

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Atividade de frações bioativas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) sobre
o metabolismo de ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica**

PEDRO ERNESTO DE RESENDE

PORTO ALEGRE, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Atividade de frações bioativas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) sobre
o metabolismo de ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica**

Dissertação apresentada por
PEDRO ERNESTO DE RESENDE
para obtenção do TÍTULO DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. George González Ortega
Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Kucharski

PORTO ALEGRE, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de mestrado acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de março de 2013 pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dra. Gilsane Lino von Poser

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dra. Valquíria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

de Resende, Pedro Ernesto

Atividade de frações bioativas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) sobre o metabolismo de ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica / Pedro Ernesto de Resende. -- 2013.

135 f.

Orientador: George González Ortega.

Coorientador: Luiz Carlos Kucharski.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. *Ilex paraguariensis*. 2. Erva-mate. 3. Saponinas, polifenóis e metilxantinas. 4. Metabolismo. I. González Ortega, George, orient. II. Kucharski, Luiz Carlos, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG), Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFRGS) e Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) do Departamento de Fisiologia – ICBS desta Universidade, com apoio e financiamento da CAPES e CNPq.

*Para meus pais,
Pedro e Adriana.
Fontes eternas de
inspiração e incentivo.*

“Great things are not accomplished by those who yield to trends, fads and popular opinion.”

—Jack Kerouac

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. George González Ortega, pelo acolhimento, convivência, conversas, ensinamentos e risadas, proporcionando um precioso crescimento pessoal e profissional, e principalmente por mostrar que a ciência e o conhecimento não se restringem a uma determinada área.

Ao Professor Dr. Luiz Carlos Kucharski, pela ajuda imensurável, acolhimento, parceria, e principalmente por tornar esse trabalho possível.

Ao doutorando Samuel Kaiser pelo apoio, aprendizado, incentivo, e principalmente pela amizade construída ao longo desses anos.

A bolsista de iniciação científica Vanessa Pittol, por toda ajuda e apoio prestados nesse trabalho.

Aos colegas/amigos do Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia da UFRGS por todo aprendizado e agradável convivência diária.

Aos colegas do LaMEC - Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada - do Departamento de Fisiologia da UFRGS, em especial a Raquel, Ana e Cláudia por toda ajuda prestada para realização desse trabalho. E ao professor Otávio Jaconi Saraiva pelo auxílio na realização das análises bioquímicas.

A CAPES e CNPq, órgãos que financiaram o desenvolvimento deste trabalho.

A Silvia e Mustafa, por todo carinho, acolhimento e convivência, e por me alimentarem quase todos os finais de semana.

A todos meus fiéis amigos de Porto Alegre e Caxias do Sul.

A toda minha família, em especial minha mãe, Adriana Rodrigues da Fonseca de Resende e meu pai, Pedro Ernesto de Resende Neto, por todo apoio, amor incondicional e por sempre acreditar que a educação é o melhor caminho para a formação do caráter de um indivíduo.

A Morena, por tornar meus dias mais interessantes, diferentes, excitantes, autênticos e culturais. Obrigado por toda motivação, incentivo, apoio, sinceridade, companheirismo, amor e amizade que trouxeste para minha vida.

RESUMO

Ilex paraguariensis A. St. Hil. é uma espécie nativa da América do Sul popularmente conhecida como mate ou erva-mate. Três principais classes de compostos bioativos estão presentes nas folhas: metilxantinas, polifenóis e saponinas, nas quais são atribuídas diversas atividades biológicas, incluindo efeitos no metabolismo lipídico. Do ponto de vista químico e biológico, essa espécie é bastante estudada. Em relação ao processo de obtenção, enriquecimento e purificação das frações do mate, porém, a pesquisa tecnológica revela-se restrita. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade dos principais grupos de compostos do mate sobre o metabolismo de ratos Wistar submetidos à uma dieta hiperlipídica. A extração de polifenóis, metilxantinas e saponinas das folhas foi otimizado mediante um desenho experimental do tipo Box-Behnken, obtendo-se rendimentos máximos de 357, 41 e 15 mg/g de planta seca, respectivamente. Uma fração enriquecida em polifenóis e metilxantinas (MXPL) e outra enriquecida em saponinas (SFL) foram preparadas por fracionamento em fase sólida de resina polimérica, metanol e água em gradiente decrescente de polaridade. Os rendimentos para polifenóis, metilxantinas e saponinas foram 497, 88 e 245 mg/g de material seco, respectivamente. Vinte quatro ratos Wistar machos foram submetidos a uma dieta hiperlipídica e seis ratos submetidos à uma dieta padrão durante cinco semanas. Posteriormente, foram separados em dois grupos controles (dieta padrão e hiperlipídica), um grupo tratado com extrato de mate (YME), outro tratado com MXPL e outro tratado com SFL. Nenhum aumento significativo no peso corporal em ratos com dieta hiperlipídica foi observado, contudo, houve alterações evidentes em outros parâmetros relevantes relacionados ao metabolismo. Resultados referentes à redução de peso corporal, níveis plasmáticos de glicose e lipogênese se contrapõem a outros antes relatados na literatura, sugerindo uma relação com o modelo animal utilizado. Atividades observadas para o extrato e frações indicam claramente que essas podem ser diferentes e até opostas, levando a acreditar que os principais compostos do mate possuam diferentes efeitos no metabolismo quando testados separadamente.

Palavras chave: *Ilex paraguariensis*, erva-mate, saponinas, polifenóis, metilxantinas, metabolismo, ratos Wistar.

ABSTRACT

Ilex paraguariensis A. St. Hil. is a South American native species commonly known as mate or yerba mate and is widely used as stimulant tea-like beverages. Methylxanthines, polyphenols and saponins are the main compounds present in its leaves. To these, are attributed several biological activities, including effects in lipid metabolism. Although there are a range of studies of mate, in the point of view of technological processing and biological testing of enriched and purified fractions revealed to be restricted. In this sense, the aim of this study is to evaluate the activity of the main compounds found in mate on the lipid metabolism of male Wistar rats fed with a high-fat diet. For this propose, it was obtained and optimized an extract of mate leaves (YME) by a Box-Behnken design, obtaining maximum yields of 357, 41 and 15 mg/g dry material, respectively. Subsequently, the main compounds were separated by solid phase extraction and fractionation using a polymer resin, methanol and water, in decreasing gradient polarity, achieving an enriched fraction of polyphenol and methylxanthines (MXPL) and an enriched fraction of saponins (SFL). Yields for polyphenols, saponins and methylxanthines were 497, 88 and 245 mg/g of dry material, respectively. Twenty four male Wistar rats were submitted to a high-fat diet and six to a standard diet, during five weeks and separated in five groups (standard diet (control) ($n = 6$); high-fat diet ($n = 6$); YME-treated group ($n = 6$); MXPL-treated group ($n = 6$); SFL-treated group ($n = 6$)). No significant increase in rats body weight fed with high-fat diet was observed. However, there were evident alterations in fat other relevant parameters related to metabolism. Dissimilar results regarding the reduction of body weight, plasma levels of glucose and lipogenesis, for instance, are opposed to other studies, previously reported in the literature, suggesting that the animal model might be determinant in the evaluation of these activities. Likewise, effects observed in the crude extract and enriched fractions clearly indicate that these may be different, even opposite, leading to believe that the main compounds of mate have different effects on metabolism when are tested separately.

Keywords: *Ilex paraguariensis*, mate, saponins, methylxanthines, polyphenols, metabolism, Wistar rats.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sinopse dos ensaios biológicos realizados, em esquema.....29
- Figura 2.** Folhas e frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Fotógrafos: Márcio Verdi e Eduardo L. Hettwer Giehl. Fonte: Flora Digital do Rio Grande do Sul).....34
- Figura 3.** Principais polifenóis encontrados nas folhas do mate. Ácido neoclorogênico (A); ácido clorogênico (B); ácido criptoclorogênico (C); e rutina (R1: β -D-rutinosídeo) (D).....35
- Figura 4.** Cafeína (A) e Teobromina (B).....36
- Figura 5.** Saponinas encontradas nas folhas e frutos de *Ilex paraguariensis*. - ara: α -L-arabinopiranosil; rha: α -L-ramnopiranosil; glc: β -D-glicopiranosil; aglu: ácido glicurônico. Fo: folhas; Fr: frutos.....37
- Figura 6.** Perfil por CLAE dos polifenóis presentes no extrato das folhas de mate (YME) em 340 nm. Os sinais foram codificados como: (1) ácido neoclorogênico; (2) ácido clorogênico; (3) ácido criptoclorogênico; (4) Pico 4; (5) Pico 5; (6) rutina; (7) Pico 6.....76
- Figura 7.** Perfil por CLAE dos polifenóis presentes na fração enriquecida em polifenóis e metilxantinas (MXPL) de mate em 340 nm. Os picos foram codificados como: (1) ácido neoclorogênico; (2) ácido clorogênico; (3) ácido criptoclorogênico; (4) Pico 4; (5) Pico 5; (6) rutina; (7) Pico 6.....76
- Figura 8.** Perfil por CLAE dos polifenóis presentes na fração enriquecida em saponinas das folhas do mate (SFL) em 340 nm. Os picos foram codificados como: (4) Pico 4; (7) Pico 6.....77
- Figura 9.** Perfil comparativo por CLAE de polifenóis presentes em YME, MXPL, SFL e SFF em 340 nm.....77

Figura 10. Perfil por CLAE das metilxantinas presentes no extrato das folhas do mate (YME) em 280 nm. Os picos foram codificados como: (1) Teobromina; (2) Cafeína.....78

Figura 11. Perfil por CLAE das metilxantinas da fração enriquecida em polifenóis e metilxantinas (MXPL) das folhas de mate em 280 nm. Os picos foram codificados como: (1) Teobromina; (2) Cafeína.....78

Figura 12. Perfil por CLAE das metilxantinas da fração enriquecidas em saponinas das folhas de mate em 280 nm.....79

Figura 13. Perfil comparativo por CLAE de metilxantinas presentes em YME, MXPL, SFL em 340 nm.....79

Figura 14. Perfil por CLAE das saponinas de referência ilexosídeo II (1) e chikusetsusaponina IVa (2).....80

Figura 15. Perfil por CLAE das saponinas do extrato das folhas de mate (YME) em 205 nm. Os picos foram codificados como: (1) Pico 1; (2) Pico 2; (3) Pico 3; (4) chikusetsusaponina IVa; (5) Pico 5; (6) Pico 6; (7) Pico 7.....80

Figura 16. Perfil por CLAE das saponinas da fração enriquecida em polifenóis e metilxantinas das folhas de mate (MXPL) em 205 nm.....81

Figura 17. Perfil por CLAE das saponinas da fração enriquecida em saponinas das folhas de mate (SFL) em 205 nm. Os picos foram codificados como: (1) ilexosídeo II; (2) Pico 1; (3) Pico 2; (4) Pico 3; (5) chikusetsusaponina; (6) Pico 5; (7) Pico 6; (8) Pico 7.....81

Figura 18. Perfil comparativo por CLAE das saponinas das folhas do mate (SFL) em 205 nm.....82

LISTA DE ABREVIATURAS

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Detector Ultra-violeta

GOT – Glutamic-Oxaloacetic Transaminase

GTP – Glutamic-Pyruvic Transaminase

HDL – High Density Lipoprotein

LC-PDA – Liquid Chromatography – Photodiode Array Detector

LDL – Low Density Lipoprotein

YME – Yerba Mate Extract

MXPL – Enriched Fraction of Methylxanthines and Polyphenols of Mate Leaves

SFL – Enriched Fraction of Saponins of Mate Leaves

UPLC/Q-TOF-MS – Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry

X1 – Ethanol Concentration

X2 – Temperature

X3 – Drug:Solvent Ratio

KRB – Krebs-Ringer-Buffer

SD – Standard deviation

Da – Daltons

RSM – Response Surface Methodology

MSR – Metodologia de Superfície de Resposta

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA..... | 21 |
| OBJETIVOS..... | 25 |
| REFERENCIAL TEÓRICO..... | 31 |
| DISCUSSÃO GERAL..... | 47 |
| CONCLUSÕES..... | 53 |
| PERSPECTIVAS..... | 57 |
| REFERÊNCIAS..... | 61 |
| ANEXOS..... | 73 |

**INTRODUÇÃO E
RELEVÂNCIA DO TEMA**

Ilex paraguariensis A. St. Hil. (Aquifoliaceae) popularmente conhecida como mate ou erva-mate (folhas e galhos processados industrialmente) é uma espécie nativa da América do Sul e possui um importante papel social, econômico, e cultural nessa região. Entre os principais constituintes químicos do mate destacam-se as metilxantinas, polifenóis e saponinas. Metilxantinas são denominadas alcaloides purínicos de caráter anfótero, representadas principalmente pela cafeína, teobromina e teofilina, e apresentam atividade estimulante no sistema nervoso central (RATES, 2010). Derivados cafeoilquínicos e flavonoides são os polifenóis de maior abundância encontrados no mate e são atribuídos vários efeitos, principalmente antioxidante (HECK e col., 2008). Saponinas são metabólitos secundários com característica anfifílica presente em altos teores nas folhas e principalmente nos frutos imaturos dessa espécie apresentando inúmeras atividades biológicas (PAVEI e col., 2007).

