

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

Fernanda de Andrade

**ESTUDO TOXICOLÓGICO E ANÁLISE DA ESTABILIDADE
TÉRMICA DO EXTRATO NEBULIZADO DE ERVA MATE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia, na linha de pesquisa de Análises Clínicas.
Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz da Silva

Florianópolis

2011

Fernanda de Andrade

**ESTUDO TOXICOLÓGICO E ANÁLISE DA ESTABILIDADE
TÉRMICA DO EXTRATO NEBULIZADO DE ERVA MATE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Farmácia.

Universidade Federal de Santa Catarina, 28 de Fevereiro de 2011.

Prof. Eloir P. Schenkel, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof., Dr. Edson Luiz da Silva,
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr. Euclides Lara Cardozo Júnior,
Universidade Paranaense

Prof.^a, Dr.^a Edna Regina Amante,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a Ângela Machado de Campos,
Universidade Federal de Santa Catarina

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

A553e Andrade, Fernanda de

Estudo toxicológico e análise da estabilidade térmica do extrato nebulizado de erva mate [dissertação] / Fernanda de Andrade ; orientador, Edson Luiz da Silva. - Florianópolis, SC, 2011.

105 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Erva-mate. 3. Extratos vegetais. 4. Toxicidade - Testes. 5. Estabilidade. I. Silva, Edson Luiz da. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

Dedico esta obra aos meus pais, pelo carinho dedicado, os grandes responsáveis pelo que sou.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter estado ao meu lado por todo o tempo, presente em todas as coisas, sempre guiando meus passos.

Ao meu orientador, pelo acolhimento, confiança, orientação, paciência e pelo exemplo de profissionalismo, e humildade.

À amiga Brunna pelas conversas, pela amizade, pela força, pelo carinho.

À amigas Aliny, Graziela, Elayne, Daysi, pelo acolhimento, pelas conversas e pela amizade, com certeza marcaram muito e vou levar comigo para sempre.

Às meninas do laboratório, pelas conversas, e desabafos.

Ao Professor Marcelo Maraschin, do Laboratório de Bioquímica Vegetal do CCA-UFSC por ter cedido seu laboratório para as análises, pelo acolhimento e ajuda do pessoal do laboratório, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo carinho.

À Professora Cláudia Almeida Coelhos de Albuquerque do Laboratório de Histologia da FURB pela análise microscópica dos cortes histológicos.

À Elizia Barbosa do Laboratório de Patologia da FURB pela atenção e confecção das lâminas dos cortes histológicos.

Ao Laboratório de Bioquímica do Hospital Universitário da UFSC pelas análises de Sódio e Potássio.

À empresa Mate Leão pelo fornecimento do extrato seco de erva mate.

Ao Programa de Pós Graduação por ter me aceito no programa de mestrado.

Aos meus pais que entenderam minha ausência, agradeço pelo carinho, amor, pelos conselhos e por guiarem meus passos.

À minha irmã Jéssica por ter cuidado dos coelhos quando precisei.

Aos familiares e amigos que me forneceram apoio durante minha caminhada.

Ao meu namorado Adriano, por ter estado ao meu lado por todo esse período, pelas inúmeras conversas, pela força nos momentos mais difíceis, pelos ótimos momentos que passamos juntos, pelo amor, carinho, tranquilidade e compreensão.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original

Albert Einstein

RESUMO

Neste estudo foram avaliadas a eventual toxicidade em animais e a estabilidade térmica e microbiológica do extrato nebulizado de erva mate (*Ilex paraguariensis*) em cápsulas. Para verificar a toxicidade aguda, foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas (n=6), aos quais foram administrados com água (controle) ou extrato seco de erva mate (grupo mate) dissolvido em água (2 g/kg), por gavagem. Os animais foram avaliados por 14 dias com relação à ingestão de água, ração, variação do peso corpóreo e comportamento. Ao final do estudo, os animais foram mortos, e os órgãos foram analisados macroscopicamente. Não houve mortes, ou diferença significativa no peso corpóreo entre os grupos. Não foram encontradas alterações nos órgãos dos animais administrados com mate. No estudo de doses repetidas foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas (n=10) e coelhos *New Zealand* (n=3). Os animais receberam água (controle) ou extrato seco de erva mate dissolvido em água (2 g/kg), diariamente, durante 12 semanas. Avaliou-se o peso corpóreo, comportamento e foram realizadas análises bioquímicas e hematológicas. Ao final, os animais foram mortos e o fígado, estômago, rins e intestino delgado foram analisados microscopicamente. Não houve mortes, diferenças na evolução do peso corpóreo, nem alterações comportamentais entre os animais que consumiram erva mate. Além disso, as análises bioquímicas e hematológicas revelaram alterações não associadas à toxicidade. Em adição, não foram observadas alterações histopatológicas celulares e/ou teciduais indicadoras de atipias decorrentes de toxicidade nos animais do grupo mate em relação aos controles. A estabilidade química do extrato seco de erva mate verde foi avaliada a partir do estudo de longa duração, na ausência ou na presença do adjuvante dióxido de silício. As cápsulas ficaram armazenadas em recipiente impermeável, sob temperatura de 30 °C, por período de 12 meses. No estudo de estabilidade acelerado, as cápsulas contendo extrato seco de erva mate verde ou tostada permaneceram sob temperatura de 40 °C, por seis meses. Para a quantificação dos compostos, o extrato seco foi dissolvido em água e a concentração dos compostos fenólicos totais, dos ácidos clorogênico, gálico e dicafeoilquínico, das metilxantinas cafeína e teobromina, da capacidade antioxidante total (FRAP e TEAC) e das saponinas totais foi monitorada durante o estudo. Segundo a legislação vigente, foram aceitas variações de até 10%. Além disso, a contagem de micro-organismos foi realizada nos extratos secos de erva mate verde e

tostada, mantidos sob as diferentes condições de temperatura e períodos de tempo. De acordo com os resultados obtidos, a concentração dos constituintes do extrato seco de erva mate em cápsulas manteve-se constante durante os períodos de tempo avaliados de seis ou 12 meses, independente da presença do adjuvante. Além disso, não foram encontradas variações na contagem de fungos e bactérias, independente da temperatura e tempo de armazenamento. Em conclusão, o extrato seco de erva mate não apresentou toxicidade aguda ou crônica em ratos e coelhos e as cápsulas de extrato de mate mantiveram-se estáveis durante o período avaliado. Com base nesses resultados, indicamos que os estudos de toxicidade em seres humanos poderão ser realizados com o extrato de erva mate.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, erva mate, extrato seco, toxicidade, estabilidade.

ABSTRACT

In the present study, we evaluated the eventual toxicity in animals and the termic and microbiological stability of nebulized extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in capsules. To determine the eventual acute toxicity, we used male and female Wistar rats (n = 6) with administration of water (control) or dried extract of yerba mate (mate group) dissolved in water (2 g/kg) by gavages. Animals were monitored for 14 d and the water and food intakes, body weight changes, and behavior were evaluated. After 14 d, the animals were killed and organs were macroscopically examined. There were no deaths or significant differences in body weight gain between animal groups. Additionally, no morphological changes were found in organs of mate-administered animals. In the chronic study, males and females Wistar rats (n = 10) and New Zealand White rabbits (n = 3) were used. Animals received water (control) or 2 g/kg mate extract dissolved in water daily during 12 wk. Body weight and behavior were monitored. In addition, we carried out biochemical and hematological analysis. At the end of 12 wk, the animals were killed and the liver, stomach, kidneys and small intestine were examined microscopically. There were no deaths, differences in body weight gain, or behavioral changes in animals that consumed mate. Furthermore, the biochemical and hematological tests revealed only few variations not associated with toxicity. In addition, there were no histopathological changes, and cell or tissue alterations indicating toxicity in the animals of mate group. The chemical stability of dry extract of yerba mate green was verified in a long-term study, in which capsules of dried extract of yerba mate, in the absence or presence of the adjuvant silicium dioxide, were stored in a waterproof container at 30 °C for 12 mo. Additional assays were carried out with capsules of green and roasted yerba mate extracts kept at 40 °C for 6 mo (accelerated study). For the evaluation of chemical stability, dry extracts were dissolved in water and the concentration of total phenols, chlorogenic, gallic, and dicaffeoylquinic acids, caffeine, theobromine, total antioxidant capacity (FRAP and TEAC), and total saponins was monitored during the study period. According to Brazilian laws, a maximum variation of 10% in the constituent levels was accepted. Moreover, microorganism count was carried out in dry extract of green and roasted yerba mate in capsules kept at different temperatures for 6 and 12 mo. The results showed that constituents of mate extracts in capsules were highly stable at 30 or 40 °C for 6 or 12 months, regardless

of adjuvant. In addition, no variations were found in the count of fungi and bacteria, regardless of storage temperature and time period. In summary, dry mate extract showed no acute or chronic toxicity in rats and rabbits and mate extract in capsules remained stable during the study period of 6 or 12 mo. Based on these results, we suggest that toxicity studies in humans can be performed with capsules of mate.

Keywords: *Ilex paraguariensis*, yerba mate, dried extract, toxicity, stability.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura molecular dos principais compostos fenólicos (modificado de BASTOS, 2007). 30
- Figura 2 – Estrutura molecular das metilxantinas; 1: cafeína, 2: teobromina e 3: teofilina (adaptado de GNOATTO, et al., 2007). 32
- Figura 3 – Estrutura molecular básica de saponinas isoladas de *Ilex paraguariensis* derivadas do ácido ursólico (modificado de TAKETA; BREITMAIER; SCHENKEL, 2004). 34
- Figura 4 – Variação do peso corporal dos ratos Wistar machos (símbolos fechados) e fêmeas (símbolos abertos), durante 14 dias de acompanhamento após a administração, em dose única, de 2 g/kg de extrato seco de erva mate (grupo mate) ou de água (grupo controle) por gavagem. 48
- Figura 5 – Aspecto macroscópico dos órgãos de ratas que receberam água (A) ou 2,0 g/kg de peso de extrato seco de erva mate (B) por gavagem, em dose única. 49
- Figura 6 – Variação do peso corporal dos ratos Wistar machos (símbolos fechados) e fêmeas (símbolos abertos), durante 12 semanas de acompanhamento após a administração, de extrato seco de erva mate (2 g/kg), em doses repetidas (grupo mate) ou de água (grupo controle) por gavagem. 50
- Figura 7 – Corte histológico transversal do estômago de ratos Wistar machos que receberam administração intragástrica diária de água (controle; A) ou de extrato seco de erva mate na dose de 2,0 g/kg (B) durante 12 semanas. Esparsos eosinófilos são observados na camada mucosa (). Aumento de 400x. 54
- Figura 8 – Cortes histológicos de rim (A e B), fígado (C e D) e do intestino delgado (E e F) de ratos Wistar machos. Os animais receberam administração intragástrica diária de água (controle, A, C, E) ou de 2,0 g/kg de extrato seco de erva mate (B, D, F) por 12 semanas. (A) Gomérulo renal com cápsula bem delimitada e túbulos renais bem preservados; Túbulo contorcido distal. (B) Região cortical apresentando vasos congestos (*). (C e D) Veia centro lobular (*); (C) Hepatócitos preservados mostrando os depósitos de glicogênio. (D) Moderada congestão nos sinusóides (*); células de Kupffer no lóbulo hepático (). (E) e (F) Mucosa intestinal; epitélio cilíndrico simples bem preservado e células caliciformes (). Aumento de 400 x. 55
- Figura 9 – Variação do peso corporal dos coelhos New Zealand machos (símbolos fechados) e fêmeas (símbolos abertos), durante 12 semanas de acompanhamento após a administração, de extrato seco de erva mate (2 g/kg), em doses repetidas (grupo mate) ou de água (grupo controle) por via oral. 56
- Figura 10 – Cortes histológicos transversais de estômago (A, B, C e D) e longitudinais de rim (E e F) de coelhos New Zealand machos do grupo controle (A, C e E) e do grupo mate (B, D e F) que receberam diariamente extrato de erva mate na dose de 2 g/kg durante 12 semanas. (A e B): Camada mucosa do estômago preservada, células de revestimento da mucosa são observadas com discreta congestão vascular. Aumento de 400 x. (C e D): Camadas mucosa,

- submucosa e muscular externa são observadas no campo. Aumento de 100 x. (E e F): (*) Presença do corpúsculo renal, com cápsula de Bowmann bem preservada e moderada congestão vascular. Aumento de 400 x. 64
- Figura 11 – Cortes histológicos transversais de Fígado (Fig. A e B) e transversais de intestino delgado duodeno (Fig. C e D) de coelhos machos que receberam diariamente água (controle; A e C) ou 2 g/kg de peso de extrato seco de erva mate (B e D) por 12 semanas. A: Veia centro lobular (*) e hepatócitos dispostos radialmente. Aumento de 400 x. B: veia centrolobular congesta. Hepatócitos bem preservados. C: São observadas as camadas mucosa, submucosa, com glândulas de Brünner (*) e muscular externa. D são observadas a camada mucosa, com vilosidade bem preservada, e a camada submucosa, com glândulas de Brünner (*). Aumento de 400 x. 65
- Figura 12 – Estabilidade dos compostos fenólicos totais (A) e da capacidade antioxidante total, quantificada pelos métodos FRAP (B) e TEAC (C), no extrato seco de erva mate verde em cápsulas, mantido a 30 °C durante 12 meses. O extrato seco foi encapsulado na ausência ou na presença de 5, 10 ou 20% de adjuvante. Os resultados são a média ± desvio-padrão de três determinações, em duplicata. 67
- Figura 13 – Estabilidade dos principais compostos fenólicos isolados no extrato seco de erva mate verde em cápsulas, mantidos a 30 °C durante 12 meses. O extrato seco foi encapsulado na ausência de adjuvante. Os resultados são a média ± desvio-padrão de duas determinações, em triplicata, para cada variável. Concentrações iniciais de ácido gálico = 19,1 ± 1,1 mg/g; de ácido clorogênico = 39,8 ± 5,9 mg/g; de ácido dicafeoilquínico = 9,95 ± 0,94 mg/g. 68
- Figura 16 – Estabilidade das principais metilxantinas, no extrato seco de erva mate verde em cápsulas, mantido a 30 °C durante 12 meses. O extrato seco foi encapsulado na ausência de adjuvante. Os resultados são a média ± desvio-padrão de três determinações, em duplicata. Concentrações iniciais de cafeína = 0,10 ± 0,013 mg/g; de teobromina = 0,076 ± 0,007 mg/g. 69
- Figura 18 – Estabilidade do teor de saponinas totais quantificado por meio de ensaio colorimétrico (A) ou de CLAE (B) no extrato seco de erva mate verde em cápsulas, mantidas a 30 °C durante 12 meses. O extrato seco foi encapsulado na ausência de adjuvante. Os resultados são a média ± desvio-padrão de duas determinações, em triplicata, para cada período de tempo. Concentração inicial: (A) = 32,9 ± 0,20 mg/g; (B) = 21,9 ± 0,15 mg/g. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fenóis totais, ácidos clorogênico e gálico, cafeína e teobromina, saponinas totais e capacidade antioxidante total (FRAP e TEAC) contidas no extrato seco de erva mate verde.	47
Tabela 2 - Efeito da administração repetida do extrato seco de erva mate (2,0 g/kg) nos parâmetros hematológicos de ratos Wistar adultos, durante 12 semanas.	52
Tabela 3 - Efeito da administração repetida do extrato seco de erva mate (2,0 g/kg) nos parâmetros bioquímicos de ratos Wistar adultos, durante 12 semanas.	53
Tabela 4 - Efeito da ingestão prolongada do extrato de erva mate (2,0 g/kg) nos parâmetros hematológicos de coelhos New Zealand machos adultos, durante 12 semanas.	58
Tabela 5 - Efeito da ingestão prolongada do extrato de erva mate (2,0 g/kg) nos parâmetros bioquímicos de coelhos New Zealand machos adultos, durante 12 semanas.	60
Tabela 6 - Efeito da ingestão prolongada do extrato de erva mate (2,0 g/kg) nos parâmetros hematológicos de coelhos New Zealand fêmeas adultas, durante 12 semanas.	61
Tabela 7 - Efeito da administração do extrato de erva mate (2,0 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos de coelhos New Zealand fêmeas adultas, durante 12 semanas.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2' – azino-bis-(3-etilbenzotiazilidina- 6- ácido sulfônico)
ALT	Alanina Amino Transferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato Amino Transferase
AU	Ácido Úrico
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CT	Colesterol Total
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FA	Fosfatase Alcalina
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Potential</i>
GGT	Gama Glutamil Transferase
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês, <i>High-density lipoprotein</i>)
HDL-C	Colesterol da HDL (ou HDL-colesterol)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, <i>Low-density lipoprotein</i>)
LDL-C	Colesterol da LDL (ou LDL-colesterol)
PT	Proteínas Totais
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TG	Triglicerídeos
TROLOX	6-hidroxi, 2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
TPTZ	2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina
TSA	Ágar Caseína Soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VCM	Volume Corpuscular Médio
VLDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, <i>Very low-density lipoprotein</i>)
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 APRESENTAÇÃO DO ESTUDO	25
1.2 ERVA MATE	27
1.2.1 <i>Constituintes</i>	29
1.2.1.1 Compostos Fenólicos.....	29
1.2.2.2 Metilxantinas.....	31
1.2.2.3 Saponinas	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 MATERIAIS E REAGENTES	37
3.2 MÉTODOS	38
3.2.1 <i>Avaliação da Toxicidade Aguda e de Doses Repetidas do Extrato Seco de Erva Mate Verde em Animais</i>	38
3.2.1.1 Animais.....	38
3.2.1.2 Verificação da Toxicidade Aguda do Extrato Seco de Erva Mate	38
3.2.1.3 Verificação da Toxicidade de Doses Repetidas do Extrato Seco de Erva Mate Verde em Ratos e Coelhos	39
3.2.1.3.1 Ratos	39
3.2.1.3.2 Coelhos.....	39
3.2.2 <i>Estabilidade Térmica e Avaliação Microbiológica dos Extratos Secos de Erva Mate Verde e Tostada em Cápsulas</i>	40
3.2.2.1 Preparação dos Extratos Aquosos de Erva Mate para as Análises ..	41
3.2.2.2 Quantificação dos Compostos Fenólicos.....	41
3.2.2.2.1 Quantificação dos Fenóis Totais.....	41
3.2.2.2.2 Determinação de Compostos Fenólicos por CLAE.....	41
3.2.2.3 Quantificação da Capacidade Antioxidante Total	42
3.2.2.3.1 FRAP	42
3.2.2.3.2 TEAC.....	43
3.2.2.4 Determinação de Metilxantinas por CLAE.....	43
3.2.2.5 Quantificação das Saponinas totais.....	44
3.2.2.5.1 Quantificação das Saponinas Totais por Método Colorimétrico	44
3.2.2.5.2 Determinação de Saponinas Totais por CLAE.....	44
3.2.3 <i>Análise Microbiológica do Extrato Seco de Erva Mate Verde e Tostada em Cápsulas</i>	45
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45

3.3.1 <i>Estudo de toxicidade aguda e de doses repetidas</i>	45
4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO SECO DE ERVA MATE VERDE.....	47
4.2 ESTUDOS DE TOXICIDADE.....	47
4.2.1 <i>Toxicidade Aguda</i>	48
4.2.2 <i>Toxicidade de Doses Repetidas</i>	49
4.2.2.1 Ratos.....	49
4.2.2.1.1 Análises Hematológicas e Bioquímicas.....	50
4.2.2.1.2 Estudo Histopatológico em Ratos.....	54
4.2.2.2 Coelhos.....	56
4.2.2.2.1 Análises Hematológicas e Bioquímicas.....	56
4.2.2.2.2 Estudo Histopatológico em Coelhos.....	63
4.3 ESTABILIDADE QUÍMICA DO EXTRATO SECO DE ERVA MATE VERDE E TOSTADA EM CÁPULAS.....	65
4.3.1 <i>Estudo de Longa Duração com Extrato Seco de Erva Mate Verde</i>	65
4.3.1.1 Compostos Fenólicos e Capacidade Antioxidante Total.....	65
4.3.1.1.1 Metilxantinas.....	69
4.3.1.1.2 Saponinas Totais.....	70
4.3.2 <i>Estudo Acelerado com o Extrato Seco de Erva Mate Verde</i>	71
4.3.2.1 Compostos Fenólicos e Capacidade Antioxidante Total.....	71
4.3.2.1.1 Metilxantinas.....	74
4.3.2.1.2 Saponinas Totais.....	75
4.3.3 <i>Estudo Acelerado com o Extrato Seco de Erva Mate Tostada</i>	76
4.3.3.1 Compostos Fenólicos e Capacidade Antioxidante Total.....	76
4.3.3.1.1 Metilxantinas.....	79
4.3.3.1.2 Saponinas Totais.....	80
4.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO EXTRATO SECO DE ERVA MATE VERDE E TOSTADA EM CÁPULAS.....	81
5 DISCUSSÃO.....	83
5.1 ESTUDO TOXICOLÓGICO EM ANIMAIS.....	83
5.2 ESTABILIDADE TÉRMICA DO EXTRATO SECO DE ERVA MATE EM CÁPULAS.....	88
6 CONCLUSÕES.....	93
6.1 ESTUDOS DE TOXICIDADE.....	93
6.2 ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	93
ANEXO A – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS.....	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do estudo

O consumo de plantas está associado com um reduzido risco de doenças crônicas (câncer e doenças cardiovasculares). Essa associação deve-se em parte por causa das substâncias com capacidade antioxidante, e também daquelas que modulam a atividade enzimática e a expressão gênica (DAY et al., 2004). Na área farmacêutica as plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas, tanto para a obtenção de fármacos (que são substância ativas isoladas), como para a obtenção de adjuvantes, ou, ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais: os medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL, GOSMANN, PETROVICK, 2000). No Brasil, encontram-se registrados 512 medicamentos fitoterápicos, dos quais mais de 70% apresentam-se como formas farmacêuticas sólidas (CARVALHO et al., 2008). A matéria-prima para estes produtos é constituída, majoritariamente, por extratos secos, os quais dentre as suas vantagens incluem a maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, mais fácil padronização, maior concentração dos compostos ativos e mais elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas. Dentre os procedimentos de secagem destaca-se a técnica de secagem por aspersão (*spray drying*) (OLIVEIRA, PETROVICK, 2010).

