ 0,04
3	287,80 $\pm$ 25,80 <sup>d</sup>	426,91 $\pm$ 36,29 <sup>d</sup>	1686,56 $\pm$ 169,74 <sup>c</sup>	1223,53 $\pm$ 136,88 <sup>b</sup>	ND
6	87,62 $\pm$ 6,21 <sup>c</sup>	105,05 $\pm$ 11,56 <sup>b</sup>	3357,68 $\pm$ 122,05 <sup>d</sup>	2121,63 $\pm$ 92,81 <sup>d</sup>	ND
9	17,53 $\pm$ 0,21 <sup>ab</sup>	35,68 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	1741,46 $\pm$ 34,96 <sup>c</sup>	871,15 $\pm$ 27,73 <sup>a</sup>	ND
12	ND	6,67 $\pm$ 2,31 <sup>a</sup>	73,78 $\pm$ 8,27 <sup>a</sup>	1512,97 $\pm$ 143,83 <sup>c</sup>	ND
24	ND	3,94 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	73,73 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	1484,81 $\pm$ 4,39 <sup>c</sup>	ND

Valores médios  $\pm$  DP de determinações em triplicata.

Valores médios na mesma coluna seguidos de letras diferentes são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ND

= Não detectado.

No tempo de 6 horas de hidrólise enzimática os teores de epigalocatequina galato e ácido ferúlico continuaram a aumentar, enquanto os conteúdos de ácido gálico e ácido clorogênico diminuíram. Este comportamento pode ter ocorrido em virtude da ação enzimática sobre compostos mais simples, devido a um impedimento estérico da enzima. Portanto, já que os ácidos clorogênico e gálico ficaram em suas formas livres, a hidrólise causou redução nos teores desses ácidos (Tabela 3.1), assim como observado com o ácido 4,5 dicafeoilquínico quando liberado durante a hidrólise.

Após 9 horas de hidrólise, todos os teores de fenólicos diminuíram e entre 12 e 24 horas estabilizaram, portanto, após 12 horas todos os glicosídeos fenólicos foram convertidos em suas agliconas. Um comportamento similar foi observado por La Torre et al. (2004) quando utilizaram a mesma enzima para hidrolisar glicosídeos de resveratrol de vinhos. De acordo com esses autores, o resveratrol tendeu a redução e estabilização após 24 horas de hidrólise a 40 °C. Além disso, o ácido gálico não foi detectado após 12 horas, possivelmente pela sua instabilidade após longos períodos de hidrólise.

Apesar de não estar presente no tempo zero, o teor de ácido ferúlico aumentou durante a hidrólise enzimática. Tal comportamento era esperado, pois segundo Manach et al. (2004), a maior parte do ácido ferúlico presente em plantas encontra-se esterificado com arabinoxilanas e hemiceluloses. Portanto, à medida que ocorria o processo de hidrólise as ligações  $\beta$ -*O*-glicosídicas eram clivadas.

### **3.2 Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante do concentrado da casca dos ramos residuais da erva-mate foi diferente ( $p < 0.05$ ) entre os tempos 0, 3, 6, 9 e 12 horas de hidrólise com  $\beta$ -glicosidase (Tabela 3.2). Em 6 horas de hidrólise o concentrado da casca dos ramos residuais da erva-mate alcançou a maior atividade antioxidante e após 9 horas essa atividade teve redução, tornando-se inferior da encontrada para o concentrado anterior ao tratamento com a enzima. Pôde-se observar também que durante a maior atividade antioxidante (no tempo de 6 horas) obteve-se os maiores teores de epigalocatequina galato, sugerindo o papel fundamental deste composto na atividade antioxidante da casca do resíduo da erva-mate. Do et al. (2009) submeteram extrato de folhas de amoreira à hidrólise com  $\beta$ -glicosidase por 6 horas à 40 °C e obtiveram aumento na atividade antioxidante devido a conversão dos glicosídeos fenólicos em suas agliconas. Em 3 horas de hidrólise também foi

observada alta atividade antioxidante, onde o teor de ácido clorogênico foi maior do que nos demais tempos avaliados (Tabela 2).

