

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
TESE DE DOUTORADO

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS E QUIMIOMÉTRICAS PARA
ELUCIDAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ERVA-MATE**

ALLAN DOS SANTOS POLIDORO

Prof.^a Dr^a Rosângela Assis Jacques
Orientadora

Porto Alegre, agosto de 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALLAN DOS SANTOS POLIDORO

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS E QUIMIOMÉTRICAS PARA
ELUCIDAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ERVA-MATE**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Química

Profa. Dra. Rosângela Assis Jacques
Orientadora


Porto Alegre, agosto de 2022

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre 08/2016 e 08/2022, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Rosângela Assis Jacques. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Elina Bastos Caramão



Profa. Dra. Mariana Roberto Gama

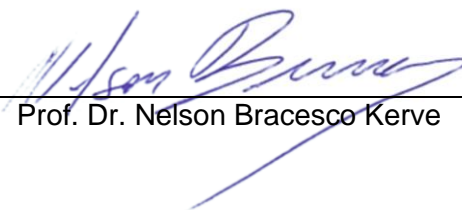
Sato



Documento assinado digitalmente
ROBERTA DA SILVA BUSSAMARA RODRIGUE
Data: 02/09/2022 08:49:57-0300
Verifique em <https://verificador.itb.br>

Profa. Dra. Roberta Bussamara

Rodrigues



Prof. Dr. Nelson Bracesco Kerve



Profa. Dra. Rosângela Assis Jacques



Allan dos Santos Polidoro

*“Nobody exists on purpose.
Nobody belongs anywhere.
Everybody's gonna die.
Come watch TV.”
Morty Smith, Rick and Morty*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Instituto de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química, pelo ensino de excelência e infraestrutura proporcionada, que possibilitaram o desenvolvimento dessa tese.

À Profa. Dra. Rosângela Jacques, pela orientação, apoio e amizade que transcendem o âmbito acadêmico.

À Profa. Dra. Elina Caramão, cujo brilhantismo e conhecimento me inspiram desde a aurora de meus primeiros passos na ciência.

Às Profas. Dra. Cláudia Zini e Dra. Juliane Welke, pelo exemplo que suas trajetórias acadêmicas representam.

Aos colegas do LAAO, pelo apoio profissional e pessoal. Em especial, agradeço à Claissa Nied Peixoto, cuja admiração e curiosidade por cada detalhe do universo embalam tantas conversas. Agradeço também à Vitória Prestes, que me emprestou seus ombros e ouvidos nos momentos em que as cores do mundo feneciam aos meus olhos. Agradeço ainda à Camila Hoffmann, Dra. Francieli Mayer, Karolina Hernandez e Arieli dos Santos por colorirem meus dias com suas personalidades cativantes. Parafraseando Carl Sagan, “diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com vocês”.

Agradeço à Julia Cristina Oliveira Pazinato, pela amizade e por compartilhar comigo os momentos de ansiedade e tristeza que o desenvolvimento de uma tese de doutorado provoca.

Agradeço à Dra. Anaí Loreiro dos Santos, por sua disposição em compartilhar seus conhecimentos acerca dos mais diversos temas. Sua inteligência e sagacidade irão nortear-me por toda vida.

Agradeço à Dra. Patrícia Inglez, pela empatia, acolhimento, escuta, e por me ajudar a trilhar os caminhos tortuosos da densa floresta da existência.

Aos amigos Dra. Eliane Lazzari e Dr. Tiago Schena, que me honram com uma amizade que o tempo e as distâncias continentais não conseguem abalar.

À Aline Nunes, pelo amor, carinho e compreensão. Obrigado pelos sorrisos e lágrimas compartilhadas em todos esses anos. *I love you 3000!*

Aos meus pais: Maria Luiza dos Santos e Romildo Polidoro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa.

À CAPES, pela bolsa de doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIV
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XIX
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. OBJETIVOS	23
1.1.1. Objetivo Geral	23
1.1.2. Objetivos Específicos	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
2.1. ERVA-MATE	26
2.1.1. Histórico	26
2.1.2. Caracterização da Espécie	27
2.1.2.1. Taxonomia	27
2.1.2.2. Descrição da Espécie	27
2.1.2.3. Fenologia.....	30
2.1.2.4. Área de Ocorrência Natural.....	30
2.1.3. Produção Agrícola	33
2.1.4. Processamento	33
2.1.4.1. Ciclo do Cancheamento.....	34
2.1.4.1.1. Colheita	34
2.1.4.1.2. Sapeco.....	35
2.1.4.1.3. Secagem.....	36
2.1.4.1.4. Cancheamento	37
2.1.4.1.5. Estacionamento	37
2.1.4.2. Ciclo do Beneficiamento.....	39
2.1.5. Utilização	40
2.1.6. Aspectos Econômicos.....	43
2.1.6.1. Produtividade.....	43
2.1.6.2. Mercado Internacional	45
2.1.7. Metabólitos Secundários em Erva-Mate	46
2.1.7.1. Terpenos	48
2.1.7.2. Fenilpropanoides	53

2.1.7.3. Compostos Fenólicos.....	55
2.1.7.3.1. Ácidos Fenólicos	55
2.1.7.3.2. Flavonoides.....	60
2.1.8. Metilxantinas	64
2.1.9. Atividade Antioxidante da erva-mate.....	65
2.2. EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	68
2.2.1. Extração Assistida por Ultrassom.....	68
2.2.2. Extração por Hidrodestilação	69
2.3. ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	70
2.3.1. Métodos Espectrofotométricos	71
2.3.1.1. Espectrofotometria de absorção no Ultravioleta e Visível	71
2.3.1.1.1. Determinação do Conteúdo de Flavonoides Totais (TFC).....	71
2.3.1.1.2. Determinação do Conteúdo Fenólico Total (TPC)	72
2.3.1.1.3. Método do DPPH para Determinação do Potencial Antioxidante....	73
2.3.1.2. Espectrometria de Fluorescência Molecular	74
2.3.2. Métodos Cromatográficos	78
2.3.2.1. Cromatografia Líquida.....	78
2.3.2.1.1. Cromatografia líquida de ultra alta pressão acoplada à espectrometria de massas por quadrupolo - tempo de voo (UHPLC-QTOF- MS)	80
2.3.2.2. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC).....	80
2.4. QUIMIOMETRIA	84
2.4.1. Delineamento de Experimentos	85
2.4.1.1. Delineamento Composto Central.....	86
2.4.1.2. Metodologia de Superfície de Resposta	87
2.4.1.3. Ajuste por Mínimos Quadrados	88
2.4.1.4 Avaliação do modelo matemático ajustado	89
2.4.2. Reconhecimento de Padrões	93
2.4.2.1. Análise de Componentes Principais.....	93
2.4.3. Métodos Quimiométricos de Segunda Ordem	95
2.4.3.1. Métodos Quimiométricos em Função da Ordem dos Dados	95
2.4.3.2. Modelos de Tucker	96
2.4.3.3. Análise de fatores paralelos (PARAFAC)	97
2.4.3.3.1. Mínimos Quadrados Alternados.....	101

3. MATERIAIS E MÉTODOS	103
3.1. ETAPAS EXPERIMENTAIS	103
3.1. REAGENTES, SOLVENTES E PADRÕES	104
3.2. PREPARO DAS AMOSTRAS	105
3.3. METABÓLITOS NÃO-VOLÁTEIS	106
3.3.1. Extração Assistida por Ultrassom	106
3.3.1.1. Otimização dos Parâmetros da UAE	106
3.3.2. Avaliação do Rendimento Mássico	108
3.3.3. Ensaio Espectrofotométrico	109
3.3.3.1. Conteúdo Fenólico Total (TPC)	109
3.3.3.2. Conteúdo de Flavonoides Totais (TFC)	110
3.3.3.3. Atividade Antioxidante: Método do DPPH	111
3.3.4. Análises por Espectrometria de Fluorescência Molecular	112
3.3.5. Análises Cromatográficas por HPLC-DAD	112
3.3.6. Análises Cromatográficas por UHPLC-QTOF-MS	113
3.3.7. Análises Quimiométricas	114
3.4. METABÓLITOS VOLÁTEIS	114
3.4.1. Hidrodestilação	114
3.4.2. Análises Cromatográficas por GCxGC/TOFMS	114
3.4.2.1. Tratamento de Dados	115
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
4.1. METABÓLITOS NÃO-VOLÁTEIS	118
4.1.1. Otimização dos Parâmetros da UAE	118
4.1.1.1. Validação dos Modelos	122
4.1.1.2. Análise das Superfícies de Resposta	126
4.1.1.3. Maximização das Respostas	130
4.1.2. Espectrometria de Fluorescência Molecular e PARAFAC	132
4.1.2.1. Análise Exploratória por PARAFAC	136
4.1.3. Caracterização Química por UHPLC-QTOF-MS	138
4.1.4. Quantificação das metilxantinas e dos compostos fenólicos	142
4.1.4.1. Análise por componentes principais	147
4.2. METABÓLITOS VOLÁTEIS	150
5. CONCLUSÃO	168
6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	171

6.1. ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS CIENTÍFICOS.....	171
6.2. PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS	173
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (a) <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil., fotografada em: RS, Protásio Alves, Linha Visconde de Mauá, zona rural de Protásio Alves; ⁴⁸ (b) Erva-mate: 1- Ramo masculino; 2- Ramo feminino; 3- Ramo com frutos; 4- Flor masculina; 5- Seção longitudinal de flor masculina; 6- Flor feminina; 7- Seção longitudinal de flor feminina; 8- Fruto; 9- Seção longitudinal do fruto; 10- Seção transversal do fruto. Adaptado de Köhler, H. A. (1887). ⁴⁹	28
Figura 2: Área de ocorrência natural da erva-mate na América do Sul. ⁶¹	31
Figura 3: Tipos climáticos de Köeppen definidos dentro da área de ocorrência natural da erva-mate. Adaptado de Oliveira e Rotta (1985). ⁵⁹	32
Figura 4: Aparelho secador rotativo de erva-mate. ⁸⁰	37
Figura 5: Diferença entre a erva-mate estacionada (direita) e não-estacionada (esquerda). ⁸¹	38
Figura 6: Armazenamento de erva-mate. ⁸⁰	39
Figura 7: Comércio internacional de erva-mate em 2020. Principais países (a) exportadores e (b) importadores de erva-mate no mundo. Adaptado de OEC (2022). ¹⁰⁰	45
Figura 8: Resumo da biossíntese de alguns metabólitos secundários da erva-mate.	48
Figura 9: Biossíntese dos terpenos e esteroides. Adaptado de Simões (2007).	49
Figura 10: Rotas biossintéticas de alguns monoterpênicos cíclicos e acíclicos. ¹²³	51
Figura 11: Agliconas das saponinas de <i>Ilex paraguariensis</i> , derivadas do (a) ácido ursólico e (b) oleanólico.....	52
Figura 12: Metabólitos secundários oriundos do metabolismo da glicose via ácido chiquímico. ¹⁰²	54
Figura 13: Ácido cinâmico com indicação das posições de esterificação e principais derivados cinâmicos para produção de CGAs: ácido cafeico (C), ácido ferúlico (F) e ácido p-cumárico (pCo).	57
Figura 14: Ácidos cafeoilquínicos (CQAs).	57
Figura 15: Ácidos feruloilquínicos (FQAs).	58