Nesse contexto, dentre as plantas popularmente conhecidas e consumidas encontra-se a erva mate. Na medicina popular a erva mate é indicada para o tratamento de inúmeras desordens, tais como artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de fluidos, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas. Pesquisas publicadas recentemente, inclusive pelo nosso grupo de pesquisa, têm provado cientificamente os efeitos que podem explicar muitas das propriedades farmacológicas atribuídas a erva mate. Foi demonstrado que o extrato aquoso de erva mate tem capacidade hepatoprotetora, estimulante do sistema nervoso central, diurética, efeito colerético e de propulsão intestinal, antioxidante e quimiopreventivo, emagrecedor, antiviral, vasodilatador e inibidor das reações de glicação (revisado por BASTOS et al., 2007; BRACESCO et al., 2010; HECK; DE MEJIA et al., 2007.).

Vários componentes fitoquímicos têm sido identificados no extrato aquoso de erva mate. Os principais componentes pertencem à classe dos ácidos fenólicos (ácido clorogênico e seus isômeros; ácido caféico; 3,4-ácido dicafeoilquínico; 3,5-ácido dicafeoilquínico) e das metilxantinas, ou alcalóides purínicos (cafeína e teobromina). A erva mate apresenta, ainda, uma pequena quantidade de flavonóides (quercetina, canferol e rutina). Além disso, contém saponinas triterpênicas e já foram identificados cerca de 15 aminoácidos, diversos minerais (alumínio, cálcio, cromo, cobre, ferro, fósforo, manganês, níquel, potássio e zinco) e vitaminas (C, B1 e B2) (revisado por BASTOS et al., 2007; BRACESCO et al., 2010; HECK; DE MEJIA, 2007; SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2000.).

Resultados anteriores de nosso laboratório mostraram que o extrato aquoso de erva mate tem o potencial de inibir a progressão da aterosclerose *in vivo*, em coelhos alimentados com colesterol (MOSIMANN; WILHELM-FILHO; SILVA, 2006). Além disso, em camundongos com aterosclerose, os quais apresentam disfunção endotelial semelhante aos pacientes com DAC, mostramos que a administração prolongada do extrato de erva mate melhorou de forma significativa a reatividade vascular *ex vivo* (FELIPPI et al., 2006). Ou seja, a erva mate reverteu a inibição da contração e do relaxamento vascular verificada nos animais com aterosclerose. Baisch et al. (1998) já haviam demonstrado um efeito vasodilatador *in vitro* para o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em artéria mesentérica de ratos. Confirmamos esses resultados utilizando anéis isolados de artéria aorta de ratos (FELIPPI et al., 2005).

Recentemente, realizamos um estudo em nosso laboratório no qual demonstramos que a ingestão de infusão de erva mate (chimarrão ou chá mate tostado) durante 20 ou 40 dias reduziu significativamente o LDL-C e aumentou o HDL-C em pacientes com hipercolesterolemia (DE MORAIS, et al., 2009). No entanto, foi observado que muitos indivíduos participantes que não possuem o hábito de ingerir chás, particularmente aqueles de sabor amargo e sem açúcar – como a erva mate – não conseguiram ingerir a infusão de erva mate, particularmente o chimarrão, sugerindo que o mesmo deve acontecer com uma parcela significativa da população. Dessa forma, com o intuito de fazer com que mais pessoas se beneficiem das propriedades da erva mate, idealizamos o desenvolvimento de cápsulas contendo o extrato seco da erva mate, bem como analisamos a toxicidade em animais e verificamos a estabilidade química e microbiológica do extrato seco.

1.2 ERVA MATE

A erva mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hilaire, 1822) é uma planta arbórea pertencente à família Aquifoliaceae. Suas partes aéreas são utilizadas para o preparo de uma bebida muito apreciada pelo seu sabor amargo característico (ou peculiar) e propriedades estimulantes. A infusão de erva mate era consumida pelos nativos da América do Sul quando o novo mundo foi descoberto pelos europeus. Nos dias de hoje, a infusão de erva mate (preparada exclusivamente com folhas secas e moídas de *Ilex paraguariensis*, de acordo com a legislação brasileira e argentina) é consumida em torno de um a dois litros por dia por milhões de pessoas e constitui a principal alternativa para o café e chá preto (MOSIMANN, WILHELM-FILHO; SILVA, 2006). É encontrada na região subtropical da América do Sul e está presente no Brasil, principalmente nos estados da região Sul e no Mato Grosso do Sul, no norte da Argentina, Paraguai e Uruguai (BASTOS, et al., 2007) apresentando elevada importância econômica social e cultural para a população dessas regiões. A Argentina é o maior exportador de erva mate, enquanto o Uruguai tem o maior consumo *per capita*: 6-8 kg/pessoa/ano, seguido pela Argentina 5 kg/pessoa/ano. Somente três estados no Brasil tem apreciadores assíduos de chimarrão em sua população, mas até 70% da população masculina dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná consomem chimarrão diariamente (BRACESCO et al., 2010). A erva mate é cultivada nos estados da região sul e aproximadamente 596 municípios desenvolvem a atividade ervateira, envolvendo 710 mil pessoas para uma produção anual de 650 mil toneladas de folhas (MACCARI; SANTOS, 2000). O maior consumidor nacional de erva mate é o estado do Rio Grande do Sul, com 65% do total, seguido pelos estados do Paraná (17%), de Santa Catarina (12%) e Mato Grosso do Sul (3%) (CIGANA, 2008).

Além do chimarrão, são conhecidas outras bebidas à base de erva mate como o tererê, mate cozido (cocido, em espanhol), e o chá mate. O chimarrão e o tererê são preparados com as folhas, secas e moídas de erva mate, utilizando água quente e água fria, respectivamente. O chimarrão é consumido no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Paraguai (MAZZAFERA, 1997), enquanto o tererê é mais consumido no centro-oeste do Brasil e no Paraguai. O mate cozido refere-se ao mate de folhas secas e moídas preparado na forma de infusão de ervas, usualmente comercializado em saches, semelhante a muitos outros chás, sendo consumido principalmente na Argentina e no Uruguai. O chá mate é preparado com folhas secas e moídas de erva

mate tostada e é consumido especialmente no Brasil e Argentina (revisado por BASTOS et al., 2007; HECK, MEJIA, 2007).

Utilizada há séculos como bebida estimulante, a erva mate vem ganhando rápida aceitação nos mercados de vários países fora da América do Sul incluindo EUA e países Europeus, tanto na forma de chá, como ingrediente na formulação de alimentos, suplementos dietéticos e cosméticos (revisado por BASTOS et al., 2007; HECK, DE MEJIA, 2007). Na última década, *Ilex paraguariensis* tem sido usada na formulação de cervejas, cremes, doces além de outros usos não tradicionais (VIEIRA et al., 2008). Recentemente, tem atingido supermercados na forma de bebidas energéticas na Califórnia e está sendo vendida na Europa em combinação com outras ervas como um chá energético ou como auxiliar na redução do peso (BRACESCO et al., 2010).

Além disso, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de encapsular os antioxidantes naturais da erva mate. Deladino e colaboradores (2008) encapsularam o extrato liofilizado de erva mate com alginato de cálcio isolado, ou adicionado de quitosana, demonstrando que o processo pode ser uma alternativa promissora para a suplementação alimentar com antioxidantes naturais ou mesmo para aplicação na indústria alimentícia. Outro trabalho semelhante foi realizado por Harris e colaboradores (2010), os quais prepararam nanopartículas e microsferas para a encapsulação dos componentes ativos do extrato de erva mate, porém, com foco nas aplicações cosméticas. Nesse contexto também, um estudo *in vivo*, demonstrou que o uso de cápsulas contendo uma mistura de erva mate, guaraná (*Paullinia cupana*) e damiana (*Turnera diffusa* var. *aphrodisiaca*) prolongou o esvaziamento gástrico, reduziu o tempo de percepção de saciedade e induziu uma significativa perda de peso (5,1 kg) após 45 dias em indivíduos com sobrepeso (ANDERSEN; FOGH, 2001).

Nas plantas em geral, além dos constituintes fitoquímicos, e também dos metais pesados, outros compostos que podem estar presentes e eventualmente serem prejudiciais a saúde, por terem efeito mutagênico e carcinogênico, são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs). Os PAHs são encontrados no café, formados durante o processo de torrefação, e também estão presentes na erva mate, e neste caso, tem origem da degradação dos compostos e do aquecimento da madeira durante o ‘sapeco’ (rápido processo de secagem) e do final da etapa de secagem (revisado por BASTOS, 2007). Nesse sentido, alguns estudos epidemiológicos têm sido desenvolvidos com o intuito de provar se o mate apresenta efeitos carcinogênicos ou

não. A maioria desses estudos tem focado no câncer oral, pulmonar, esofágico, laringico e de baço e esses, tem verificado evidências de associações aliadas com o consumo de mate (BATES et al., 2007; GOLDENBERG et al., 2003; SEWRAN et al., 2003). A ação sinérgica entre mate, álcool, e cigarro tem um papel claro em vários estudos; enquanto em outros, deficiências nutricionais e uma higiene oral precária estiveram presentes como um fator que pode estar associado na patogenia da doença. Nenhum aumento do risco esteve associado às bebidas à base de mate geladas. Dessa forma, mais estudos precisam ser realizados antes de uma sentença definitiva em relação ao risco de câncer associado com alguma das várias formas de consumo do mate. Um estudo recente relatando o processamento do mate com os PAHs mostrou que a concentração desses compostos foi inferior ao limite máximo considerado por apresentar risco de saúde (VIEIRA, 2010).

Particularmente, em se tratando da erva mate, não existem estudos em animais que tenham avaliado a toxicidade do extrato aquoso ou do extrato seco de erva mate. Recentemente, em estudos *in vivo* realizados em nosso laboratório, verificou-se que, a ingestão de três doses diárias de mate por 40 dias ou chá mate por 40 ou 60 dias por indivíduos saudáveis, não promoveu alterações nos parâmetros hematológicos, nos marcadores renais e hepáticos (BOAVENTURA, 2010; KLEIN, 2010; DE MORAIS, 2009; STEFANUTO, 2010).

1.2.1 Constituintes

1.2.1.1 Compostos Fenólicos

Dentre as inúmeras propriedades biológicas da erva mate, a atividade antioxidante tem sido amplamente estudada e está associada ao conteúdo de compostos fenólicos do mate, particularmente os derivados cafeoilquínicos (Fig. 1) e em menor concentração os flavonóides rutina, quercetina, diglicosídeo de luteolina e a cafeoilglicose (BASTOS et al., 2005; BASTOS et al., 2006; BASTOS et al., 2007; CARINI et al., 1998; FILIP et al., 2000; FILIP et al., 2001; RICCO; WAGNER; GURNI, 1991). Desses, os ácidos dicafeoilquínicos (6,8% do peso seco) e clorogênico (3 a 5% do peso seco) são os que estão em maior proporção (CARINI et al., 1998; FILIP et al., 2001). Nos extratos aquosos de *Ilex paraguariensis*, os níveis de polifenóis são superiores aos encontrados no chá verde e semelhantes aos encontrados no vinho tinto (GUGLIUCCI et al., 2009a e b). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é determinada por sua

estrutura molecular e, mais especificamente, pela posição e grau de hidroxilação da estrutura do anel. A atividade antioxidante é convencionalmente usada para indicar a habilidade de um antioxidante neutralizar alguns radicais, nesse contexto, os compostos fenólicos são tipicamente neutralizadores de oxigênios reativos (HE; VENANT, 2004).

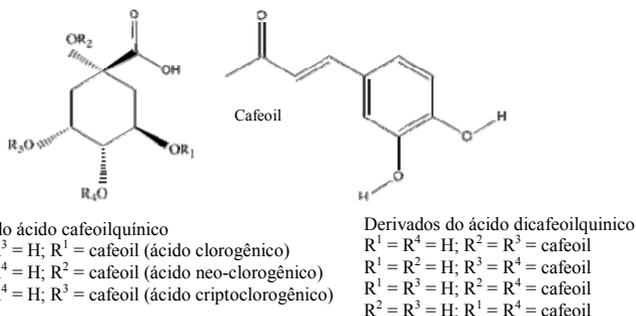


Figura 1 – Estrutura molecular dos principais compostos fenólicos (modificado de BASTOS, 2007).

No organismo, os ácidos clorogênicos (ACs) passam por um complexo processo de absorção e metabolismo, o qual é consistente com o metabolismo de compostos xenobióticos (KONG, et al., 2001). Os ACs são clivados pela atividade enzimática da microflora intestinal e subsequentemente ocorre absorção dos ácidos hidroxicinâmicos (p-cumárico, cafeico, e ácido ferúlico), produtos da o-metilação e conjugação do ácido cafeico e então ocorre absorção dos produtos de degradação (dihidroferúlico; 3-hidroxihipurico e ácido hipúrico) (RECHNER et al., 2002). Os ACs também podem ser absorvidos sem nenhuma modificação prévia, como observado no plasma de seres humanos após ingestão aguda de café, a maior fonte de ácidos clorogênicos da dieta ocidental (CLIFFORD et al., 2004; MONTEIRO et al., 2001; NARDINI et al., 1995; NARDINI et al., 2002; NATELLA et al., 2007; RECHNER et al., 2002).

Gugliucci e Stahl (1995) demonstraram, pela primeira vez, que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* inibiu a oxidação da LDL *in vitro* e que esta inibição foi dependente da concentração do extrato. Subsequentemente, Gugliucci (1996) estendeu essas observações para uma situação *ex vivo*, demonstrando que os antioxidantes presentes no extrato de mate foram absorvidos e alcançaram concentração no plasma

de indivíduos saudáveis, suficientemente elevadas para inibir a oxidação *ex vivo* do plasma induzida pelo cobre. Recentemente, estudo realizado em nosso laboratório (SILVA et al., 2008) confirmou os resultados de Gugliucci (1996) e ampliou o estudo demonstrando que a ingestão de infusão de erva mate pode inibir a oxidação *ex vivo* das partículas de LDL, diminuindo, inclusive, a formação de óxidos de colesterol. Isto significa que alguns compostos antioxidantes do mate, que atingiram o plasma após a absorção, permaneceram aderidos às partículas de LDL isoladas e, conseqüentemente, podem inibir as modificações oxidativas da LDL que ocorrem em locais específicos, como por exemplo, no espaço subendotelial das artérias durante a formação e progressão da aterosclerose.

1.2.2.2 Metilxantinas

As metilxantinas são uma classe de alcalóides purínicos encontrados em muitas plantas diferentes incluindo chás, café e chocolate. As xantinas encontradas no mate incluem teofilina (1,3-dimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) e cafeína (1,3,7-trimetilxantina) (ATHAYDE et al., 2000). As fórmulas estruturais desses compostos estão apresentadas na Figura 2. Destes três compostos a cafeína é encontrada em maior quantidade, 1 a 2% do peso seco, seguido por teobromina 0,3 a 0,9% do peso seco. Em contraste com a teobromina e a cafeína, a teofilina tem sido encontrada em apenas pequenas quantidades nas folhas. Isso pode ser devido ao fato de a teofilina ser um intermediário no catabolismo da cafeína na planta (ITO; CROZIER; ASHIHARA, 1997). A cafeína é um dos metabólitos das plantas mais conhecidos, e sua ingestão é comumente relacionada a efeitos colaterais à saúde. Os efeitos colaterais imediatos da cafeína incluem palpitação, distúrbios gastrointestinais, ansiedade, tremor, aumento da pressão arterial e insônia (CHOU; BENOWITZ, 1994; NURMINEN et al., 1999).

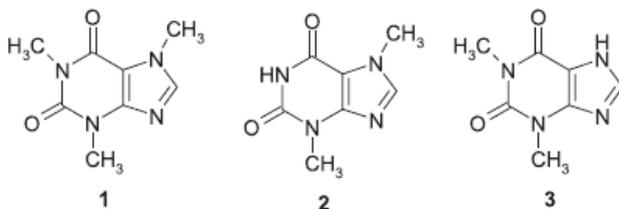


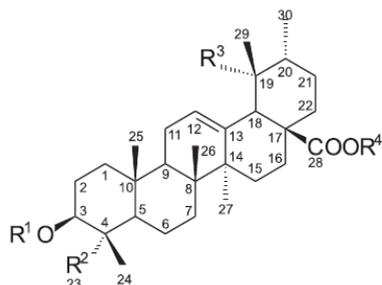
Figura 2 – Estrutura molecular das metilxantinas; 1: cafeína, 2: teobromina e 3: teofilina (adaptado de GNOATTO, et al., 2007).

Por outro lado, a cafeína influencia o sistema nervoso central, cardíaco, muscular e a atividade renal. Esse efeito no sistema nervoso central está confinado ao centro cortical responsável pelas maiores funções psíquicas, e resulta em um reforço bem coordenado das funções cerebrais e, conseqüentemente, ótima vigilância e atividade mental (BOKUCHAVA; SKOBELEVA, 1980). As propriedades estimulantes conhecidas há longo tempo pelos nativos habitantes da América do Sul são atribuídas a estes compostos. A cafeína também acelera o metabolismo e a captação de oxigênio pelos tecidos do corpo e tem o potencial de produzir efeitos significantes nos alvos metabólicos como saciedade, termogênese, e oxidação de gorduras (WESTERTER-PLANTENGA et al, 2006). Dentre as várias preparações de plantas disponíveis comercialmente e que reivindicam possuir ação anti-obesidade, somente o extrato de *Ilex paraguariensis* provocou a queda no quociente respiratório, indicando uma elevação na proporção de gordura oxidada (MARTINET; HOSTETTMANN; SCHUTZ, 1999). Além disso, o uso de cápsulas contendo uma mistura de erva mate, guaraná (*Paullinia cupana*) e damiana (*Turnera diffusa* var. *aphrodisiaca*) prolongou o esvaziamento gástrico, reduziu o tempo de percepção de saciedade e induziu uma significativa perda de peso (5,1 kg) após 45 dias em indivíduos com sobrepeso (ANDERSEN; FOGH, 2001).

Alguns autores indicam que o café seja a principal fonte de cafeína na população adulta, no entanto, a ingestão de cafeína varia amplamente devido ao fato de que, enquanto parte da população não ingere café, outros, ingerem quantidades substanciais da bebida (BARONE; ROBERTS, 1996; MANDEL, 2002). Indivíduos que costumam beber chimarrão ou tererê podem ingerir de 1 a 6 litros dessas bebidas por dia, indicando que o mate é uma importante fonte de cafeína na dieta (BARROS et al., 2000).

1.2.2.3 Saponinas

De particular importância é a possível propriedade hipocolesterolêmica da erva mate, a qual pode ser atribuída à presença de saponinas. Saponinas são moléculas derivadas de esteróides ou terpenos altamente solúveis em água, e sua estrutura (anfipática), promove a redução da tensão superficial de soluções aquosas formando espuma quando agitado (revisado por SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2000). Várias saponinas triterpênicas contendo o ácido ursólico foram isoladas das folhas do mate (Fig. 3) (GOSMANN et al., 1995; KRAEMER et al., 1996). As saponinas apresentam comportamento anfifílico e capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos, possuindo, assim, propriedades de diminuir a concentração plasmática de colesterol, conforme demonstrado pela adição de saponinas de várias espécies vegetais à dieta de animais de experimentação (revisado por SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2000). Particularmente, as saponinas isoladas da *Ilex paraguariensis*, bem como o extrato aquoso da planta, inibiram *in vitro* a difusão passiva de ácido cólico através de membrana de celulose (FERREIRA et al., 1997), mimetizando a inibição da absorção de ácidos biliares pelas células intestinais, a qual tem efeito na diminuição do colesterol plasmático. Além disso, Paganini-Stein et al. (2005) relataram que o extrato aquoso de erva mate diminuiu a concentração sérica de colesterol total e triglicérides em ratos alimentados com colesterol. A administração de extrato aquoso de erva mate também reduziu a fração VLDL-LDL em ratos obesos (PANG; CHOI; PARK, 2008). Também demonstramos que a administração prolongada de extrato aquoso de erva mate para coelhos diminuiu os valores de colesterol total em aproximadamente 30%, porém sem diferença estatisticamente significativa (MOSIMANN; WILHELM-FILHO; SILVA, 2006). Recentemente, realizamos um estudo em nosso laboratório no qual demonstramos que a ingestão de infusão de erva mate (chimarrão ou chá mate tostado) durante 20 ou 40 dias reduziu significativamente o LDL-C e aumentou o HDL-C em pacientes com hipercolesterolemia (DE MORAIS, et al., 2009).