Além disso, verificou-se também em 9 horas de hidrólise, que a atividade antioxidante e o teor de epigallocatequina galato e ácido clorogênico decresceram, sugerindo também a relação entre eles. Macedo et al. (2011) também obtiveram um aumento da atividade antioxidante da erva-mate após hidrólise enzimática por 30 minutos à 40 °C utilizando ambos os métodos DPPH e ORAC, e atribuíram tal comportamento a presença do ácido clorogênico.

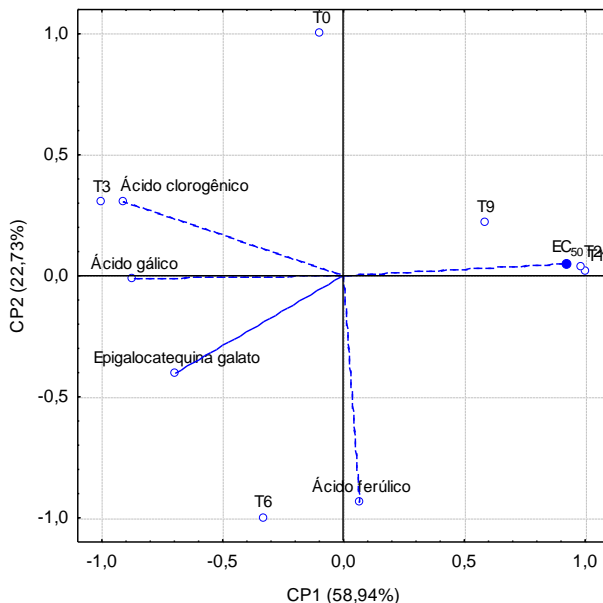
**Tabela 2: Atividade antioxidante ( $EC_{50}$  mg amostra/gDPPH) do concentrado da casca dos ramos residuais da erva-mate durante a hidrólise enzimática com  $\beta$ -glicosidase, a 37 °C.**

Tempo (h)	Atividade antioxidante ( $EC_{50}$ – mg amostra/gDPPH)
0	14,26 ± 0,82 <sup>c</sup>
3	12,34 ± 0,37 <sup>b</sup>
6	11,31 ± 0,44 <sup>a</sup>
9	37,21 ± 0,77 <sup>d</sup>
12	39,07 ± 0,14 <sup>e</sup>
24	38,22 ± 2,68 <sup>de</sup>

Valores médios ± DP de determinações em triplicata.

Valores médios na mesma coluna seguidos de letras diferentes são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A partir dessas observações, foi realizada a análise de componentes principais (ACP) a fim de avaliar a relação estatística entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante. Na figura 2 têm-se a relação entre CPI e CP2 derivados da matriz de covariância das variáveis, que explicou 82% da variância total dos dados. O ácido gálico (- 0,87), o ácido clorogênico (- 0,91) e a epigallocatequina galato (- 0,70) foram negativamente correlacionados com o fator 1, enquanto o  $EC_{50}$  (0,93) foi positivamente correlacionado. Isso indica que quanto maior for o teor dos ácidos gálico, clorogênico e da epigallocatequina galato, menor será o valor do  $EC_{50}$ , e consequentemente maior será a atividade antioxidante.



**Figura 2:** Análise de componentes principais do EC<sub>50</sub> (mg amostra/gDPPH) e dos compostos fenólicos obtidos do concentrado da casca dos ramos residuais da erva-mate submetido a hidrólise enzimática com  $\beta$ -glicosidase nos tempos T0, T3, T6, T9, T12 e T24, ou seja, nos tempos iguais a 0, 3, 6, 12 e 24 horas de hidrólise, respectivamente.

O CP2 mostra principalmente o conteúdo de ácido ferúlico (-0,94), indicando que este ácido está pouco relacionado com a atividade antioxidante das amostras.