Figura 16: Ácidos p-cumaroilquínicos (pCoQAs).....	58
Figura 17: Ácidos dicafeoilquínicos (di-CQAs).	59
Figura 18: Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração. ¹⁰²	61
Figura 19: Biossíntese do núcleo fundamental dos flavonoides. ¹⁰²	62
Figura 20: Estruturas genéricas das principais classes de flavonoides. ²⁰⁵	63
Figura 21: Metilxantinas da erva-mate: cafeína, teobromina e teofilina.	64
Figura 22: Reações do processo de autoxidação. ²¹⁴	66
Figura 23: Princípio da cavitação ultrassônica.	69
Figura 24: Esquema representativo de um aparato de Clevenger.	70
Figura 25: Reação de complexação de flavonoide com Al ⁺³	72
Figura 26: Reação entre o DPPH• e um composto antioxidante.....	74
Figura 27: Diagrama representativo do princípio da espectroscopia de fluorescência. ²⁴⁴	74
Figura 28: Diagrama representativo de um espectrofluorômetro. ²⁴⁵	76
Figura 29: Espectro de fluorescência de uma amostra de água, onde os espalhamentos de luz estão indicados. ²⁴⁶	77
Figura 30: Representação esquemática do sistema de cromatografia gasosa bidimensional abrangente. ²⁵⁹	81
Figura 31: Representação esquemática do registro dos dados obtidos por GCxGC. Adaptado de Dallüge et al., 2003. ²⁶⁶	83
Figura 32: (a) Análise univariada; (b) matriz com todas as combinações; e (c) delineamento composto central.....	85
Figura 33: (a) CCD para dois fatores (k=2 e $\alpha = 2$); (b) CCD para três fatores (k=3 e $\alpha = 48$).	87
Figura 34: Representação da decomposição da matriz de dados em PCA. ²⁷⁸	94
Figura 35: Representação do desdobramento de um arranjo de dados tridimensional em uma matriz. ²⁸⁴	96
Figura 36: Representação gráfica do modelo Tucker3. ²⁸⁴	97
Figura 37: Representação gráfica do modelo PARAFAC: decomposição de um arranjo de dados tridimensional em F tríades de vetores peso. ²⁸⁴	98
Figura 38: Fluxograma das etapas experimentais realizadas no presente estudo.	104

Figura 39: Curva de calibração com ácido gálico para os ensaios de quantificação de fenólicos totais.....	110
Figura 40: Curva de calibração com rutina para os ensaios de quantificação de flavonoides totais.....	111
Figura 41: Gráficos de Valores Preditos x Observados para os modelos referentes ao (a) rendimento mássico, (b) TPC, (c) TFC, (d) %I, e (e) TAC. .	125
Figura 42: Gráficos de Valores Normais Esperados x Resíduos para os modelos referentes ao (a) rendimento mássico, (b) TPC, (c) TFC, (d) %I, e (e) TAC. .	126
Figura 43: Superfície de resposta do modelo quadrático ajustado para o rendimento mássico.	127
Figura 44: Curvas de (a) rendimento mássico, (b) TPC, (c) TFC, (d) %I, e (e) TAC em relação ao %EtOH na fase extratora.....	128
Figura 45: Superfícies de resposta do modelo quadrático ajustado para o TPC (a) e TFC (b), bem como as de percentual de inibição de DPPH (c) e área total do cromatograma de absorvância total (d), em relação ao tempo e temperatura de extração.....	129
Figura 46: Demonstração da remoção do espalhamento de Rayleigh mediante a visualização dos diagramas de contorno das matrizes referentes a análise de fluorescência da amostra de erva-mate para tererê (a) antes e (b) após a remoção.	133
Figura 47: Resultado do teste CORCONDIA: pontos vermelhos indicam os elementos da superdiagonal, que devem ser próximos do valor unitário, e os pontos em verde são os demais elementos do tensor e devem ter valores próximos de zero. A linha amarela indica a trilinearidade perfeita.	134
Figura 48: Perfis recuperados por PARAFAC em ambos os modos, (a) emissão e (b) excitação.....	135
Figura 49: Gráfico de dispersão tridimensional dos escores obtidos para os três fatores PARAFAC.	136
Figura 50: Gráficos de dispersão das projeções bidimensionais dos escores dos fatores PARAFAC. (a) fator 1 x fator 2; (b) fator 1 x fator 3; (c) fator 2 x fator 3.	137
Figura 51: Cromatograma do pico base (BPC, do inglês base peak chromatogram), em preto, obtido na análise por UHPLC-QTOF-MS (modo	

negativo), e cromatogramas dos compostos detectados por deconvolução espectral e identificados. 138

Figura 52: Identificação positiva de 5-CQA. (a) Cromatogramas extraídos dos íons 353 e 191, sobreposto ao cromatograma da função bbCID. (b) Espectro de massas obtido para o pico em 15,3 min. (c) e (d) Comparação dos perfis isotópicos mensurados com os teóricos para as espécies $(C_{16}H_{17}O_9)^-$ e $(C_7H_{11}O_6)^-$, respectivamente. 139

Figura 53: Identificação tentativa de 3-CQA. (a) Espectro de massas dos fragmentos de 3-CQA obtido na literatura. (b) Espectro de massas dos fragmentos do composto presente em 11,6 min. 140

Figura 54: Curvas de calibração com (a) teobromina, (b) cafeína, (c) 5-CQA e (d) rutina para a quantificação por HPLC-DAD. 143

Figura 55: (a) Gráfico de escores e (b) gráfico biplot de pesos e escores para a PC1 e PC2. 148

Figura 56: Pesos de cada variável nas (a) PC1 e (b) PC2. 149

Figura 57: Diagramas de cores referentes aos cromatogramas de corrente iônica total das análises por GCxGC/TOFMS de óleos essenciais de (a) folhas frescas e (b) processadas de erva-mate. 151

Figura 58: Comparação entre os LTPRI obtidos experimentalmente por GCxGC/TOFMS e os LTPRI de referência de 1D-GC em coluna apolar. 160

Figura 59: Distribuição por percentual de área dos 16 compostos majoritários (área percentual superior a 1% na amostra) identificados na fração volátil das folhas frescas de erva-mate por GCxGC/TOFMS. 161

Figura 60: Distribuição por percentual de área dos 11 compostos majoritários (área percentual superior a 1% na amostra) identificados na fração volátil das folhas processadas de erva-mate por GCxGC/TOFMS. 162

Figura 61: Distribuição dos compostos identificados nas amostras de fração volátil de folhas de erva-mate frescas e processadas, analisadas por GCxGC/TOFMS, nas suas respectivas classes químicas. 162

Figura 62: Distribuição percentual dos compostos tentativamente identificados na fração volátil das folhas frescas e processadas de erva-mate analisadas por GCxGC/TOFMS. 164

Figura 63: (A) Expansão de uma região do cromatograma. O algoritmo de deconvolução é aplicado, permitindo a detecção de dois pares de picos co-eluídos: (B) p-ment-1-en-9-al / (C) trans-carveol e (D) β -ciclocitral / (E) cis-carveol.... 165

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Derivados tradicionais e potenciais de folhas de erva-mate. ⁸⁴	41
Tabela II: Produção de erva-mate verde cultivada nos países produtores.	44
Tabela III: Subclasses de ácidos fenólicos. ¹⁴⁰	56
Tabela IV: Análise de variância para regressão múltipla. ²⁷⁴	92
Tabela V: Identificação das amostras de erva-mate analisadas, país de origem e descrição fornecida pelo fabricante.	105
Tabela VI: Ensaios para o delineamento composto central na ordem padrão.	108
Tabela VII: Variáveis e níveis decodificados do delineamento composto central.	108
Tabela VIII: Variáveis e níveis utilizados (valores codificados e decodificados) para o CCD e as respostas obtidas para a UAE da erva-mate, na ordem padrão.	119
Tabela IX: Coeficientes significativos dos modelos ajustados.	121
Tabela X: Análise de variância para o modelo quadrático.	123
Tabela XI: Condições otimizadas para UAE de folhas de erva-mate.	130
Tabela XII: Valores preditos das variáveis dependentes estudadas na condição de trabalho escolhida e valores experimentais obtidos nestas condições.	131
Tabela XIII: Compostos identificados nas amostras de erva-mate por UHPLC-QTOF-MS.	141
Tabela XIV: Resultados dos ensaios de precisão, limite de detecção e limite de quantificação	143
Tabela XV: Concentração dos compostos identificados nos extratos de erva-mate obtidos por UAE, em base seca (mg g ⁻¹ folha seca).	144
Tabela XVI: Resultados da análise por GCxGC/TOFMS para a fração volátil de folhas de erva-mate frescas e processadas.	152

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ¹D**: Primeira dimensão cromatográfica.
- ²D**: Segunda dimensão cromatográfica.
- 1D-GC**: Cromatografia gasosa monodimensional (do inglês *One Dimensional Gas Chromatography*).
- ¹t_R**: Tempo de retenção na primeira dimensão cromatográfica.
- ²t_R**: Tempo de retenção na segunda dimensão cromatográfica.
- 3-CQA**: ácido 3-cafeoilquínico.
- 4-CQA**: ácido 4-cafeoilquínico.
- 5-CQA**: ácido 5-cafeoilquínico.
- 3-FQA**: ácido 3-feruloilquínico.
- 4-FQA**: ácido 4-feruloilquínico.
- 5-FQA**: ácido 5-feruloilquínico.
- 3,4-di-CQA**: ácido 3,4-dicafeoilquínico.
- 3,5-di-CQA**: ácido 3,5-dicafeoilquínico.
- 4,5-di-CQA**: ácido 4,5-dicafeoilquínico.
- 3C,4F-QA**: ácido 3-cafeoil-4-feruloilquinico.
- 4C,5F-QA**: ácido 4-cafeoil-5-feruloilquínico.
- Acetil-CoA**: acetilcoenzima A.
- ALS**: mínimos quadrados alternados (do inglês *Alternating Least Squares*).
- ANOVA**: Análise de variância (do inglês *Analysis of Variance*).
- bbCID**: *broad band collision induced dissociation*.
- BPC**: Cromatograma do pico base (do inglês *base peak chromatogram*).
- CCD**: Delineamento composto central (do inglês *Central Composite Design*).
- CORCONDIA**: teste de consistência trilinear (do inglês *Core Consistency Diagnostic*).
- CQA**: ácido cafeoilquínico (do inglês *caffeoylquinic acid*).
- CV**: Coeficiente de variação.
- Da**: Daltons.
- DAD**: detector de arranjo de diodos (do inglês *Diode Array Detector*).
- DCM**: Diclorometano.
- di-CQA**: ácido dicafeoilquínicos (do inglês *dicaffeoylquinic acid*).
- di-FQA**: ácido diferuloilquínico (do inglês *diferuloylquinic acid*).