Na última década, houve um aumento dos estudos com o mate e suas propriedades biológicas, como antioxidante, anti-mutagênica, anti-inflamatória e, sobretudo, efeito anti-obesidade (BRACESCO et al., 2011). Muitos trabalhos realizados com erva-mate e modelos de obesidade induzida por dieta (PANG e col., 2008; ARÇARI e col., 2009; HUSSEIN e col., 2011a; HUSSEIN e col., 2011b; SILVA e col., 2011) ou mesmo seres humanos (DE MORAIS e col, 2009, KIM e col, 2012) tem mostrado um efeito na redução da gordura e peso corporal, melhoria de níveis plasmáticos de triglicerídeos, colesterol e glicose, além da regulação de expressão gênica envolvida no metabolismo lipídico. Entretanto, existem na literatura divergências e dados contraditórios relativo à essa atividade do mate.

Embora amplamente estudado do ponto de vista fitoquímico e biológico, a pesquisa com o mate revela ser restrita e incipiente em relação à tecnologia de obtenção frações enriquecidas e purificadas dos principais compostos. Além disso, a maioria dos trabalhos emprega um extrato aquoso de erva-mate, mimetizando o uso do chimarrão ou do chá-mate, permanecendo assim, incerto se os efeitos devem ser atribuídos aos polifenóis, metilxantinas ou saponinas (RESENDE e col., 2012). Neste sentido, surge a oportunidade de investigar a influência de compostos de mate sobre o metabolismo lipídico, separadamente.

Em estudo feito sobre a caracterização estrutural e avaliação biológica da fração enriquecida em saponinas dos frutos de mate (RESENDE e col., 2012), demonstrou-se uma redução significativa no tecido adiposo retroperitoneal em ratos saudáveis, alimentados com dieta padrão e tratados simultaneamente com essa fração, sem alteração de peso corporal, quando comparados ao grupo controle. Além disso, evidenciou-se uma redução significativa de triglicerídeos nos níveis plasmáticos dos animais tratados. A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, observou-se que a variação de peso, redução de massa adiposa, atividade metabólica dos tecidos hepático e adiposo, além de parâmetros bioquímicos podem estar todos interligados. De modo comparativo, a fração enriquecida em saponinas demonstrou ter a maior atividade nesses ensaios realizados, sugerindo assim que esses metabólitos secundários possuem forte influência no metabolismo de lipídios.

Nesse sentido, surge como perspectiva de investigação o efeito dos compostos bioativos presentes na erva-mate comercial sobre atividades biológicas ligadas ao metabolismo de lipídios, com ênfase nas saponinas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade das principais frações bioativas presentes na erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), sobre o metabolismo de lipídios de ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica, conjuntamente com a sua separação e purificação dessas mediante técnicas em fase polimérica sólida.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Adaptar e modificar, quando necessário, métodos analíticos por CLAE e UPLC/Q-TOF-MS destinados à caracterização e doseamento do teor de metilxantinas, polifenóis e saponinas presentes no extrato bruto e respectivas frações enriquecidas;
- II. Otimizar a extração da erva-mate empregando o processo de maceração dinâmica, delineado conforme experimento do tipo Box-Behnken de três fatores, em três níveis;
- III. Obter frações enriquecidas de polifenóis, metilxantinas e saponinas presentes na erva-mate, mediante uso de fracionamento em fase polimérica sólida;
- IV. Determinar as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, transaminases (TGO e TGP), creatinina, uréia e amilase, assim como avaliar a oxidação de glicose no fígado, a gordura retroperitoneal e no músculo sóleo, a síntese de glicogênio no fígado e músculo, a lipogênese e lipólise no fígado, músculo e tecido adiposo, a concentração de triglicerídeos, colesterol e glicogênio no fígado e a concentração de gordura nas fezes em ratos Wistar submetidos à dieta padrão (controle negativo), dieta hiperlipídica (controle positivo) e a tratamentos específicos com extrato bruto e frações enriquecidas em saponinas e metilxantinas-polifenóis.

A Figura 1 apresenta um esquema representativo da dissertação mostrando as etapas realizadas ao longo do trabalho.

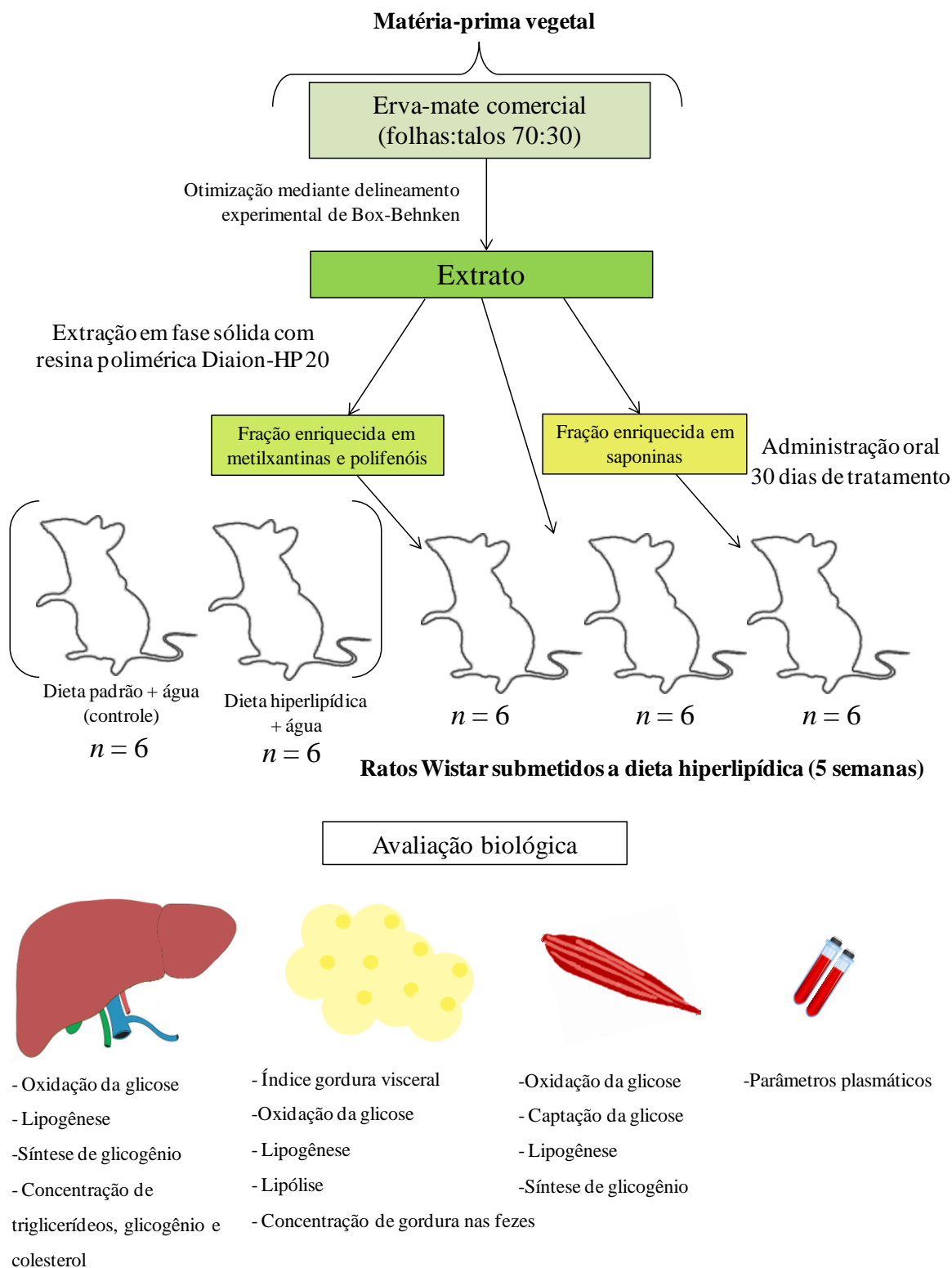


Figura 1. Sinopse da obtenção das frações e dos ensaios biológicos realizados, em esquema.

REFERENCIAL TEÓRICO

ASPECTOS BOTÂNICOS

Ilex paraguariensis A. St. Hil. é uma espécie popularmente conhecida como *mate*, sendo que a denominação *erva-mate* é dada para especificar o produto de transformação tecnológica obtido, principalmente, das folhas da espécie. A cultura do *mate* é antiga em vários países sul-americanos. Tendo sido originada pelos índios e adotada posteriormente pelos colonizadores, tem hoje uma forte expressão cultural na região sul do Brasil. Além de serem usadas na preparação de bebidas aquosas como o *chimarrão* e chás, as folhas do *mate* constituem a matéria-prima de corantes naturais e antioxidantes, assim como na preparação de cosméticos e medicamentos. O *mate* é também conhecido por suas propriedades tônica, estimulante e diurética (PASINATO, 2003).

Tradicionalmente, o *mate* compõe um dos sistemas agro-florestais mais antigos e característicos da região sul, assumindo importância ambiental e socioeconômica significativa. Foi por um longo tempo um dos primeiros produtos das exportações brasileiras (PENTEADO e col., 2000).

A *erva-mate* (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) é uma espécie nativa do Brasil, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Argentina. No Brasil, especificamente, há ocorrência nos estados de Mato Grosso, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (EDWIN e REITZ, 1967). Atualmente, Argentina é o principal produtor mundial, seguida pelo Brasil e Paraguai. A produção mundial estimada no ano de 2002 foi de cerca de 900.000 toneladas, abrangendo uma área cultivada próxima a 3000 km² (HECK e MEJIA, 2007).

Morfologicamente são descritas três subespécies botânicas de *mate*, sendo a subespécie *I. paraguariensis* A. St. Hil. a predominante, com maior área de dispersão nas regiões sub-tropicais e temperadas da América do Sul (ANDREWS, 1985). A espécie ocorre como uma árvore perenifólia de altura variável, que quando cultivada, oscila de 3 a 5 m, mas que pode atingir até 30 m na idade adulta, quando em estado silvestre (CARVALHO, 2003). Tem floração de outubro a dezembro, e frutificação de janeiro a março (BACKES e IRGANG, 2002).



Figura 2. Folhas e frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Fotógrafos: Márcio Verdi e Eduardo L. Hettwer Giehl. Fonte: Flora Digital do Rio Grande do Sul).

A comercialização dessa espécie ocorre estritamente para as folhas e talos, enquanto que o fruto é um subproduto do processamento da erva-mate, desprovido de valor comercial, contudo, fonte abundante de saponinas (PEIXOTO e col., 2010).

ASPECTOS FITOQUÍMICOS

A presença de três frações de compostos químicos foi estabelecida para as folhas de mate, a saber: compostos polifenólicos, metilxantinas e derivados triterpenóides, principalmente saponinas.

POLIFENÓIS

Os compostos polifenólicos constituem um importante grupo químico da erva-mate, sendo o ácido clorogênico o mais conhecido (ATHAYDE e col., 2000). O teor dessa classe de compostos nos extratos de folhas de mate é maior que a relatada para o chá verde (*Camellia sinensis*) e similar ao encontrado em vinhos tintos (GUGLIUCCI e col., 2009 a, b; BRACESCO e col., 2011). Também, cabe destacar a presença dos flavonóides quercetina-3-O-rutinosídeo (rutina), quercetina-3-O-glicosídeo (isoquercitrina) (RICCO e col., 1991), canferol-3-O-glicosídeo, canferol-3-O-rutinosídeo e quercetina livre (OHEM e HOLZL, 1988), juntamente com os ácidos neoclorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) e criptoclorogênico (KRAEMER, 1997).

Esses compostos têm sido analisados por vários métodos quantitativos incluindo ensaio de Folin Ciocalteu, biossensor da tirosinase, cromatografia líquida de alta-eficiência (CARINI e col., 1998; CHANDRA e DEMEJIA GONZALEZ, 2004; DALL'ORTO, 2005; PAVEI, 2007; PEIXOTO, 2010).

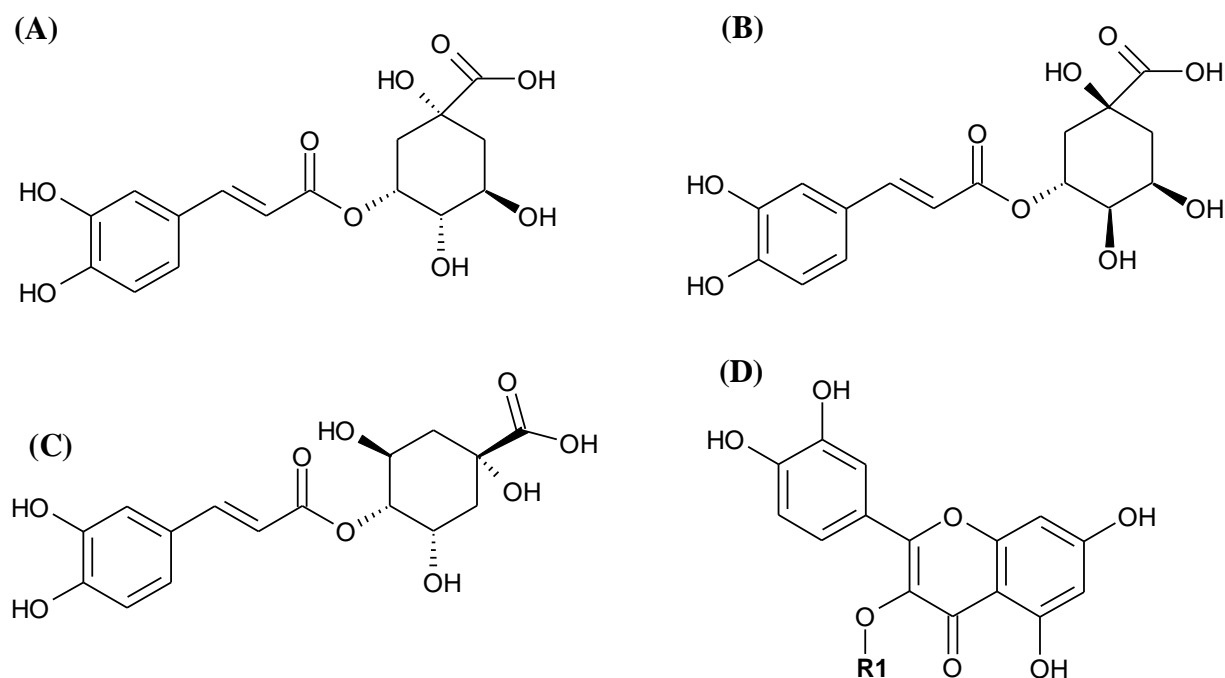


Figura 3. Principais polifenóis encontrados nas folhas do mate. Ácido neoclorogênico (A); ácido clorogênico (B); ácido criptoclorogênico (C); e rutina (R1: β -D-rutinosídeo) (D).