Os resultados apresentados na figura 2 mostram que os tempos de hidrólise de 3 e 6 horas foram inversamente correlacionados com o EC<sub>50</sub>, indicando que nestes tempos foram encontradas as maiores atividades antioxidantes, confirmando os resultados apresentados na tabela 2.

A  $\beta$ -glicosidase foi capaz de catalisar a hidrólise dos glicosídeos fenólicos do concentrado da casca dos ramos residuais da erva-mate, e desta forma aumentar sua atividade antioxidante. Este aumento indica que a forma bioativa destes compostos *in vitro* é a forma de aglicona. Estudos futuros são necessários para determinar as aplicações do concentrado da casca dos ramos residuais da erva-mate hidrolisado pela  $\beta$ -glicosidase com intuito de aumentar sua atividade antioxidante.

## 4 CONCLUSÃO

Através da hidrólise enzimática com a  $\beta$ -glicosidase foi possível converter os glicosídeos fenólicos do concentrado da casca dos ramos residuais da erva-mate em suas agliconas e então exercer influência na atividade antioxidante da amostra. O ácido clorogênico e a epigalocatequina galato foram detectados em suas maiores concentrações nos tempos 3 e 6 horas de hidrólise, respectivamente. Além disso, as maiores atividades antioxidantes foram também obtidas nestes mesmos tempos. A análise de componentes principais (APC) confirmou a relação entre ambos os compostos com a atividade antioxidante da casca dos ramos residuais da erva-mate e a fraca relação do ácido ferúlico com esta atividade.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOS, D. H. M.; ISHIMOTO, E. Y.; MARQUES, M. O. M.; FERRI, A. F.; TORRES, E. A. F. S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p.538–543, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p.25–30, 1995.

DA SILVA, E. L.; NEIVA, T. J. C.; SHIRAI, M.; TERÃO, J.; ABDALLA, D. S. P. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, p.973–979, 2008.

DO, Y.-K.; KIM, J.-M.; CHANG, S.-M.; HWANG, J-H; KIM, W-S. Enhancement of polyphenol bio-activities by enzyme reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p.173–178, 2009.

FILIP, R.; LOTITO, S. B.; FERRARO, G.; FRAGA C. G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p.1437–1446, 2000.

GILEWICZ-LUKASIK, B.; KOTER, S.; KURZAWA, J. Concentration of anthocyanins by the membrane filtration. **Separation and Purification Technology**, v. 57, p.418–424, 2007.

HSIEH, M. C.; GRAHAM, T. L. Partial purification and characterization of a soybean  $\beta$ -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. **Phytochemistry**, v. 58, p.995–1005, 2001.

LA TORRE, G. L.; LAGANÀ, G.; BELLOCCO, E.; VILASI, F.; SALVO, F.; DUGO, G. Improvement on enzymatic hydrolysis of resveratrol glucosides in wine. **Food Chemistry**, v. 85, p.259–266, 2004.

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

MAILLARD, M. N.; BERSET, C. Evolution of antioxidant activity during kilning: Role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p.1789–1793, 1995.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p.727–47, 2004.

MATTA, V. M.; MORETTI, R. H; CABRAL, L. M. C. Microfiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of acerola juice. **Journal Food Engineering**, v. 61, p.477–482, 2004.

PAGLIOSA, C. M., SIMAS, K. N., AMBONI, R. D. M. C., MURAKAMI, A. N. N., PETKOWICZ, C. L. O., MEDEIROS, J. D, RODRIGUES, A. C., AMANTE, E. R. Characterization of the bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Industrial Crops and Products**, v. 32, p.428–433, 2010.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the Antiradical Efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 76, p.270–276, 1998.

SCHINELLA, G. R.; TROIANI, G.; DAVILA, V.; DE BUSCHIAZZO, P. M.; TOURNIER, H. A. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p.357–360, 2000.