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1	H	CH ₃	H	H
2	Ac	CH ₃	H	H
3	H	CH ₂ OH	H	H
4	α-L-Ara1→	CH ₂ OH	HO	H
5	α-L-Ara1→	CH ₃	HO	β-D-Glc1→
6	β-D-Glc1→3α-L-Ara1→	CH ₃	HO	β-D-Glc1→

Figura 3 – Estrutura molecular básica de saponinas isoladas de *Ilex paraguariensis* derivadas do ácido ursólico (modificado de TAKETA; BREITMAIER; SCHENKEL, 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi verificar a eventual toxicidade do extrato seco de erva mate verde em animais e a estabilidade dos principais constituintes do extrato de erva mate verde e tostada em cápsulas, sob diferentes temperaturas de armazenamento.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a eventual toxicidade aguda do extrato seco de erva mate verde em ratos;
- Averiguar a eventual toxicidade do extrato seco de erva mate verde em ratos e coelhos por meio do estudo de doses repetidas;
- Avaliar a estabilidade térmica do extrato seco de erva mate verde e tostada em cápsulas, mantidas em diferentes condições de temperatura, através da quantificação de fenóis totais, atividade antioxidante e saponinas totais por metodologia colorimétrica e de compostos fenólicos, metilxantinas e saponinas totais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Detectar e quantificar os possíveis microorganismos presentes no extrato de erva mate verde e tostada em cápsulas nos diferentes períodos de tempo e sob diferentes temperaturas de armazenamento (30 e 40 °C).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os extratos secos de erva mate (*Ilex paraguariensis*) foram fornecidos pela empresa Leão Júnior S/A – Curitiba-PR. Os resíduos sólidos foram obtidos por nebulização em torre de secagem *Spray Dryer* por aspersão, sem a adição de adjuvantes, a partir dos extratos aquosos de erva mate verde (tipo chimarrão) e de mate tostado.

Os conjuntos de reagentes para as determinações de glicose, triglicerídeos, colesterol, uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), proteínas totais, gama-glutamil transferase (GGT), bilirrubina e fosfatase alcalina (FA) foram obtidos da empresa Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa – MG). Os eletrólitos sódio e potássio foram quantificados por meio de eletrodos íons seletivos em equipamento automatizado Siemens (Newark, NJ, Estados Unidos) e as demais análises bioquímicas foram realizadas em equipamento automatizado Cobas Mira Plus Roche (Basle, Suíça). As análises hematológicas foram realizadas por contador automatizado Sysmex XE-2100i Roche (Kobe, Japão).

As substâncias relacionadas a seguir foram adquiridas da SIGMA (Steinheim, Alemanha ou St. Louis, EUA): Reagente de Folin-Ciocalteu, ácido ursólico, 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolidina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 6-hidroxi, 2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), dióxido de silício, ácido clorogênico, ácido gálico, cafeína e teobromina.

A hematoxilina, eosina e parafina foram adquiridas da empresa Cromoline Química Fina Ltda (São Paulo, Brasil). Etanol, acetato de sódio e cloreto férrico (FeCl_3) foram obtidos da empresa Labsynth (Diadema-SP); vanilina, persulfato de potássio, metanol, acetonitrila, *n*-butanol, foram adquiridos da empresa VETEC (Rio de Janeiro, Brasil); ácido clorídrico (HCl), ácido perclórico, acetona, carbonato de sódio, clorofórmio, ácido acético glacial, e os demais reagentes foram adquiridos de outras marcas nacionais. Todas as soluções foram preparadas com água ultra pura ou deionizada, com reagentes de pureza analítica.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Avaliação da Toxicidade Aguda e de Doses Repetidas do Extrato Seco de Erva Mate Verde em Animais

3.2.1.1 Animais

Para o estudo agudo e crônico foram utilizados ratos Wistar, *Rattus norvegicus* var *albinus*, com dois meses de idade, machos e fêmeas, pesando em média 212,9 e 164,2 g, respectivamente. No estudo crônico, além dos ratos, também foram utilizados coelhos New Zealand, *Cuniculus orytolagus*, machos e fêmeas, com dois meses de idade e pesando em média 1,4 e 1,3 kg, respectivamente. Todos os animais foram distribuídos em dois grupos, mate e controle. Os animais do grupo mate receberam extrato seco de erva mate verde dissolvido em água, por gavagem, enquanto os animais do grupo controle receberam igual volume de água. Além disso, todos os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em situações controladas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h) e temperatura (22 ± 2 °C).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo nº PP00379) e todos os animais foram provenientes do Biotério Central da UFSC (anexo A).

3.2.1.2 Verificação da Toxicidade Aguda do Extrato Seco de Erva Mate

A toxicidade aguda do extrato seco de erva mate verde foi avaliada por meio da administração intragástrica de 2 g/kg de peso do extrato seco, por gavagem, em dose única, a ratos Wistar machos e fêmeas (n = 6 por grupo). Esta é a dose máxima permitida de acordo com a legislação vigente e demais literaturas utilizadas (BRASIL, 2004; BRASIL, 1996, OGA, 2003). Os animais controles receberam o mesmo volume de água por gavagem. Sinais clínicos de toxicidade, como consumo de água e de ração e atividade comportamental, foram monitorados nos animais de ambos os grupos após 15, 30 e 60 min e a cada 4 h durante as primeiras 24 h e diariamente pelos 14 dias subsequentes, seguindo normas da Resolução 90 (BRASIL, 2004). Durante o estudo, o peso corporal dos animais foi aferido a cada três dias. Ao final do experimento, após jejum de 12 h, todos os animais

foram mortos por hipovolemia (exsanguinação pela artéria aorta abdominal) sob anestesia etérea e os órgãos foram analisados macroscopicamente *in situ*.

3.2.1.3 Verificação da Toxicidade de Doses Repetidas do Extrato Seco de Erva Mate Verde em Ratos e Coelho

3.2.1.3.1 Ratos

A eventual toxicidade de doses repetidas do extrato seco de erva mate verde foi determinada por meio da administração intragástrica diária de 2 g/kg de peso corpóreo do extrato seco, por gavagem, a ratos Wistar machos e fêmeas (n = 10 por grupo), por 12 semanas (BRASIL, 2004; BRASIL, 1996, OGA, 2003). Os animais do grupo controle receberam água (veículo) no mesmo volume e pela mesma via de administração (n = 5 por grupo). O peso corporal dos animais foi aferido semanalmente. Ao final de três meses, após jejum de 12 h, os animais foram anestesiados com éter, foi feita laparotomia e o sangue foi coletado através da artéria aorta abdominal para tubos com ou sem o anticoagulante ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA). Os animais foram mortos por hipovolemia. Após centrifugação (750 x g, 10 min), o soro foi obtido e utilizado para as análises bioquímicas de sódio, potássio, GGT, AST e ALT, FA, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicérides, glicose, proteínas totais, bilirrubina e ferro. O sangue total, coletado com anticoagulante EDTA, foi utilizado para a análise do hemograma completo. O rim, estômago, fígado e intestino delgado foram retirados para as análises histopatológicas. Para tanto, alíquotas dos órgãos foram mantidas em formalina 10% por 24 a 48 h e, posteriormente, foram imersas em álcool etílico 70% seguida pela inclusão em parafina. Os cortes histológicos e a confecção das lâminas (coloração com hematoxilina e eosina) foram realizados no Laboratório de Patologia da Universidade Regional de Blumenau – FURB. As análises histopatológicas foram realizadas pela Professora Claudia Almeida Coelho de Albuquerque no Laboratório de Morfologia da FURB.

3.2.1.3.2 Coelho

A avaliação da eventual toxicidade de doses repetidas do extrato de erva mate verde foi realizada por meio da administração diária de 2 g/kg do extrato seco dissolvido em água, por via oral

utilizando-se bebedouros, a coelhos brancos, machos e fêmeas, da linhagem New Zealand ($n = 3$ por grupo), por um período de 12 semanas. A cada 30 dias, foram feitas coletas de sangue, após jejum de 12 h, através de punção da artéria central da orelha para a realização de análises bioquímicas e hemograma completo. O peso dos animais foi aferido semanalmente. Ao final do estudo e após jejum de 12 h, os animais foram mortos por hipovolemia (exsanguinação por punção cardíaca) após anestesia intravenosa com pentobarbital sódico 40 mg/kg. Após a laparotomia, os órgãos foram retirados para as análises histopatológicas, conforme descrito acima no item 3.2.1.3.1.

3.2.2 Estabilidade Térmica e Avaliação Microbiológica dos Extratos Secos de Erva Mate Verde e Tostada em Cápsulas

Para os testes de estabilidade, os extratos secos de erva mate verde ou tostada foram encapsulados na ausência ou na presença de 5, 10 ou 20% do adjuvante dióxido de silício coloidal (GNOATTO, 2003), em cápsulas gelatinosas tamanho 00, utilizando-se encapsulador de acrílico manual. As cápsulas foram mantidas em embalagem impermeável e, de acordo com a legislação vigente, não havendo a necessidade de controlar a umidade (BRASIL, 2005). Diante disso, as cápsulas foram mantidas em estufas de cultura modelo 002CB, da marca Fanen, sob as seguintes condições de temperatura: a) estudo acelerado (seis meses): 40 ± 2 °C; b) estudo de longa duração (12 meses): 30 ± 2 °C, seguindo legislação vigente da ANVISA (BRASIL, 2005). Nos tempos 0, 3 e 6 meses (estudo acelerado) e 0, 3, 6, 9 e 12 meses (estudo de longa duração) foi avaliado o conteúdo de fenóis totais, de saponinas totais e a capacidade antioxidante total por análises colorimétricas. Além disso, foram quantificadas as concentrações de metilxantinas, compostos fenólicos e saponinas totais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme metodologias descritas a seguir. Nos mesmos períodos de tempo, foram realizadas análises microbiológicas do extrato de erva mate verde ou tostada em cápsulas. Conforme a legislação vigente, para todas as análises foi aceita variação de até 10% na concentração dos constituintes (BRASIL, 2005). De acordo com a *World Health Organization* - WHO (2005), o limite máximo de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL estabelecido para bactérias aeróbicas é de 10^5 /g, sendo de 10/g para *Echerichia coli*, de 10^3 /g para outras enterobactérias, e ausência de *Salmonella* sp. e

Shigella sp. Para fungos, o limite máximo de UFC/mL aceito nas amostras é de 10^3 /g.

3.2.2.1 Preparação dos Extratos Aquosos de Erva Mate para as Análises

Nos diferentes períodos de tempo, as cápsulas de erva mate verde ou tostada foram retiradas da estufa e os extratos secos de erva mate foram re-suspensos em água deionizada, na proporção de 16 mg/mL para a erva mate verde, ou 4,6 mg/mL para a erva mate tostada. Estas concentrações dos extratos de resíduos sólidos foram obtidas a partir de infusões de mate verde ou tostado em proporções usadas em estudos anteriores e normalmente consumidas pela população.

3.2.2.2 Quantificação dos Compostos Fenólicos

3.2.2.2.1 *Quantificação dos Fenóis Totais*

O conteúdo de fenóis totais dos extratos aquosos de erva mate, preparados conforme descrição acima foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu segundo metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999). Cinquenta microlitros dos extratos aquosos de erva mate foram misturados com 150 μ L de etanol (95%), 800 μ L de água destilada e 80 μ L de Folin-Ciocalteu (50%). Após 5 min, foram adicionados 150 μ L de carbonato de sódio 5% e a mistura permaneceu à temperatura ambiente por 1 h, na ausência de luz. A leitura da absorbância do produto colorido foi realizada em comprimento de onda de 765 nm (espectrofotômetro Spectrum SP2000 – Xangai, China). O ácido clorogênico foi usado como padrão e os resultados foram expressos em mg/g de extrato seco. As análises foram realizadas em duplicata de três amostras de extratos de erva mate verde ou tostada de cada período de tempo.

3.2.2.2.2 *Determinação de Compostos Fenólicos por CLAE*

Os compostos fenólicos nos extratos aquosos de erva mate foram quantificados por CLAE de fase reversa (Schimadzu LC-10, Kyoto, Japan), usando coluna Nucleosil C18 (4,6 mm diâmetro x 250 mm comprimento) com detector UV/Visível (Shimadzu SPD 10A). Para a determinação dos compostos fenólicos, os extratos aquosos foram centrifugados (750 g, 10 min) e alíquotas foram injetadas na coluna C18, mantida a 40 °C, com detecção em 280 nm. A fase móvel

isocrática foi constituída de água/ácido acético/*n*-butanol (350:1:10, v/v/v), e foi utilizado fluxo de 1 mL/min. A determinação quantitativa foi baseada no método de padrões externos por comparação com o tempo de retenção dos compostos fenólicos puros. As curvas de calibração foram obtidas através do gráfico das áreas dos picos com diferentes concentrações de ácido gálico ($y = 18930x - 22758$, $r^2 = 0,99$) e ácido clorogênico ($y = 12195x - 93608$, $r^2 = 0,99$). Para todas as análises, a concentração dos compostos fenólicos foi calculada utilizando-se a média dos resultados de três medidas consecutivas de duas amostras de cada período de tempo avaliado.

3.2.2.3 Quantificação da Capacidade Antioxidante Total

A capacidade antioxidante dos extratos aquosos de erva mate foi realizada por meio de dois métodos, FRAP (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Potential*) e TEAC (do inglês, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) (BENZIE; STRAIN, 1996, PELLEGRINI et al. (2001). Todas as análises foram realizadas em duplicata de três amostras de extratos de erva mate verde ou tostada de cada período de tempo.

3.2.2.3.1 FRAP

O ensaio FRAP se baseia no potencial redutor férrico de compostos antioxidantes presentes na amostra. Os antioxidantes reduziram o Fe^{+3} a Fe^{+2} , o qual foi quelado pela 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ, com absorção máxima em 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996). Resumidamente, 10 μ L de extrato aquoso de erva mate foram adicionadas a 1 mL da solução de trabalho, que contém cloreto férrico ($FeCl_3$), TPTZ e tampão acetato de sódio. A mistura foi incubada por 15 min, a 37°C e, posteriormente, realizou-se a leitura da absorbância do produto colorido em 593 nm (espectrômetro Spectrum SP2000 – Xangai, China). A concentração da capacidade antioxidante foi calculada a partir da curva padrão preparada com diferentes concentrações de Trolox ($y = 0,00042x - 0,00168592$, $r^2 = 0,9990422$), um análogo hidrossolúvel da vitamina E e os resultados foram expressos em mol/g equivalentes Trolox.

3.2.2.3.2 TEAC

O método conhecido por TEAC e descrito por Pellegrini et al. (2001) baseia-se na habilidade dos antioxidantes presentes no extrato de erva mate sequestrarem o cátion radical estável ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), um cromóforo azul-esverdeado com absorção máxima em 734 nm. A solução ABTS 7,0 mM, preparada em persulfato de potássio 2,45 mM, foi diluída em água para fornecer absorvância de aproximadamente 0,70 em 734 nm. A concentração da capacidade antioxidante foi calculada a partir da curva padrão preparada com diferentes concentrações de Trolox ($y = 0,11713x + 2,687$, $r^2 = 0,99795$). Após a adição de alíquotas dos extratos aquosos de erva mate ou de Trolox em 1 mL da solução de ABTS diluída, a absorvância foi medida imediatamente após homogeneização, a 30 °C, em espectrofotômetro semi-automatizado (Bioplus BIO 2000 – Barueri, SP). Os resultados foram expressos em mol/g equivalentes Trolox.

3.2.2.4 Determinação de Metilxantinas por CLAE

As metilxantinas presentes no extrato aquoso de erva mate foram quantificadas de acordo com metodologia descrita por Strassmann e colaboradores (2008), por CLAE de fase reversa (Shimadzu LC-10, Kyoto, Japan), usando coluna Shim-pack C18 (4,6 mm diâmetro x 250 mm comprimento) com detector UV/visível (Shimadzu SPD 10A). Os extratos de erva mate foram misturados com diclorometano, homogeneizados e deixados em repouso por 1 h. A fase orgânica foi evaporada e re-suspensa em 2 mL de diclorometano. Após centrifugação (750 g/10 min) e diluição, alíquotas da fase orgânica foram injetadas na coluna termostatisada a 30 °C, com detecção em 272 nm. A fase móvel isocrática foi constituída de acetonitrila/0,1% ácido fórmico (15:85, v/v), e foi utilizado fluxo de 1 mL/min. A determinação quantitativa foi realizada usando curvas de calibração padrão de cafeína ($y = 14502,02x$, $r^2 = 0,99$) e teobromina ($y = 22044x - 15279$, $r^2 = 0,99$). Para todas as análises, a concentração dos compostos foi calculada pela média dos resultados de três determinações consecutivas de duas amostras dos diferentes extratos em cada período de tempo.

3.2.2.5 Quantificação das Saponinas totais

3.2.2.5.1 *Quantificação das Saponinas Totais por Método Colorimétrico*

A quantificação das saponinas totais foi realizada por método espectrofotométrico, conforme extração descrita por Gnoatto, Schenkel e Bassani (2005) e reação com vanilina e ácido perclórico descrita por Fan e He (2006). As saponinas contidas em 10 mL dos extratos aquosos de mate verde ou tostado foram submetidas à hidrólise com 5 mL de HCl 12 N, durante 2 h sob refluxo. As saponinas foram extraídas com 6 mL de clorofórmio, em processo repetido por quatro vezes. As frações clorofórmicas foram combinadas e evaporadas em evaporador rotativo e o resíduo foi re-suspenso em 10 mL de etanol. Para a quantificação, alíquotas da solução etanólica foram evaporadas e 150 µL de vanilina a 5%, preparada em ácido acético glacial, e 500 µL de ácido perclórico foram adicionados sobre o resíduo seco. A mistura foi incubada a 60 °C por 45 min. Após resfriamento em banho de gelo. Acrescentou-se ácido acético glacial e a absorbância foi lida em 548 nm (espectrofotômetro Spectrum SP2000 – Xangai, China). Como padrão, utilizou-se o ácido ursólico ($y = 0,00087205x - 0,02339$, $r^2 = 0,99827$), núcleo triterpênico majoritário das saponinas de *Ilex paraguariensis* (GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005).

3.2.2.5.2 *Determinação de Saponinas Totais por CLAE*

As saponinas dos extratos aquosos de erva mate foram quantificadas por cromatografia líquida de fase reversa (Shimadzu LC-10, Kyoto, Japan), usando coluna Supelco C18 (4,6 mm diâmetro x 250 mm comprimento) mantida a 23°C ± 3°C e detector UV/visível (Shimadzu SPD 10A), conforme metodologia descrita por Gnoatto, Schenkel e Bassani (2005). Após hidrólise ácida e extração das saponinas, a fase clorofórmica foi evaporada conforme descrito acima e o resíduo seco foi re-suspenso em acetonitrila. Alíquotas diluídas desta solução foram injetadas na coluna C18 e como fase móvel foi utilizada mistura de acetonitrila:água (70:30, v/v), com fluxo de 1 mL/min. A detecção foi realizada em 203 nm. Para todas as determinações a concentração de saponinas totais foi calculada pela média dos resultados de três determinações consecutivas de duas amostras. E a curva padrão ($y = 1911,98x - 3483,28$, $r^2 = 0,99$).

3.2.3 Análise Microbiológica do Extrato Seco de Erva Mate Verde e Tostada em Cápsulas

Para a realização das análises microbiológicas foram seguidas normas preconizadas pela WHO (2005). Os extratos de erva mate verde ou tostada, presentes nas cápsulas armazenadas sob diferentes condições de temperatura, foram re-suspensos em água estéril na proporção de 100 mg em 10 mL, e alíquotas foram utilizadas para a pesquisa de eventuais bactérias e fungos. Todas as análises foram realizadas com duas amostras e em duplicata, de cada período avaliado; no início do estudo, e ao final do estudo.

Para o crescimento e identificação de bactérias, os extratos aquosos foram semeados em meios específicos para cada grupo microbiano selecionado e incubados por 48 h a 35 °C para enterobactérias e bactérias mesófilas aeróbias e a 45 °C para *Echerichia coli*. Para o crescimento de *Salmonella*, inicialmente, alíquotas dos extratos foram incubados em caldo selenito por 24 h e, posteriormente, foi feita a semeadura em Ágar *Salmonella Shigella*. O meio de cultura Agar Caseína Soja – TSA foi utilizado para a quantificação de bactérias mesófilas aeróbias e o meio de Agar MacConkey – MC foi usado para a quantificação de enterobactérias. Colônias típicas desenvolvidas em cada meio seletivo foram selecionadas para a realização de provas morfo-tintoriais e bioquímicas (KONEMAN, 2001). De acordo com a literatura utilizada, o limite máximo de UFC/mL estabelecido para bactérias aeróbicas é de 10^5 /g, sendo de 10^3 /g para *Echerichia coli*, de 10^3 /g para outras enterobactérias, e ausência de *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. (WHO, 2005).

Para o crescimento e identificação das colônias de fungos, foi utilizada a técnica de *pour plate*, na qual 1 mL do extrato aquoso, preparado conforme descrição anterior, foi misturado em 15 mL de meio Ágar Sabouraud líquido. Após homogeneização e solidificação do meio, as placas foram incubadas por inversão em estufa por 48 h a 30 °C. Segundo a WHO (2005), o limite máximo de UFC/mL de fungos nas amostras é de 10^3 /g.

3.3 Análise estatística

3.3.1 Estudo de toxicidade aguda e de doses repetidas

Para todas as análises realizadas, a estatística descritiva foi apresentada na forma de média e desvio padrão. Os testes de Shapiro-

Wilk foram aplicados para testar a normalidade das variáveis contínuas. Quando necessário, utilizou-se transformação logarítmica dos dados. No estudo agudo, para os dados com distribuição gaussiana, utilizou-se teste t de Student não pareado para comparações entre os diferentes grupos experimentais do peso corpóreo e da ingestão de água e ração pelos animais. Para dados que não possuíram distribuição gaussiana utilizou-se o teste de Mann Whitney. No estudo de doses repetidas, para os resultados dos ratos e coelhos do peso corpóreo, das análises bioquímicas e hematológicas que possuíram distribuição gaussiana, as comparações inter-grupos (controle e mate) foram realizadas através do teste t de Student não pareado e para os dados que não apresentaram distribuição gaussiana, utilizou-se o teste de Mann Witnney. Foi considerado um nível de significância menor do que 5%. Para o tratamento estatístico dos dados utilizou-se o software *SigmaStat* versão 3.5.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização Química do Extrato Seco de Erva Mate Verde

Os resultados da caracterização química do extrato seco de erva mate verde e tostada estão representados na Tabela 1. Os principais compostos fenólicos, como o ácido clorogênico e o ácido gálico, representam aproximadamente 13 e 6% dos compostos fenólicos totais, respectivamente, na erva mate verde. Com relação às metilxantinas, a concentração de cafeína foi 1,3 vezes maior do que àquela de teobromina.