METILXANTINAS

A presença de metilxantinas está associada fortemente ao mate. Conforme os estudos de CLIFFORD e RAMIREZ-MARTINEZ (1990), cafeína é a principal metilxantina encontrada nas folhas do mate (teor de 0,89–1,73%), seguida da teobromina (0,26–0,88%) e, em menor quantidade, teofilina. Entretanto, as condições e métodos de extração possuem uma forte influência no teor desses compostos (GNOATTO e col., 2007). As xantinas encontram-se no grupo dos alcaloides purínicos e são relatados em diferentes tipos de espécies, incluindo o café e o cacau (ATHAYDE, 2000). Essa classe de compostos apresenta um amplo espectro de

atividades farmacológicas, principalmente como efeito estimulante sobre o sistema nervoso central (RATES, 2010).

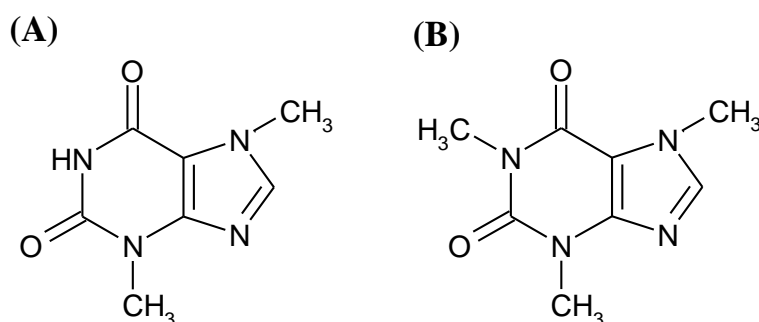
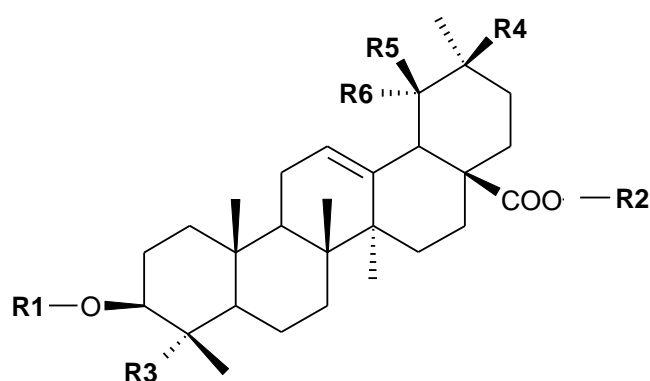


Figura 4. Cafeína (A) e teobromina (B).

SAPONINAS

O mate é uma espécie que se caracteriza pelo elevado teor de saponinas em suas folhas e, principalmente, nos frutos imaturos (KRAEMER, 1997; ATHAYDE, 2000; TAKETA, 2004; PAVEI e col., 2007). GOSMANN (1989) relatou teores de saponinas de 5 a 10% do peso seco de folhas de erva-mate. A elucidação estrutural dessas saponinas foi estabelecida por GOSMANN e SCHENKEL (1989), MONTANHA (1990), GOSMANN e col. (1995), KRAEMER e col. (1996) e SCHENKEL e col. (1997), sendo, atualmente reconhecidos 13 glicosídeos triterpênicos contendo glicose, ramnose e arabinose. As saponinas das folhas de *Ilex paraguariensis* apresentam majoritariamente agliconas derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico (SCHENKEL e col., 1997).

Embora o presente trabalho não tenha como foco a obtenção de saponinas a partir dos frutos do mate, cabe ressaltar a que esses apresentam um perfil por CLAE semelhante às folhas (PAVEI e col., 2007; PEIXOTO e col., 2010; PEIXOTO e col., 2011, RESENDE e col., 2012), tornando-se dessa maneira comparáveis.



| Saponina | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R6 | Fonte | Referência |
|------------------------|------------------------|----------------------|---------------------|------------------|------------------|-----|-------|-----------------------|
| J1a | -ara(2-1)rha | -H | -CH ₃ | -CH ₃ | -H | -H | Fo | Montanha, 1990 |
| J1b | -ara(2-1)rha | -H | -CH ₃ | -H | -CH ₃ | -H | Fo | Montanha, 1990 |
| J2a | -ara(3-1)glc | -H | -CH ₃ | -CH ₃ | -H | -H | Fo | Montanha, 1990 |
| J2b | -ara(3-1)glc | -H | -CH ₃ | -H | -CH ₃ | -H | Fo | Montanha, 1990 |
| J3a | -ara(2-1)rha | -glc | -CH ₃ | -CH ₃ | -H | -H | Fo | Montanha, 1990 |
| J3b | -ara(2-1)glc | -glc | -CH ₃ | -H | -CH ₃ | -H | Fo | Montanha, 1990 |
| matesaponina 1 | -ara(3-1)glc | -glc | -CH ₃ | -H | -CH ₃ | -H | Fo | Gosmann, 1989 |
| matesaponina 2 | -ara[(2-1)rha](3-1)glc | -glc | -CH ₃ | -H | -CH ₃ | -H | Fo | Gosmann, 1995 |
| matesaponina 3 | -ara(3-1)glc | -glc(6-1)glc | -CH ₃ | -H | -CH ₃ | -H | Fo | Gosmann, 1995 |
| matesaponina 4 | -ara[(2-1)rha](3-1)glc | -glc(6-1)glc | -CH ₃ | -H | -CH ₃ | -H | Fo | Gosmann, 1995 |
| matesaponina 5 | -ara[(2-1)rha](3-1)glc | -glc(6-1)glc(4-1)glc | -CH ₃ | -H | -CH ₃ | -H | Fo | Kraemer e col., 1996 |
| guaianicina B | -ara(3-1)glc | -glc | -CH ₃ | -CH ₃ | -H | -H | Fo | Martinet e col., 2001 |
| nudicaucina C | -ara[(2-1)rha](3-1)glc | -glc | -CH ₃ | -CH ₃ | -H | -H | Fo | Martinet e col., 2001 |
| matesídeo | -ara | -H | -CH ₂ OH | -CH ₃ | -CH ₃ | -OH | Fr | Taketa e col., 2004 |
| ziyu-glicosídeo I | -ara | -glc | -CH ₃ | -CH ₃ | -CH ₃ | -OH | Fr | Taketa e col., 2004 |
| ilexosídeo II | -ara(3-1)glc | -glc | -CH ₃ | -CH ₃ | -CH ₃ | -OH | Fr | Taketa e col., 2004 |
| chikusetsusaponina IVa | -aglu | -glc | -CH ₃ | -CH ₃ | -H | -H | Fr | Dahmer e col., 2012 |

Figura 5. Saponinas encontradas nas folhas e frutos de *Ilex paraguariensis*. - ara: α -L-arabinopiranosil; rha: α -L-ramnopiranosil; glc: β -D-glicopiranosil; aglu: ácido glicurônico. Fo: folhas; Fr: frutos. (Adaptado de Pavei, 2004).

No que tange aos frutos do mate, TAKETA e col. (2004) isolaram e identificaram duas sapogeninas e três saponinas não detectadas nas folhas desta espécie. As saponinas apresentam núcleo hidróxi-ursólico e são derivadas dos ácidos rotúndico e pomólico, sendo uma monodesmosídica e de estrutura inédita, denominada matesídeo. As saponinas bidesmosídicas isoladas nos frutos de *Ilex paraguariensis*

foram anteriormente relatadas em espécies de *Ilex* nativas da Ásia, sendo conhecidas como ziyu-glicosídeo I e ilexosídeo II.

EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DE MATE

De modo geral, a tendência atual é a obtenção de produtos vegetais padronizados e purificados mais eficazes, seguros e ao mesmo tempo, de maior valor agregado, acompanhado da remoção de compostos com ação indesejável e do enriquecimento do teor de compostos de interesse (TIERRA, 1999).

A eficiência na extração de compostos em matéria-prima vegetal depende de diversos parâmetros tais como temperatura, tempo, polaridade do solvente, pH, entre outros, e os seus efeitos podem ser independentes ou interativos (MYLONAKI, 2008; NACZK e SHAHIDI, 2004; NEGRÃO MURAKAMI e col., 2011).

A obtenção de extratos é tradicionalmente realizada através da aplicação de temperaturas elevadas durante um longo período de tempo, além da utilização de solventes orgânicos que limitam suas aplicações devido a toxicidade e resíduos gerados (SONAGLIO, ORTEGA, PETROVICK, e BASSANI, 2007).

Existe na literatura muitos estudos sobre as várias condições empregadas para extração de compostos das folhas e frutos do mate (GOSMANN e col., 1989; GNOATTO e col., 2005; HECK e MEJIA, 2007; PAVEI e col., 2007; PEIXOTO e col., 2010). No entanto, existe pouca pesquisa sobre a otimização de extração visando obter concentrações elevadas de seus principais constituintes (NEGRÃO MURAKAMI e col., 2011).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi desenvolvida por Box e colaboradores na década de 50 (MONTGOMERY, 2005). Este termo foi originado a partir da perspectiva gráfica gerada por modelos matemáticos, e seu uso tem sido amplamente adotado na quimiometria. MSR consiste em um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas que se baseiam no ajuste de modelos empíricos para os dados experimentais obtidos em relação ao projeto experimental. Para este objetivo,

funções polinomiais lineares e quadráticas são utilizadas para descrever o sistema estudado e, por conseguinte, a explorar condições experimentais (modelagem e deslocamento) até a sua otimização (BEZERRA e col., 2008).

Dentre outros métodos utilizados, o desenho experimental de Box-Behnken apresenta-se como um modelo muito eficiente, que requer um reduzido número de corridas e, portanto, torna-se uma alternativa útil e prática (KHURI e CORNELL, 1996; MONTGOMERY, 2005), incluindo em processos de extração visando uma substância ou uma classe de substâncias de uma matéria-prima vegetal específica (KIM e col., 2010).

No tocante aos métodos de separação e obtenção de frações purificadas e de compostos isolados, uma das técnicas mais empregadas para as saponinas, é o fracionamento líquido-líquido, principalmente, mediante uso de solventes apolares, como éter ou hexano, seguidos de partição com *n*-butanol/água (SOETAN e col., 2006; GÜÇLÜ-USTUNDAG; MAZZA, 2007). Entretanto, este método tem por desvantagens a perda potencial de compostos mais polares e, ainda, a possibilidade da permanência residual de solventes na fração de saponinas. Ainda que o fracionamento em fase líquida seja aplicado no isolamento visando à identificação de saponinas ou para posterior avaliação biológica, outras técnicas apresentam-se viáveis, dentre elas, o fracionamento em fase sólida (DINI e col., 2009; PEIXOTO e col., 2010).

O aprimoramento nos processos de purificação de frações saponosídicas bioativas empregando a extração em fase sólida, em detrimento ao fracionamento líquido-líquido, tem motivado a avaliação de suportes com diversas características estruturais (PAVEI, 2007; PEIXOTO, 2010; VERZA, 2012). Nesse caso, vários tipos de resina têm sido propostas, dentre elas sílica gel, sílica C18 e resinas poliaromáticas, utilizando como solvente de eluição gradientes decrescentes de polaridade combinados por misturas de água com metanol ou etanol (PAVEI, 2004; PARK e col., 2005; PEIXOTO, 2010; VERZA 2012).

Em relação à análise qualitativa e quantitativa de saponinas, o método mais aplicado é a CLAE acoplada a diversos tipos de detectores, como UV, arranjo de

diodos, espectrômetro de massas e espalhamento de luz com detector evaporativo (OLESZEK, 2002). Para a avaliação de saponinas de mate por CLAE, GNOATTO e col. (2005) desenvolveram um método para extratos de folhas, mediante hidrólise, e utilizando ácido oleanólico como padrão. Para os frutos, foi desenvolvido e validado um método com eluição isocrática tendo como padrão a matessaponina 3 (PAVEI e col., 2007. BORRÉ e col., 2010).

As opções por métodos analíticos mais sensíveis incluem a CLAE associada a espectrometria de massas de MS/MS, que permite a caracterização e posterior identificação (FOUBERT, 2010). PEIXOTO e col. (2009) utilizando CLAE acoplada ao espectrômetro de massas demonstraram a presença do ilexosídeo II na fração enriquecida em saponinas dos frutos do mate e outros compostos com massas moleculares características de saponinas.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO MATE

Além de servir como marcadores químicos e taxonômicos, que permitem diferenciar o mate de outras espécies do gênero *Ilex* descritas como adulterantes na composição do produto erva-mate (SCHENKEL e col., 1997), para as saponinas tem sido relatada uma série de atividades biológicas importantes.