- DMAPP:** dimetilalil-pirofosfato (do inglês *Dimethylallyl Pyrophosphate*).
- DOE:** Delineamento de experimentos (do inglês *Design of Experiments*).
- DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilidrazil.
- EEM:** matriz excitação emissão (do inglês *emission-excitation matrix*).
- ESI:** Ionização por eletronebulização (do inglês *Eletrospray Ionization*).
- eV:** Elétron Volts.
- FE:** Fase estacionária.
- FM:** Fase móvel.
- FPP:** farnesil-pirofosfato (do inglês *Farnesyl Pyrophosphate*).
- FQA:** ácido feruloilquínico (do inglês *feruloylquinic acid*).
- GC:** Cromatografia gasosa (do inglês *gas chromatography*).
- GCxGC:** Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (do inglês *comprehensive two-dimensional gas chromatography*).
- GC-FID:** Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (do inglês *gas chromatography with flame ionization detector*).
- GC/qMS:** Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas quadrupolar (do inglês *gas chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry*).
- GCxGC/qMS:** Cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas quadrupolar (do inglês *comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry*).
- GCxGC/TOFMS:** Cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo (do inglês *comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry*).
- GGPP:** geranilgeranil-pirofosfato (, do inglês *Geranylgeranyl Pyrophosphate*)
- g.l.:** Graus de liberdade
- GPP:** *trans*-geranil-pirofosfato (do inglês *Geranyl Pyrophosphate*).
- HDL:** Lipoproteínas de alta densidade (do inglês *High Density Lipoproteins*).
- HPA:** Hidrocarboneto policíclico aromático.
- HPLC:** Cromatografia líquida de alta pressão (do inglês *High Pressure Liquid Chromatography*).
- HRMS:** Espectrometria de massas de alta resolução (do inglês *High-resolution mass spectrometry*).

IPP: Isopentenil-pirofosfato (do inglês *Isopentenyl Pyrophosphate*)

L.: Lineu.

LAO: Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica.

LC/ESI-MS: Cromatografia líquida associada a espectrômetro de massas com ionização por eletronebulização (do inglês *Liquid Chromatography/Electrospray Ionization - Mass Spectrometry*).

LD: Limite de detecção.

LQ: Limite de quantificação.

LTPRI: Índice de retenção por programação linear de temperatura (do inglês *linear temperature programmed retention index*).

LTPRI_{exp}: Índice de retenção obtido experimentalmente.

LTPRI_{Lit}: Índice de retenção descrito na literatura.

m/z: Razão massa/carga.

MQ: Média quadrática.

MS/MS: Espectrometria de massa em tandem.

PARAFAC: Análise de fatores paralelos (do inglês *Parallel Factor Analysis*).

PC: Componente principal (do inglês *Principal component*).

PCA: Análise de componentes principais (do inglês *Principal Component Analysis*).

pCoQA: ácido *p*-cumaroilquínico (do inglês *p-coumaroylquinic acid*).

pH: Potencial hidrogeniônico.

PTFE: Politetrafluoretileno-teflon.

qMS: Espectrometria de massas quadrupolar (do inglês *quadrupole mass spectrometry*).

QqQ: Analisador de massas triplo quadrupolo.

ROS: Espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

RSM: Metodologia de superfície de resposta (do inglês *Response Surface Methodology*).

r²: Coeficiente de determinação.

S/N: Relação sinal/ruído (do inglês *signal-to-noise ratio*).

sp.: Espécie.

SQ: Soma quadrática.

TAC: Cromatograma de absorbância total (do inglês *Total Absorbance Chromatogram*);

TFC: Conteúdo de Flavonoides Totais (do inglês *Total Flavonoid Content*).

TIC: Cromatograma de íons totais (do inglês *Total Ion Chromatogram*);

TOFMS: Espectrometria de massas por tempo de voo (do inglês *time-of-flight mass spectrometry*).

TPC: Conteúdo Fenólico Total (do inglês *Total Phenolic Content*).

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

UHPLC-QTOF-MS: Cromatografia líquida de ultra alta pressão acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo (do inglês *Ultra-high Pressure Liquid Chromatography*).

UV: ultravioleta.

v/v: volume/volume

Vis: Visível.

RESUMO

A erva-mate consiste em uma planta nativa e cultivada no Brasil, Argentina e Paraguai, consumida principalmente como uma infusão de suas folhas e galhos. Suas folhas possuem diversas propriedades nutricionais e medicinais, atribuídas aos seus metabólitos secundários, cuja composição pode variar em função de fatores, como o tipo de cultivo, clima, condições agronômicas e processamento industrial. Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo estabelecer estratégias para a elucidação da composição não-volátil de amostras de erva-mate de diferentes países, além de investigar como o processamento afeta a composição volátil. A obtenção dos metabólitos não voláteis de amostras de erva-mate processada de diferentes países foi realizada mediante UAE, otimizada utilizando um CCD 2³, aliada à RSM. As variáveis dependentes avaliadas foram o rendimento da extração, TPC, TFC, atividade antioxidante e a área total do cromatograma de absorvância total obtido pela análise de HPLC-DAD, enquanto as variáveis independentes utilizadas foram temperatura (30 – 80 °C), tempo de extração (11,6 – 28,4 min) e percentual de etanol na fase extratora hidroetanólica (8 – 92%). Os extratos foram analisados por fluorescência molecular, e os resultados modelados por PARAFAC, que apontou que amostras brasileiras possuem um maior teor de pigmentos, enquanto as dos demais países possuem um maior teor fenólico. Além disso, os extratos foram caracterizados por UHPLC-QTOF-MS, que possibilitou a identificação de 13 ácidos clorogênicos, 2 metilxantinas, entre outros compostos, que foram quantificados por HPLC-DAD. Estes resultados foram modelados mediante uma PCA, que evidenciou que as folhas de erva-mate produzidas a partir de ervais cultivados possuem uma quantidade mais elevada de ácidos clorogênicos, e que as amostras de países platinos possuem uma maior concentração da maioria dos ácidos clorogênicos e flavonoides, quando comparadas às amostras brasileiras. Em paralelo, a composição da fração volátil das folhas processadas e *in natura* da erva-mate, obtida por hidrodestilação, foi avaliada por GCxGC/TOFMS. Foram identificados 157 e 291 compostos nas folhas frescas e processadas, respectivamente. Contaminantes tóxicos como isômeros de hidrocarbonetos e HPA's foram identificados na erva processada, sugerindo a necessidade de utilizar métodos de processamento livres de fumaça.

ABSTRACT

Yerba mate is a plant native and cultivated in Brazil, Argentina, and Paraguay, consumed mainly as an infusion of its leaves and branches. Its leaves have several nutritional and medicinal properties, attributed to their secondary metabolites, whose composition can vary depending on factors such as the type of cultivation, climate, agronomic conditions, and industrial processing. Given the above, the present study aimed to establish strategies for the elucidation of the non-volatile composition of yerba mate samples from different countries, in addition to investigating how processing affects the volatile composition. Obtaining non-volatile metabolites from samples of yerba mate processed from different countries was performed by means of UAE, optimized using a CCD 2³, combined with the RSM. The dependent variables evaluated were extraction yield, TPC, TFC, antioxidant activity and the total area of the total absorbance chromatogram obtained by HPLC-DAD analysis, while the independent variables used were temperature (30 – 80 °C), extraction time (11.6 – 28.4 min) and percentage of ethanol in the hydroethanolic extractor phase (8 – 92%). The extracts were analyzed by molecular fluorescence, and the results modeled by PARAFAC, which showed that Brazilian samples have a higher pigment content, while those from other countries have a higher phenolic content. Furthermore, the extracts were characterized by UHPLC-QTOF-MS, which allowed the identification of 13 chlorogenic acids, 2 methylxanthines, among other compounds, which were quantified by HPLC-DAD. These results were modeled using a PCA, which showed that yerba mate leaves produced from cultivated yerba mate have a higher amount of chlorogenic acids, and that samples from Argentina, Paraguay and Uruguay have a higher concentration of most chlorogenic acids and flavonoids, when compared to the Brazilian samples. In parallel, the composition of the volatile fraction of the processed and fresh leaves of yerba mate, obtained by hydrodistillation, was evaluated by GCxGC/TOFMS. 157 and 291 compounds were identified in fresh and processed leaves, respectively. Hazardous contaminants such as hydrocarbon isomers and PAHs were identified in the processed leaves, suggesting the need to use smoke-free methods in its industrial processing.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), da família Aquifoliaceae, consiste em uma planta de grande interesse econômico e social, amplamente consumida como uma bebida, na forma de, por exemplo, chimarrão e tererê, preparada por uma infusão de suas folhas e galhos.¹⁻³ Trata-se de uma planta nativa de regiões subtropicais da América do Sul, sendo cultivada principalmente no Brasil, Argentina e Paraguai. Em 2018, o Brasil foi o principal produtor, com 939 mil toneladas de erva-mate, seguido pela Argentina, com 809 mil toneladas, e Paraguai, com uma produção de 105 toneladas.⁴