Tabela 1 - Fenóis totais, ácidos clorogênico e gálico, cafeína e teobromina, saponinas totais e capacidade antioxidante total (FRAP e TEAC) contidas no extrato seco de erva mate verde.

	Extrato Seco de Erva Mate			
	Verde		Tostada	
	mg/g	mg/cápsula	mg/g	mg/cápsula
Fenóis Totais ^a	304,5 ± 30,1	51,8 ± 4,4	271,7 ± 18,8	46,2 ± 3,2
Ácido Clorogênico ^b	39,8 ± 5,9	6,8 ± 1,0	19,9 ± 2,1	3,4 ± 0,35
Ácido Gálico ^b	19,1 ± 1,1	3,2 ± 0,19	10,1 ± 1,9	10,1 ± 1,9
Ácido Di-cafeoilquínico ^b	9,95 ± 0,94	1,69 ± 0,16	4,97 ± 0,38	0,84 ± 0,06
Cafeína ^b	0,10 ± 0,013	0,017 ± 0,002	0,08 ± 0,009	0,013 ± 0,001
Teobromina ^b	0,076 ± 0,007	0,013 ± 0,001	0,045 ± 0,004	0,007 ± 0,001
Saponinas Totais ^a	32,9 ± 0,2	5,6 ± 0,03	13,9 ± 0,9	2,3 ± 0,15
	(mmol/g)	(mol/cápsula)	(mmol/g)	(mol/cápsula)
FRAP ^a	1,5 ± 0,07	0,3 ± 0,01	1,5 ± 0,05	0,3 ± 0,09
TEAC ^a	0,8 ± 0,04	0,1 ± 0,01	0,9 ± 0,04	0,2 ± 0,07

Os resultados estão expressos como média ± DP. FRAP, *ferric reducing antioxidant potential*; TEAC, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*.

^a Ensaios colorimétricos realizados com três amostras em duplicata.

^b Ensaios realizados por CLAE com duas amostras em triplicata.

4.2 Estudos de Toxicidade

4.2.1 Toxicidade Aguda

No estudo toxicológico agudo, o qual foi realizado em ratos Wistar após a administração do extrato seco de erva mate, em dose única de 2,0 g/kg de peso, não houve mortes ou alterações no comportamento dos animais, ao longo dos 14 dias de acompanhamento. Em relação à ingestão de ração e água, o consumo de ração pelos machos do grupo controle foi superior em comparação aos animais que receberam o extrato seco de erva mate (grupo mate) ($p = 0,01$). Para as fêmeas, pelo contrário, houve maior ingestão de ração pelos animais do grupo mate comparado às fêmeas do grupo controle ($p = 0,01$). Não houve variação significativa na ingestão de água pelos animais dos diferentes grupos experimentais (resultados não mostrados). Quando avaliada a evolução do peso corpóreo dos animais, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos controle e mate, para machos e fêmeas (Fig. 4). A administração aguda de extrato de erva mate não provocou alterações anatômicas macroscópicas nos órgãos das fêmeas (Fig. 5), o mesmo foi encontrado para os machos (não mostrados).

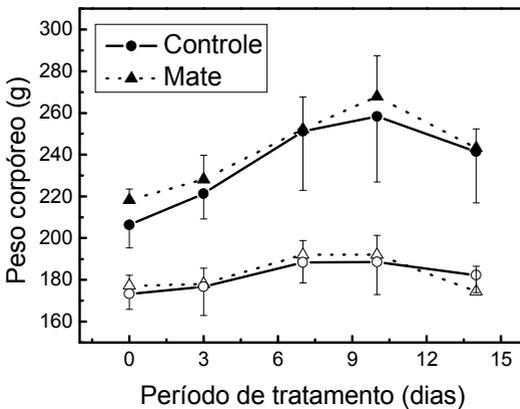


Figura 4 – Variação do peso corporal dos ratos Wistar machos (símbolos fechados) e fêmeas (símbolos abertos), durante 14 dias de acompanhamento após a administração, em dose única, de 2 g/kg de extrato seco de erva mate (grupo mate) ou de água (grupo controle) por gavagem.

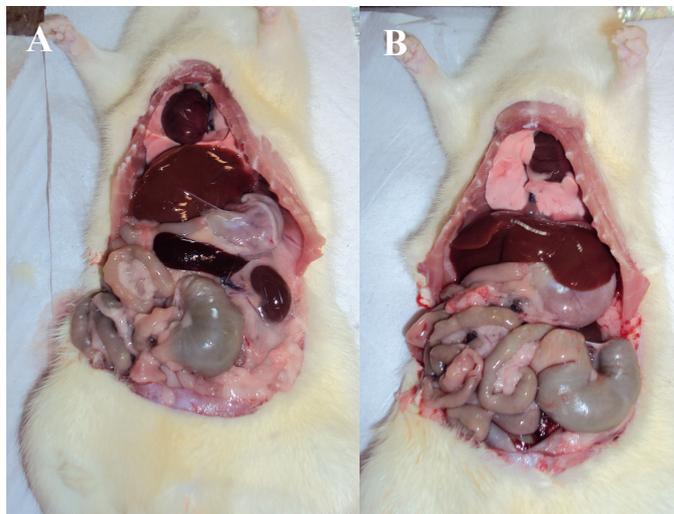


Figura 5 – Aspecto macroscópico dos órgãos de ratas que receberam água (A) ou 2,0 g/kg de peso de extrato seco de erva mate (B) por gavagem, em dose única.

4.2.2 Toxicidade de Doses Repetidas

Conforme preconiza a legislação vigente (BRASIL, 2004), o estudo toxicológico de doses repetidas foi realizado em animais roedores e não roedores, ratos Wistar e coelhos brancos da linhagem New Zealand, respectivamente.

4.2.2.1 Ratos

No estudo toxicológico de doses repetidas em ratos Wistar, o qual foi realizado pela administração intragástrica diária do extrato seco de erva mate na dose de 2,0 g/kg de peso, por 12 semanas, não foram observadas mortes ou diferenças significativas no peso corpóreo entre os animais dos grupos controle e mate, para ambos os sexos (Fig. 6).

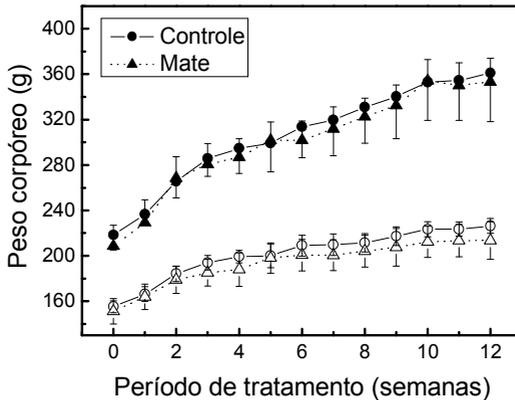


Figura 6 – Variação do peso corporal dos ratos Wistar machos (símbolos fechados) e fêmeas (símbolos abertos), durante 12 semanas de acompanhamento após a administração, de extrato seco de erva mate (2 g/kg), em doses repetidas (grupo mate) ou de água (grupo controle) por gavagem.

4.2.2.1.1 Análises Hematológicas e Bioquímicas

Após 12 semanas da administração do extrato seco de erva mate, foi coletada amostra de sangue dos animais para a realização do hemograma completo e análises bioquímicas. A administração prolongada do extrato de erva mate aos animais machos e fêmeas não modificou significativamente os valores da maioria dos parâmetros hematológicos avaliados como, por exemplo, os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM), hemoglobina, hematócrito, contagem de eritrócitos e de leucócitos totais (Tabela 2). No entanto, nos ratos machos que receberam o extrato de erva mate foi encontrado valor aumentado na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (2,2%) e no número de plaquetas (23,3%), enquanto o número de neutrófilos foi 22,2% menor que aquele dos animais controles ($p < 0,05$). As fêmeas do grupo mate tiveram aumento significativo na CHCM (6,5%), no número de plaquetas (45,6%) e de aproximadamente três vezes no

número de monócitos ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Tabela 2).

A Tabela 3 apresenta os resultados dos parâmetros bioquímicos séricos dos animais dos grupos mate e controle. A administração de extrato de erva mate não alterou os valores dos principais marcadores bioquímicos de função hepática e renal ou indicadores de desequilíbrios metabólicos, como enzimas transaminases, bilirrubina, creatinina, ácido úrico, glicose, colesterol total, proteínas totais e eletrólitos. No entanto, algumas modificações nos exames laboratoriais foram observadas nos animais. Por exemplo, os ratos machos apresentaram diminuição significativa de 56,8% nos valores de triglicerídeos e de 36,3% na atividade da enzima FA em relação aos animais controles ($p < 0,05$). Além disso, houve aumento de três vezes na atividade da enzima GGT dos animais machos do grupo mate ($p < 0,05$). Por outro lado, as fêmeas tiveram aumento significativo na concentração de uréia (24,7%) e de ferro (32%) em relação aos animais controles ($p < 0,05$; Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito da administração repetida do extrato seco de erva mate (2,0 g/kg) nos parâmetros hematológicos de ratos Wistar adultos, durante 12 semanas.

Parâmetros	Machos		Fêmeas	
	Controle	Erva mate	Controle	Erva mate
Eritrócitos ($\times 10^7 / \mu\text{L}$)	8,9 \pm 0,2	8,6 \pm 0,3	7,8 \pm 0,2	8,1 \pm 0,2
Hemoglobina (g/dL)	16,5 \pm 0,2	16,8 \pm 0,7	14,7 \pm 0,4	15,9 \pm 0,4
Hematócrito (%)	45,4 \pm 0,5	45,3 \pm 0,7	41,2 \pm 1,2	42,0 \pm 0,9
VCM (fL)	51,0 \pm 0,9	50,8 \pm 0,4	52,8 \pm 0,6	52,0 \pm 0,5
HCM (pg)	18,5 \pm 0,3	19,0 \pm 0,1	18,8 \pm 0,2	19,8 \pm 0,3
CHCM (g/dL)	36,3 \pm 0,1	37,1 \pm 0,1**	35,7 \pm 0,1	38,0 \pm 0,5*
Plaquetas ($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	513,7 \pm 23,5	633,8 \pm 25,5*	507,3 \pm 37,0	737,8 \pm 21,2*
Leucócitos ($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	5,2 \pm 0,8	5,8 \pm 0,9	4,9 \pm 1,3	6,2 \pm 0,5
Neutrófilos (%)	17,7 \pm 1,0	14,0 \pm 1,0*	20,7 \pm 3,3	17,0 \pm 1,5
Eosinófilos (%)	0,4 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,2	0,9 \pm 0,7
Basófilos (%)	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0
Linfócitos (%)	78,2 \pm 1,8	80,6 \pm 2,3	77,3 \pm 3,2	77,8 \pm 1,5
Monócitos (%)	3,2 \pm 1,0	5,0 \pm 1,7	1,5 \pm 0,6	4,3 \pm 0,8*

Os valores representam a média \pm desvio padrão de cinco animais controle e 10 animais do grupo mate. VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. *, ** P < 0,05 ou P < 0,0001 comparado ao respectivo grupo controle (Teste t de Student).

Tabela 3 - Efeito da administração repetida do extrato seco de erva mate (2,0 g/kg) nos parâmetros bioquímicos de ratos Wistar adultos, durante 12 semanas.

Parâmetros	Machos		Fêmeas	
	Controle	Erva mate	Controle	Erva mate
Glicose (mg/dL)	117,5 ± 14,8	110,5 ± 9,0	119,5 ± 10,3	113,1 ± 19,6
Colesterol Total (mg/dL)	104,0 ± 32,8	96,3 ± 21,9	101,5 ± 26,3	101,1 ± 18,3
Triglicerídeos (mg/dL)	78,3 ± 32,7	36,0 ± 16,0*	31,8 ± 10,4	39,9 ± 12,2
Ácido Úrico (mg/dL)	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,4	1,1 ± 0,5
Uréia (mg/dL)	39,9 ± 2,4	42,7 ± 3,9	35,9 ± 3,0	44,6 ± 4,5*
Creatinina (mg/dL)	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,3
AST (U/L)	75,3 ± 9,8	102,2 ± 11,4	80,0 ± 13,2	112,3 ± 17,0
ALT (U/L)	29,8 ± 9,4	47,0 ± 5,9	34,8 ± 9,2	42,0 ± 11,9
GGT (U/L)	1,1 ± 0,3	2,5 ± 0,4*	3,3 ± 0,5	3,8 ± 0,7
FA (U/L)	146,0 ± 35,2	92,5 ± 19,2*	108,8 ± 34,8	102,8 ± 16,8
Bilirrubina (mg/dL)	1,6 ± 1,2	1,9 ± 1,1	1,3 ± 0,7	1,0 ± 0,6
Proteínas Totais (g/dL)	6,3 ± 0,4	6,5 ± 0,6	6,5 ± 0,4	6,6 ± 0,4
Sódio (mEq/L)	140,8 ± 0,5	137,5 ± 3,9	135,0 ± 2,9	136,8 ± 2,8
Potássio (mEq/L)	4,6 ± 0,2	4,4 ± 0,2	4,2 ± 0,2	4,3 ± 0,2
Ferro (µg/dL)	164,3 ± 12,1	200,4 ± 31,4	237,0 ± 33,5	312,8 ± 37,5*

Os valores representam a média ± desvio padrão de cinco animais controle e 10 animais do grupo mate. AST: Aspartato Amino Transferase, ALT: Alanina Amino Transferase, GGT: Gama-Glutamil Transferase, FA: Fosfatase Alcalina. *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle (Teste t de Student).

4.2.2.1.2 Estudo Histopatológico em Ratos

Após 12 semanas de administração do extrato seco de erva mate aos ratos Wistar, os animais foram mortos por hipovolemia (exsanguinação pela artéria aorta abdominal) sob anestesia etérea e os órgãos foram retirados para análise histopatológica.

De acordo com os resultados histopatológicos do estômago (Fig. 7), dos rins, fígado e intestino delgado (Fig. 8) de ratos machos não foram observadas alterações morfológicas importantes indicadoras de atipias celulares e/ou teciduais. Resultados semelhantes foram encontrados para as fêmeas (não mostrados). Entretanto, no estômago dos ratos machos e fêmeas de ambos os grupos foram observados eosinófilos, notadamente na camada mucosa (Fig. 7). No rim, a região cortical apresenta-se com vasos congestionados e no intestino delgado, epitélio cilíndrico simples bem preservado (Fig. 8). No fígado dos animais dos grupos controle e mate foi visualizada moderada congestão vascular e esparsos espaços porta contendo agregações leucocitárias (Fig. 8).

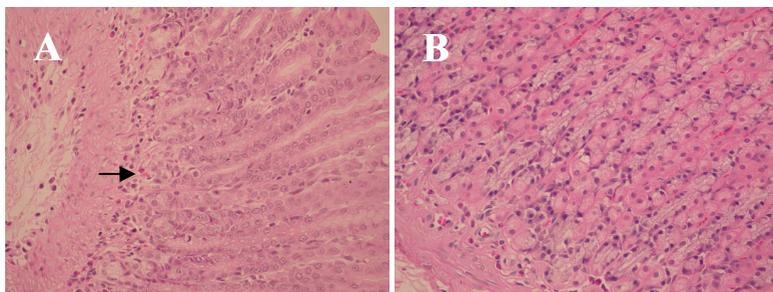


Figura 7 – Corte histológico transversal do estômago de ratos Wistar machos que receberam administração intragástrica diária de água (controle; A) ou de extrato seco de erva mate na dose de 2,0 g/kg (B) durante 12 semanas. Esparsos eosinófilos são observados na camada mucosa (→). Aumento de 400x.

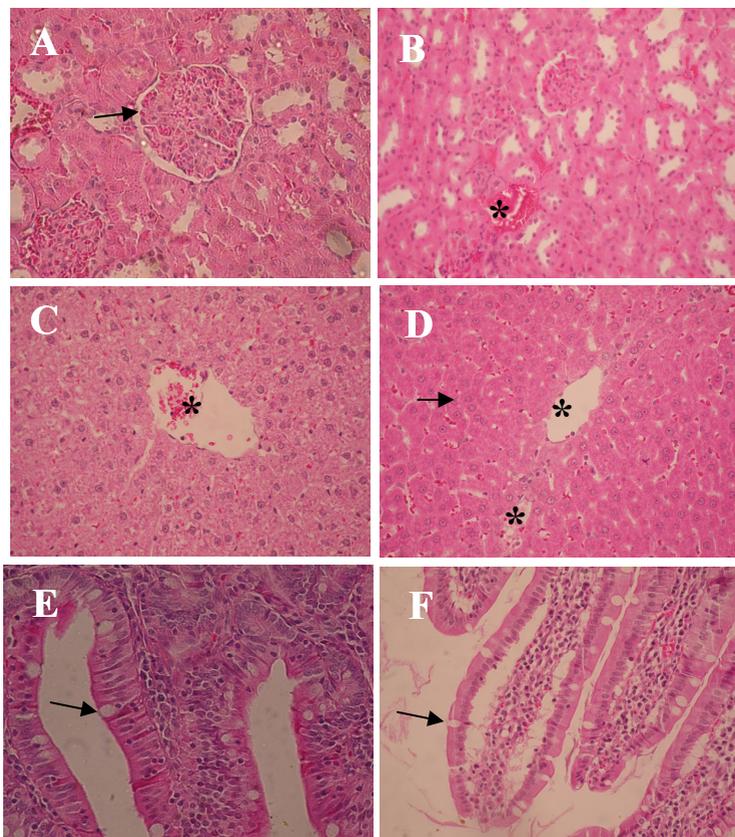


Figura 8 – Cortes histológicos de rim (A e B), fígado (C e D) e do intestino delgado (E e F) de ratos Wistar machos. Os animais receberam administração intragástrica diária de água (controle, A, C, E) ou de 2,0 g/kg de extrato seco de erva mate (B, D, F) por 12 semanas. (A) Gomérulo renal com cápsula bem delimitada e túbulos renais bem preservados; Túbulo contorcido distal. (B) Região cortical apresentando vasos congestos (*). (C e D) Veia centro lobular (*); (C) Hepatócitos preservados mostrando os depósitos de glicogênio. (D) Moderada congestão nos sinusóides (*); células de Kupffer no lóbulo hepático (→). (E) e (F) Mucosa intestinal; epitélio cilíndrico simples bem preservado e células caliciformes (→). Aumento de 400 x.

4.2.2.2 Coelhos

No estudo toxicológico de doses repetidas com o extrato de erva mate (2,0 mg/kg) realizado em coelhos, não foram observadas diferenças significativas na evolução do peso corpóreo entre os animais de ambos os sexos dos grupos controle e mate (Fig. 9).

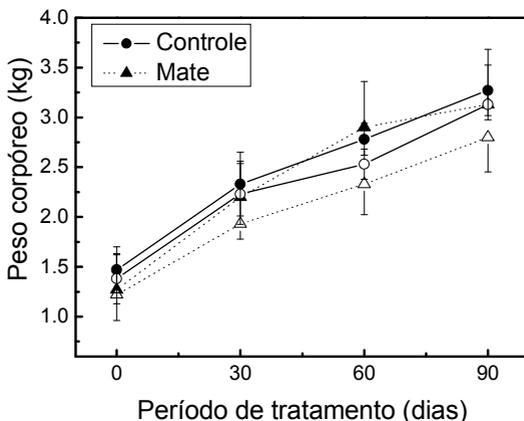


Figura 9 – Variação do peso corporal dos coelhos New Zealand machos (símbolos fechados) e fêmeas (símbolos abertos), durante 12 semanas de acompanhamento após a administração, de extrato seco de erva mate (2 g/kg), em doses repetidas (grupo mate) ou de água (grupo controle) por via oral.

4.2.2.2.1 Análises Hematológicas e Bioquímicas

A ingestão prolongada de extrato de erva mate, na dose de 2,0 g/kg de peso, pelos coelhos machos não promoveu alterações significativas em alguns parâmetros hematológicos, como os índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM, e na contagem de plaquetas e de leucócitos após 30, 60 ou 90 dias do estudo, comparado aos animais do grupo controle (Tabela 4). No entanto, houve aumento significativo na concentração de hemoglobina (14,4%), hematócrito (15,2%), no número de eritrócitos (14,7%), de neutrófilos (76,0%) e de monócitos (104,9%), após 30 dias de tratamento, e redução no número de linfócitos (35,3%) ($p < 0,05$). Após 60

dias de tratamento, houve aumento no número de neutrófilos (74,1%) e redução no número de linfócitos (27,0%) e após 90 dias, houve aumento apenas do hematócrito (6,1%) ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Efeito da ingestão prolongada do extrato de erva mate (2,0 g/kg) nos parâmetros hematológicos de coelhos New Zealand machos adultos, durante 12 semanas.