A pesquisa sobre as propriedades biológicas e farmacológicas do mate teve um início tardio se comparado com outras espécies relacionadas, como o chá verde, café, cola, guaraná e cacau, por exemplo (BRACESCO e col., 2011). No entanto, nos últimos 15 anos, houve um aumento significativo na literatura de estudos acerca das propriedades biológicas e farmacológicas da erva-mate demonstrando diversos efeitos, a saber, antioxidante, antimutagênico, antiinflamatório, antiglicêmico, antitrombótico e principalmente na redução de peso e perfil lipídico (PANG e col., 2008; GUGLIUCCI, 2009a,b; ARÇARI e col., 2009; MEJÍA e col., 2009; ARÇARI e col.2010; GOSMANN e col., 2012, RESENDE e col., 2012).

Em relação aos polifenóis é atribuída atividade antioxidante significativa, tanto *in vitro* quanto *ex-vivo*, e para produtos tecnológicos secos por *spray-drying*, obtidos

de soluções extrativas aquosas de mate e de erva-mate. Adicionalmente, foi evidenciado um efeito hepatoprotetor *in vivo* frente ao estresse oxidativo e ao dano hepático provocado pelo tetracloreto de carbono (SILVA, 2007).

Várias propriedades farmacológicas são atribuídas às metilxantinas, que incluem a estimulação do sistema nervoso central, vasoconstrição periférica, relaxamento da musculatura lisa e estimulação do miocárdio (KIKATANI e col., 1993; LORIST e TOPS, 2003).

No que tange às atividades biológicas, as saponinas possuem uma ampla variedade, com destaque para as atividades: analgésica, antialérgica, anti-edematosa, anti-inflamatória, antifúngica, antimicrobiana, antiviral, hemolítica, imunoestimulante, moluscicida, neuroprotetora, expectorante, sedativa, assim como hipocolesterolêmica, efeitos na redução da absorção de gorduras e inibição da lipase pancreática, essas últimas associadas ao tema do presente trabalho (HOSTETTMANN e MARSTON, 1995; MILGATE e ROBERTS, 1995; LACAILLE-DUBOIS e WAGNER, 1996; FRANCIS e col., 2002; BRACESCO e col., 2011).

Na literatura há diversos trabalhos relacionados com a atividade da erva-mate sobre o metabolismo de lipídios de camundongos (ARÇARI e col., 2009; MARTINS e col., 2009; ARÇARI e col., 2011; HUSSEIN e col., 2011a; HUSSEIN e col., 2011b; KANG e col., 2012), ratos Wistar (OLIVEIRA e col., 2008; PEREIRA e col., 2011; SILVA e col., 2011; PIMENTEL e col., 2012; RESENDE e col., 2012; BORGES e col., 2013; LIMA e col., 2013); ratos Sprague-Dawley (PANG e col., 2008) e humanos (DE MORAIS e col., 2009; KIM e col., 2012).

Embora grande parte desses estudos indique efeitos significativos no metabolismo lipídico, é possível constatar a falta de um maior detalhamento sobre a composição química das preparações testadas, na maioria deles. Algumas divergências, incluindo relatos de atividades opostas, parecem ser devidas ao modelo animal utilizado ou a fatores relacionados com o processamento tecnológico e identidade dos produtos testados. Em outros casos, as inferências sobre as possíveis

substâncias bioativas são decorrentes de analogias ou de outras premissas não corroboradas experimentalmente.

No contexto das atividades atribuídas aos polifenóis de mate, há relatos que o chá das folhas inibe *in vitro* a atividade da lipase pancreática, tanto humana quanto suína e que, em *in vivo*, o mate suprimiu o aumento do peso corporal e reduziu os níveis de triglicerídeos e colesterol (LDL) do soro de camundongos tratados com dieta hiperlipídica (MARTINS e col., 2009). Os autores atribuem essa atividade, em parte, aos polifenóis presentes no chá de mate, considerando que vários polifenóis como flavonas, flavonóis, taninos e chalconas inibem essa enzima responsável pela absorção de gorduras ao nível intestinal (MARTINS e col., 2009). De modo controverso, SUGIMOTO e col. (2009) também evidenciaram a inibição da lipase pancreática suína pelo extrato metanólico das folhas de mate e três triterpenos oligo-glicosilados isolados desse extrato. Uma atividade supressora similar foi constatada para saponinas isoladas de *Platicodi radix* (HAN e col., 2002) e de ginseng (LIU e col., 2008).

Recentemente GOSMANN e col. (2012) relataram a inibição *in vitro* da acumulação de triglicerídeos em adipócitos 3T3-L1 mediante uso de um extrato de polifenóis das folhas secas de mate (50 mg/mL), sendo a rutina (100 µg/mL) tida como a principal responsável desta atividade. Além disso, os extratos de erva-mate tiveram um efeito modulatório na expressão de genes relacionados com a adipogênese como PPAR γ 2, leptina, TNF- α e C/EBP α , indicando assim uma potencial influência desses compostos no metabolismo de lipídios (GOSMANN e col., 2012).

Nesse mesmo sentido, PEREIRA e col. (2012), investigaram a influência do mate na homeostase glicêmica em ratos Wistar, utilizando frações de metilxantinas e polifenóis, além de infusões de erva-mate bruta e tostada. Os resultados desse estudo mostraram que *I. paraguariensis* tem um potencial efeito anti-hiperglicêmico capaz de melhorar o estado diabético e é provavelmente, uma fonte de múltiplos compostos hipoglicêmicos.

Em estudo realizado com extrato de folhas de mate, administrado a ratos Wistar, verificou-se uma redução na oxidação de glicose do fígado, que demonstra a

diminuição da mobilização hepática deste substrato, assim como uma redução na taxa de triglicerídeos plasmáticos (RESENDE e col., 2012). Os autores concluíram que a presença das metilxantinas cafeína (480 µg/mL) e teobromina (145 µg/mL) podem estar, em parte, influenciando nessa atividade.

O efeito anti-obesidade tem sido tema de várias publicações associadas às saponinas. Em uma série de trabalhos HAN e col. (1999a, 1999b, 2000) observaram esse efeito em ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica e tratados com extratos vegetais ricos em saponinas. O mesmo grupo de pesquisadores (HAN e col., 2002) constatou complementaridade entre a redução do peso corporal, do tecido adiposo parametrial e da esteatose hepática em ratos submetidos à uma dieta hiperlipídica tratados com 10 a 30 g/kg de saponinas de *Platycodi radix*. Além disso, ratos que receberam oralmente uma emulsão de lipídios não demonstraram aumento no nível de triglicerídeos plasmáticos, quando tratados com 375 mg/kg dessas saponinas. Esses autores também observaram um efeito inibitório, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre a atividade da lipase pancreática associado à saponina purificada Platicodin D, na dose de 244 mg/kg, bem como inibição do aumento de triglicerídeos sanguíneos. Dados publicados sugerem que outras saponinas também podem exercer atividades similares. Assim, LIU e col. (2008) relataram que ginsenosídeos de caules e folhas de *Panax quinquefolium* inibiram *in vitro* tanto a atividade da lipase pancreática quanto o aumento induzido de triglicerídeos plasmáticos em ratos tratados com uma emulsão de lipídios. Do mesmo modo, observaram uma diminuição na massa de tecido adiposo parametrial, após a administração em longo prazo dessas saponinas em concentrações de 1 a 3%.

PANG e col. (2008) em estudo feito *in vivo*, ao administrar um extrato hidroetanólico de mate conjuntamente com uma dieta hiperlipídica, verificaram uma redução significativa do peso corporal e da gordura visceral, redução nos níveis de lipídio sanguíneo e hepático, glicose, insulina e leptina em ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica. Constataram ainda um efeito protetor contra a obesidade induzida em ratos, associado a uma maior expressão da proteína desacopladora da fosforilação da AMPK (PANG e col., 2008).

ARÇARI e col. (2009) corroboraram que camundongos induzidos à obesidade e tratados com extrato aquoso de erva-mate tostada comercial atenuaram de forma acentuada o ganho de peso, adiposidade, retornando os níveis séricos de colesterol, triglicerídeos, LDL e glicose aos seus valores normais.

Ainda nesse sentido, a administração oral de extrato aquoso de mate durante sete semanas a camundongos induziu decréscimos significativos no peso corporal, índice de massa corporal e da ingestão de alimentos em um modelo Tsumura Suzuki de síndrome metabólica obesos e diabéticos (TSOD) (HUSSEIN e col., 2011a). Esses efeitos foram acompanhados de uma redução significativa no nível de glicose, triglicerídeos, ácidos graxos não-esterificados e colesterol plasmáticos e melhoria na sensibilidade à insulina, aumentando a captação de glicose no teste de tolerância à insulina. Além disso, o mate melhorou significativamente o nível de adiponectina, e apresentou redução significativa no peso do tecido adiposo branco, e índice de adiposidade. Em conjunto, os autores sugerem que o mate pode induzir efeitos benéficos decorrentes de uma maior sensibilidade ao efeito da insulina em quadros de diabetes, dislipidemia e obesidade na síndrome metabólica.

O mesmo grupo de pesquisa verificou os efeitos da erva-mate em marcadores do apetite e saciedade. A administração crônica de extrato aquoso de mate em camundongos (50 e 100 mg/kg) durante três semanas reduziu significativamente as gorduras, ingestão alimentar, peso corporal, e melhorou o perfil plasmático e hepático. Ainda, o mate induziu aumentos significativos nos níveis de GLP-1 e leptina em comparação ao controle sugerindo assim efeitos na modulação de marcadores relacionados à saciedade e ao apetite (HUSSEIN e col., 2011b).

Em um estudo clínico, randomizado e duplo-cego, controlado com placebo, avaliou-se a eficácia e segurança de um extrato seco de mate encapsulado em 60 indivíduos com excesso de peso com idades entre 20 a 39 anos, durante seis semanas. Após esse período, os indivíduos que tomaram mate apresentaram uma redução significativa percentual de gordura corporal (0,3% vs 0,6%, $P < 0,05$) e massa de gordura (0,5 kg vs 0,2 kg, $P < 0,05$) em relação aos que receberam placebo. Não foram

observadas diferenças significativas em outras medidas como perda de peso, níveis de colesterol total, triglicerídeos, HDL e glicose (KIM e col., 2012).

Mais recentemente, RESENDE e col. (2012), administrando oralmente um extrato aquoso de erva-mate e uma fração enriquecida em saponinas dos frutos imaturos de mate em ratos Wistar saudáveis, demonstraram uma redução significativa de 35% do peso da gordura retroperitoneal, além de uma redução na oxidação da glicose no fígado e tecido adiposo de 90% e 60%, respectivamente. Adicionalmente foi verificada uma redução de triglicerídeos no nível plasmático dos animais tanto para o extrato aquoso de mate quanto para a fração enriquecida em saponinas. De modo oposto, MELO e col. (2007) não verificaram diferenças significativas na evolução ponderal de ratos Wistar tratados com extratos de mate, porém, submetidos a uma dieta hiperlipídica.

Os dados disponíveis na literatura evidenciam claramente um efeito divergente sobre os níveis plasmáticos da glicose e dependente do modelo animal utilizado (ARÇARI e col., 2009; ARÇARI e col., 2011; HUSSEIN e col., 2011a; HUSSEIN e col., 2011b; SILVA e col., 2011; GOMES e col., 2012; RESENDE e col., 2012).

Nesse contexto, na comparação dos efeitos de extrato aquoso de mate (sem tratamento industrial) e extrato aquoso da erva-mate comercial, foi observada uma diminuição significativa na gordura visceral acompanhada de um aumento significativo na glicose sanguínea de ratos Wistar sadios. Na ocasião, essa atividade foi atribuída às altas concentrações de açúcar, cafeína e saponinas encontradas na erva-mate bruta (SILVA e col., 2011). De forma similar, RESENDE e col. (2012) constataram que ratos Wistar normais tratados com extrato hidroetanólico dos frutos do mate também apresentaram aumento no nível plasmático de glicose, quando comparados ao grupo controle.

GOMES e colaboradores (2012) relatam ausência de alterações significativas nos parâmetros de perfil lipídico e na variação de peso de ratos Wistar tratados com extrato de erva-mate e submetidos a dieta hiperlipídica. Naqueles tratados com mate também foi observado um aumento da insulinemia, levando a um processo de

resistência à insulina, contrastando com outros autores (ARÇARI e col., 2011; HUSSEIN e col., 2011a). Os autores sugerem que esses resultados podem levar ao agravamento desse quadro e conseqüentemente à síndrome metabólica.

Estudos sobre toxicidade aguda para saponinas de mate sugerem a ausência de efeitos tóxicos. Em relação á fração de saponinas de frutos de mate, PEIXOTO e col. (2009) avaliaram a toxicidade da fração enriquecida em saponinas do mate (INPI 0501510-3, 2004) obtidas a partir dos frutos desta através do potencial hemolítico *in vitro* e da citotoxicidade sobre cultura de célula de mamífero. Para a atividade hemolítica foi determinado um valor de IC₅₀ de 0,2 g/L. Enquanto que o valor de IC₅₀ para citotoxicidade foi de 3,8 g/L, caracterizando um produto de muito baixa toxicidade. A ausência de propriedades hemolíticas, para as saponinas das folhas de *Ilex paraguariensis*, verificado por GOSMANN (1989), contribui, também, para uma menor citotoxicidade destes glicosídeos. Níveis plasmáticos de creatinina, uréia e nas transaminases TGO e TGP permaneceram inalterados indicando, assim, que esses extratos não apresentam toxicidade renal nem hepática (RESENDE e col., 2012).

DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho foi delineado e desenvolvido tendo como referência relatos da atividade da erva-mate sobre o metabolismo de lipídios (ARÇARI e col., 2009; HUSSEIN e col., 2011a; HUSSEIN e col., 2011a; PANG e col., 2008; SILVA e col., 2011) a qual foi atribuída principalmente aos polifenóis, metilxantinas e saponinas presentes nas folhas dessa espécie. Adicionalmente, RESENDE e col. (2012) recentemente comprovaram um efeito anti-obesidade de uma fração enriquecida em saponinas dos frutos imaturos do mate. Embora amplamente estudado, a pesquisa com mate revela-se restrita e incipiente em relação à obtenção tecnológica de extratos e frações enriquecidas e purificadas. Grande parte dos trabalhos é baseada em dados insuficientes quanto à composição química e ainda, empregam extratos aquosos de mate, mimetizando o uso do chimarrão ou do chá mate, permanecendo assim, incerto à qual classe de compostos os efeitos devem ser atribuídos. Nesse sentido surge a oportunidade de avaliar os compostos presentes no mate separadamente, bem como, o possível efeito sinérgico e complementar entre eles.

Desse modo, a etapa inicial do trabalho destinou-se à obtenção e otimização de um extrato liofilizado e padronizado, buscando um rendimento máximo de compostos. Foi possível estabelecer as condições ideais do processo de extração empregando o desenho experimental do tipo Box-Behnken utilizando três fatores, em três diferentes níveis. Temperatura de extração, concentração de etanol e razão droga:solvente foram considerados os parâmetros mais relevantes. Quinze experimentos foram realizados de acordo com o desenho experimental. O melhor rendimento foi alcançado utilizando-se 50% de etanol (v/v), temperatura de extração de 30 °C e razão droga:solvente de 1:4 (m/v), e consequentemente selecionado (YME) para dar continuidade ao trabalho.

Visando determinar a influência dos compostos do mate sobre o metabolismo lipídico separadamente, frações enriquecidas foram desenvolvidas a partir do YME, mediante extração em fase sólida utilizando a resina polimérica Diaion HP-20 (Supelco, EUA). O processo foi aplicado com sucesso, obtendo-se uma fração enriquecida em polifenóis e metilxantinas (MXPL) e uma fração enriquecida em saponinas (SFL). Além disso, os métodos cromatográficos empregados mostraram-se satisfatórios e específicos para cada classe de compostos aplicados. Análises

complementares acerca da quantificação dos principais compostos presentes tanto no extrato quanto nas frações enriquecidas encontram-se no Anexo 2.

Adicionalmente, as análises de UPLC/Q-TOF-MS permitiram a caracterização das principais saponinas derivadas dos ácidos oleanólico, ursólico, e pomólico presente nas folhas. Pode-se ainda, identificar a presença do ilexosídeo II e chikusetsusaponina IVa no extrato e a fração de saponinas, sendo a chikusetsusaponina IVa, o composto majoritário (Fig. B). Esses resultados corroboram com dados anteriormente relatados (PEIXOTO e col., 2011; TAKETA e col., 2004; DAHMER e col., 2012; PIRES e col., 1997).

A partir da avaliação biológica feita com ratos machos Wistar, pode-se verificar os parâmetros de peso corporal e das gorduras retroperitoneal e epididimal, oxidação de glicose, síntese de glicogênio, lipogênese, lipólise, teor hepático de glicogênio, triglicerídeos e colesterol, teor de gordura nas fezes, e ainda, parâmetros bioquímicos plasmáticos. Adicionalmente, foram empregados diferentes tipos de tecidos nos ensaios (fígado, tecido adiposo retroperitoneal e músculo sóleo) a fim de verificar o metabolismo integralmente.

De maneira geral, a dieta hiperlipídica adotada não forneceu um aumento significativo no peso final dos animais. Este fato pode ter limitado a avaliação do efeito causado pela dieta, bem como a avaliação das atividades do extrato e frações bioativas de mate. No entanto, outros parâmetros importantes relacionados com o metabolismo lipídico puderam ser estabelecidos e discutidos ao longo do trabalho.

Cabe ressaltar que os dados obtidos nesse trabalho indicam claramente que o extrato e as frações enriquecidas do mate apresentaram efeitos distintos no metabolismo, demonstrando que embora estejam em concentrações equivalentes, proporcionam efeitos diferentes quando estão separados, inclusive de forma antagônica.

De acordo com trabalhos na literatura, o extrato das folhas de mate (YME) exibiu uma redução de aproximadamente 30% nas gorduras viscerais avaliadas, em relação ao grupo controle submetido à dieta hiperlipídica (ARÇARI e col., 2009;

HUSSEIN e col., 2011a; HUSSEIN e col., 2011a; KANG e col., 2012; MARTINS e col., 2009; PANG e col., 2008).

Em relação aos parâmetros bioquímicos, o extrato e as frações bioativas também apresentaram atividades diferenciadas. O grupo tratado com a fração enriquecida em polifenóis e metilxantinas (MXPL) exibiu efeitos de redução no nível de triglicérides, colesterol e LDL plasmáticos. Os polifenóis e metilxantinas presentes nessa fração parecem contribuir diretamente para essa atividade atribuída ao mate, a qual pode ser encontrada em vários trabalhos na literatura utilizando diferentes modelos de animais (PAGANINI-STEIN e col., 2005; MOSIMANN e col., 2006; ARÇARI e col., 2009; MARTINS e col., 2009; HUSSEIN e col., 2011a; HUSSEIN e col., 2011a; SILVA e col., 2011; KANG e col., 2012; RESENDE e col., 2012;).

O uso de extratos de erva-mate e a concentração plasmática de glicose apresentam-se divergentes na literatura. Parece que dependendo do modelo animal utilizado, extratos de mate também podem comportar-se de maneira diferente (ARÇARI e col., 2009; BORGES e col., 2013; HUSSEIN e col., 2011a; HUSSEIN e col., 2011b; LIMA e col., 2013; OLIVEIRA e col., 2008; PEREIRA e col., 2011; PIMENTEL e col., 2012; RESENDE e col., 2012; SILVA e col., 2011).

Perfis semelhantes entre alguns ensaios biológicos realizados demonstram que a atividade da oxidação da glicose pode estar relacionada com a atividade lipogênica e de síntese de glicogênio nos tecidos avaliados. Diferentemente do grupo tratado com o extrato (YME), os grupos tratados com ambas as frações enriquecidas do mate apresentaram um aumento na oxidação da glicose hepática e muscular.

Em relação à atividade lipogênica, todos os animais tratados com erva-mate apresentaram um decréscimo na lipogênese hepática demonstrando um potencial efeito protetor no fígado. O grupo das saponinas de mate foi o único a apresentar um aumento na atividade lipogênica do tecido adiposo. Levando em consideração que a insulina é um importante fator que controla e estimula a lipogênese, o aumento dessa atividade no tecido adiposo pode estar relacionado com uma modulação desse hormônio, como já relatado anteriormente (ARÇARI e col., 2011; PEREIRA e col.,

2012; BORGES e col., 2013). Além disso, as saponinas parecem induzir a excreção de gordura nas fezes, através da inibição da lipase pancreática em nível intestinal, já relatada para o mate (MARTINS e col., 2009; SUGIMOTO e col., 2009).

Aparentemente, as frações enriquecidas de erva-mate apresentaram uma maior influência no metabolismo de ratos Wistar através de diferentes mecanismos, contribuindo para o melhoramento dos parâmetros e fatores avaliados.

Nos últimos anos tem-se aumentado o número de trabalhos utilizando dietas hipercalóricas ou hiperlipídicas. Vários métodos são descritos para a avaliação específica dos efeitos da administração aguda ou crônica de novos agentes anti-obesidade sobre o peso corporal, ingestão de alimentos, gorduras viscerais, e perfil plasmático em modelos animais com excesso de peso, obesos ou geneticamente modificados. No entanto, a obesidade monogênica em humanos é extremamente rara e hoje é amplamente aceito que dietas que induzem à obesidade de ratos e camundongos são os modelos mais adequados para prever o potencial terapêutico de novos produtos no tratamento da obesidade. As divergências encontradas na literatura entre estudos com o mate sobre o metabolismo de lipídios podem estar relacionadas com o tipo de linhagem e modelo animal aplicado, dieta fornecida, maneira de administração, forma de obtenção dos extratos ou frações, confusão nas espécies testadas, e ainda, modo de analisar os dados obtidos.

CONCLUSÕES

De modo geral, a otimização da extração das folhas de mate dos seus principais compostos foi empregado com sucesso utilizando desenho experimental do tipo Box-Behnken. A extração em fase sólida permitiu a obtenção de duas frações enriquecidas em polifenóis-metilxantinas e saponinas a partir do extrato da erva-mate em um rendimento de 497, 88 and 245 mg/g de material seco.

As preparações de mate utilizadas nesse trabalho foram capazes de influenciar o metabolismo de ratos machos Wistar submetidos a uma dieta hiperlipídica. Apesar de nenhuma das preparações de mate ter reduzido o peso total dos animais, o extrato e as frações apresentaram efeitos distintos, particularmente quando avaliados separadamente.

Modificações foram observadas no ganho de peso das gorduras, oxidação da glicose, lipogênese, lipólise, síntese de glicogênio, parâmetros bioquímicos plasmáticos e excreção de gordura nas fezes, dependendo do material avaliado.

Os resultados obtidos nesse trabalho estão em alguns aspectos de acordo com os relatos em outros estudos empregando extratos de mate encontrados na literatura. Entretanto, algumas divergências relativas à redução de peso e gordura visceral, lipogênese e nível plasmático de glicose foram evidenciadas.

Estudos adicionais são necessários para elucidar quais dos principais compostos ou frações são responsáveis pelas atividades biológicas.

PERSPECTIVAS

O presente trabalho apresentou algumas questões relativas as atividades do mate sobre o metabolismo de ratos Wistar, surgindo como perspectivas a avaliação das frações enriquecidas em diferentes modelos animais, bem como dietas fornecidas, além de ensaios biológicos mais específicos, incluindo testes em nível biomolecular e hormonal, a fim de verificar os possíveis mecanismos de ação dos principais compostos presentes no mate.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, S. A checklist of Aquifoliaceae of Bahia. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, 37 (63): 34-44, 1985.

ARÇARI D.P.; BARTCHEWSKY W.; DOS SANTOS T.W.; OLIVEIRA K.A.; FUNCK A.; PEDRAZZOLI J.; DE SOUZA M.F.; SAAD M.J.; BASTOS D.H.; GAMBERO A.; CARVALHO P. O.; RIBEIRO M.L. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, 12: 2127-33, 2009.

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

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul**. Guia de Identificação e Interesse Ecológico, Instituto Souza Cruz, RS, 2002.

BEZERRA, M.A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S.; ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, 76 (5): 965-977, 2008.

BORRÉ G. L.; KAISER S.; PAVEI C.; DA SILVA F.A.; BASSANI V. L.; ORTEGA G. G. Comparison of methylxanthine, phenolics and saponin contents in leaves, branches and unripe fruits from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (mate). **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, 33: 1–13, 2010.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, 136: 378–384, 2011.

CARINI M.; FACINO R.M.; ALDINI G.; CALLONI M.; COLOMBO L.; Characterization of phenolic antioxidants from Mate (*Ilex paraguariensis*) by liquid

chromatography mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 12: 1813–1819, 1998.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Embrapa Informações Tecnológicas; Colombo, PR: Embrapa Floresta, 2003.

CLIFFORD, M.N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J.R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, 35: 13–21, 1990.

DINI, I.; TENORE, G.C.; DINI, A. Saponins in *Ipomoea batatas* tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. **Food Chemistry**, 113 (2): 411-419, 2009.

EDWIN, G.; REITZ, P.R. Aquifoliáceas. In: REITZ, P.R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues, 1967.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: A review. **British Journal of Nutrition**, 88 (6): 587-605, 2002.

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

GNOATTO, S.C.B.; BASSANI, V.L.; COELHO, G.C.; SCHENKEL, E.P. Influence of the extraction methodology on the methylxanthines content of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. **Quimica Nova** 30 (2), pp. 304-307, 2007.

GOMES, L.F., **Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre o metabolismo de ratos tratados com dieta hiperlipídica**. Dissertação de Mestrado, PPG - Fisiologia – ICBS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

GOSMANN, G. **Saponinas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate)**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1989.

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

GÜÇLÜ-USTUNDAG, O.; MAZZA, G. Saponins: Properties, applications and processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 47 (3): 231-258, 2007.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D.H.M. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. **Fitoterapia**, 80: 138-142, 2009a.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D.H.M.; SCHULZE, J.; SOUZA, M.F.F. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, 80: 339-344, 2009b.

HAN, L.K.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Reduction in fat storage during chitin–chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, 23: 174–179, 1999a.

HAN, L.K.; TAKAKU, T.; LI, J.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Anti-obesity action of oolong tea. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, 23: 98–105, 1999b.

HAN, L.K.; XU, B.J.; KIMURA, Y.; ZHENG, Y.; OKUDA, H. *Platycodi radix* affects lipid metabolism in mice with high fat diet-induced obesity. **Journal of Nutrition**, 130: 2760–2764, 2000.