SCHULDT, E. Z.; BET, A. C.; HORT, M. A.; IANSEN, C.; MARASCHIN, M.; CKLESS, K.; RIBEIRODO-VALLE, R. M. An ethyl acetate fraction obtained from a southern Brazilian red wine relaxes rat mesenteric arterial bed through hyperpolarization and NO-cGMP pathway. **Vascular Pharmacology**, v. 43, p.62–68, 2005.

TSUI, E.M.; CHERYAN, M. Membrane processing of xanthophylls in ethanol extracts of corn. **Journal of Food Engineering**, v. 83, p.590–595, 2007.

VINCZE, I.; VATAI, G. Application of nanofiltration for coffee extract concentration. **Desalination**, v. 162, p.287–294, 2004.

XU, L.; WANG, S. The Ginkgo biloba extract concentrated by nanofiltration. **Desalination**, v. 184, p.305–313, 2005.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Stabilization of canola oil with flavonoids. **Food Chemistry**, v. 50, p.393-396, 1994.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A casca dos ramos residuais da erva-mate foi utilizada como substrato para a obtenção de um extrato aquoso rico em compostos fenólicos e com alta atividade antioxidante, sendo por meio da metodologia de superfície de resposta possível determinar a condição ótima para extração destes compostos. Dentre os fatores pesquisados, apenas a temperatura foi significativa nesta extração, onde empregando  $85 \pm 5$  °C se atingiu a maior concentração de compostos fenólicos totais.

A nanofiltração mostrou-se como uma alternativa eficaz para a concentração de compostos fenólicos do extrato aquoso da casca dos ramos residuais da erva-mate, já que com o aumento do fator de redução volumétrico (FRV) houve também aumento da concentração destes compostos, alcançando coeficiente de retenção de 99,77% no FRV de 6,0. Além disso, a atividade antioxidante também aumentou com o aumento do FRV, tendo no FRV 6,0 o maior desempenho.

A partir dos resultados de cromatografia líquida de alta performance (CLAE) obtidos para o extrato otimizado e concentrados nos FRVs 2,0, 4,0 e 6,0 foram detectados os ácidos gálico, 4,5-dicafeoilquínico, clorogênico e a epigalocatequina galato, sendo os dois últimos compostos os majoritários tanto no extrato otimizado como nos seus concentrados (FRV 4,0 e 6,0).

A hidrólise enzimática do concentrado de FRV igual a 6,0 possibilitou a conversão dos glicosídeos fenólicos presentes nesta matéria-prima em suas agliconas, além de influenciar na sua atividade antioxidante. Foi também possível detectar o teor de ácido ferúlico presente no concentrado, o qual não havia sido detectado anteriormente à hidrólise. O ácido clorogênico e a epigalocatequina galato foram detectados em seus maiores teores nos tempos 3 e 6 horas de hidrólise, respectivamente, sendo as maiores atividades antioxidantes também obtidas nestes mesmos tempos. A análise de componentes principais (APC) confirmou a relação entre ambos os compostos com a atividade antioxidante da casca dos ramos residuais da erva-mate, além da fraca relação do ácido ferúlico com esta atividade.

O sucesso na concentração dos compostos fenólicos do extrato aquoso da casca dos ramos residuais da erva-mate por nanofiltração confere a esta matéria-prima grande potencial de emprego pela indústria de alimentos como fonte de compostos bioativos. Desta forma, possibilitar-se-ia a aplicação deste resíduo agroindustrial e agregar-se-ia

valor ao mesmo, fortalecendo a cultura da erva-mate. Além disso, o concentrado hidrolisado pela enzima  $\beta$ -glicosidase mostrou-se com atividade antioxidante superior a do não hidrolisado, devido ao aumento dos compostos fenólicos livres considerados a forma bioativa destes compostos *in vitro*.

Estudos futuros são necessários para caracterizar outros compostos presentes no concentrado da casca dos ramos residuais da erva-mate, como saponinas e carotenóides; para avaliar *in vivo* possíveis efeitos tóxicos para a saúde humana; e para determinar as aplicações do concentrado hidrolisado pela  $\beta$ -glicosidase com intuito de aumentar sua atividade antioxidante.