Parâmetros	30 dias		60 dias		90 dias	
	Controle	Erva mate	Controle	Erva mate	Controle	Erva mate
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	5,3 ± 0,1	6,1 ± 0,3*	5,8 ± 0,3	6,0 ± 0,3	5,9 ± 0,2	6,4 ± 0,3
Hemoglobina (g/dL)	11,1 ± 0,1	12,7 ± 0,3*	12,4 ± 0,4	12,5 ± 0,4	12,9 ± 0,4	13,6 ± 0,5
Hematócrito (%)	33,0 ± 0,6	38,0 ± 1,4*	36,3 ± 1,5	37,5 ± 1,4	39,1 ± 1,4	41,5 ± 1,3*
VCM (fL)	61,7 ± 0,3	62,0 ± 0,6	63,0 ± 1,0	63,0 ± 1,2	65,9 ± 1,8	65,4 ± 1,4
HCM (pg)	20,8 ± 0,4	21,2 ± 0,4	21,5 ± 0,4	21,0 ± 0,5	21,7 ± 0,3	21,4 ± 0,4
CHCM (g/dL)	33,5 ± 0,3	33,8 ± 0,4	34,1 ± 0,3	33,4 ± 0,2	32,9 ± 0,4	32,7 ± 0,2
Plaquetas (x 10 ⁴ /μL)	20,3 ± 3,2	20,8 ± 4,5	21,7 ± 9,8	18,6 ± 5,2	13,9 ± 2,8	21,3 ± 5,7
Leucócitos (x 10 ⁴ /μL)	6,5 ± 0,7	7,7 ± 1,4	7,4 ± 0,6	7,9 ± 1,2	8,6 ± 0,7	7,5 ± 0,2
Neutrófilos (%)	24,8 ± 3,6	44,1 ± 1,7*	23,9 ± 0,8	41,6 ± 4,0*	19,6 ± 1,2	26,7 ± 4,3
Eosinófilos (%)	0,9 ± 0,6	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0
Basófilos (%)	2,0 ± 0,5	2,5 ± 1,0	2,0 ± 0,8	1,8 ± 0,7	1,8 ± 1,0	1,8 ± 0,6
Linfócitos (%)	68,3 ± 4,2	44,2 ± 4,1*	67,8 ± 1,4	49,5 ± 5,5*	66,1 ± 0,7	66,6 ± 3,5
Monócitos (%)	4,1 ± 0,9	8,4 ± 1,1*	5,6 ± 1,3	6,3 ± 1,8	5,8 ± 0,2	4,8 ± 0,6

Os valores representam as médias ± desvio padrão de três animais. VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle (Teste t de Student).

Em relação aos parâmetros bioquímicos avaliados, a administração do extrato de mate aos animais não modificou significativamente os marcadores de lesão renal ou hepática ou, ainda, alguns outros indicadores de desequilíbrios metabólicos nos coelhos machos em relação aos animais do grupo controle (Tabela 5). Entretanto, foi encontrado valor aumentado da enzima FA (38,9%) e valor reduzido de ferro (25,4%) após 60 e 90 dias, respectivamente, da administração do extrato de mate.

A ingestão prolongada do extrato de mate pelas fêmeas não promoveu diferenças significativas no hemograma, exceto aumento de 4,7% no hematócrito após 90 dias (Tabela 6), ou nas análises bioquímicas (Tabela 7).

Tabela 5 - Efeito da ingestão prolongada do extrato de erva mate (2,0 g/kg) nos parâmetros bioquímicos de coelhos New Zealand machos adultos, durante 12 semanas.

Parâmetros	30 dias		60 dias		90 dias	
	Controle	Erva mate	Controle	Erva mate	Controle	Erva mate
Glicose (mg/dL)	98,0 ± 14,9	91,7 ± 23,2	104,7 ± 18,6	92,7 ± 11,5	96 ± 11,3	101,3 ± 3,2
Colesterol Total (mg/dL)	83,0 ± 18,1	88,0 ± 35,3	57,0 ± 23,4	86,3 ± 10,1	42,7 ± 12,9	52,7 ± 11,2
Triglicérides (mg/dL)	37,0 ± 5,0	85,0 ± 32,1	39,3 ± 14,3	74,7 ± 63,1	39,0 ± 20,2	37,7 ± 22,0
Ácido Úrico (mg/dL)	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1
Uréia (mg/dL)	36,2 ± 2,9	34,4 ± 4,9	38,1 ± 7,8	34,6 ± 2,5	46,5 ± 2,5	47,4 ± 14,7
Creatinina (mg/dL)	1,6 ± 0,3	1,4 ± 0,3	0,8 ± 0,6	0,6 ± 0,2	2,0 ± 0,4	1,5 ± 0,1
AST (U/L)	42,3 ± 8,1	51,0 ± 18,7	40,3 ± 12,7	47,0 ± 7,6	44,0 ± 6,2	35,3 ± 7,8
ALT (U/L)	47,3 ± 11,9	49,7 ± 7,5	51,7 ± 22,2	44,33 ± 16,9	50,0 ± 28,0	51,3 ± 15,0
GGT (U/L)	7,0 ± 1,7	9,3 ± 2,3	9,7 ± 0,6	9,3 ± 1,5	7,8 ± 1,0	8,8 ± 1,9
FA (U/L)	85,3 ± 24,0	107,3 ± 19,8	72,3 ± 12,5	100,0 ± 8,5*	86,0 ± 20,5	96,2 ± 22,1
Bilirrubina (mg/dL)	0,9 ± 0,9	1,8 ± 0,3	1,3 ± 0,5	1,4 ± 0,9	1,0 ± 0,5	1,4 ± 0,4
Proteínas Totais (g/dL)	4,5 ± 1,1	5,8 ± 0,4	5,6 ± 0,4	5,4 ± 0,3	6,1 ± 0,1	5,6 ± 0,3
Sódio (mEq/L)	133,9 ± 5,7	138,3 ± 4,6	135,7 ± 4,9	115,4 ± 33,9	133,3 ± 4,5	133,0 ± 7,6
Potássio (mEq/L)	3,9 ± 0,5	3,6 ± 0,3	3,7 ± 0,2	3,0 ± 0,9	3,9 ± 0,3	3,7 ± 0,5
Ferro (µg/dL)	259,0 ± 97,3	275,7 ± 46,6	209,7 ± 22,9	183 ± 85,2	188,7 ± 15,7	141,4 ± 18,3*

Os valores representam a média ± desvio padrão de três animais. AST: Aspartato amino transferase, ALT: Alanina amino transferase, GGT: Gama-glutamil transferase, FA: Fosfatase alcalina. *P < 0,05 comparado ao grupo controle (Teste t de Student).

Tabela 6 - Efeito da ingestão prolongada do extrato de erva mate (2,0 g/kg) nos parâmetros hematológicos de coelhos New Zealand fêmeas adultas, durante 12 semanas.

Parâmetros	30 dias		60 dias		90 dias	
	Controle	Erva mate	Controle	Erva mate	Controle	Erva mate
Eritrócitos ($\times 10^7/\mu\text{L}$)	6,0 \pm 0,1	5,8 \pm 0,2	5,4 \pm 0,5	6,0 \pm 0,1	6,0 \pm 0,1	6,0 \pm 0,2
Hemoglobina (g/dL)	12,6 \pm 0,2	12,5 \pm 0,5	11,4 \pm 1,1	13,2 \pm 0,1	12,4 \pm 0,2	13,2 \pm 0,3
Hematócrito (%)	37,2 \pm 0,9	36,9 \pm 1,1	33,4 \pm 3,2	38,0 \pm 0,1	38,1 \pm 0,4	40,3 \pm 0,5*
VCM (fL)	61,7 \pm 0,9	63,3 \pm 1,2	62,0 \pm 1,0	63,0 \pm 1,2	64,1 \pm 1,4	66,9 \pm 1,6
HCM (pg)	20,8 \pm 0,2	21,4 \pm 0,5	21,2 \pm 0,2	21,9 \pm 0,4	21,3 \pm 0,0	21,9 \pm 0,4
CHCM (g/dL)	33,7 \pm 0,1	33,9 \pm 0,2	34,1 \pm 0,3	34,8 \pm 0,2	33,3 \pm 0,8	32,8 \pm 0,4
Plaquetas ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	231,3 \pm 34,9	262,7 \pm 65,4	171,3 \pm 51,7	194,0 \pm 37,5	154,0 \pm 40,4	199,7 \pm 37,5
Leucócitos ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	6,6 \pm 1,4	6,5 \pm 0,7	7,6 \pm 1,8	8,5 \pm 0,4	8,8 \pm 0,3	8,3 \pm 1,3
Neutrófilos (%)	24,3 \pm 3,6	36,5 \pm 5,7	32,3 \pm 6,2	29,5 \pm 5,6	23,6 \pm 4,7	28,1 \pm 3,9
Eosinófilos (%)	1,0 \pm 0,3	1,7 \pm 0,3	0,6 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,0 \pm 0	0,0 \pm 0
Basófilos (%)	3,2 \pm 0,9	2,4 \pm 0,8	3,5 \pm 0,8	2,2 \pm 0,7	4,8 \pm 1,0	3,6 \pm 1,2
Linfócitos (%)	63,3 \pm 6,4	54,9 \pm 7,1	58,6 \pm 8,2	64,3 \pm 5,1	68,3 \pm 5,5	63,2 \pm 5,2
Monócitos (%)	8,3 \pm 2,3	5,5 \pm 1,3	7,0 \pm 1,9	5,7 \pm 0,7	5,3 \pm 0,7	6,1 \pm 0,4

Os valores representam a média \pm desvio padrão de três animais. VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. *P < 0,05 comparado ao grupo controle (Teste t de Student).

Tabela 7 - Efeito da administração do extrato de erva mate (2,0 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos de coelhos New Zealand fêmeas adultas, durante 12 semanas.

Parâmetros	30 dias		60 dias		90 dias	
	Controle	Erva mate	Controle	Erva mate	Controle	Erva mate
Glicose (mg/dL)	108,0 ± 10,5	99,0 ± 29,1	101,0 ± 5,9	111,7 ± 8,1	114,7 ± 5,8	88,7 ± 16,9
Colesterol Total (mg/dL)	101,7 ± 10,7	109,7 ± 30,2	106,3 ± 12,3	104,7 ± 18,6	68,3 ± 16,9	91,0 ± 17,8
Triglicerídeos (mg/dL)	43,3 ± 21,7	46,3 ± 25,7	49,0 ± 29,1	36,3 ± 13,7	48,7 ± 22,2	33,0 ± 24,8
Ácido Úrico (mg/dL)	0,4 ± 0,4	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,0
Uréia (mg/dL)	46,8 ± 7,8	40,0 ± 3,1	50,1 ± 7,3	41,4 ± 7,0	52,3 ± 4,5	53,2 ± 1,2
Creatinina (mg/dL)	1,6 ± 0,4	1,0 ± 0,6	1,0 ± 0,5	0,5 ± 0,2	1,8 ± 0,5	1,4 ± 0,3
AST (U/L)	48,0 ± 8,5	35,7 ± 15,0	51,7 ± 4,7	43,3 ± 7,0	36,3 ± 8,5	34,7 ± 6,7
ALT (U/L)	62,0 ± 9,6	59,0 ± 5,2	67,0 ± 7,2	58,3 ± 12,9	47,3 ± 8,7	69,3 ± 11,5
GGT (U/L)	8,3 ± 4,9	8 ± 1,2	9,3 ± 4,2	7,0 ± 1,1	9,5 ± 4,8	8,7 ± 1,2
FA (U/L)	113,0 ± 16,7	116,7 ± 3,5	93,0 ± 37,5	85,7 ± 11,6	65,0 ± 35,3	62,5 ± 19,0
Bilirrubina (mg/dL)	0,8 ± 1,6	2,4 ± 0,3	1,2 ± 0,1	0,2 ± 0,3	1,5 ± 0,8	1,1 ± 0,5
Proteínas Totais (g/dL)	5,8 ± 0,2	5,6 ± 0,3	5,5 ± 0,2	5,0 ± 0,2	6,0 ± 0,1	5,7 ± 0,1
Sódio (mEq/L)	142,0 ± 2,7	133,7 ± 10,1	91,8 ± 41,7	98,3 ± 34,3	143,0 ± 3,0	140,0 ± 12,2
Potássio (mEq/L)	4,5 ± 0,3	3,6 ± 0,7	3,9 ± 0,4	3,0 ± 1,3	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,5
Ferro (µg/dL)	323,7 ± 61,1	312,8 ± 24,8	256,7 ± 50,5	245,3 ± 18,8	330,8 ± 88,1	187,2 ± 41,4

Os valores representam a média ± desvio padrão de três animais. AST: Aspartato Amino Transferase, ALT: Alanina Amino Transferase, GGT: Gama-Glutamil Transferase, FA: Fosfatase Alcalina. *P < 0,05 comparado ao grupo controle (Teste t de Student).

4.2.2.2.2 Estudo Histopatológico em Coelhos

Após 12 semanas de administração do extrato seco de erva mate aos coelhos New Zealand, os animais foram mortos por hipovolemia (exanguinação por punção cardíaca), sob anestesia com pentobarbital sódico. Fígado, rim, estômago e intestino delgado foram retirados para a realização dos cortes histológicos. De acordo com os resultados histopatológicos do estômago e rins (Fig. 10), e do fígado e intestino delgado (Fig. 11) não foram observadas alterações morfológicas importantes indicadoras de atipias celulares e/ou teciduais. Entretanto, discreta ou moderada congestão vascular foi observada no estômago e nos rins dos animais machos (Fig. 10). Resultados semelhantes foram encontrados nos cortes histológicos dos órgãos das fêmeas (não mostrados). É possível observar que as vilosidades do intestino delgado permaneceram preservadas durante a ingestão da erva mate (Fig. 11).

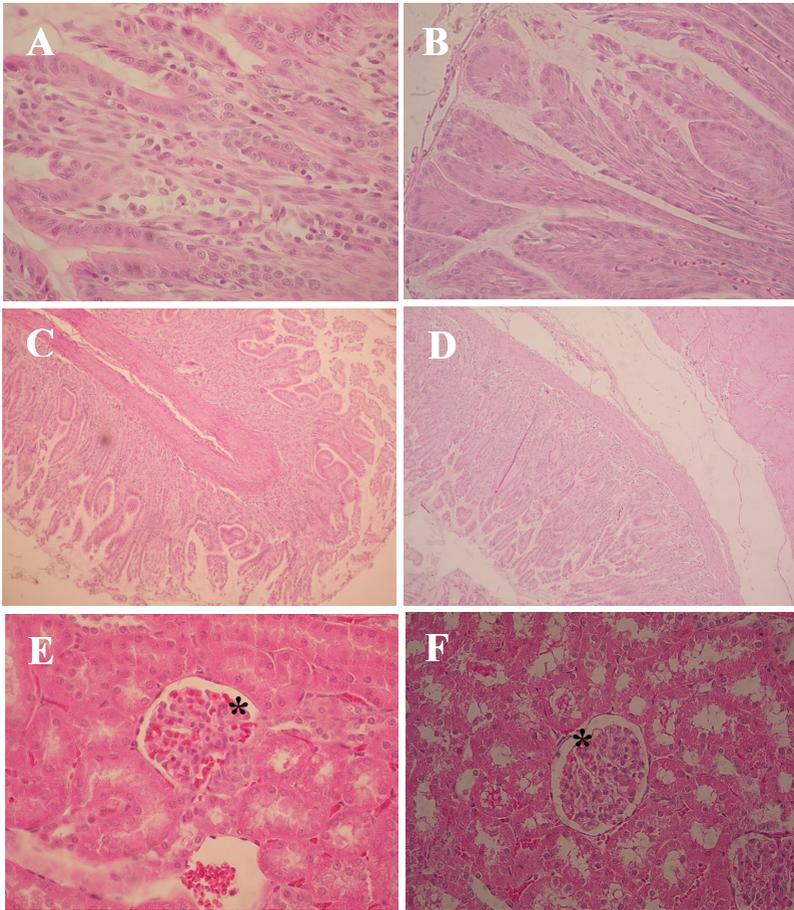


Figura 10 – Cortes histológicos transversais de estômago (A, B, C e D) e longitudinais de rim (E e F) de coelhos New Zealand machos do grupo controle (A, C e E) e do grupo mate (B, D e F) que receberam diariamente extrato de erva mate na dose de 2 g/kg durante 12 semanas. (A e B): Camada mucosa do estômago preservada, células de revestimento da mucosa são observadas com discreta congestão vascular. Aumento de 400 x. (C e D): Camadas mucosa, submucosa e muscular externa são observadas no campo. Aumento de 100 x. (E e F): (*) Presença do corpúsculo renal, com cápsula de Bowmann bem preservada e moderada congestão vascular. Aumento de 400 x.

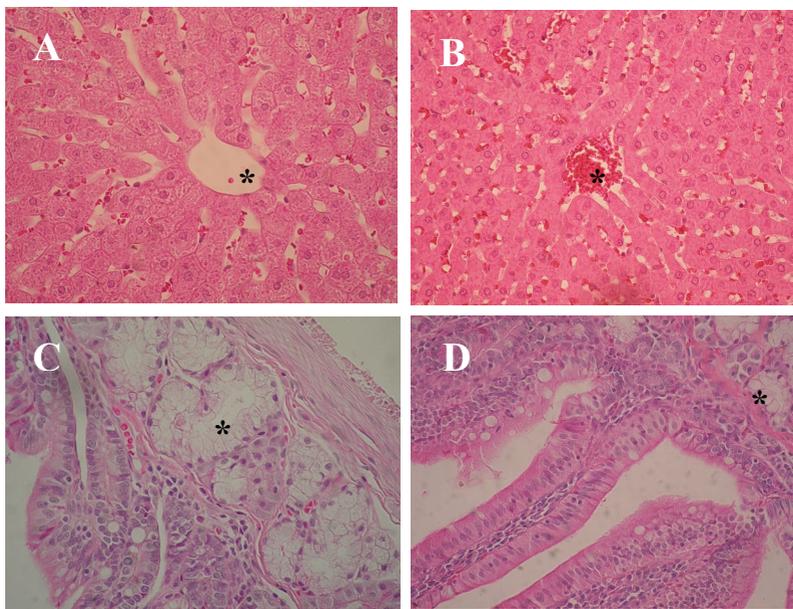


Figura 11 – Cortes histológicos transversais de Fígado (Fig. A e B) e transversais de intestino delgado duodeno (Fig. C e D) de coelhos machos que receberam diariamente água (controle; A e C) ou 2 g/kg de peso de extrato seco de erva mate (B e D) por 12 semanas. A: Veia centro lobular (*) e hepatócitos dispostos radialmente. Aumento de 400 x. B: veia centrolobular congestionada. Hepatócitos bem preservados. C: São observadas as camadas mucosa, submucosa, com glândulas de Brünner (*) e muscular externa. D são observadas a camada mucosa, com vilosidade bem preservada, e a camada submucosa, com glândulas de Brünner (*). Aumento de 400 x.

4.3 Estabilidade Química do Extrato Seco de Erva Mate Verde e Tostada em Cápsulas

4.3.1 Estudo de Longa Duração com Extrato Seco de Erva Mate Verde

4.3.1.1 Compostos Fenólicos e Capacidade Antioxidante Total

No estudo de longa duração, cápsulas contendo o extrato seco de erva mate permaneceram armazenadas em frascos impermeáveis sob temperatura de 30 °C por um período de 12 meses. O peso médio das

cápsulas sem adição de adjuvante foi de $175 \pm 5,6$ mg. A umidade relativa do ar média foi de $62,7 \pm 5,0$. Os resultados referentes à variação no conteúdo de fenóis totais e capacidade antioxidante total, quantificada pelo potencial de redução do ferro (FRAP) ou do radical ABTS (TEAC), estão apresentados na Figura 12. Para as análises, foram utilizadas três amostras de cada período de tempo avaliado (0, 3, 6, 9 e 12 meses) e de cada concentração do adjuvante dióxido de silício (0, 5, 10 e 20%). A concentração de fenóis totais no extrato de erva mate utilizado foi de 304,5 mg equiv. ácido clorogênico/g. O extrato seco de erva mate em cápsulas manteve-se estável durante o período de 12 meses em relação ao conteúdo de fenóis totais, com variações inferiores a 10%. A variação média encontrada nos valores de fenóis totais no extrato seco de erva mate sem adjuvante foi de 3,2% ao longo de 12 meses. A presença do adjuvante dióxido de silício não modificou substancialmente a estabilidade dos fenóis totais no extrato em cápsulas, sendo que foram observadas variações médias de 4,3%, 2,8% e 5,2% na presença de 5, 10 ou 20% de adjuvante, respectivamente (Fig. 12A). A variação nos teores dos principais ácidos fenólicos quantificados por CLAE, como ácidos gálico, clorogênico e dicafeoilquinico presentes no extrato seco de erva mate sem adjuvante estão representados nas Figuras 13, 14 e 15. Não foram observadas variações superiores a 10% para os compostos fenólicos isolados.

Resultados semelhantes foram encontrados para a capacidade antioxidante total. Pelo método FRAP, a variação média encontrada para a capacidade antioxidante no extrato seco de erva mate sem adjuvante foi de 2,2%, enquanto que na presença de 5, 10 ou 20% de adjuvante a variação foi de 4,8%, 4,0% e 6,8%, respectivamente (Fig. 12B). Quando a capacidade antioxidante foi quantificada pelo método TEAC, a variação média para o extrato seco na ausência de adjuvante foi de 5,9%. Na presença de 5, 10 ou 20% de adjuvante a variação média foi de 4,7%, 3,0% e 3,9%, respectivamente (Fig. 12C). A capacidade antioxidante total do extrato seco de erva mate verde foi de 1,5 mol equiv. Trolox/g ou de 0,8 mol equiv. Trolox/g, quantificada pelos métodos FRAP e TEAC, respectivamente.