Quando a erva-mate para chimarrão é destinada ao mercado interno brasileiro, normalmente, esta é embalada e comercializada logo após o beneficiamento. Entretanto, quando o produto é destinado à exportação, na maioria dos casos, este é submetido a um processo de estacionamento, onde a erva-mate cancheada é embalada em sacos e mantida em depósitos, por 6 meses a 2 anos. Esta etapa é uma das mais importantes do processamento, pois nesta fase são atingidos os perfis de sabor necessários ao produto final.⁵ Durante este processo ocorrem reações de oxidação que alteram a coloração e sabor do produto, conferindo-lhe novos atributos. No Brasil, há uma preferência pelo produto de coloração verde e menos amargo (erva sem estacionamento), enquanto os países platinos preferem o produto de coloração amarelada e mais amarga (erva descansada, com longo período de estacionamento).⁶

Contudo, vale ressaltar que a tecnologia de processamento industrial da erva-mate, atualmente, é limitada, devido à falta de pesquisa e pelo empirismo praticado pelo setor ervateiro. Essa falta de informações dificulta a padronização e o controle de qualidade da erva-mate, que exige o conhecimento dos fatores que afetam seus atributos, tanto qualitativos quanto quantitativos. Logo, é necessário desenvolver estudos que possam avaliar a tecnologia usada no processamento da erva-mate, obtendo-se informações precisas sobre a matéria-prima e processos utilizados e sua relação com a composição química do produto.⁷

Embora 96% da produção de erva-mate seja destinada ao preparo de chimarrão e tererê, não é plausível restringir a utilização das folhas de erva-mate

unicamente ao preparo de bebidas, uma vez que a erva-mate pode ser explorada tanto pela indústria de alimentos, como pelas indústrias química e farmacêutica.⁸⁻¹² Atualmente, essa espécie tem sido exportada para várias partes do mundo, principalmente EUA e Europa, devido às suas propriedades nutricionais e medicinais (tônica, colerética, diurética, antioxidante, hipocolesterolêmica, antienvhecimento, antitrombótica, anti-inflamatória, antiobesidade, etc.).³ Dentre os compostos conhecidos e responsáveis por essas propriedades benéficas da erva-mate, destacam-se os polifenóis, principalmente os ácidos clorogênicos, e as metilxantinas teobromina e cafeína. Neste contexto, a composição qualitativa e quantitativa e, conseqüentemente, a atividade dos compostos bioativos da erva-mate pode variar em função de diversos fatores, como o tipo de cultivo, clima, condições agrônômicas e processamento industrial.¹³ Contudo, verifica-se uma lacuna na literatura, no que tange o desenvolvimento e aplicação de metodologias de avaliação das mudanças causadas no perfil volátil e não-volátil das folhas de erva-mate durante o seu cultivo e processamento, bem como a diferenciação química deste produto consumido e produzido em diferentes países.

Apesar das propriedades benéficas dos compostos bioativos da erva-mate, até o momento, a maior parte da literatura científica pertinente utiliza apenas metodologias convencionais para a extração destes compostos.¹⁴⁻¹⁸ Neste contexto, técnicas avançadas de extração, como a extração assistida por ultrassom (UAE, do inglês *Ultrasound-Assisted Extraction*), possibilitam processos mais seletivos, reprodutivos, controlados e seguros.¹⁹⁻²¹ Devido às inúmeras vantagens, a UAE tem sido amplamente aplicada à extração de metabólitos secundários de alimentos, plantas medicinais etc.,^{20,22} representando uma alternativa promissora para a extração de compostos bioativos da erva-mate.

A eficiência da UAE depende de diversos fatores, como a temperatura e tempo de extração, bem como a composição do solvente extrator utilizado.²³⁻²⁵ Logo, o estudo do comportamento destes parâmetros, aliado à avaliação da qualidade dos extratos torna-se de suma importância. Contudo, verifica-se a ausência de estudos de metodologias multivariadas de planejamento de experimentos aplicados à UAE de compostos bioativos de erva-mate.

Diante do exposto, a presente pesquisa propõe-se a estudar o perfil não-volátil das folhas de erva-mate, oriundas de diferentes países e com diferentes formas de cultivo, e averiguar como o processamento industrial altera a composição química volátil das folhas de erva-mate.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

Estabelecer estratégias de elucidação da composição dos metabólitos secundários não voláteis em erva-mate, oriundas de diferentes países e com diferentes formas de cultivo, utilizando técnicas modernas de extração e análise, aliadas a ferramentas quimiométricas, e avaliar como o processamento industrial altera a composição química volátil das folhas de erva-mate.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Aplicar um delineamento composto central (CCD, do inglês *Central Composite Design*) ao estudo dos parâmetros “composição do solvente extrator, “tempo” e “temperatura”, envolvidos no processo de UAE de metabólitos secundários não voláteis de folhas de erva-mate processada, tendo como variáveis dependentes o rendimento da extração, a atividade antioxidante e os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais dos extratos, bem como a área cromatográfica total obtida mediante análise destes extratos por Cromatografia líquida de alta pressão com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD, do inglês *High Pressure Liquid Chromatography – Diode Array Detector*);
- Ajustar os dados experimentais à um modelo matemático, mediante o método de mínimos quadrados, verificando a significância do modelo ajustado por Análise de Variância (ANOVA, do inglês *Analysis of Variance*) e avaliando a parametricidade dos resíduos;
- Estimar as condições que maximizam a eficiência da UAE de folhas processadas de erva-mate;

- Validar o modelo ajustado realizando a UAE da erva-mate nas condições de trabalho escolhidas e verificando uma possível diferença estatística significativa entre o valor predito e o obtido experimentalmente;
- Realizar a UAE, nas condições de trabalho escolhidas, de amostras de erva-mate de diferentes países e formas de processamento e cultivo;
- Realizar uma análise exploratória não-supervisionada dos extratos obtidos, utilizando a técnica de espectrometria de fluorescência molecular, aliada à modelagem PARAFAC;
- Caracterizar a composição química da fração não-volátil dos metabólitos secundários de erva-mate mediante a técnica de cromatografia líquida de ultra alta pressão com analisador quadrupolo - tempo de voo (UHPLC-QTOF-MS, do inglês *Ultra-high Pressure Liquid Chromatography – quadrupole time-of-flight mass spectrometry*);
- Quantificar os compostos identificados nos extratos por HPLC-DAD;
- Realizar uma análise exploratória não-supervisionada dos dados obtidos por HPLC-DAD utilizando análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*);
- Obter a fração volátil de folhas *in natura* e processadas de erva-mate por hidrodestilação;
- Caracterizar as frações voláteis mediante a resolução e identificação dos compostos por GCxGC/TOFMS, aliado à utilização de índices de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI, do inglês *linear temperature programmed retention index*) e deconvolução espectral;
- Estimar, mediante normalização de área, os teores dos compostos identificados em cada amostra e comparar os resultados obtidos, avaliando o efeito do processamento industrial na composição volátil da erva-mate.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ERVA-MATE

2.1.1. Histórico

A utilização da erva-mate pelos povos nativos da América do Sul data de períodos anteriores à própria colonização europeia no continente, e vem sendo evidenciada mediante achados arqueológicos. Neste contexto, foram encontradas folhas de erva-mate ao lado de alimentos, em túmulos pré-colombianos localizados no distrito de Ancón, na Região de Lima, zona central do Peru, evidenciando sua utilização pelos povos incas.²⁶

O primeiro registro dos colonizadores europeus acerca do consumo de erva-mate ocorreu em 1554. Na ocasião, o primeiro Governador de Assunção – Domingo Martínez de Irala – em incursões pelas terras de Guáira (atual território do Paraná), constatou que os nativos faziam uso de uma bebida estimulante à base de erva-mate. Chamada pelos Guaranis de *káa-y* (água de erva saborosa), a bebida era produzida mediante a infusão de folhas secas e trituradas de erva-mate, e consumida em um recipiente, confeccionado a partir do fruto maduro da cucurbitácea *Legenaria vulgaris*, popularmente chamado de porongo (daí o nome mate, oriundo do vocábulo *mati*, denominação na língua quéchua para este recipiente). Esta infusão era consumida mediante o auxílio de um canudo de taquara, cuja base possuía um trançado de fibras, que impedia a passagem dos fragmentos das folhas.²⁷⁻³²

No entanto, o cultivo sistemático da erva-mate só passou a ocorrer no século XVII, por volta de 1670, sob orientação dos jesuítas da Companhia de Jesus em seus 30 povos das Missões de Guarani, situados na faixa ao longo dos rios Paraguai e Uruguai. Este foi o impulso definitivo para o surgimento da economia ervateira, uma vez que contribuiu para a difusão da bebida entre os europeus e seu preparo foi aperfeiçoado.³³⁻³⁵

A classificação taxonômica da erva-mate ocorreu no início do século XIX, pelo naturalista francês August de Saint-Hilaire que, no período 1820-1823, empreendera em várias viagens pelo Brasil. Em 1820, Saint-Hilaire esteve no

Rio Grande do Sul, Paraná e litoral e, ao retornar à França, em 1823, apresentou um relatório descritivo dos ervais sulinos brasileiros à Academia de Ciências do Instituto da França, onde propôs a designação de *Ilex paraguariensis* ou *I. mate*.³⁵⁻³⁹

2.1.2. Caracterização da Espécie

2.1.2.1. Taxonomia

A erva-mate, de nome científico *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., descrita por August de Saint-Hilaire, cujas exsicatas estão depositadas no Museu de História Natural de Paris, pertence à seguinte classificação taxonômica:^{5,38}

- Reino: Plantae
- Divisão: Angiospermae
- Classe: Dicotyledoneae
- Subclasse: Archichlamydeae
- Ordem: Celastrales
- Família: Aquifoliaceae
- Gênero: *Ilex*
- Espécie: *I. paraguariensis*

Esta espécie é conhecida popularmente como erva-mate, caaguaçu, orelha-de-burro, *ka'a*, erva-mate-de-talo-branco, erva-piriquita, carvalho-branco, mate, erva, entre outros nomes usuais.^{36,40}

2.1.2.2. Descrição da Espécie

A erva-mate (**Figura 1**) consiste em uma planta perenifólia sob condições naturais, de porte arbustivo a arbóreo, com altura variável de acordo com as condições de ocorrência, manejo e idade da planta que, por sua vez, pode alcançar cem anos. Além disso, trata-se de uma espécie umbrófila, crescendo preferencialmente entre pinheirais de *Araucária angustifólia*. Quando situada em sub-bosques de floresta, a planta pode atingir até 30 metros de altura.⁴¹⁻⁴⁵ Em

contrapartida, nos sistemas agrícolas atuais, com adensamentos e podas regulares, a altura, geralmente, não ultrapassa 2 metros.^{36,46,47}