HAN, L.K.; KIMURA, Y.; KAWASHIMA, M.; TAKAKU, T.; TANIYAMA, T.; HAYASHI, T.; ZHENG, Y.N.; OKUDA, H. Anti-obesity effects in rodents of dietary tea saponin, a lipase inhibitor. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, 25: 1459–1464, 2001.

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

HAN, L.K.; ZHENG, Y.N.; YOSHIKAWA, M.; OKUDA, H.; KIMURA, Y. Anti-obesity effects of chikusetsusaponins isolated from *Panax japonicus* rhizomes. **BMC Complement and Alternative Medicine**, 5 (9), 2005.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, 72 (9): 138-151, 2007.

HECK, C.; SCHMALCKO, M.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56: 8394–8403, 2008.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Saponins. **Cambridge University Press**, Cambridge, 1995.

HUSSEIN, G.M.E.; MATSUDA, H.; NAKAMURA, S.; AKIYAMA, T.; TAMURA, K.; YOSHIKAWA, M. Protective and ameliorative effects of maté (*Ilex paraguariensis*) on metabolic syndrome in TSOD mice. **Phytomedicine**, 19 (1): 88-97, 2011a.

HUSSEIN, G.M.E.; MATSUDA, H.; NAKAMURA, S.; HAMAOKA, M.; AKIYAMA, T.; TAMURA, K.; YOSHIKAWA, M. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) promotes satiety and body weight lowering in mice: Involvement of glucagon-like peptide-1. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 34 (12): 1849-1855, 2011b.

KIKATANI, T.; WATANABE, Y.; SHIBUYA, T. Different effects of methylxanthines on central serotonergic postsynaptic neurons in a mouse behavioral model. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 44: 457–461, 1993.

KIM, S.; YUN, E.J.; BAK, J. S.; LEE, H., LEE, S.J., KIM, C.T.; LEE, J-H.; KIM, K.H. Response surface optimized extraction and chromatographic purification of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* leaves. **Food Chemistry**, 121: 521–526, 2010.

KRAEMER, K. H. *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate): distribuição de saponinas e estudos iniciais em culturas de células em suspensão. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, 1997. Tese (Doutorado em Farmácia).

KRAEMER, K.H.; TAKETA, A.T.C.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemistry**, 42 (4): 1119-1122, 1996.

KHURI, A.I.; CORNELL, J.A. **Response Surfaces: Designs and Analyses**. (2nd ed). New York: Marcel Dekker, 1996.

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; WAGNER, H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. **Phytomedicine**, 2: 363–386, 1996.

LANGFORT, J.; PLOUG, T.; IHLEMANN, J. Expression of hormone-sensitive lipase and its regulation by adrenaline in skeletal muscle. **Biochemical Journal**, 340:456-459, 1999.

LORIST, M.M.; TOPS, M. Caffeine, fatigue and cognition. **Brain and Cognition**, 53: 82–94, 2003.

MARAVALHAS, N. Theophylline and theobromine constant methyl purines in caffeine-containing plants. **Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. Publicação Química**, 10: 17-25, 1965.

MARTINET, A.; NDJOKO, K.; TERREAUX, C.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; SCHULTZ, Y. NMR and LC-MS Characterization of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemical Analysis**, 12(1): 48-52, 2001.

MARTINS, F.; NOSSO, T. M.; PORTO, V. B.; CURIEL, A.; GAMBERO, A.; BASTOS D. H.M.; RIBEIRO M. L.; CARVALHO, P. O. Maté tea inhibits *in vitro*

pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, 18: 42–47, 2009.

MELO, S.S.; NUNES, N.S.I; BAUMGARTEN, C.; TRESSOLDI, C.; FACCIN, G.; ZANUZO, K.; MICHELS, M.K.; CUNHA, N.; SPECHT, S.; SILVA, M.W. Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) sobre o perfil metabólico em ratos alimentados com dietas hiperlipídicas. **Alimentos e Nutrição**, 18(4): 439 – 447, 2007.

MILGATE, J.; ROBERTS, D. C. K. The nutritional and biological significance of saponins. **Nutrition Research**, 15: 1223–1249, 1995.

MONTANHA, J. A. **Estudo químico e biológico das saponinas de *Ilex paraguariensis* A St. Hil. – Aquifoliaceae**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia da UFRGS, 1990. Dissertação de Mestrado.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. (6th ed.). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2005.

MOSIMANN, A.L.; WILHELM-FILHO D.; da SILVA E.L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol fed rabbits. **Biofactors**, 26: 59-70, 2006.

MYLONAKI, S.; KIASOS, E.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 392: 977 - 985, 2008.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, 1054, 95 – 111, 2004.

NEGRÃO MURAKAMI, A.N.; DE MELLO CASTANHO AMBONI, R.D.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMANTE, E.R.; DE MORAES ZANOTTA, L.; MARASCHIN, M.; CUNHA PETRUS, J.C.; TEÓFILO, R.F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, 44 (10): 2211-2216, 2011.

OHEM, N.; HÖLZL, J. Some investigations on *Ilex paraguariensis* flavonoids and triterpenes. **Planta Medica**, 54 (6): 576, 1988.

OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography A**, 967 (1): 147-162, 2002.

PAGANINI-STEIN, F.L.; SCHMIDT, B.; FURLONG, E.B. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high cholesterol diets. **Biological Research of Nursing**, 7: 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. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 476 (2): 178-185, 2008.

PARK, S. Y.; CHOI, H. S.; YOON, C. S.; NOHARA, T. A new lupane glycoside from the leaves of *Acanthopanax koreanum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 53 (1): 97-99, 2005.

PASINATO, R. Aspectos etnoentomológicos, socioeconômicos e ecológicos relacionados à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no município de Salto do Lontra, Paraná, Brasil. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2003. Dissertação de Mestrado.

PAVEI, C. **Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Dissertação de Mestrado em Farmácia, 2004.

PAVEI, C.; GUZATTO, P.; PETROVICK, P.R.; GOSMANN, G.; ORTEGA, G.G. Development and validation of an HPLC method for the characterization and assay of the saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (mate) fruits. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, 30 (1): 87-95, 2007.

PEIXOTO, M.P.G.; TRETER, J.; RESENDE, P.E.; Da SILVEIRA, N.P.; ORTEGA, G.G.; LAWRENCE, M.J.; DREISS, C.A., Wormlike micellar aggregates of saponins

from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate): a characterisation by cryo-TEM, rheology, light scattering and small-angle neutrons scattering. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 100: 536–546, 2010.

PEIXOTO, M.P.G.; KAISER, S.; VERZA, S.G.; RESENDE, P.E.; TRETER, J.; PAVEL, C., BORRÉ, G.L.; ORTEGA, G.G. LC-UV assay method and UPLC/Q-TOF-MS characterization of saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.Hil. (mate) unripe fruits. **Phytochemical Analysis**, 23 (4): 415–420, 2011.

PENTEADO, S.R.C.; IEDE, E.T.; LEITE, M.S.P. **Pragas da erva-mate: perspectiva de controle**. In: Congresso sul-americano da erva-mate, reunião técnica da erva-mate, Encantado, 2000. Anais. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2000.

PEREIRA, D.F., KAPPEL, V.D., CAZAROLLI, L.H., BOLIGON, A.A., ATHAYDE, M.L., GUESSER, S.M., DA SILVA, E.L., SILVA, F.R.M.B. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine** 19 (10), pp. 868-877, 2012.

RATES, S.M. Metilxantinas. In C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz, & P. R. Petrovick (Eds.), **Farmacognosia e da Planta ao Medicamento**, 885 - 901. Porto Alegre, Brazil: Editora da UFRG/ Editora da UFSC, 2010.

RESENDE, P.E.; VERZA, S.G.; KAISER, S.; GOMES, L.F.; KUCHARSKI, L.C.; ORTEGA, G.G. The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 144 (3): 735-740, 2012.

RICCO, R.A.; WAGNER, M.L.; GURNI, A.A. Estudo comparativo de flavonóides em seis espécies austrosudamericanas del gênero *Ilex*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, 10 (1): 29-35, 1991.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MONTANHA, J.A.; HEIZMANN, B.M.; ATHAYDE, M.L.; TAKETA, A.T.C.; PIRES, V.S.; GUILLAUME, D. Saponins from

maté (*Ilex paraguariensis*) and other South American *Ilex* species: ten years research on *Ilex* saponins. **Ciência e Cultura**, 49 (5/6): 359-363, 1997.

SILVA, R.D'.A.; SCOPEL, A.L.; GOMES, L.F.; GALLON, C.W.; KAISER, S.; PAVEI, C.; ORTEGA, G.G.; KUCHARSKI, L.C.; JAHN, M.P., The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal fat and glucose levels in male Wistar rats. **Fitoterapia** 82: 818–826, 2011.

SOETAN, K. O.; OYEKUNLE, M. A.; AIYELAAGBE, O. O.; FAFUNSO, M. A. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor* L. Moench. **African Journal of Biotechnology**, 5 (23): 2405-2407, 2006.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz, & P. R. Petrovick (Eds.), **Farmacognosia e da Planta ao Medicamento**, 289 - 326. Porto Alegre, Brazil: Editora da UFRG/ Editora da UFSC, 2007.

TAKETA, A.T.C.; BREITMAIER, E.; SCHENKEL, E.P. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (mate). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 15 (2): 205-21, 2004.

TIERRA, M. **Why standardized herbal extracts? An Herbalist's Perspective**. Disponível em: <<http://www.planetherbs.com/articles/standardized>>. Acesso em 25 de novembro de 2011.

VERZA, S.G., DE RESENDE, P.E., KAISER, S., QUIRICI, L., TEIXEIRA, H.F., GOSMANN, G., FERREIRA, F., ORTEGA, G.G. Micellar aggregates of saponins from *Chenopodium quinoa*: Characterization by dynamic light scattering and transmission electron microscopy. **Pharmazie**, 67 (4): 288-292, 2012.

ANEXOS

ANEXO 1. Aprovação do comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 20811

Título: Influencia de frações bioativas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate) sobre o metabolismo de lipídios

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

GEORGE GONZALEZ ORTEGA - coordenador desde 01/03/2011
LUIZ CARLOS RIOS KUCHARSKI - pesquisador desde 01/03/2011
Samuel Kaiser - pesquisador desde 01/03/2011
SIMONE GASPARIN VERZA - pesquisador desde 01/03/2011
LUANA FERREIRA GOMES - pesquisador desde 01/03/2011
Pedro Ernesto de Resende - pesquisador desde 01/03/2011
VANESSA PITTOL - pesquisador desde 01/03/2011
RENATA COUGO MORAES - pesquisador desde 01/03/2011

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 26/03/2012 - Sala de Reuniões do 2º andar da Reitoria, Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 36 ratos Wistar machos adultos (2 meses de idade), de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 30 de Março de 2012

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética

ANEXO 2. Cromatogramas obtidos por CLAE dos principais compostos presentes no extrato das folhas de mate (YME) e frações enriquecidas de metilxantinas e polifenóis (MXPL) e saponinas (SFL).

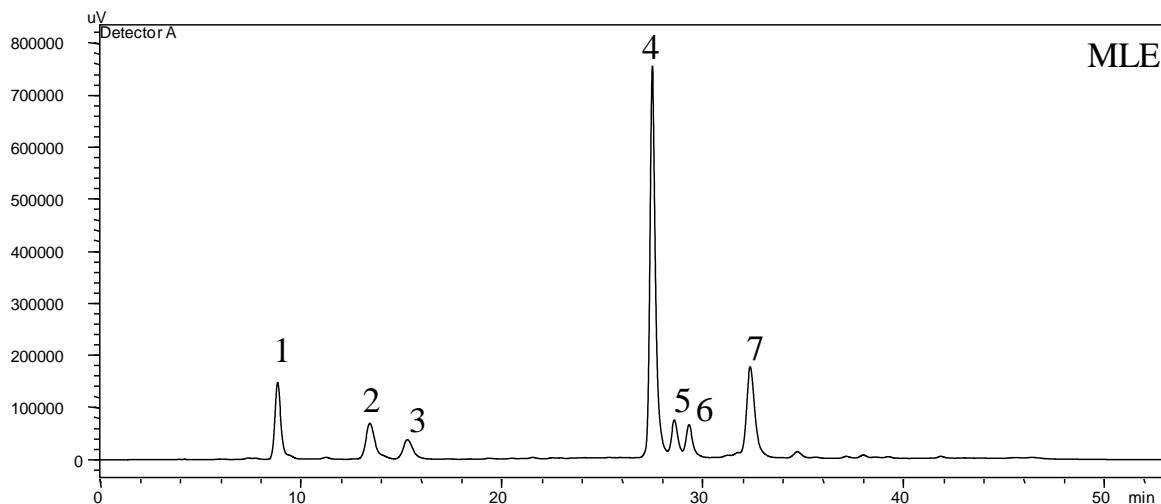


Fig. 6. Perfil por CLAE dos polifenóis presentes no extrato das folhas de mate (YME) em 340 nm. Os sinais foram codificados como: (1) ácido neoclorogênico; (2) ácido clorogênico; (3) ácido criptoclorogênico; (4) Pico 4; (5) Pico 5; (6) rutina; (7) Pico 6.