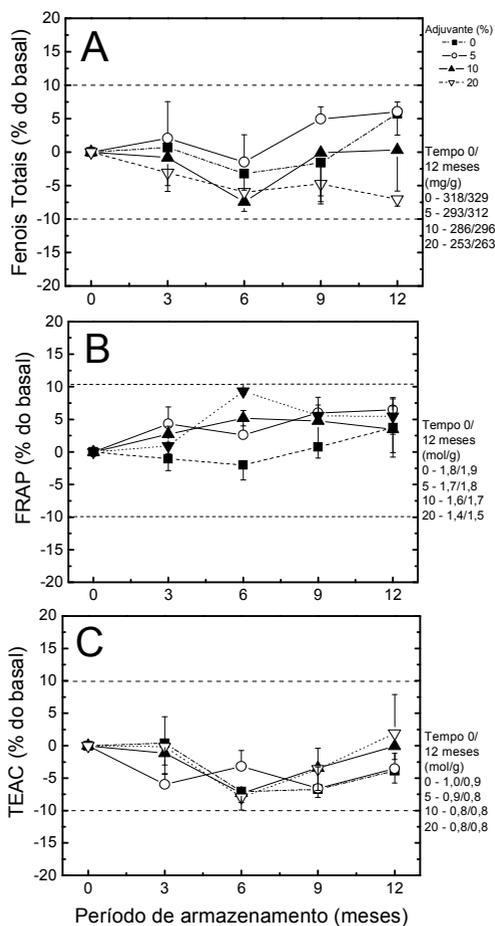


Figura 12 – Estabilidade dos compostos fenólicos totais (A) e da capacidade antioxidante total, quantificada pelos métodos FRAP (B) e TEAC (C), no extrato seco de erva mate verde em cápsulas, mantido a 30 °C durante 12 meses. O extrato seco foi encapsulado na ausência ou na presença de 5, 10 ou 20% de adjuvante. Os resultados são a média \pm desvio-padrão de três determinações, em duplicata.

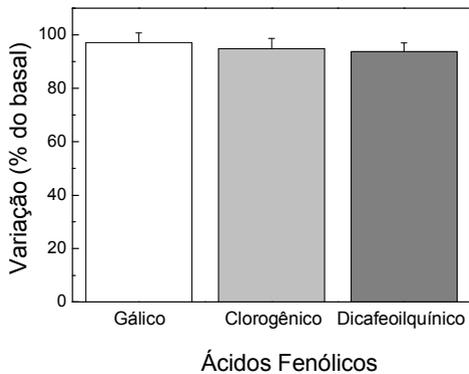


Figura 13 – Estabilidade dos principais compostos fenólicos isolados no extrato seco de erva mate verde em cápsulas, mantidos a 30 °C durante 12 meses. O extrato seco foi encapsulado na ausência de adjuvante. Os resultados são a média \pm desvio-padrão de duas determinações, em triplicata, para cada variável. Concentrações iniciais de ácido gálico = $19,1 \pm 1,1$ mg/g; de ácido clorogênico = $39,8 \pm 5,9$ mg/g; de ácido dicafeoilquinico = $9,95 \pm 0,94$ mg/g.

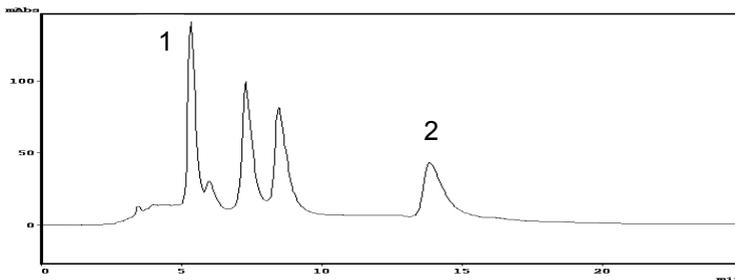


Figura 14 – Cromatograma dos principais compostos fenólicos no extrato seco de erva mate verde em cápsulas, na ausência de adjuvante. Período basal. Pico n° 1, ácido gálico; pico n° 2, ácido clorogênico.

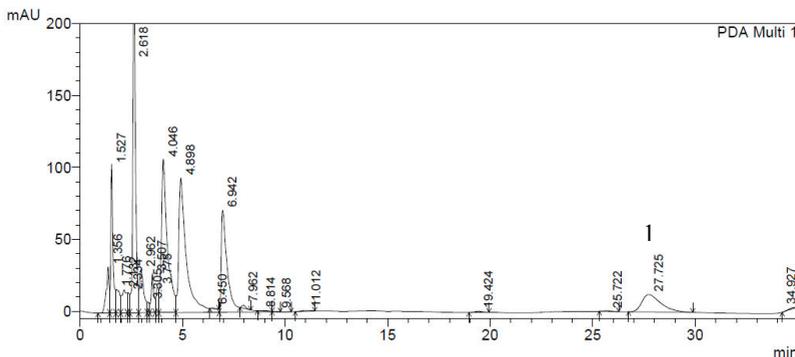


Figura 15 – Cromatograma dos compostos fenólicos no extrato seco de erva mate verde em cápsulas, sem adjuvante. Período basal. Pico n° 1, ácido dicafeoilquínico.

4.3.1.1 Metilxantinas

A concentração de metilxantinas no extrato seco de erva mate verde manteve-se estável no estudo de longa duração, com variações inferiores a 10%, como pode ser observado na figura 16.

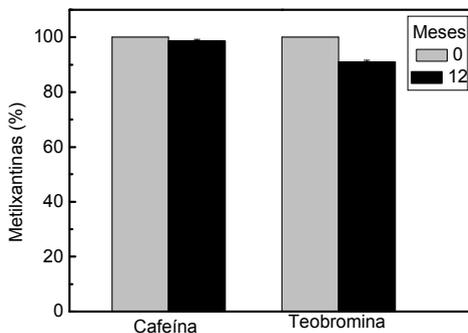


Figura 14 – Estabilidade das principais metilxantinas, no extrato seco de erva mate verde em cápsulas, mantido a 30 °C durante 12 meses. O extrato seco foi encapsulado na ausência de adjuvante. Os resultados são a média \pm desvio-padrão de três determinações, em duplicata. Concentrações iniciais de cafeína = $0,10 \pm 0,013$ mg/g; de teobromina = $0,076 \pm 0,007$ mg/g.

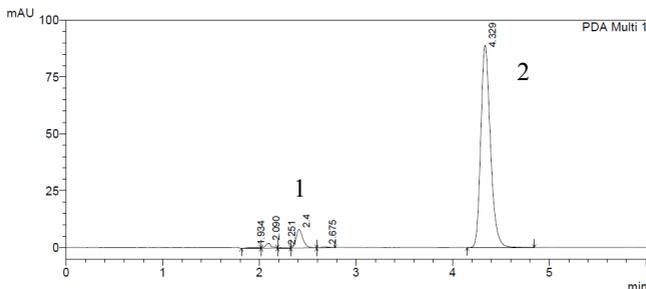


Figura 17 – Cromatograma das metilxantinas no extrato seco de erva mate verde em cápsulas, sem adjuvante. Período basal. Pico n° 1, teobromina; pico n° 2, cafeína.

4.3.1.2 Saponinas Totais

A concentração de saponinas totais no extrato de erva mate utilizado foi de 21,9 mg equiv. ácido ursólico/g. Considerando a ausência de efeitos importantes do adjuvante dióxido de silício na estabilidade dos fenóis totais no extrato de erva mate em cápsulas, a quantificação do teor de saponinas totais foi realizada apenas no extrato sem adjuvante. Nas Figuras 18 e 19 está representada a variação do teor de saponinas totais, quantificado através de ensaios colorimétricos (Fig. 18A) ou através de CLAE (Fig. 18B), presentes no extrato seco de erva mate em cápsulas mantidas a 30 °C, por um período de 12 meses. A variação média na concentração de saponinas totais no extrato seco foi inferior a 10% independente da análise, por ensaio colorimétrico ou por CLAE.

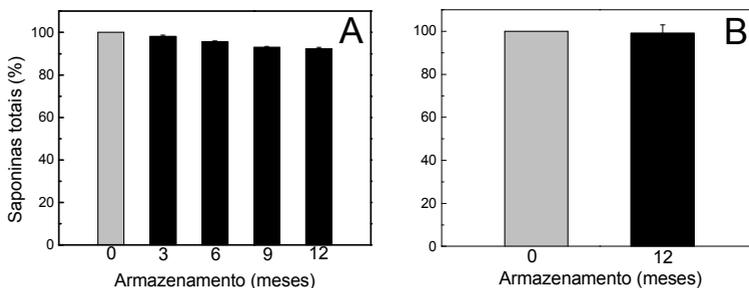


Figura 158 – Estabilidade do teor de saponinas totais quantificado por meio de ensaio colorimétrico (A) ou de CLAE (B) no extrato seco de erva mate verde em cápsulas, mantidas a 30 °C durante 12 meses. O extrato seco foi encapsulado na ausência de adjuvante. Os resultados são a média \pm desvio-padrão de duas determinações, em triplicata, para cada período de tempo. Concentração inicial: (A) = $32,9 \pm 0,20$ mg/g; (B) = $21,9 \pm 0,15$ mg/g.

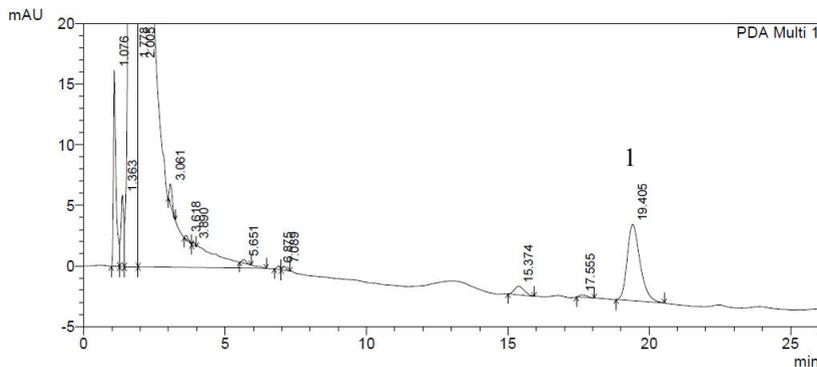


Figura 19 – Cromatograma de saponinas totais quantificado por CLAE no extrato seco de erva mate verde em cápsulas, na ausência de adjuvante. Pico n° 1, saponinas totais.

4.3.2 Estudo Acelerado com o Extrato Seco de Erva Mate Verde

4.3.2.1 Compostos Fenólicos e Capacidade Antioxidante Total

No estudo acelerado, as cápsulas contendo o extrato seco de erva mate verde permaneceram armazenadas em frascos impermeáveis

sob temperatura de 40 °C por seis meses. Os resultados referentes à variação no conteúdo de fenóis totais e capacidade antioxidante total, quantificada pelo FRAP ou TEAC, estão apresentados na Figura 20. Foram utilizadas três amostras de cada período de tempo avaliado (0, 3, 6 meses) e de cada concentração do adjuvante dióxido de silício (0, 5, 10 e 20%). O extrato seco de erva mate em cápsulas permaneceu estável durante o período de seis meses em relação ao conteúdo de fenóis totais, ácidos fenólicos e capacidade antioxidante total, com variações inferiores a 10%, independente da presença de adjuvante. Na figura 20, 21 e 22 estão representados os resultados da variação dos principais compostos fenólicos como ácidos gálico, clorogênico e dicafeoilquínico. A variação desses compostos foi inferior a 10%.

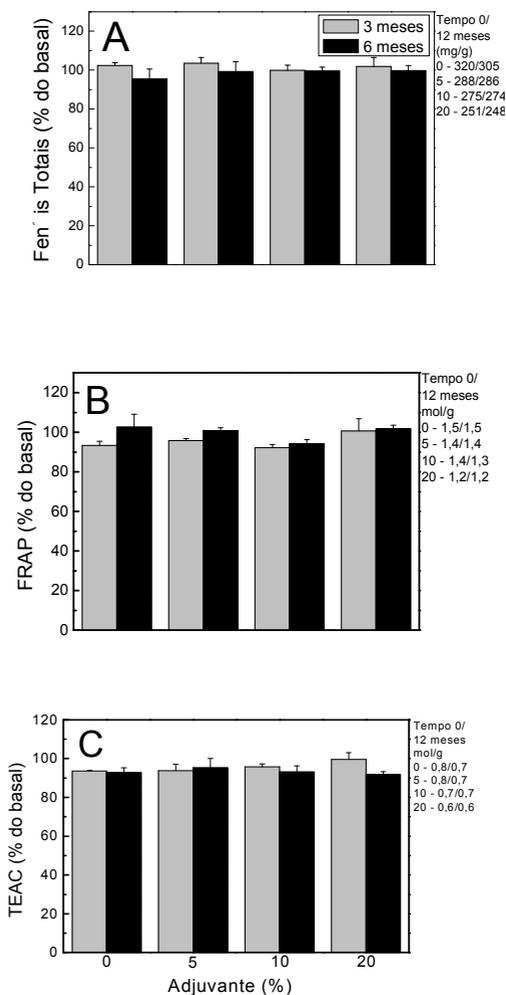


Figura 20 – Estabilidade do teor de compostos fenólicos totais (A) e da capacidade antioxidante total, quantificada pelos métodos FRAP (B) e TEAC (C), no extrato seco de erva mate verde em cápsulas mantidas a 40 °C durante seis meses. O extrato seco foi encapsulado na ausência (0%) ou na presença de 5, 10 ou 20% de adjuvante. Os resultados são a média \pm desvio-padrão de três determinações, em duplicata, para cada variável nos diferentes períodos de tempo.

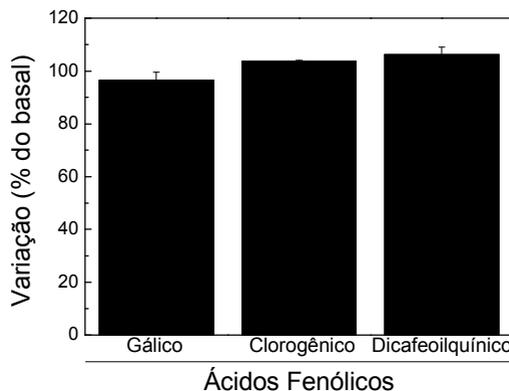


Figura 21 – Estabilidade dos principais compostos fenólicos isolados no extrato seco de erva mate verde em cápsulas, mantidos a 40 °C durante 6 meses. O extrato seco foi encapsulado na ausência de adjuvante. Os resultados são a média \pm desvio-padrão de duas determinações, em triplicata, nos diferentes períodos de tempo.

4.3.1.1 Metilxantinas

Os resultados da variação na concentração de metilxantinas no extrato seco de erva mate verde estão representados nas figuras 24 e 25. Como pode ser observado, o teor de metilxantinas manteve-se estável no estudo acelerado, com variações inferiores a 10%. As cápsulas foram mantidas por seis meses a 40 °C e a quantificação foi realizada por CLAE.

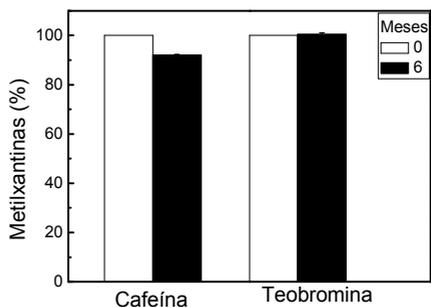


Figura 22 – Estabilidade da concentração das principais metilxantinas, no extrato seco de erva mate verde em cápsulas mantidas a 40 °C durante seis meses. O extrato seco foi encapsulado na ausência de adjuvante. Os resultados são a média \pm desvio-padrão de três determinações, em duplicata, para cada variável.

4.3.2.2 Saponinas Totais

Tendo em vista a ausência de efeitos importantes do adjuvante na estabilidade dos fenóis totais no extrato de erva mate em cápsulas, a quantificação da variação do conteúdo de saponinas totais foi realizada apenas no extrato sem adjuvante. A variação média no teor de saponinas totais no extrato seco de erva mate mantido a 40 °C durante seis meses foi de 1,7% (Fig. 23A) no ensaio colorimétrico ou 7,1% (Fig. 23B) por CLAE. O cromatograma está representado na Figura 27.

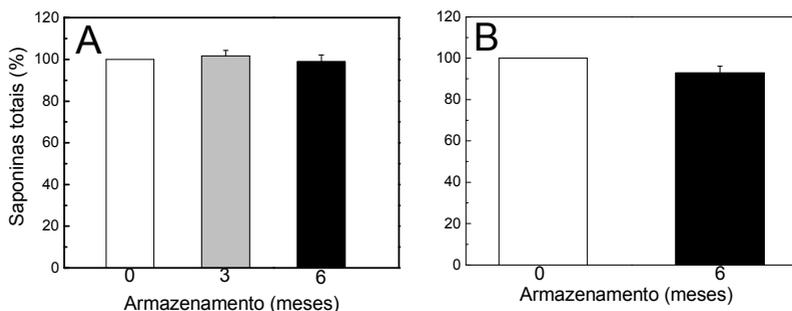


Figura 23 – Estabilidade do teor de saponinas totais, quantificado por meio de ensaio colorimétrico (A) ou CLAE (B), no extrato seco de erva mate verde em cápsulas mantidas a 40 °C durante seis meses. O extrato seco foi encapsulado sem

adjuvante. Os resultados são a média \pm desvio-padrão de duas determinações, em triplicata, para cada período de tempo.

4.3.3 Estudo Acelerado com o Extrato Seco de Erva Mate Tostada

4.3.3.1 Compostos Fenólicos e Capacidade Antioxidante Total

Na Figura 24 estão representados os resultados referentes à variação no conteúdo de fenóis totais e capacidade antioxidante total, quantificada pelo FRAP ou TEAC. No estudo acelerado, as cápsulas contendo o extrato seco de mate tostado permaneceram armazenadas em frascos impermeáveis sob temperatura de 40 °C por seis meses. Para as análises foram utilizadas três amostras de cada período de tempo avaliado (0, 3, 6 meses) e de cada concentração de adjuvante (0, 5, 10 e 20%). O extrato seco de erva mate em cápsulas manteve-se estável durante o período de seis meses em relação ao conteúdo de fenóis totais e capacidade antioxidante total, com variações inferiores a 10%, independente da presença do adjuvante dióxido de silício. O teor de compostos fenólicos totais no extrato seco de erva mate tostada foi de 271,7 mg/g enquanto a capacidade antioxidante total foi de 1,5 e 0,9 mol/g equivalentes Trolox quantificados por FRAP ou TEAC, respectivamente. A variação nos teores dos principais ácidos fenólicos quantificados por CLAE presentes no extrato seco de erva mate sem adjuvante estão representados nas figuras 25, 26 e 27. Não foram observadas variações superiores a 10% para os compostos fenólicos isolados. O peso médio das cápsulas sem adição de adjuvante foi de 175 \pm 5,6 mg. A umidade relativa do ar média foi de 62,7 \pm 5,0.

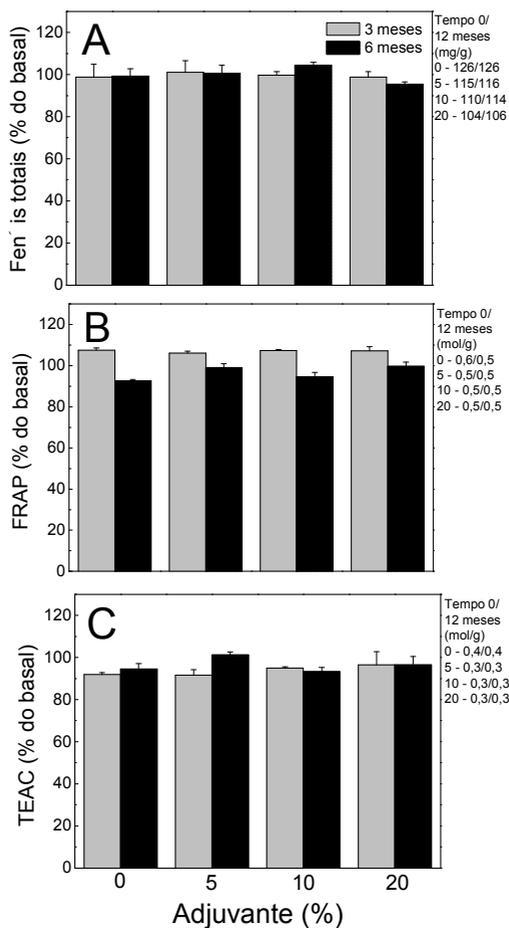


Figura 24 – Estabilidade do teor de compostos fenólicos totais (A) e da capacidade antioxidante total, quantificada pelos métodos FRAP (B) e TEAC (C), no extrato seco de erva mate tostada em cápsulas mantidas a 40 °C durante seis meses. O extrato seco foi encapsulado na ausência ou na presença de 5, 10 ou 20% de adjuvante. Os resultados são a média \pm desvio-padrão de três determinações, em duplicata, para cada variável nos diferentes períodos de tempo.

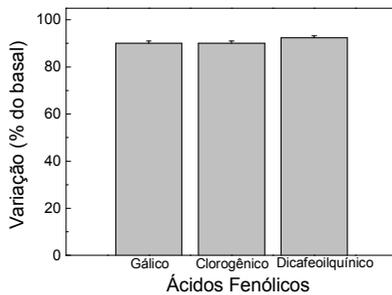


Figura 25 – Estabilidade dos principais compostos fenólicos isolados no extrato seco de erva mate tostada em cápsulas, mantidos a 40 °C durante 6 meses. O extrato seco foi encapsulado na ausência de adjuvante. Os resultados são a média \pm desvio-padrão de duas determinações, em triplicata. Concentrações iniciais de ácido gálico = $10,1 \pm 1,9$ mg/g; de ácido clorogênico = $19,9 \pm 2,1$ mg/g; de ácido dicafeoilquinico = $4,97 \pm 0,38$ mg/g.

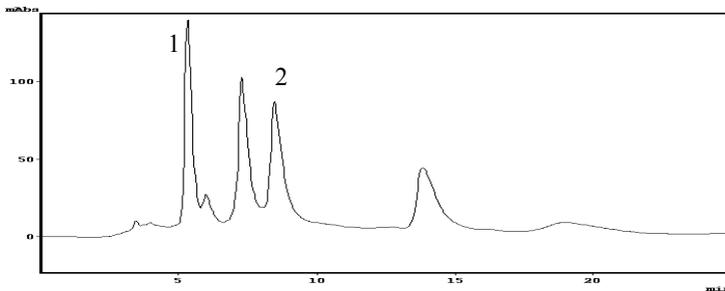


Figura 26 – Cromatograma dos principais compostos fenólicos no extrato seco de erva mate tostada em cápsulas, na ausência de adjuvante. Período basal. Pico nº 1, ácido gálico; pico nº 2, ácido clorogênico.