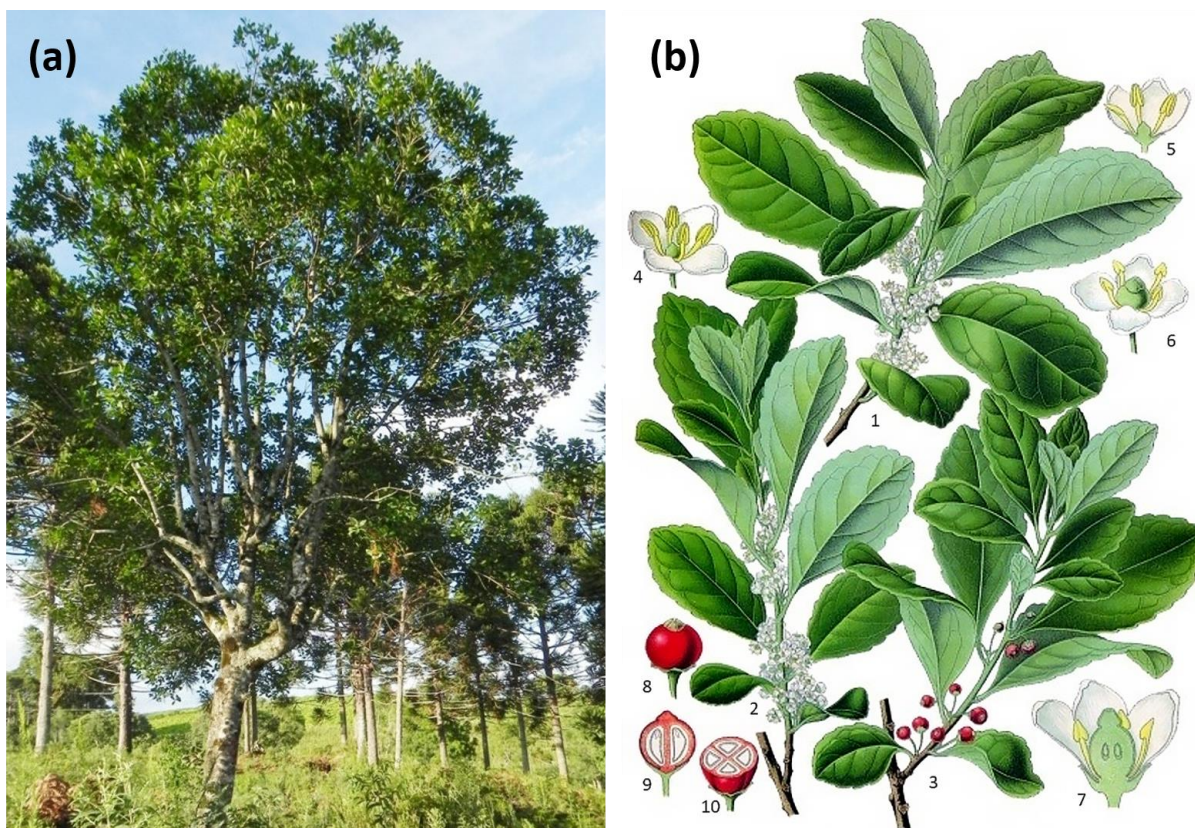


Figura 1: (a) *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., fotografada em: RS, Protásio Alves, Linha Visconde de Mauá, zona rural de Protásio Alves;⁴⁸ **(b)** Erva-mate: 1- Ramo masculino; 2- Ramo feminino; 3- Ramo com frutos; 4- Flor masculina; 5- Seção longitudinal de flor masculina; 6- Flor feminina; 7- Seção longitudinal de flor feminina; 8- Fruto; 9- Seção longitudinal do fruto; 10- Seção transversal do fruto. Adaptado de Köhler, H. A. (1887).⁴⁹

O caule é cilíndrico, reto ou pouco tortuoso, de cor acinzentada, geralmente com 20 a 25 cm de diâmetro, mas podendo chegar a 50 cm. Seus ramos são cilíndricos ou subcilíndricos, cinzentos, comumente com 20 a 25 mm de diâmetro, podendo alcançar até 50 mm.^{44,45} Vale notar que a denominação “erva”, empregada para plantas arbustivas, não lenhosas, não deve ser considerada fielmente para a descrição desta espécie, uma vez que a erva-mate é uma árvore de porte relativamente desenvolvido, sendo o emprego deste termo, originalmente, histórico.^{50,51}

Em árvores adultas e em estado nativo, a casca atinge em média 2 cm de espessura, com coloração persistente, que varia de cinza-claro a acastanhada. Possui aspecto áspero e rugoso, com cicatrizes transversais e lenticelas abundantes, muitas vezes formando linhas longitudinais. A casca interna, por sua vez, possui textura arenosa e cor branca-amarelada que, após incisão, escurece rapidamente em contato com o ar.³⁶

As flores, por sua vez, são pequenas, não vistosas, pedunculadas e dispostas em inflorescências fasciculadas de até cinco flores, com curtos pedicelos. No que diz respeito ao comportamento das flores, embora nas plantas femininas sejam encontrados estames e, nas masculinas, pistilo, pode-se considerar a erva-mate como uma planta dioica críptica ($2n = 40$), uma vez que estas estruturas não funcionam e são abortadas pela planta que, dessa forma, torna-se unissexual por aborto, tendo assim a fecundação cruzada como única forma de reprodução. Em cada flor, nota-se um cálice gamossépalo com quatro sépalas de cor verde clara e uma corola branca formada por quatro pétalas. Entre essas pétalas, há quatro estames largos.^{44,47,51,52}

O fruto consiste em uma baga dupla globular, muito pequena, medindo geralmente entre 4 e 8 mm, com quatro sementes pequenas revestidas por um tegumento fino, áspero e duro, de coloração amarelo-clara ou parda. Quando imaturo, o fruto apresenta uma coloração verde, tornando-se vermelho-arroxeadado em sua maturidade. Nesta última fase, uma polpa mucilaginosa envolve a semente, e os pássaros são atraídos pelo fruto e se alimentam deste, expelindo posteriormente as sementes envolvidas em suas dejeções, favorecendo a disseminação das plantas.^{36,44,51,53}

Os ramos da erva-mate são acinzentados, geralmente com 20 a 50 cm de diâmetro, podendo chegar a 100 cm quando presentes em sub-bosques. Suas folhas são simples, alternas, geralmente estipuladas, de textura subcoriáceas a coriáceas. Seu formato é estreito na base e ligeiramente obtuso no vértice, medindo 5 a 10 cm de comprimento, mas podendo chegar a 18 cm em ambiente de sub-bosques florestais. As margens são irregulares e serrilhadas da porção mediana até a extremidade superior. O pecíolo é glabro, embora algumas vezes pubescente, relativamente curto e um tanto retorcido, medindo geralmente 7 a 15 mm de comprimento.^{36,41,44,51,54,55} Entretanto, essas características podem

variar muito, sendo significativamente influenciadas por variáveis tais como sombreamento, sazonalidade, clima e genética, despertando interesse tecnológico, uma vez que essas condições podem afetar as características dos produtos comerciais.^{50,56}

2.1.2.3. Fenologia

A erva-mate apresenta fenofases bem definidas, embora possam ser alteradas conforme o microclima de algumas regiões. Nos estados do Rio Grande do sul e Santa Catarina, a espécie floresce no período de setembro a dezembro, enquanto no Paraná, de setembro a novembro. Sob condições adequadas, a floração e a frutificação iniciam, gradativamente, aos dois anos de idade em árvores oriundas de propagação vegetativa, e aos cinco em árvores provenientes de sementes.^{52,53} As sementes maduras são encontradas de dezembro a março, porém, em altitudes acima de 800 metros, foram encontrados fruto maduros no final de abril e início de maio.⁵⁷ A polinização é realizada, principalmente, pelo vento e por insetos, enquanto a dispersão das sementes é de forma zoocórica. Após o corte, os ramos levam entre 35 a 40 dias para rebrotar; 40 a 45 dias após a brotação para ter 50% da planta com flores; 30 a 40 dias após a floração para a produção de frutos, e igual período até a maturação.⁵⁸

2.1.2.4. Área de Ocorrência Natural

A ocorrência natural da erva-mate (**Figura 2**) está distribuída em uma área de, aproximadamente, 540.000 km², que corresponde à cerca de 3% do território sul-americano. Este território compreende as regiões tropicais e subtropicais do Brasil, Argentina e Paraguai, estendendo-se desde a latitude de 21° até 30° S, e longitude 48° 30' até 56° 10' O. A maior concentração ocorre nas altitudes de 500 a 1000 m, podendo ocorrer, em pontos isolados, fora destes limites.^{8,36,44,57,59,60}



Figura 2: Área de ocorrência natural da erva-mate na América do Sul.⁶¹

A maior área de ocorrência natural da erva-mate pertence ao Brasil (aproximadamente 80%), no bioma Mata Atlântica, sendo que a área estimada de distribuição corresponde a 450.000 km², representando cerca de 5% do território nacional e compreendendo em torno de 450 municípios, principalmente nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.^{44,57,59,62} No país, a espécie é encontrada principalmente sob meia sombra dos pinheiros, imbuias e outras árvores de grande porte.^{57,61,63,64}

No Rio Grande do Sul, sua dispersão geográfica compreende principalmente a região centro-oeste. Em Santa Catarina, por sua vez, ocorre principalmente na região que se estende do Planalto Norte Catarinense, até o extremo oeste. No Paraná, a espécie está presente desde a região centro sul e sudoeste até a Serra do Mar, com exceção do litoral. Em contrapartida, em São Paulo ocorre com pouca frequência, estando presentes em áreas localizadas no sudoeste do Estado, onde são encontradas pequenas manchas de matas com ocorrência de *Araucaria angustifolia*, enquanto que, no Mato Grosso do Sul, ocorre majoritariamente em municípios sulinos.^{10,60,65}

Na Argentina, a região de ocorrência concentra-se, majoritariamente, em Província de Misiones, estendendo-se por 60% do seu território, ocupando uma área de 18.000 km², equivalente a 1% da superfície do país. No Paraguai, sua maior concentração situa-se entre os Rios Paraguai e Paraná. Por fim, embora existam citações da ocorrência natural da erva-mate na Bolívia, em Santa Cruz

de la Sierra, e no Uruguai, em Nocena, consistem, aparentemente, em materiais introduzidos.^{28,57,59}