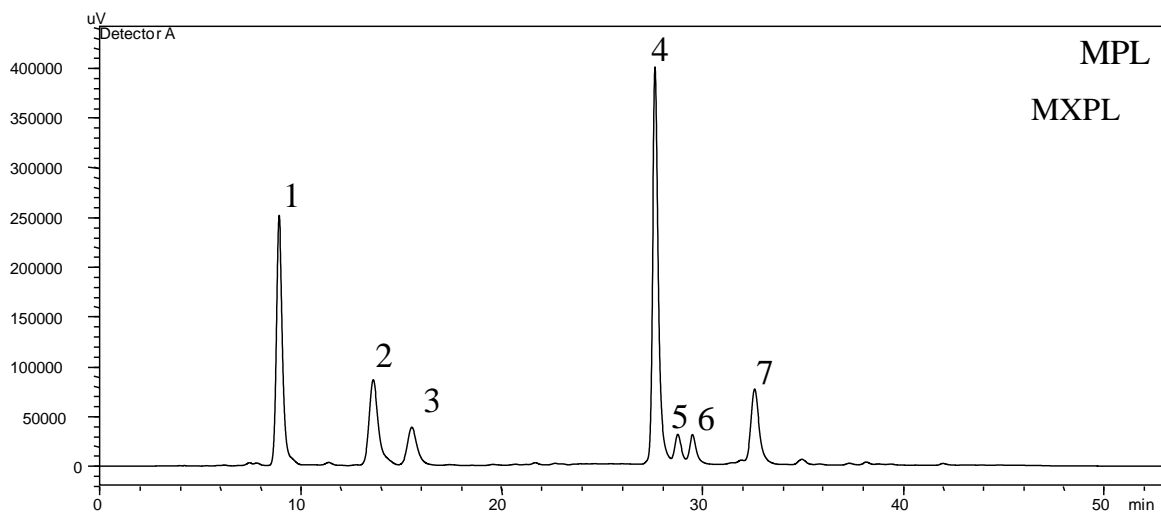


Fig. 7. Perfil por CLAE dos polifenóis presentes na fração enriquecida em polifenóis e metilxantinas (MXPL) de mate em 340 nm. Os picos foram codificados como: (1) ácido neoclorogênico; (2) ácido clorogênico; (3) ácido criptoclorogênico; (4) Pico 4; (5) Pico 5; (6) rutina; (7) Pico 6.

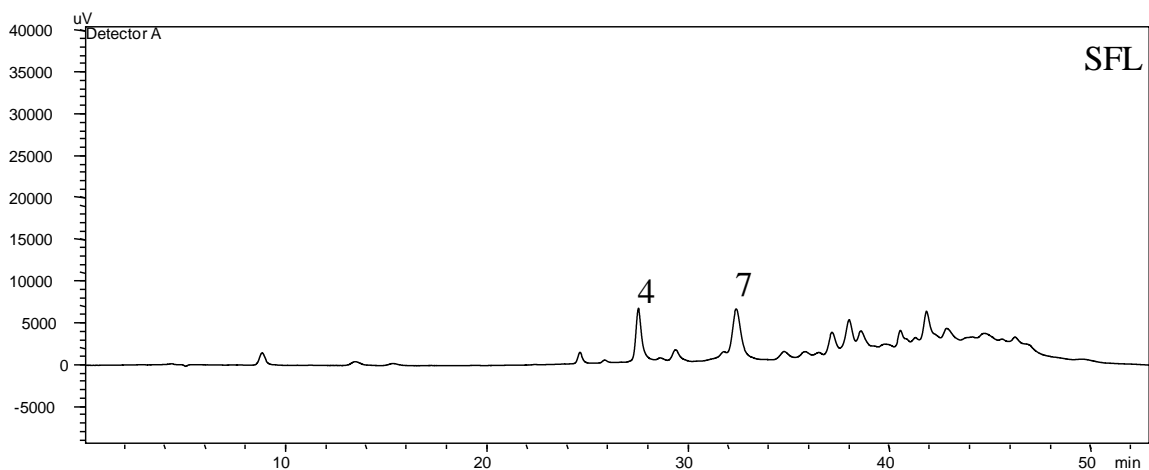


Fig. 8. Perfil por CLAE dos polifenóis presentes na fração enriquecida em saponinas das folhas do mate (SFL) em 340 nm. Os picos foram codificados como: (4) Pico 4; (7) Pico 6.

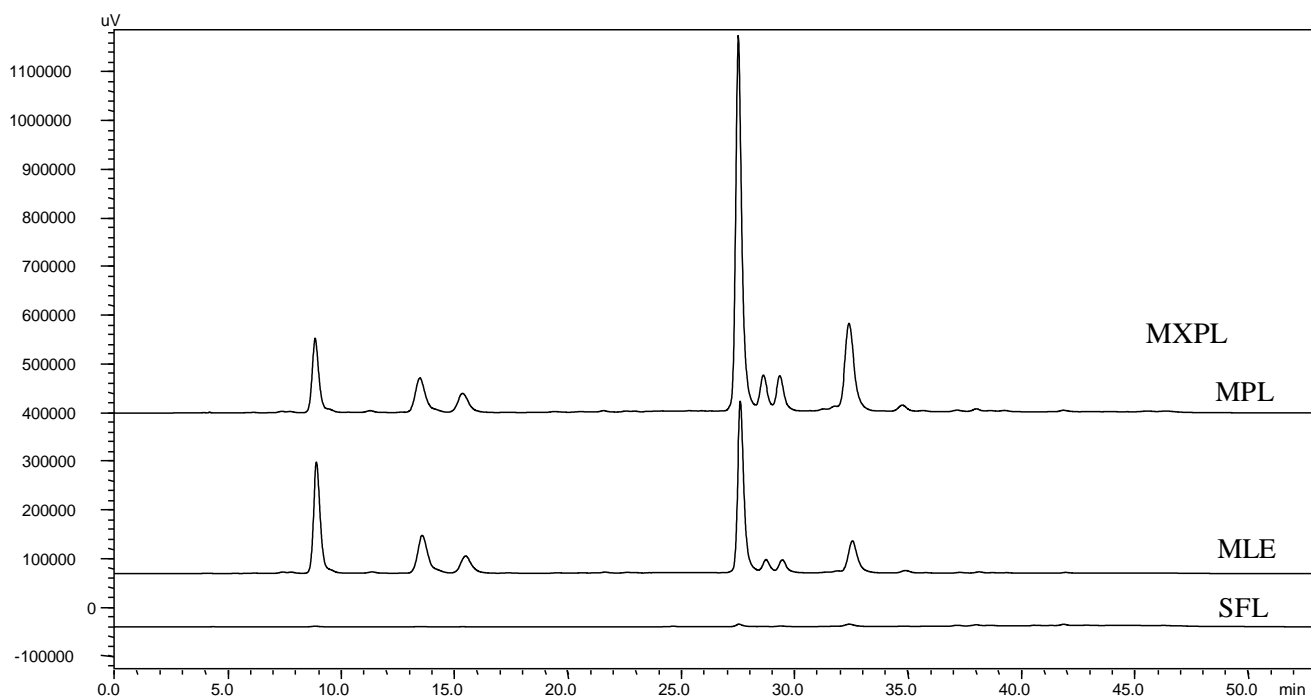


Fig. 9. Perfil comparativo por CLAE de polifenóis presentes em YME, MXPL e SFL em 340 nm.

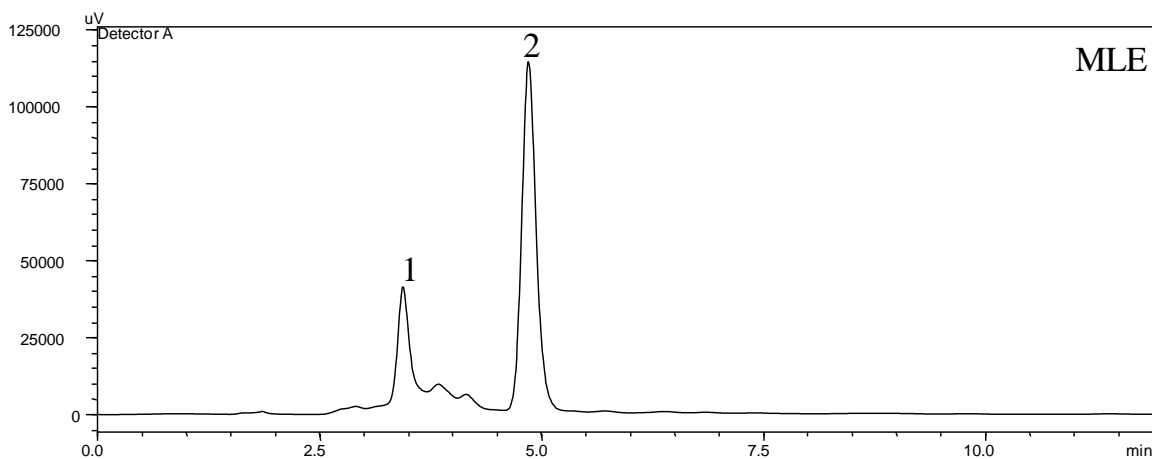


Fig. 10. Perfil por CLAE das metilxantinas presentes no extrato das folhas do mate (YME) em 280 nm. Os picos foram codificados como: (1) teobromina; (2) cafeína.

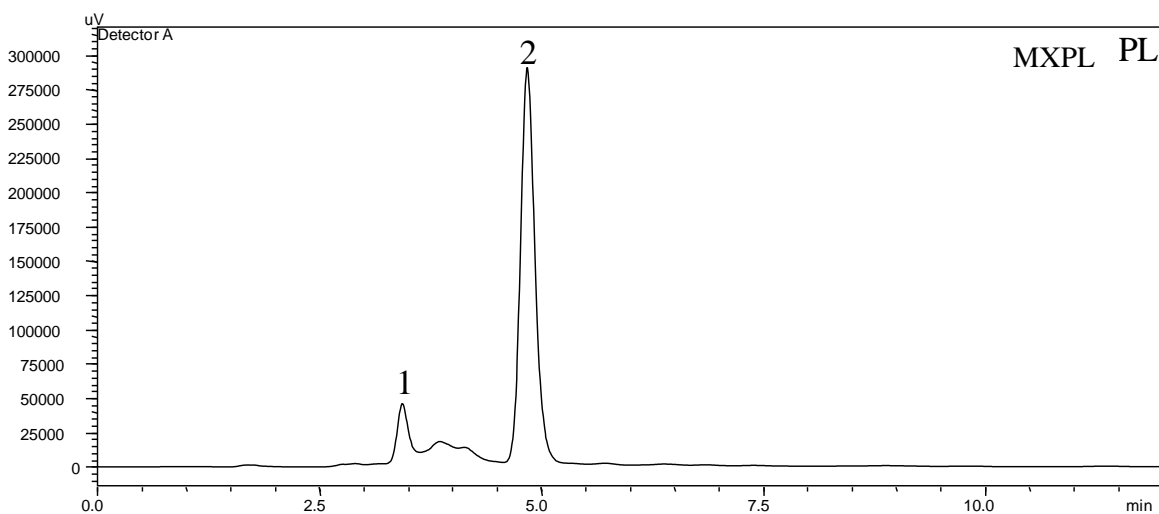


Fig. 11. Perfil por CLAE das metilxantinas da fração enriquecida em polifenóis e metilxantinas (MXPL) das folhas de mate em 280 nm. Os picos foram codificados como: (1) teobromina; (2) cafeína.

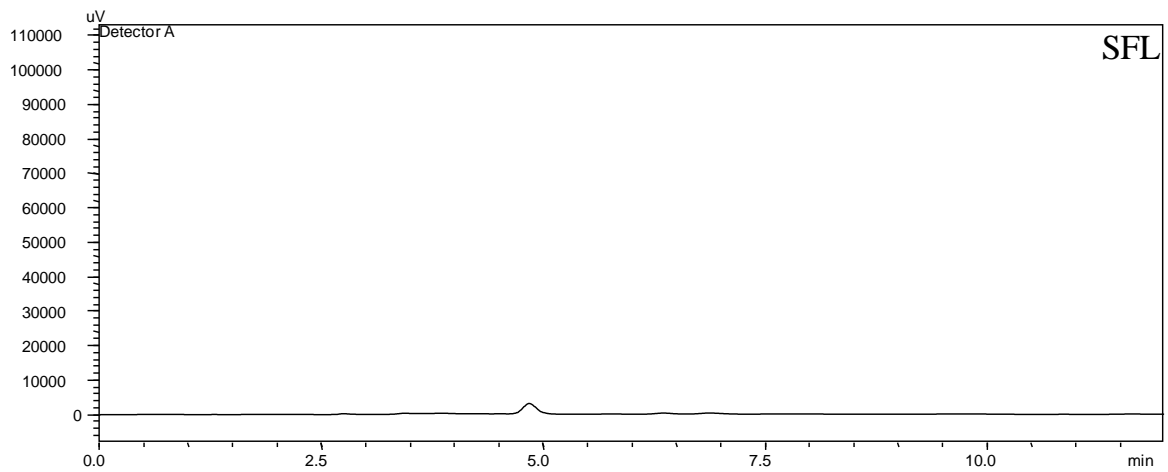


Fig. 12. Perfil por CLAE das metilxantinas da fração enriquecidas em saponinas das folhas de mate em 280 nm.