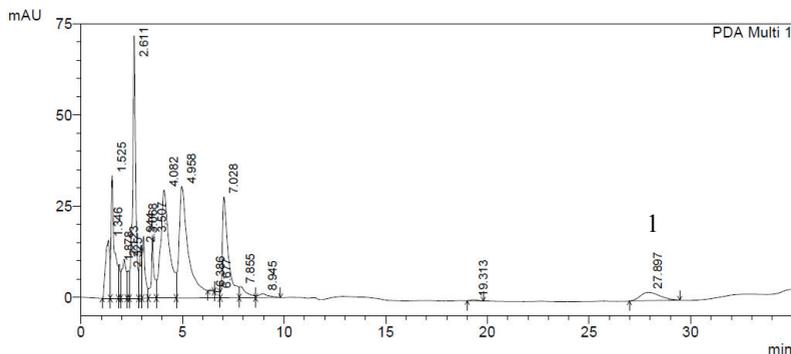


Figura 27 – Cromatograma do ácido dicafeoilquínico (Pico n° 1) no extrato seco de erva mate tostada em cápsulas, na ausência de adjuvante.

4.3.1.1 Metilxantinas

A concentração de metilxantinas no extrato seco de erva mate tostada manteve-se estável no estudo acelerado, com variações inferiores a 10%. As cápsulas contendo o extrato seco de erva mate tostado foram armazenadas por seis meses a 40 °C (Figuras 28 e 29).

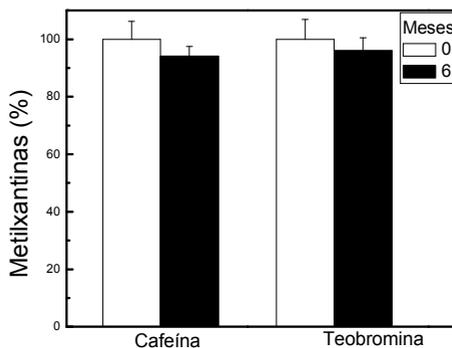


Figura 28 – Estabilidade das principais metilxantinas no extrato seco de erva mate tostada em cápsulas, mantidos a 40 °C durante 6 meses. O extrato seco foi encapsulado na ausência de adjuvante. Os resultados são a média \pm desvio-padrão de duas determinações, em triplicata.

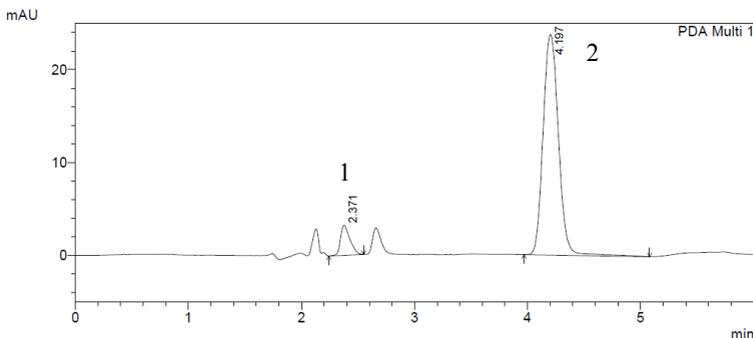


Figura 29 – Cromatograma das metilxantinas no extrato seco de erva mate tostada em cápsulas. O extrato seco foi encapsulado na ausência de adjuvante. Pico n° 1, teobromina; pico n° 2, cafeína.

4.3.3.2 Saponinas Totais

Considerando a ausência de efeitos importantes do adjuvante dióxido de silício na estabilidade dos fenóis totais no extrato de erva mate tostada em cápsulas, a quantificação do conteúdo de saponinas totais foi realizada apenas no extrato sem adjuvante. A variação média no teor de saponinas totais no extrato seco de erva mate tostada em cápsulas mantidas a 40 °C por seis meses foi de 2,6% para as análises realizadas em ensaio colorimétrico e 5,5% para as análises realizadas por CLAE (Fig. 30 e 31). O teor de saponinas totais observado através dos ensaios colorimétricos foi de 31,9 mg/g enquanto o teor de saponinas totais quantificados por CLAE foi de 21,8 mg/g de extrato seco de mate tostado.

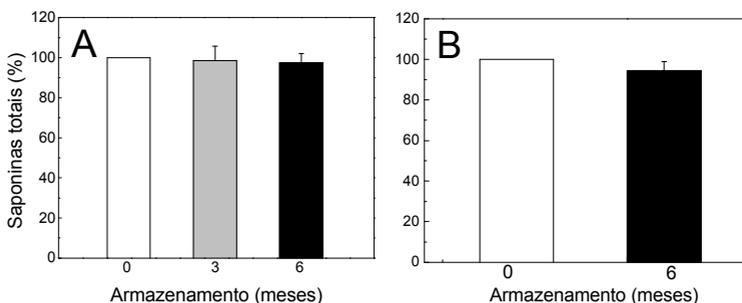


Figura 30 – Estabilidade do teor de saponinas totais avaliado por metodologia colorimétrica (A) e por CLAE (B), no extrato seco de erva mate tostada em cápsulas mantidas a 40 °C durante seis meses, sem adjuvante. Os resultados são a média ± desvio-padrão de duas determinações, em triplicata. Concentração inicial pelo método colorimétrico = $13,95 \pm 0,9$ mg/g; método cromatográfico = $9,3 \pm 0,7$ mg/g

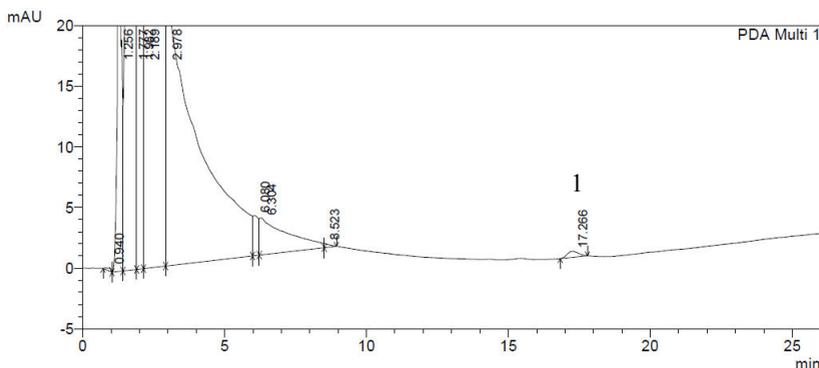


Figura 31 – Cromatograma de saponinas totais no extrato seco de erva mate tostada em cápsulas sem adjuvante. Pico n° 1, saponinas totais.

4.4 Análise Microbiológica do Extrato Seco de Erva Mate Verde e Tostada em Cápsulas

Nos estudos de longa duração e acelerado, no qual as cápsulas de erva mate foram mantidas a 30 e 40 °C, respectivamente, foi realizada a avaliação microbiológica de ambos os extratos, verde e tostado, sem adjuvante. Após re-suspensão em água destilada estéril, os extratos de mate foram semeados em ágar caseína soja, ágar CLED, ágar

McConkey e em ágar SS (*Salmonella* sp., *Schigella* sp.), previamente enriquecido com caldo selenito, antes e ao final dos estudos de estabilidade. Após 48 h de incubação a 35 °C nos meios citados acima, não foi verificado crescimento microbiano no período inicial ou no final dos estudos.

A análise da presença de fungos foi avaliada por meio da técnica de *pour plate*, na qual o extrato seco de mate verde ou tostado foi re-suspendido em água estéril e adicionado ao ágar Sabouraud no seu estado líquido. Após 48 h de incubação a 30 °C, não foi observado crescimento de colônias no meio de cultivo independente da temperatura na qual foram armazenadas as cápsulas contendo os extratos de mate.

5 DISCUSSÃO

Dois temas centrais foram abordados no presente estudo, os quais foram discutidos separadamente: *i*) avaliação da toxicidade aguda e por doses repetidas do extrato seco de erva mate verde (tipo chimarrão) em animais e; *ii*) estabilidade térmica dos extratos de erva mate verde e tostada em cápsulas.

5.1 Estudo Toxicológico em Animais

O consumo de plantas medicinais tem crescido nos últimos tempos e o assunto vem recebendo muita atenção. Uma das justificativas para esse crescimento é que mais pessoas têm decidido retornar ao caminho “mais natural” de vida, com aumento na crença, embora errônea, de que todo produto natural é saudável e seguro (ERNST, 2004; RIETJENS et al., 2005). Entretanto, para que a população faça uso seguro e apropriado das plantas medicinais e fitoterápicos é preciso que sejam realizados estudos sistemáticos principalmente sobre toxicidade e ação farmacológica. Conforme salientado por Simões e Schenkel (2002), para que possam ser preparadas monografias oficiais sobre plantas medicinais é indispensável estabelecer conhecimentos botânicos, agrônômicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos e, apenas após a realização desses estudos será possível, por questões éticas e lógicas, pensar em ensaios clínicos (SIMÕES; SCHENKEL, 2002). Além disso, com base em resultados reportados em estudos científicos sabe-se que há muitos compostos nas plantas que podem ter efeitos tóxicos, genotóxicos e carcinogênicos quando usados cronicamente (ERNST, 2004; RIETJENS et al., 2005).

Em nosso meio, uma planta que apresenta potenciais propriedades benéficas à saúde humana, porém sem que tenham sido realizados estudos toxicológicos, é a erva mate (*Ilex paraguariensis*), cujas folhas secas e moídas são usadas para o preparo de infusões regionalmente conhecidas como chimarrão, tererê, mate cozido e chá mate. Na maioria das vezes, as bebidas são apreciadas pelo seu sabor amargo peculiar e propriedades estimulantes por uma parcela significativa da população de alguns países da América do Sul. Porém, o sabor amargo característico que a infusão possui pode ser fator limitante para aquelas pessoas que não possuem o hábito de ingerir chás, particularmente sem açúcar ou adoçantes. Dessa forma, com o intuito de fazer com que mais pessoas se beneficiem das prováveis propriedades

da planta, idealizamos o desenvolvimento de cápsulas contendo extrato seco de erva mate. Porém, para que as cápsulas de erva mate possam ser avaliadas quanto às suas propriedades farmacológicas em indivíduos saudáveis ou pacientes é preciso, primeiramente, comprovar a sua segurança por meio de ensaios toxicológicos em animais para, em seguida, realizar estudos toxicológicos em seres humanos. Portanto, um dos objetivos principais deste estudo foi verificar a toxicidade do extrato seco de erva mate verde em animais. Vale mencionar que foram feitos ensaios somente com o extrato de erva mate verde, pois o extrato de mate tostado já é livremente comercializado e normalmente consumido pela população. Com base nos resultados do presente estudo, podemos sugerir que o extrato seco de erva mate é seguro para a realização de estudos de toxicidade em seres humanos.

Neste trabalho, utilizamos a administração do extrato seco de erva mate aos animais por via oral, considerando-se a forma usual de consumo da planta pela população (OGA, 2003). No estudo toxicológico agudo, a administração intragástrica por gavagem de 2,0 g/kg do extrato seco de erva mate a ratos Wistar, machos e fêmeas, não provocou mortes entre os animais. Portanto, não foi possível determinar a dose que promove a morte de 50% dos animais (DL50). Além disso, não foram observados sinais de toxicidade, incluindo-se modificações no comportamento, alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorréia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade e contorções abdominais. Condizente com esses achados, também não houve diferenças significativas no ganho de peso corpóreo entre os animais dos grupos controle e mate durante 14 dias de monitoramento. Apesar da ausência de diferenças no ganho de peso corpóreo, os machos do grupo mate consumiram menor quantidade de ração que os animais controles. Por outro lado, as fêmeas administradas com o extrato de mate tiveram maior ingestão de ração. Tais resultados indicam que, provavelmente, a ingestão de ração não esteja diretamente relacionada à administração aguda do extrato de erva mate. Ao final de 14 dias de acompanhamento, todos os animais foram mortos e autopsiados e os órgãos foram observados macroscopicamente. Não foram verificadas alterações macroscópicas dos órgãos dos animais do grupo mate em comparação aos animais controle e, dessa forma, não houve necessidade da realização de estudos histopatológicos com os órgãos (BRASIL, 2004).

O conjunto de observações acima revela ausência de toxicidade aguda do extrato seco de erva mate na dose utilizada, a qual é

considerada máxima pela legislação vigente (BRASIL, 2004, BRASIL, 1996; OGA, 2003).

Devido à inobservância de efeitos relacionados à dose de 2,0 g/kg no estudo agudo, utilizamos esta mesma concentração para a realização dos estudos de doses repetidas em duas espécies de mamíferos, ratos Wistar e coelhos New Zealand, com duração de 12 semanas (BRASIL, 2004). O uso de duas espécies de animais segue a legislação vigente e também pelo fato que diferenças de respostas indicam que o efeito tóxico não é universal e que a extrapolação para o homem deve ser feita considerando-se essas divergências (OGA, 2003).

No estudo de doses repetidas, a administração prolongada do extrato de erva mate aos animais (ratos e coelhos) durante 12 semanas não provocou sinais ou sintomas aparentes de toxicidade, incluindo ausência de alterações comportamentais ou no ganho de peso corpóreo. Além disso, a administração do extrato de mate não modificou significativamente a maioria dos parâmetros hematológicos analisados. No entanto, houve aumento de 2,2 e 6,5% na CHCM para os ratos machos e fêmeas, respectivamente. Esses resultados podem ter ocorrido em consequência à somatória de dois fatores diferentes, como diminuição não significativa do VCM e aumento da HCM nos ratos machos e fêmeas. Também foi observado aumento no número de plaquetas em 23,3 e 45,6% para ratos machos e fêmeas, respectivamente. Apesar da diferença significativa, normalmente as plaquetas apresentam ampla faixa de valores de referência e, assim, os resultados ainda se encontram dentro da faixa descrita para a espécie, ou são inferiores aos relatados em outros estudos (GONÇALVES, 2007; LIMA, 2006; HARKNESS, WAGNER, 1993; MACKENZIE et al., 2010), não apresentando, portanto, alterações clínicas aos animais.

Em relação aos coelhos, apesar da existência de algumas variações significativas em alguns parâmetros hematológicos após 30 e 60 dias de tratamento com o extrato de mate, elas não se mantiveram após 90 dias, exceto aumento no hematócrito de 6,1 e 5,8%, para machos e fêmeas, respectivamente. Esta elevação na porcentagem de hemácias não se refletiu na quantidade de eritrócitos e, portanto, pode ser considerada clinicamente irrelevante, além de estar dentro da faixa estabelecida para a espécie (OGA, 2003). Vale notar que os animais roedores não apresentaram semelhante elevação no hematócrito, assim como o aumento no número de plaquetas observado para os ratos não se repetiu nos coelhos. Ou seja, não ocorreu um padrão sistemático de alterações em parâmetros hematológicos análogos, e em ambas as espécies de animais, que seja condizente com qualquer quadro

indicativo de efeitos colaterais. Em suma, com base nesses resultados é plausível concluir que a administração prolongada do extrato de erva mate não apresentou toxicidade aos animais, detectável pelos exames hematológicos da série vermelha.

Em relação à série branca, as ratas do grupo mate apresentaram aumento de aproximadamente três vezes no número de monócitos. Embora significativos, os resultados ainda são semelhantes aos valores para a espécie descritos por Lima (2006) ou inferiores àqueles encontrados por Gonçalves (2007). Além disso, a monocitose ocorre normalmente em infecções virais, leucemia mielomonocítica crônica e após quimioterapia (WILLIAMS et al, 1976), sendo, portanto, de difícil associação com o consumo do extrato de erva mate. Os ratos machos que receberam administração de mate tiveram redução significativa no número de neutrófilos (21,0%). Entretanto, semelhante ao relatado para os parâmetros anteriores, o número de neutrófilos ainda está dentro dos limites de referência para a espécie (HARKNESS, WAGNER, 1993). De qualquer maneira, pode-se especular que esta redução esteja relacionada ao potencial antiinflamatório da erva mate, particularmente devido aos efeitos das saponinas e dos compostos fenólicos (WANG et al, 2008). Foi demonstrado recentemente que a administração de erva mate diminuiu os marcadores de inflamação no pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro (LANZETTI et al., 2008) ou de mediadores inflamatórios em camundongos obesos (ARÇARI et al., 2011). Porém, curiosamente, a diminuição no número de neutrófilos não foi observada nas ratas, nem tampouco nos coelhos machos ou fêmeas, inviabilizando, assim, conclusões contundentes sobre o possível efeito antiinflamatório do extrato de mate no presente estudo, com base na diminuição no número de neutrófilos. Estudos realizados com seres humanos em nosso laboratório também demonstraram ausência de alterações expressivas nos parâmetros hematológicos após a ingestão de 1 L diário de infusão de erva mate (chimarrão) durante 90 dias (BOAVENTURA, 2010; DE MORAIS, 2009; KLEIN, 2010, STEFANUTO, 2010;).

A maioria dos parâmetros bioquímicos avaliados, como marcadores de função renal ou hepática, colesterol total, glicose, proteínas totais, sódio e potássio, não apresentaram alterações significativas, indicando ausência de modificações importantes no metabolismo geral pela ingestão do extrato de erva mate pelos ratos ou coelhos. No entanto, a administração do extrato de mate aos ratos machos promoveu redução significativa de triglicerídeos (56,8%). Resultados semelhantes foram relatados por Paganini-Stein e

colaboradores (2005) em ratos que receberam dieta hiperlipêmica. A ausência de diminuição nos triglicerídeos das ratas, bem como nos coelhos, indica que este efeito da erva mate pode ser específico ao sexo e/ou à espécie. Recentemente, também observamos que a ingestão de aproximadamente 1 L diário de chá mate por indivíduos dislipidêmicos, durante 60 dias, diminuiu significativamente a concentração sérica de triglicerídeos em 20% (STEFANUTO, 2010). Tais resultados podem ser explicados, pelo menos em parte, ao efeito inibitório da atividade da enzima lipase pancreática pela erva mate (MARTINS et al., 2010).

Além disso, a administração do extrato de mate para os ratos provocou aumento significativo na concentração de ferro no soro das fêmeas (~ 32%) e dos machos (~ 22%, embora sem significância estatística). A presença de ferro na erva mate pode ter contribuído para o aumento desse parâmetro (revisado por BRACESCO, 2010; HECK DE MEJIA, 2007; WILLIAMS, 1976). No entanto, resultados contrários foram observados nos coelhos, com diminuição de 25% no ferro sérico dos machos e 43% nas fêmeas. Em seres humanos, não observamos alterações na concentração sérica de ferro (BOAVENTURA, 2010; DE MORAIS, 2009; KLEIN, 2010, STEFANUTO, 2010). Dessa forma, parece que novamente os efeitos da erva mate na concentração de ferro sérico são específicos a determinada espécie de animal.

Para finalizar, no presente estudo também foram realizadas análises histopatológicas de vários órgãos de ambas as espécies de animais avaliados. Além da ausência de modificações expressivas e/ou consistentes nos resultados dos parâmetros bioquímicos séricos marcadores de lesão tecidual, as análises histopatológicas do fígado não revelaram alterações importantes indicadoras de atipias celulares, indicando ausência de lesão neste órgão para ambas as espécies de animais. Da mesma forma, a análise histopatológica dos rins de ratos e coelhos não revelou alterações indicadoras de atipias celulares e/ou teciduais.

Foram incluídas neste estudo análises histopatológicas do estômago e do intestino delgado, pois existem relatos de ocorrência de distúrbios gastrointestinais provocados pela erva mate, provavelmente pela presença de cafeína (revisado por BASTOS, et al, 2007). Além disso, distúrbios e/ou lesões gastrointestinais poderiam afetar o metabolismo geral dos animais, pois o epitélio do intestino delgado exerce papel crucial na digestão e modificação de componentes alimentares, bem como na absorção de nutrientes. Entretanto, confirmando novamente a ausência de anormalidades nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, não foram observadas alterações

importantes no estômago ou no intestino dos animais submetidos à administração do extrato de erva mate.

Os resultados apresentados no presente estudo indicam que o conjunto de observações relativas às análises bioquímicas e hematológicas, aliados às análises histopatológicas dos principais órgãos que eventualmente poderiam ser afetados pela administração prolongada do extrato seco de erva mate em duas espécies de mamíferos, ratos e coelhos, demonstrou que a erva mate não promoveu alterações indicadoras de toxicidade, corroborando os resultados de estudos realizados em humanos (BOAVENTURA, 2010; DE MORAIS, 2009; KLEIN, 2010; STEFANUTO, 2010;). Com base nesses resultados podemos sugerir que o extrato seco de erva mate pode ser utilizado com segurança para a realização futura de estudos de toxicidade em seres humanos saudáveis.

5.2 Estabilidade térmica do Extrato Seco de Erva Mate em Cápsulas

A estabilidade química dos constituintes bioativos presentes em extratos vegetais garante a ação farmacológica sugerida para esses extratos. No presente estudo, foram desenvolvidas cápsulas contendo extratos secos de erva mate verde ou tostada e a estabilidade dos principais constituintes descritos para a planta foi monitorada ao longo de seis ou 12 meses. Além disso, análises microbiológicas foram realizadas com o extrato encapsulado.

Uma das operações mais frequentes na produção de medicamentos é a secagem, sendo empregada no processamento de diversos materiais para a obtenção de pós e grânulos. O objetivo principal da secagem farmacêutica é a retirada de água, responsável por propiciar um meio reacional para reações químicas, fenômenos físicos e proliferação microbiana (DE SOUZA et al., 2006; RANKELL et al., 2001; SANTOS et al., 2000).