Toda a área de abrangência da erva-mate está compreendida na região sul-americana de clima temperado (**Figura 3**), com a planta resistindo às baixas temperaturas. Seguindo a classificação de Köppen-Geiger, nesta área atuam, majoritariamente, dois grupos climáticos: Cfb (clima oceânico temperado) e Cfa (clima subtropical úmido). Ambos os grupos consistem em climas temperados (C), com precipitações regularmente distribuídas no decorrer do ano, proporcionando um clima sempre úmido (f), com variações de temperatura do mês mais quente superiores ou inferiores a 22 °C (a ou b, respectivamente).⁵⁹ Todavia, ainda há pequenas ocorrências dos tipos climáticos Cwa (clima temperado úmido com inverno seco e verão quente) e Aw (clima tropical com estação seca no inverno).^{44,57,59}

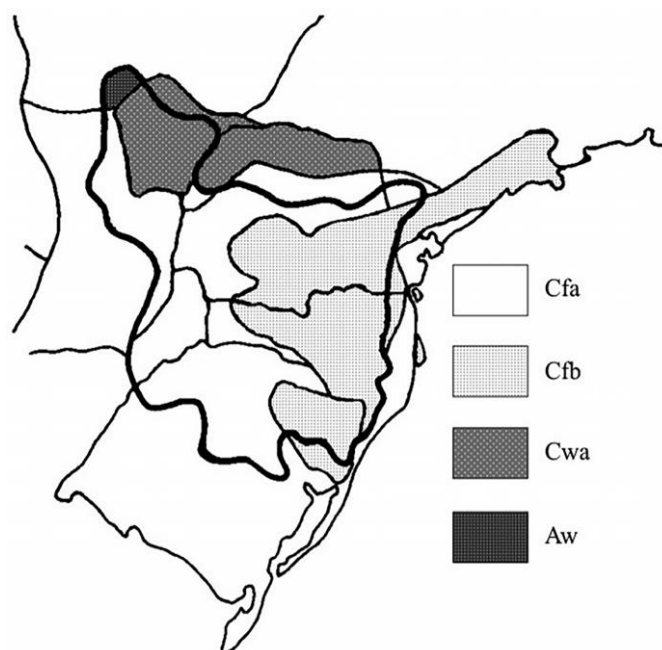


Figura 3: Tipos climáticos de Köppen definidos dentro da área de ocorrência natural da erva-mate. Adaptado de Oliveira e Rotta (1985).⁵⁹

No que diz respeito ao solo, a espécie possui boa adaptação naqueles que apresentam boa profundidade e permeabilidade, embora não seja observada em solos hidromórficos. Além disso, a erva-mate possui boa adaptação em ambientes com fertilidade natural de média a alta, embora

apresente tolerância a solos com baixa fertilidade natural, sendo resistente a solos degradados. Em contrapartida, solos rasos, com menos de um metro de profundidade, ocasionam queda no rendimento da planta, que é acentuada em períodos de déficit hídrico, além de reduzir sua vida útil. Quanto à textura, observa-se que a espécie ocorre mais frequentemente em solos argilosos (>35% de argila), embora seja encontrada em locais com textura média (15 a 35% de argila). Por outro lado, a planta é raramente encontrada em solos constituídos por areias quartzosas (<15% de argila).^{44,57,59,66,67}

2.1.3. Produção Agrícola

Os ervais de produção podem ser distintos em dois sistemas: erval nativo (com cobertura vegetal, ou seja, sombreado), e o cultivado (sem cobertura vegetal, ou seja, a pleno Sol). Os ervais nativos são aqueles formados pela ação da natureza, ou seja, localizado em meio a floresta nativa. Nestes ervais, é comum ocorrer a ação do homem nas fases iniciais de formação dos cultivos, seja com eliminação da vegetação rasteira e poda das plantas, ou por adensamento, que consiste no plantio de mudas de erva-mate em locais onde já existem ervais nativos. Em contrapartida, os ervais cultivados caracterizam-se pelo plantio de mudas e um sistema de manejo convencional. Para o plantio dos ervais, são observados alguns procedimentos de preparo do solo que variam com o clima, vegetação natural, topografia, tipo e condições do solo. Vale ressaltar que as plantas de erva-mate adaptam-se melhor em ambiente sombreado, ou seja, em cultivo consorciado com outras árvores de maior porte.^{47,68} Além disso, a exposição ao sol influencia no sabor final do produto, podendo torná-lo mais “suave” ou mais “amargo”.^{69,70}

2.1.4. Processamento

A tecnologia utilizada no processamento da erva-mate sofreu, relativamente, poucas alterações nos últimos anos, quando comparada à evolução observada em outros setores agroindustriais. Sendo assim, a análise

da tecnologia em uso pelo setor ervateiro exige esclarecimentos em função das suas especificidades.

Neste contexto, o processamento da erva-mate, pode ser dividido em duas etapas: o ciclo do cancheamento e o do beneficiamento. O ciclo do cancheamento é a primeira fase do processo, consistindo nas seguintes operações básicas: colheita, sapeco, secagem, cancheamento e estacionamento. Ao longo deste ciclo, especialmente nos estágios de colheita, sapeco, secagem e estacionamento, as folhas de erva-mate sofrem alterações no perfil químico e na concentração dos compostos bioativos presentes na planta, os quais podem modificar suas atividades biológicas.^{71,72} Após o ciclo de cancheamento, a erva-mate obtida, agora denominada de cancheada, segue para a segunda etapa do processo: o ciclo de beneficiamento. Nesta etapa, elaboram-se os produtos do mate, mediante operações de trituração, separação e mistura.^{43,73}

2.1.4.1. Ciclo do Cancheamento

2.1.4.1.1. Colheita

A colheita da erva-mate é realizada mediante a operação de poda, que visa a coleta de folhas e ramos finos, uma vez que estas são as partes empregadas na elaboração da erva cancheada. Esta operação consiste na colheita de até 70% dos ramos enfolhados da planta, uma vez que cortes de maior intensidade podem comprometer a rápida recuperação das árvores. Recomenda-se que esta operação seja realizada a partir do 3º ano após a implantação dos ervais. Em ervais plantados bem conduzidos, esta poda é capaz de produzir até 2,5 kg de erva verde por árvore, estabilizando sua produção a partir do 10º ano de implantação. A frequência da colheita, por sua vez, pode ser a cada um ou dois anos em ervais plantados, levando-se em consideração que o corte anual diminui o rendimento da colheita. A estação ideal para realizar esta operação é o inverno, antes das plantas entrarem em franca atividade fisiológica, ou seja, antes do início das novas brotações.

2.1.4.1.2. Sapeco

Logo após serem colhidas, as folhas de erva-mate passam por um processo de deterioração natural, associada à ação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase presentes nas folhas. Estas enzimas catalisam reações de oxidação de compostos fenólicos, causando mudança na cor das folhas, principalmente sob a incidência de luz solar e calor. Sendo assim, uma forma de controlar o processo de escurecimento consiste em reduzir a atividade enzimática, que pode ser realizado protegendo o produto da incidência direta da luz solar e das altas temperaturas.^{33,43,74}

Entretanto, além dos cuidados citados, a indústria ervateira realiza uma operação de branqueamento, comumente chamada pelo setor de sapeco. Esta etapa consiste da passagem rápida das folhas por uma fonte de calor intenso, de forma a provocar a abertura dos estômatos (daí o nome sapeco, que em guarani significa “abrir os olhos”), perda de umidade (aproximadamente 20%) e decomposição das enzimas peroxidases e polifenoxidasas.^{42,43,47,75,76} Esta operação deve ser realizada, preferencialmente, no mesmo dia da colheita dos ramos, a fim de evitar a perda de qualidade do produto.³⁶

Os equipamentos modernos para realização do sapeco consistem em um cilindro metálico, instalado com alguma inclinação, e movido mecanicamente, de maneira a permitir a movimentação da erva da extremidade mais alta, onde ocorre a alimentação contínua mediante uma esteira, para a mais baixa. A fornalha, por sua vez, é instalada na extremidade mais alta, de modo que a erva, ao cair no interior do cilindro, recebe ação direta das labaredas (temperatura média de 400 °C). Finalmente, o calor que circula no interior do equipamento é coletado por uma chaminé na extremidade mais baixa do cilindro, enquanto a erva, agora dita sapecada, sai do aparelho (a uma temperatura média de 60 °C), após um tempo de residência de aproximadamente 8 minutos, e é transportada à próxima operação por esteiras.^{36,43,44}

Embora os sapecadores sejam equipamentos simples e de fácil operação, a falta de mecanismos de controle de qualidade no processo pode dificultar a padronização e afetar a qualidade do produto. Geralmente, o controle é realizado de forma empírica pelo operador, observando parâmetros tais como o crepitar das folhas durante o processo, a coloração e o aroma da erva-mate sapecada.⁷⁷

2.1.4.1.3. Secagem

Embora a erva-mate sofra uma redução no teor de umidade durante o sapeco, essa operação seria ainda insuficiente para garantir a conservação do produto, sendo necessário efetuar uma secagem da erva sapecada, a fim de reduzir os teores de umidade a valores que garantam estabilidade ao produto. Dessa forma, esta operação completa o processo de desidratação iniciada no sapeco, sendo de fundamental importância na qualidade do produto.⁷⁸

Como na secagem de todo material vegetal, deve-se ter cuidado com o binômio tempo e temperatura, evitando a exposição excessiva do produto às altas temperaturas. Para a erva-mate, as temperaturas ideais de secagem estariam entre 80 e 110 °C. Eventuais exposições a altas temperaturas devem persistir por apenas poucos minutos, não excedendo temperaturas superiores a 130 °C.⁷⁹

Entre os sistemas modernos de secagem mecânica está o secador de esteiras, que consiste em uma estrutura com, geralmente, 2-4 pavimentos, com uma esteira em cada pavimento. A erva-mate, por sua vez, é disposta sobre as esteiras, em camadas de 30 a 80 cm de espessura, que se movimentam lentamente, transportando o material através do secador, em tempos que oscilam de 3 a 6 horas. Na parte inferior, sobre o piso, estão posicionadas as saídas de ar aquecido pela queima de madeira. O fluxo de material se dá em contracorrente, com a erva-mate entrando pela parte superior do secador. Dessa forma, este secador mecânico possui a vantagem de não ter contato direto da fumaça com o produto.⁷⁸