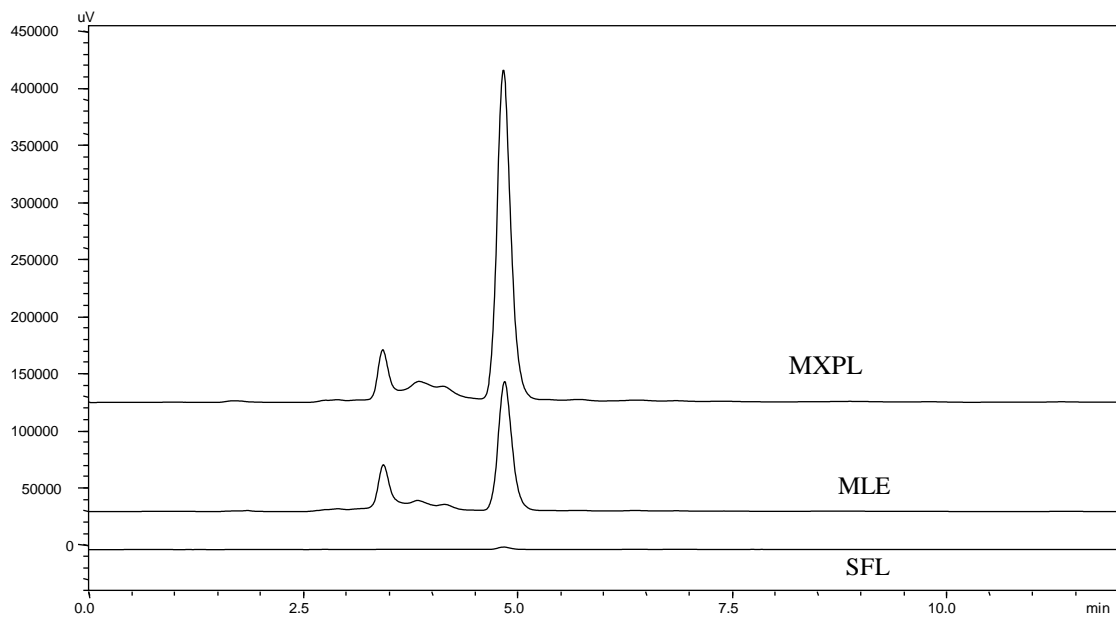


Fig.13. Perfil comparativo por CLAE de metilxantinas presentes em YME, MXPL, SFL em 340 nm.

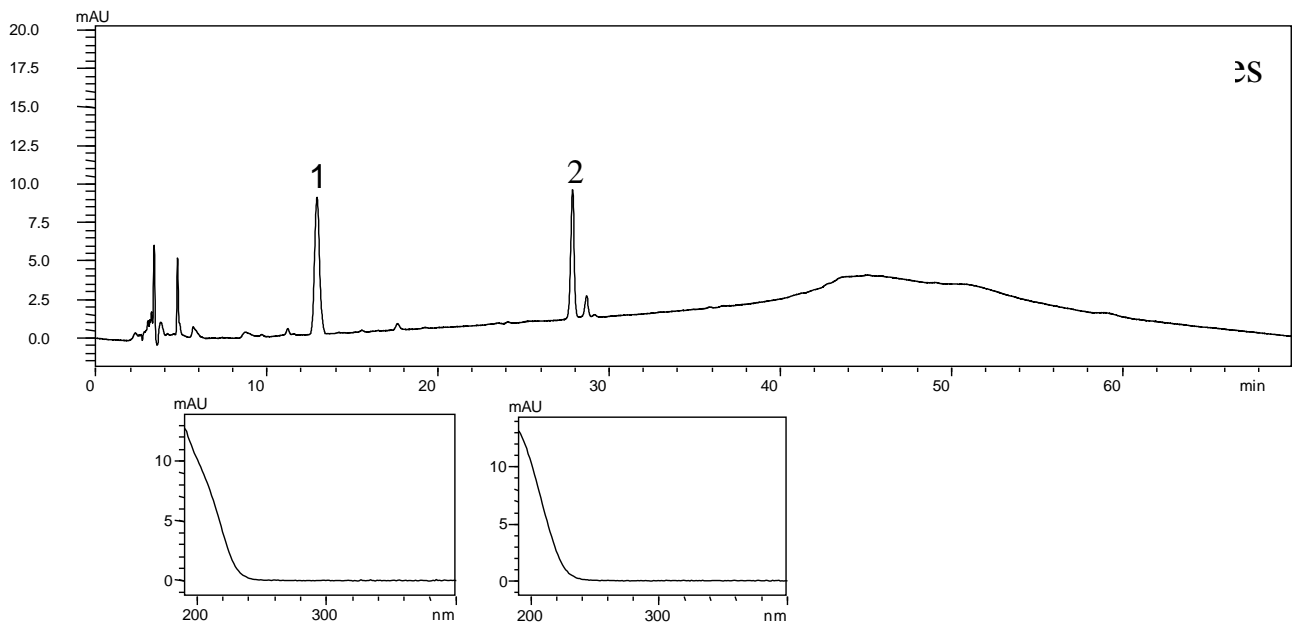


Fig. 14. Perfil por CLAE das saponinas de referência ilexosídeo II (1) e chikusetsusaponina IVa (2).

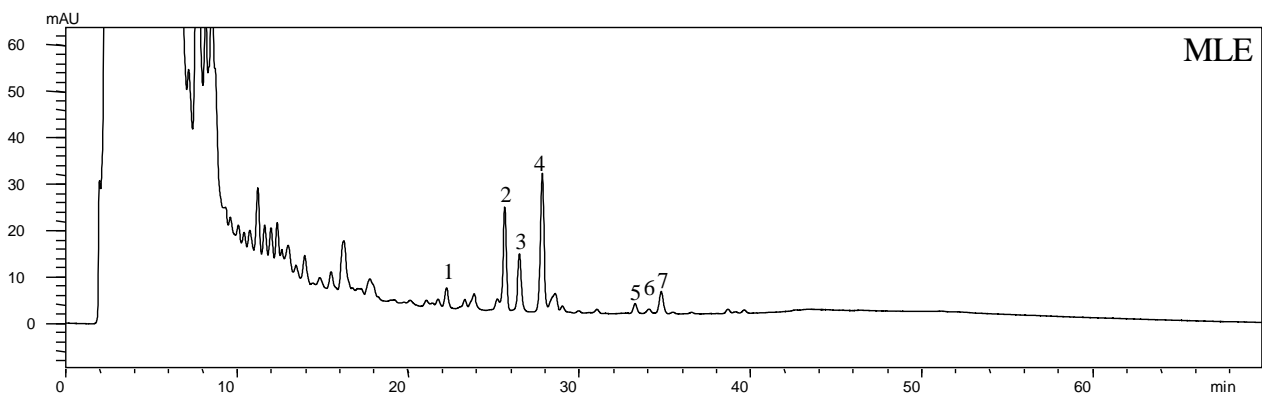


Fig. 15. Perfil por CLAE das saponinas do extrato das folhas de mate (YME) em 205 nm. Os picos foram codificados como: (1) Pico 1; (2) Pico 2; (3) Pico 3; (4) chikusetsusaponina IVa; (5) Pico 5; (6) Pico 6; (7) Pico 7.

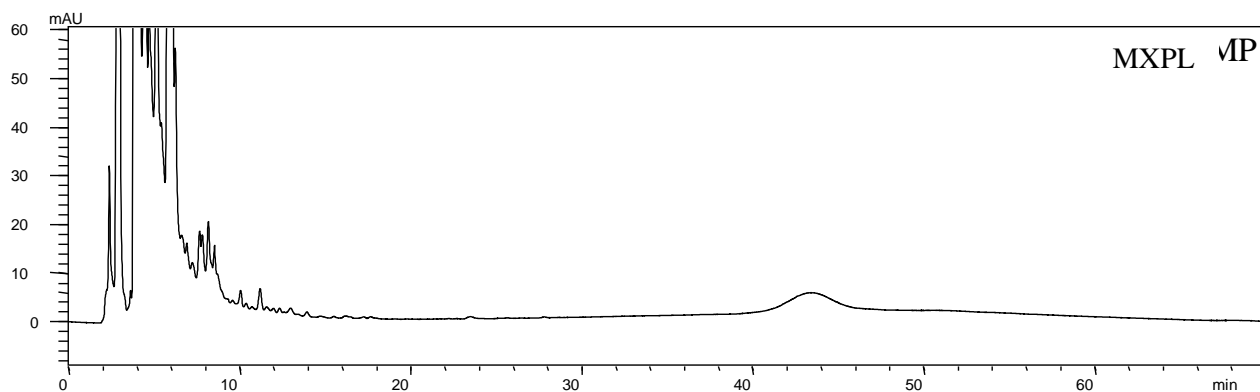


Fig. 16. Perfil por CLAE das saponinas da fração enriquecida em polifenóis e metilxantinas das folhas de mate (MXPL) em 205 nm.

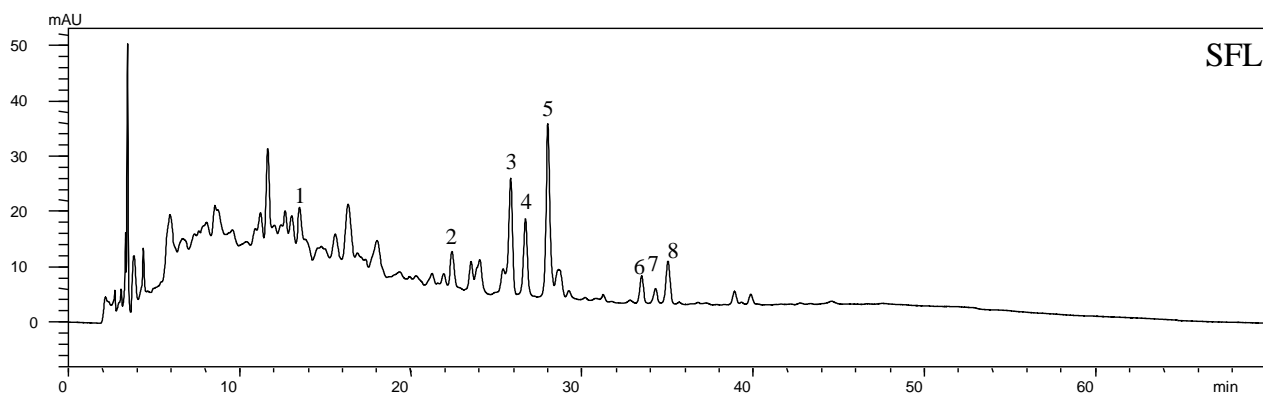


Fig. 17. Perfil por CLAE das saponinas da fração enriquecida em saponinas das folhas de mate (SFL) em 205 nm. Os picos foram codificados como: (1) ilexosídeo II; (2) Pico 1; (3) Pico 2; (4) Pico 3; (5) chikusetsusaponina; (6) Pico 5; (7) Pico 6; (8) Pico 7.

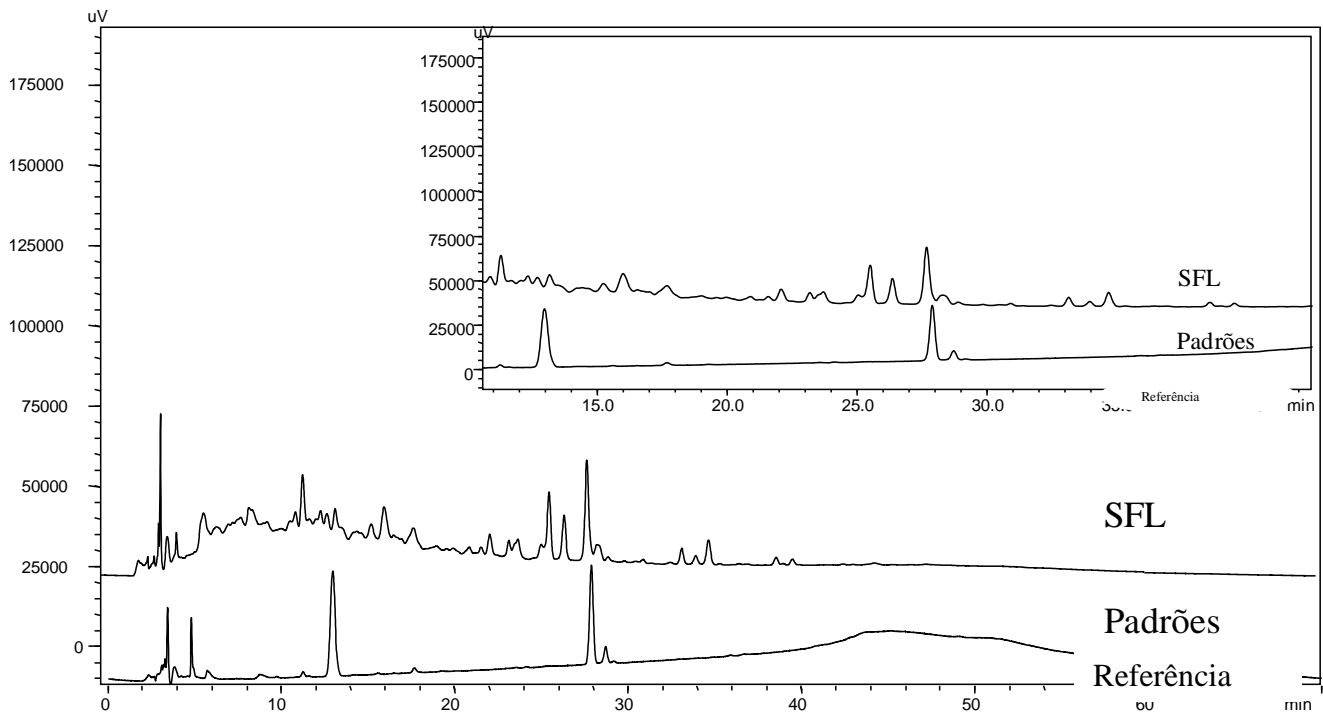


Fig. 18. Perfil comparativo por CLAE das saponinas das folhas do mate (SFL) em 205 nm.