A erva mate possui inúmeros compostos, sendo que alguns deles são responsáveis pela maior parte das propriedades biológicas descritas para a planta, como por exemplo, as metilxantinas (principalmente a cafeína) e as saponinas triterpênicas, as quais são conhecidas como matesaponinas e são derivadas do ácido ursólico (GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005; KRAEMER et al., 1996; GOSMANN et al., 1989; GOSMANN et al., 1995; MONTANHA, et al., 1990; REGINATTO et al., 1999; SCHENKEL; MONTANHA; GOSMANN, 1996). Além disso, a erva mate possui ampla quantidade de compostos fenólicos, especialmente ácido clorogênico (ácido 5-

cafeoilquínico), o qual tem sido extensivamente estudado devido a sua capacidade antioxidante (BASTOS et al., 2007; HECK; De MEJIA, 2007). O mate tostado apresenta, essencialmente, os mesmos componentes da erva mate verde, além de melanoídnas (BASTOS, et al, 2007).

Assim, a estabilidade dos principais constituintes presentes no extrato seco de erva mate foi avaliada por meio da quantificação da concentração dos compostos fenólicos totais, das saponinas totais e dos ácidos clorogênico, gálico e dicafeoilquínico, bem como das metilxantinas cafeína e teobromina. Considerando a importância do potencial antioxidante dos extratos vegetais, além da concentração dos compostos fenólicos antioxidantes, verificamos também a capacidade antioxidante total do extrato de mate. As cápsulas gelatinosas contendo os extratos de mate verde ou tostado foram mantidas, em frascos de vidro, à temperatura de 30 °C por 12 meses (estudo de longa duração) e à temperatura de 40 °C por seis meses (estudo acelerado). De acordo com a legislação vigente, foram aceitas variações de até 10% (ANVISA, 2005).

Os extratos secos de erva mate obtidos por nebulização em *spray-dryer* são altamente higroscópicos quando mantidos à temperatura ambiente. Deste modo, a estabilidade térmica dos constituintes químicos presentes no extrato de mate também foi avaliada quando encapsulados com adjuvante. No presente estudo o adjuvante de secagem utilizado foi o dióxido de silício coloidal, pois apresenta elevada superfície específica e alto poder adsorvente, apresentando excelentes resultados na obtenção de produtos secos por aspersão a partir de soluções extrativas de diferentes espécies vegetais (DE CAMPOS, 1996; DE SOUZA, 1997).

Verificamos que a presença do adjuvante dióxido de silício coloidal não modificou a estabilidade dos compostos fenólicos totais ou dos ácidos fenólicos isolados, bem como da capacidade antioxidante total dos extratos de erva mate mantidos a 30 °C ou 40 °C. Dessa forma, para as análises de saponinas totais e metilxantinas utilizamos o extrato seco em cápsulas sem adjuvante. Para todas as análises realizadas, as variações observadas foram inferiores a 10%, indicando excelente estabilidade dos constituintes do extrato de mate em cápsulas, inclusive quando armazenadas sob condições elevadas de temperatura. Além disso, considerando que pela análise dos perfis cromatográficos não foram observados subprodutos durante os diferentes períodos de tempo avaliados, é possível sugerir que não ocorreram alterações significativas nas estruturas dos principais constituintes bioativos dos extratos secos de erva mate.

Até o momento, não foram encontrados estudos semelhantes com extratos de erva mate. No entanto, Zanoelo, Cardozo-filho, Cardozo-júnior (2009) demonstraram que o superaquecimento por vapor de folhas e caules de erva mate não afetou o teor do ácido 5-*o*-dicafeoilquinico. A estabilidade de alguns dos constituintes presentes no mate também já foi avaliada em outras plantas. Por exemplo, Holzschuh e colaboradores (2007) descreveram que os compostos fenólicos totais presentes no extrato seco de *Achyrocline satureoides* se mantiveram estáveis durante o período avaliado de nove meses a 25 °C, com variações inferiores a 10%.

Em relação às metilxantinas, a cafeína adicionada a suco de frutas manteve-se estável por período de seis meses, a aproximadamente 25 °C (SOUSA et al., 2010). Corroborando esses resultados, Corey e colaboradores (2011) relataram que a concentração de cafeína em produtos feitos com maçã permaneceu estável em condições de elevada umidade por até 45 dias a 30 °C. Nesse contexto, em outro estudo realizado com chá verde em pó mantido a 22 °C por três meses, a cafeína manteve-se estável independente da adição de outros ingredientes (ORTIZ, 2008).

São escassos os trabalhos que avaliaram a estabilidade de saponinas em plantas. Shi e colaboradores (2009) determinaram a estabilidade das saponinas do feijão preto, as quais contêm a aglicona sapogenol B, e demonstraram que existem perdas desse composto por aquecimento. Por outro lado, a concentração de saponinas estereoidais presente em Taywanese yam (*Discorea pseudojaponico yamamoto*) apresentou pouca variação durante o processo de secagem sob ar quente (YANG, et al., 2009).

Além da análise da estabilidade química também foi realizada análise microbiológica do extrato seco sob as diferentes condições de temperatura. Durante o período de armazenamento, não houve crescimento microbiano indicando que as diferentes temperaturas utilizadas nesse estudo não exerceram influência no controle de microorganismos. Além disso, esses resultados também demonstram que boas práticas de manipulação foram aplicadas na preparação das cápsulas. Embora não tenhamos encontrado crescimento bacteriano ou fúngico no extrato de mate em cápsulas, Tonon e Marucci (1995) isolaram e identificaram fungos presentes na erva mate comercial relatando a presença dos gêneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Saccharomyces*. Dessa forma, é possível que o processo de obtenção dos extratos secos de erva mate por *spray-drying* tenha servido também para eliminar quaisquer cepas presentes. Além

disso, o extrato de erva mate pode não constituir um substrato favorável para o desenvolvimento microbiano ou fúngico devido à presença de substâncias inibitórias como taninos e compostos fenólicos (TONON; MARUCCI 1995).

Em suma, com base no conjunto de observações expostas acima podemos concluir que o extrato seco de erva mate verde ou tostada em cápsulas gelatinosas apresentou ótima estabilidade química dos seus principais constituintes, além de não favorecer o crescimento de microorganismos, como fungos e bactérias por período de até 12 meses sob temperatura de 30 °C, ou de até seis meses a 40 °C.

6 CONCLUSÕES

A partir das análises das variáveis do presente estudo, foi possível obter as seguintes conclusões:

6.1 Estudos de toxicidade

- A administração do extrato seco de erva mate (2 g/kg) a ratos Wistar machos e fêmeas, em dose aguda, não causou mortes entre os animais, não modificou a evolução do peso corpóreo, nem promoveu variação comportamental ou alterações macroscópicas dos órgãos.
- A administração de doses repetidas do extrato seco de erva mate (2 g/kg) a ratos e coelhos durante 12 semanas não modificou significativamente a maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados, não promoveu diferença no ganho de peso corporal, nem provocou alterações histopatológicas dos rins, fígado, estômago e intestino delgado.

6.2 Estudos de estabilidade

- O extrato seco de erva mate em cápsulas mantidas a 30 ou 40 °C, em frascos impermeáveis, durante 6 ou 12 meses, apresentou variações inferiores a 10% nos principais constituintes, como compostos fenólicos totais, ácidos clorogênico, gálico e dicafeoilquínico, cafeína, teobromina, saponinas totais e capacidade antioxidante total, independente da presença de adjuvante.
- A permanência das cápsulas de extrato seco de erva mate a 30 °C, no estudo de longa duração por 12 meses, ou a 40 °C, no estudo acelerado por 6 meses, em embalagens impermeáveis, não favoreceu o crescimento de microorganismos.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **J. Hum. Nutr. Diet.**, v. 14, n. 3, p. 243-250, 2001.

ARÇARI, D.P., et al. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Mol. Cell Endocrinol.**, 2011 (in press).

ATHAYDE, M.L.; COELHO, G.C.; SCHENKEL, E.P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil **Phytochem.** v. 55, p. 853-7, 2000.

BAISCH, A.L.M.; JOHNSTON, K.B.; STEIN, F.L.P. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 60, p. 133-139, 1998.

BARONE, J.J.; ROBERTS; H.R.. Caffeine consumption. **Food Chem. Toxicol.**, n. 34, p. 119-129, 1996.

BARROS, S.G.S. et al., Mate (*chimarrão*) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. **Arq. Gastroenterol.**, n. 37, p. 25-30, 2000.

BASTOS, D.H.M., et al. Yerba mate: Pharmacological properties, research and biotechnology. **Med. Arom. Plant. Sci. Biotechnol.**, v. 1, n.1, p. 37-46, 2007.

BASTOS, D.H.M. et al. The chlorogenic acid and caffeine content of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) beverages. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, p. 91-95, 2005.

BASTOS, D.H.M. et al. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 49, n. 3, p. 399-404, 2006.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Anal. Biochem.**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BOAVENTURA, B.C. Avaliação do efeito antioxidante da erva mate (*Ilex paraguariensis*) em indivíduos com dislipidemia. Dissertação de mestrado em nutrição. Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

BOKUCHAVA, M.A., SKOBELEVA, N.I. The biochemistry and technology of tea manufacture. **Crit. Rev. Food Sci. Nut.**, n. 12, p. 203-307, 1980.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **J. Ethnopharmacol.**, 2010. (in press).

BRASIL, 1996 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – nº 116 – Normas para estudo da toxicidade de produtos fitoterápicos, de 08/08/1996. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL, 2004 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, de 16/03/2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL, 2005 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a realização de estudos de estabilidade, de 29/07/2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.

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

CHOU, T.M.; BENOWITZ, N.L. Caffeine and coffee: effects on head and cardiovascular disease. **Comp. Biochem. Physiol.**, 109C, p. 173-189, 1994.

CIGANA, C. RS: Apex exalta virtudes terapêuticas para vender mais erva-mate. Gazeta Mercantil, São Paulo, 18 out. 2008. Disponível em <

http://www.paginarural.com.br/noticias_detalhes.php?id=97511>. Acesso 18 out. 2008.

COREY, M.E.; KERR, W.L.; MULLIGAN, J.H.; LAVELLI, V. Phytochemical stability in dried apple and green tea functional products as related to moisture properties. **Food Sci. Technol.** v. 44, p. 67-74, 2011.

DAY, A.J.; HOTHWELL, A.J.; MORGAN, M.R.A. Characterization of polyphenol metabolites. In: BAO, Y.; FENWICK, R.. (Ed.) **Phytochem. Health Dis.** 1.Ed. New York: Marcel Dekker, cap 2, p. 57-76, 2004.

DELADINO, L.; ANBINDER, P.S.; NAVARRO, A.; MARTINO, M. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydr. Pol.**, n.71, p. 126-174, 2008.

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

ERNST, E. Risks of herbal medicinal products. **Pharm. Drug Safety**, v. 13, p. 767-771, 2004.

FAN, J.P.; HE, C.H. Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high performance liquid chromatography method. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 41, n. 3, p. 950-956, 2006.

FELIPPI, R.; RIBEIRO DO VALLE, R.M.; SILVA, E.L. Efeito do extrato aquoso de erva mate (*Ilex paraguariensis*) na reatividade vascular de aorta torácica de ratos. In: XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Águas de Lindóia-SP, 2005. CD Rom, n. 44104.

FELLIPI, R. et al. Administration of aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reverses endothelial dysfunction in LDL receptor knockout mice. **Free Radical Res.** v. 40, n. 1, 2006.

FERREIRA, F. et al. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by the *Ilex paraguariensis* St. Hil.. saponins. **Phytother. Res.**, v. 11, n. 2, p. 79-81, 1997.

FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutr. Res.**, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, out. 2000.

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

GNOATTO, S.C.B. Metodologias analíticas para quantificação de marcadores químicos em preparações de *Ilex paraguariensis* (A. St. Hil.) e desenvolvimento de extrato seco por nebulização. **Cad. Farm.**, v. 19, n. 1, p. 29 -34, 2003.

GNOATO, S.C.B.; SCHENKEL, E.P.; BASSANI, V.L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **J. Bras. Chem. Soc.**, v. 16, n. 4, p. 723-726, 2005.

GONÇALVES, E.S. et al. Avaliação toxicológica crônica do extrato hidroalcoólico de *Operculina Alata* (Ham.) Urban sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas wistar. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 26, n. 3, p.369-374, 2007.

GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.; SELIGMANN, O. A new saponin from Mate, *Ilex paraguariensis*. **J. Nat. Prod.** v. 52, p. 1367-70, 1989.

GOSMANN, G., et al. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, n. 3, p. 438-441, 1995.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A.J.C. Low-density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochem. Mol. Biol. Intern.**, v. 35, n. 1, p. 47-56, 1995.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 224, n. 2, p. 338-344, jul. 1996.

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

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

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. *Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores*. 3. ed. São Paulo: Rocca, 1993, 49p.

HARRIS, R.; LECUMBERRY, E.; MATEOS-APARICIO, I.; MENGÍBAR, M.; HERAS, A. **Carbohydrate Polymers**. 2010 (in press).

HE, Q.; VENANT, N. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. **J. Zhejiang Univ. Sci.**, v. 5., n. 6, p. 676-683, 2004.

HECK, C.I.; MEJIA, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive on chemistry, health implications, and technological considerations. **J. Food Sci.**, v. 72, n. 9, 2007.

HOLZSCHUH, M.H. et al. Thermal and photo stability of phenolic constituents of an *Achyrocline satureoides* spray-dried powder. **Pharmazie**, 2007.

ITO, E; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Theophylline metabolism in high plants. **Biochim. Biophys. Acta**.v. 1336, n. 2, p. 323-330.

KLEIN, G.A. Efeito erva mate (*Ilex paraguariensis*) e da intervenção dietética no perfil glicêmico e lipídico em pacientes diabéticos tipo 2 ou de indivíduos com pré-diabetes. Dissertação de Mestrado em Nutrição. 2010.

KONEMAN, E.W. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*.5. ed. Rio de Janeiro : MEDSI, 2001. 1465p, il. Tradução de: Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.

KONG, A.N.T., et al. Induction of xenobiotic enzymes by the MAPKinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). **Drug. Metab. Rev.** v., 33, p. 255-271, 2001.

- KRAEMER, K.H., et al. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 2, p. 1119-1122, jul. 1996.
- LANZETTI, M., et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v. 24, p. 375-381, 2008.
- LIMA, C.R. Atividade cicatrizante e estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico sanativo. **Acta Pharm. Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 544-549, 2006.
- MACCARI, A.J.; SANTOS, A.P.R. Produtos alternativos e desenvolvimento de tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. MCT/CNPq/PADCT, Curitiba, PR, 2000.
- MACKENZIE, S.A., et al. Safety assessment of EPA-riche oil produced from yeast: Results of a 90-day subchronic toxicity study. **Reg. Tox. Pharm.**, p., n., 2010. (in press)
- MANDEL, H.G. Update on caffeine consumption, disposition and action. **Food Chem. Toxicol.**, n. 40, p. 1231-1234.
- MARTINET, A.; HOSTETTMANN, K.; SCHUTZ, Y. Thermogenic effects of commercially available plant preparations aimed a treating human obesity. **Phytomedicine**, v. 6, n. 4, p. 231-238, 1999.
- MARTINS, F. et al. Mate tea inhibits in vitro pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, v. 18, p. 42-47, 2010.
- MAZZAFERA, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chem.**, v. 60, p. 67-71, 1997.
- MONTANHA, J.A. Estudo químico e biológico das saponinas de *Ilex paraguariensis* *St. Hil.* Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS, 85 p. Dissertação de Mestrado em Farmácia, 1990.
- MONTEIRO, M. et al. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. **Nutrition**, v. 137, p. 2196-2201, 2001.

MOSIMANN, A.L.P.; WILHELM-FILHO, D.; SILVA, E.L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors**, v. 26, n. 1, p. 59-70, 2006.

NARDINI, M., et al. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. **Free Rad. Biol. Med.** v. 19, p. 541-552, 1995.

NARDINI, M., et al. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 50, n. 20, p. 5735 – 5741, 2002.

NATELLA, F., et al. Coffee drinking induces incorporation of phenolic acids into LDL and increases the resistance of LDL to *ex vivo* oxidation in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 86, p. 604-609, 2007.

NURMINEN, M.L. et al. Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 53, n. 11, p. 831-839, 1999.

OGA, S.; Fundamentos de Toxicologia. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 474p. (Serie Grupo Zanini-Oga).

OLIVEIRA, O.P; PETROVICK, P.R. Secagem por aspersão (*Spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Rev. Bras. Farmacognosia**, n. 20, v. 4, 641-650, 2010.

ORTIZ, J., et al. Interaction of environmental moisture with powdered green tea formulations: effect of catechin chemical stability. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 4068-4077, 2008.

PAGANINI STEIN, F.L., et al. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biol. Res. Nurs.**, v. 7, n. 2, p. 146-156, 2005.

PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 476, n. (2), p. 178-185, 2008.

PELLEGRINI, N., et al. Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 5, p. 2532-2538, 2001.

REBECCA, M.A., et al. Toxicology studies on *Stryphnodendron adstringens*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, 2002. P. 101-104.

RECHNER, A. R. et al. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. **Free Rad. Biol. Med.** v. 33, p. 220–235, 2002.

REGINATTO, F.H., et al. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species - caffeine and theobromine in erva mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 10, n. 6, p. 443-446, 1999.

RICCO, R.A.; WAGNER, M.L.; GURNI, A.A. Estudio comparativo de flavonoides en seis especies austrosudamericanas del género *Ilex*. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 10, n. 1, p. 29-35, 1991.

RIETJENS, I.M.C.M., et al. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. **Mut. Res.** n. 574, 124–138, 2005.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia. Da planta ao medicamento. 4. ed. Porto Alegre: Editora Universidade; Florianópolis: Ed. da UFSC, p.301-330, 2002.

SCHENKEL, E.P.; MONTANHA, J.A.; GOSMANN, G. Triterpene saponins from mate, *Ilex paraguariensis*. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 405, p. 47-56, 1996.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000, Capítulo 27, p. 291-320.

SEWRAN, V, et al. Mate consumption and the risk of squamous cell esophageal cancer in Uruguay. **Cancer Epid. Biom. Prev.**, n. 12, p. 508-13, 2003.

SHI, G.; et al. Yeast-cell-based microencapsulation of chlorogenic acid as a water soluble antioxidant. **J. Food Eng.** v. 80, p. 1060–1067, 2007.

SHI, J., et al. Kinetic study of saponins B stability in navy beans under different processing conditions. **J. Food Eng.** v. 93, p. 59-65, 2009.

SILVA, E.L., et al. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Res. Int.**, v. 41, p. 973-979, 2008.

SIMÕES, M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SINGLETON, V.R.; ORTHOFER, R.; LAMUELA RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOUSA, P.H.M., et al. Storage stability of a tropical fruit (cashew apple, acerola, papaya, guava and passion fruit) mixed nectar added caffeine. **Food Sci. Tech.**, v. 45, p. 2162-2166, 2010.

STEFANUTO, A. Efeito hipocolesterolêmico da erva mate (*Ilex paraguariensis*) associado ou não ao aconselhamento nutricional, em indivíduos dislipidêmicos em uso ou não de estatinas. Dissertação de Mestrado em Nutrição, 2010.

STRASSMANN, B. B. et al. Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. **J. Agric. Food Chem.** n. 56, p. 8348-8353, 2008.

TONON, S.A.; MARUCCI, R. Flora fúngica contaminante de yerba mate estacionada. Presencia de hongos productores de aflatoxinas. **Alim. Latinoam.**, v. 206, p. 23–32, 1995.

VIEIRA, M.A. et al., Chemical characterization of candy made of Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue. **J. Agric. Food Chem.** v. 56, p. 4637–4642, 2008.

WANG, S.; NOH, S. K.; KOO, S. I. Epigallocatechin gallate and caffeine differentially inhibit the intestinal absorption of cholesterol and fat in ovariectomized rats. **J. Nutr.** v. 136, p. 2791–2796, 2006.

WESTERTERP-PLANTENGA, M., et al. Metabolic effects of spices, teas, and caffeine. **Physiol. Behav.**, v. 89, n. 1, p. 85-91, 2006.

WHO. Quality control methods for medicinal plant materials, 2005. Disponível em www.who.it. Atheneu, 1996, v. 2, n. 1.

WILLIAMS, W.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J. **Hematologia**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1976. 1179p. Tradução de: Hematology.

YANG, D.J.; LU, T.J.; WANG, L.S. Effect of endogenous glycosidase on stability of steroidal saponins in Taiwanese yam (*Dioscorea pseudojaponica yamamoto*) during drying processes. **Food Chem.**, v. 113, p. 155-159, 2009.

ZANOELO, E. F.; CARDOZO-FILHO, L.; CARDOZO-JÚNIO, E.L. Superheated steam-drying of mate leaves and effect of drying conditions on the phenol content. **J. Food Process. Eng.** v. 29, n. 3, p. 253–268, 2006.

ANEXO A – Protocolo de Aprovação Pelo Comitê de Ética em Uso de Animais

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00379

TítuloEstudo de toxicidade de extrato seco de erva mate (*Ilex paraguariensis*) em animais**Data de Entrada**

16/07/2009

Resultado:

Aprovado

Data/ Prazo

18/09/2009

Considerações

Ofício n.º 145/CEUA/PRPE/2009

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Edson Luiz da Silva / Departamento de Análises Clínicas - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por um ano, para a utilização de cento e quatro ratos (*Rattus norvegicus*) e vinte e quatro coelhos.

- Processo cadastrado sob o número: 23080.029999/2009-78

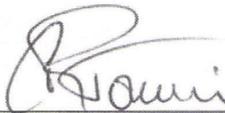
Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 24/12/2010

Data 24/09/2009

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

[Abrir Solicitação](#)[Criar Relatório](#)