Entretanto, o sistema de secagem mecânica mais empregado atualmente no Brasil é o secador rotativo de alimentação contínua (**Figura 4**), construídos na forma de cilindros metálicos com variações nas dimensões e velocidade de rotação. Normalmente os secadores rotativos são dotados de aletas helicoidais para movimentação da erva-mate e o material fica exposto a uma temperatura de 300 °C por aproximadamente 5 minutos. Na extremidade de saída, a erva é retirada pela ação de uma turbina, que não consegue ventilar os palitos, separando estes da erva. Uma variação deste sistema são os secadores de

tambor que, ao contrário do rotativo, são dotados de dispositivos internos para movimentação da erva-mate, mas o corpo do equipamento permanece imóvel. Entretanto, tanto no tambor quanto no cilindro rotativo há a desvantagem do contato direto da fumaça com o produto, o que não é observado no secador de esteira, no qual o contato é indireto, causando menores danos à matéria-prima.³⁶



Figura 4: Aparelho secador rotativo de erva-mate.⁸⁰

2.1.4.1.4. Cancheamento

O cancheamento consiste em uma trituração ou fragmentação da erva seca, podendo ser realizada de várias formas, contudo, a fragmentação mecânica é a mais utilizada no mercado moderno. Embora existam vários sistemas de fragmentação, o mais comum é o por meio de martelos picadores. Este aparato consiste em um tipo de cocho que vai sendo alimentado com erva, e martelos de madeira ou ferro, providos de lâminas nas extremidades, são movimentados por uma espécie de virabrequim, sob frequência regulável, de acordo com a necessidade de menor ou maior trituração.³⁶

2.1.4.1.5. Estacionamento

Estacionamento é um termo empregado pelo setor como sinônimo de armazenamento, consistindo no processo de maturação da erva-mate, de forma a adquirir o sabor, o aroma e a cor desejados. Esta etapa é uma das mais

importantes do processamento, pois nesta fase são atingidos os perfis de sabor necessários ao produto.⁵ Durante este processo ocorrem reações de oxidação que alteram a coloração e sabor do produto, conferindo-lhe novos atributos. Contudo, a erva cancheada pode ou não ser estacionada, ou seja, sofrendo ou não o processo de maturação, de acordo com a preferência do mercado consumidor. No Brasil, por exemplo, prefere-se o produto de coloração verde e menos amargo (erva sem estacionamento), enquanto que o mercado externo (principalmente os países platinos) prefere o produto de coloração amarelada e mais amargo (erva descansada, com longo período de estacionamento).⁶ As diferenças físicas de ambos os tipos podem ser observadas na **Figura 5**. Este procedimento é geralmente realizado armazenando-se a erva cancheada em embalagens de juta ou plástico trançado, em local ventilado, protegido da luz e da umidade, por cerca de um ano, conforme pode ser observado na **Figura 6**.³⁶



Figura 5: Diferença entre a erva-mate estacionada (direita) e não-estacionada (esquerda).⁸¹



Figura 6: Armazenamento de erva-mate.⁸⁰

2.1.4.2. Ciclo do Beneficiamento

No ciclo do beneficiamento, a erva cancheada passa por novas operações até a obtenção do produto. Contudo, do ponto de vista tecnológico e químico, as principais operações do processamento da erva-mate foram realizadas no ciclo do cancheamento, sendo o beneficiamento composto por poucas operações, visando apenas adequar o produto aos padrões de mercado.³⁶

Neste ciclo, a erva cancheada segue por uma rosca sem-fim até uma peneira rotativa de limpeza, onde os palitos fora dos padrões são separados e descartados. Na sequência, a erva passa então sobre ímãs, que retêm objetos metálicos, caindo, em seguida, sobre um martelete, que realizará a primeira redução de tamanho e homogeneização deste ciclo.³⁶

Em seguida, a erva entra novamente em peneiras rotativas de separação, que retêm os palitos, e passa em frente as folhas. Os palitos são elevados a uma nova peneira que os classifica por diâmetro, sendo em seguida triturados e direcionados a um silo de armazenamento. As folhas que foram separadas dos palitos são moídas por uma peneira cilíndrica giratória e, em seguida, passa por peneiras vibratórias com malhas, sendo classificadas em, no mínimo, dois tamanhos de folhas e em pó, que em seguida seguem para os silos apropriados.^{36,43}

Embora a composição química dos ramos, usualmente chamados de palitos, seja de perfil químico muito inferior ao das folhas, eles são adicionados à erva-mate destinada ao chimarrão, por melhorarem as propriedades físicas do

produto, facilitando o preparo da bebida. Os materiais provenientes dos silos são misturados segundo as necessidades de mercado. Neste ponto, se o tipo de produto requer adições de outras ervas, pequenos silos independentes, ou um silo com as ervas já misturadas nas doses requeridas, são acoplados ao misturador. Finalmente o produto finalizado é empacotado e armazenado, aguardando o despacho.^{36,44,50}

Vale destacar que o produto apresenta variações em função das preferências sensoriais da população consumidora, principalmente quanto à granulometria, presença de talos e envelhecimento, o que os torna bastante diferenciados. Na Argentina, por exemplo, a erva moída com paus é consumida em Buenos Aires e arredores, enquanto o restante do país consome erva-mate sem palitos. No que diz respeito ao grau de trituração, também existem diferenças, com a erva de menor granulometria mais consumida no litoral, norte e sul do país. Já o mercado consumidor uruguaio, de modo geral, prefere o mate de sabor forte, com folhas cortadas muito pequenas, sem palitos, e com quantidade significativa de pó.⁸² No Brasil, por outro lado, na industrialização da erva-mate, são utilizadas folhas, pecíolos e ramos finos no processamento industrial, tendo uma composição aproximada de 30% ramos e 70% folhas.^{82,83}

2.1.5. Utilização

A erva-mate vem sendo consumida durante séculos pelos povos sul-americanos para diversas finalidades. Atualmente, os produtos alimentícios mais comuns obtidos a partir das folhas de erva-mate são o chimarrão, tererê, chá mate, mate solúvel, entre outros. Destes, o chimarrão e o tererê, são as aplicações mais tradicionais, consumindo aproximadamente 96% da erva-mate destinada ao mercado interno. O primeiro consiste em uma bebida preparada por adições repetidas de água quente, na mesma quantidade de material seco da planta, servidos em uma cuia e ingeridos com o auxílio de uma bomba de metal. A preparação do tererê, por sua vez, é muito similar, porém obtido pela adição água fria ou gelada à erva.¹⁻³

No entanto, não é plausível restringir a utilização das folhas de erva-mate unicamente para estas finalidades, visto que o chá gelado é a bebida derivada

de mate mais aceita nas regiões quentes do país. Além disso, por possuir uma composição química complexa do ponto de vista bioquímico, pesquisadores vêm sugerindo que sejam realizados investimentos na melhoria da qualidade do produto. Dessa forma, alguns estudos têm sido conduzidos com o intuito de identificar alternativas para a utilização da erva-mate, que vêm mostrando um mercado em potencial para novos produtos (**Tabela I**).¹¹ Neste contexto, a erva-mate pode ser explorada tanto pela indústria de alimentos, como pelas indústrias química e farmacêutica.⁸⁻¹²

Tabela I: Derivados tradicionais e potenciais de folhas de erva-mate.⁸⁴

Aplicação	Apresentação	Produtos
Alimentos	Bebidas	Chá solúvel, chimarrão, tererê, chá tostado, cerveja, vinho, sucos, bebida láctea, refrigerante, mate com café, bebidas energéticas e funcionais.
	Sobremesas e outros	Gelatinas, sorvetes, cremes, pudins, barras de cereais, balas, goma de mascar, massas alimentícias, pães, biscoitos, chocolates.
	Aditivos alimentícios	Aroma, antioxidante, conservante, corante.
Cosméticos	Sólido	Pó facial, talcos, maquiagens, sabonetes e sabões.
	Líquido	Soluções, loções de beleza, óleos cosméticos, desodorantes, águas perfumadas, odorantes, xampus.
	Semissólido	Creme, gel, emulsões, maquiagens, máscaras faciais.
Medicamentos	Sólido	Pós, extratos, cápsulas, comprimidos.
	Líquido	Tintura, infusão, extrato fluído.
	Aditivos Farmacêuticos	Antioxidante, corante, antimicrobiano.

No que diz respeito às publicações de patentes e artigos científicos acerca deste tema, em virtude dos benefícios oferecidos pela erva-mate e por ser esta considerada uma das plantas mais ricas em substâncias benéficas à saúde

humana do mundo, a literatura revela a aplicação da erva-mate na produção de medicamentos, cosméticos, produtos de limpeza e na indústria de alimentos. Entretanto, vale ressaltar que o interesse pelas suas aplicações não limita-se aos países produtores, uma vez que a origem das patentes e dos produtos cosméticos indica que a Europa e a América do Norte usam a erva-mate para produtos mais elaborados.^{8,50,85,86}

No mercado de bebidas, o consumo de bebidas à base de chá-mate tem crescido, em consequência dos benefícios à saúde e pelo lançamento de novos produtos com maior aceitação pelo público, como as bebidas aromatizadas prontas para consumo, com aroma natural de frutas.⁸⁷ A erva-mate vem sendo utilizada na formulação de cervejas,⁸⁸ bebidas energéticas, refrigerantes,⁸⁹ além de ser vendido na Europa em combinação com outras ervas, na forma de chás energéticos.⁹⁰

Contudo, a erva-mate possui potencial que ultrapassa seu uso como base para bebidas. Na indústria alimentícia, produtos à base de erva-mate, como pães,⁹¹ por exemplo, além de apresentarem uma boa aceitação do público consumidor, tiveram maior vida de prateleira devido a ação antifúngica da erva-mate. Outro exemplo é o acréscimo do extrato aquoso de erva-mate em formulações de gelatina, que também receberam boa aceitação, além de conseguirem manter as substâncias bioativas da erva-mate no produto final.⁹² Balas contendo extrato de erva-mate tiveram um aumento significativo em polifenóis e minerais, além de promover um aumento na dureza dos doces, produzindo os resultados desejados em termos de características nutricionais e aceitação do público.⁸⁸ Barras de cereal contendo erva-mate também mostraram bons resultados em avaliações sensoriais e físico-químicas, corroborando para evidenciar a viabilidade do uso deste ingrediente no desenvolvimento de novos produtos alimentícios.⁹³

Algumas das utilizações para as folhas de erva-mate relatadas na literatura dizem respeito aos seus aspectos medicinais, uma vez que ela possui atividade estimulante, diurética, estomáquica e sudorífica, além da atuação do componente nioxina, anti-inflamatório natural do sistema urogenital, e auxiliar na redução da obesidade. Além disso, são relatados benefícios ao aparelho

circulatório, como no tratamento de arteriosclerose e hipertensão, bem como para o aparelho respiratório, no tratamento de bronquite e pneumonia.^{41,94}

Outra aplicação para a erva-mate citada na literatura consiste na produção de cosméticos, principalmente em países do hemisfério Norte. Nestes países, os principais cosméticos comercializados a partir do extrato de erva-mate apresentam finalidades de rejuvenescimento e proteção da pele, auxílio na redução e controle de celulite, redução de rugas, adstringente e desodorante.⁸⁶

Diante do exposto, fica claro que o mercado nacional ervateiro apresenta um elevado potencial de crescimento sendo, contudo, necessário desenvolver estratégias de *marketing*, valorização do produto e investimentos com relação ao beneficiamento da matéria prima. Entretanto, existem desafios no desenvolvimento de novos produtos alimentícios, como a perda de compostos fenólicos presentes na matéria-prima durante seu processamento, uma vez que, para que os compostos fenólicos possam exercer atividade biológica, estes devem estar numa concentração mínima que induza o efeito biológico e o mecanismo de ação.^{95,96} Além disso, por ser um produto natural, a erva-mate não apresenta uniformidade quanto ao teor de seus componentes químicos, seja pela forma de cultivo ou pela diversidade climática de sua área de ocorrência, sendo necessário estudos acerca dessa variação, de forma a facilitar sua comercialização e exportação para mercados consumidores globalizados.⁹⁷

2.1.6. Aspectos Econômicos

2.1.6.1. Produtividade

A produção mundial de erva-Mate ocorre no Brasil, Argentina e Paraguai, sendo o Brasil o principal produtor em 2018, com 939 mil toneladas de erva-mate verde. Na sequência, apresenta-se a Argentina, com 809 mil toneladas, e Paraguai, com uma produção de 105 toneladas. Avaliando-se a **Tabela II**, que apresenta os dados de produtividade de erva-mate cultivada destes países nos anos de 2008, 2013 e 2018, avaliados pela divisão estatística da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAOSTAT),⁴ observa-se que a Argentina é o país com maior área de produção, embora apresente a menor

produtividade entre os três países. Em contrapartida, o Brasil, apesar de possuir menos da metade da área de cultivo da Argentina, apresentou em 2018, aproximadamente 56,65% da produção mundial de erva-mate cultivada, seguido da Argentina (31,31%) e Paraguai (12,04%).

Tabela II: Produção de erva-mate verde cultivada nos países produtores.

	País	Produção (t)	Produção (%)	Área Cultivada (ha)	Produtividade (kg/ha)
2018	Argentina	302.099	31,31	165.327	1.827
	Brasil	546.618	56,65	71.979	7.594
	Paraguai	116.192	12,04	22.850	5.085
	TOTAL	964.909	100,00	260.156	14.506
2013	Argentina	241.365	28,64	178.995	1.348
	Brasil	515.451	61,17	67.397	7.648
	Paraguai	85.834	10,19	20.000	4.292
	TOTAL	842.650	100,00	266.392	13.288
2008	Argentina	237.858	31,75	173.940	1.367
	Brasil	434.727	58,02	71.217	6.104
	Paraguai	76.663	10,23	18.305	4.188
	TOTAL	749.248	100,00	263.462	11.660

Fonte: FAOSTAT (2020).⁴

A nível nacional, a produção está localizada na região sul, com 596 municípios desenvolvendo a atividade ervateira, e uma pequena quantidade no centro-oeste do país, devido às condições climáticas que favorecem o cultivo e a área nativa da espécie. Neste contexto, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o principal estado produtor de erva-mate foi o Rio Grande do Sul, estando o cultivo presente em cerca de 14 mil propriedades rurais distribuídas em aproximadamente 258 municípios. Em 2018, o estado foi responsável pela produção de 232.971 mil toneladas de erva-mate, correspondente a 43% da produção brasileira, ou ainda, a 24% da produção mundial naquele ano. Na sequência, o Paraná produziu 214.309 toneladas (39%); Santa Catarina, 98.045 toneladas (18%); e Mato Grosso do Sul, 1.293 toneladas (menos de 1%).^{98,99}

2.1.6.2. Mercado Internacional

No que diz respeito ao mercado internacional, segundo os dados da *The Observatory of Economic Complexity*, a erva-mate foi o 1114º produto mais comercializado no mundo em 2020, movimentando US\$ 230 milhões. Neste contexto, os principais países exportadores (**Figura 7a**) foram: a Argentina, com US\$ 89 milhões (39.1%); Brasil, com US\$ 88 milhões (38.3%); e Paraguai, com US\$ 27 milhões (11,9%). Por outro lado, os maiores importadores (**Figura 7b**) foram: Uruguai e Síria, ambos com US\$ 62 milhões (27,1%); Argentina, com US\$ 34 milhões (15%); Chile, com US\$ 14 milhões (6%); e Espanha, com US\$ 8 milhões (3,3%).¹⁰⁰

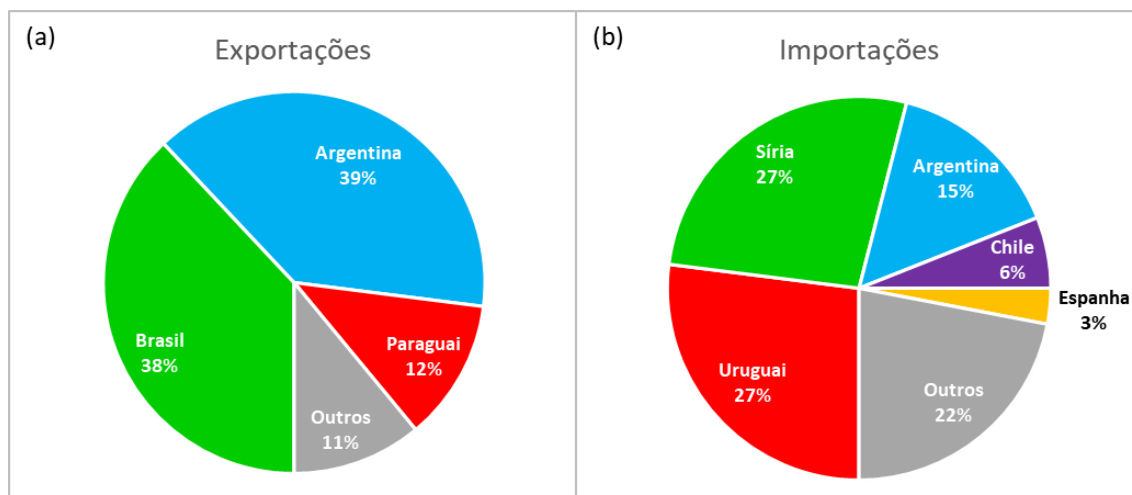


Figura 7: Comércio internacional de erva-mate em 2020. Principais países **(a)** exportadores e **(b)** importadores de erva-mate no mundo. Adaptado de OEC (2022).¹⁰⁰

Segundo dados disponibilizados pelo Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços,¹⁰¹ os principais países que importam a erva-mate brasileira são Uruguai, Chile, EUA, França e Espanha. Neste contexto, os principais estados exportadores brasileiros de erva-mate em 2017, foram: Rio Grande do Sul, US\$ 64,2 milhões em vendas (81,4%); Paraná, com US\$ 7,8 milhões (9,9%); e Santa Catarina, com US\$6 milhões.

2.1.7. Metabólitos Secundários em Erva-Mate

O metabolismo representa o conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente nas células dos seres vivos, enquanto os compostos químicos que são formados, degradados ou transformados recebem o nome de metabólitos. Estes, nos vegetais, podem ser classificados em dois grandes grupos: primários e secundários.¹⁰²

Os metabólitos primários compreendem os compostos essenciais a todos os seres vivos, com funções vitais bem definidas. Dessa forma, uma vez que todos os seres derivaram de um precursor comum, as principais macromoléculas do metabolismo primário (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) são essencialmente as mesmas, seja em um organismo vegetal ou animal, possuindo funções estruturais e de armazenamento de energia. Em contrapartida, os metabólitos secundários são produzidos mediante rotas biossintéticas complexas e, muitas vezes, desconhecidas, a partir dos metabólitos primários. Em contraste ao primeiro grupo, os metabólitos secundários são produzidos em pequenas quantidades, e nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal, sendo geralmente responsáveis por proteger a planta contra herbívoros (conferindo sabor amargo às folhas), ataque de patógenos (produzindo toxinas inseticidas), bem como beneficiá-la na competição com outros vegetais, favorecendo a atração de polinizadores, conferindo cor a flores e frutos. Além disso, ao contrário dos primários, não estão presentes em todos os vegetais, sendo constituintes químicos extremamente diversos. Dessa forma, cada família, gênero, e espécie possui uma composição química característica, podendo, inclusive, ser utilizadas como caracteres taxonômicos na classificação das plantas.¹⁰²⁻¹⁰⁶

Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente, sendo assim sua síntese afetada pelas condições ambientais. Os principais fatores que influenciam a produção de metabólitos nas plantas são a sazonalidade, a temperatura, a disponibilidade hídrica, a radiação ultravioleta, poluição atmosférica e intensidade de luz solar.¹⁰⁷

Contudo, esses compostos despertam interesse não apenas por suas atividades biológicas exercidas nas plantas sob estímulos ambientais, mas também por sua atividade farmacológica, sendo capazes de interferir a nível molecular no organismo humano. Além disso, a humanidade tem usado os metabólitos secundários para vários fins, tais como corantes, flavorizantes, fragrâncias, estimulantes, alucinógenos, inseticidas, venenos e agentes terapêuticos.^{102,108}

No que diz respeito à composição química das folhas de erva-mate, esta apresenta-se reconhecidamente complexa, uma vez que vários metabólitos secundários já foram observados. Dentre estes, pode-se destacar os terpenos, fenilpropanoides, polifenóis (flavonoides e ácidos fenólicos) e alcaloides (metilxantinas). Além disso, a composição química da erva-mate pode variar de acordo com o estágio evolutivo da planta, a época da colheita, as características climáticas, as condições do solo e do clima. As etapas do processamento industrial também podem influenciar nos teores de metabólitos presentes na erva-mate.¹⁰⁹⁻¹¹⁸ No que diz respeito à origem biossintética, conforme pode ser visualizado na **Figura 8**, a origem dos principais metabólitos secundários da erva-mate, a exceção das metilxantinas, pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato.

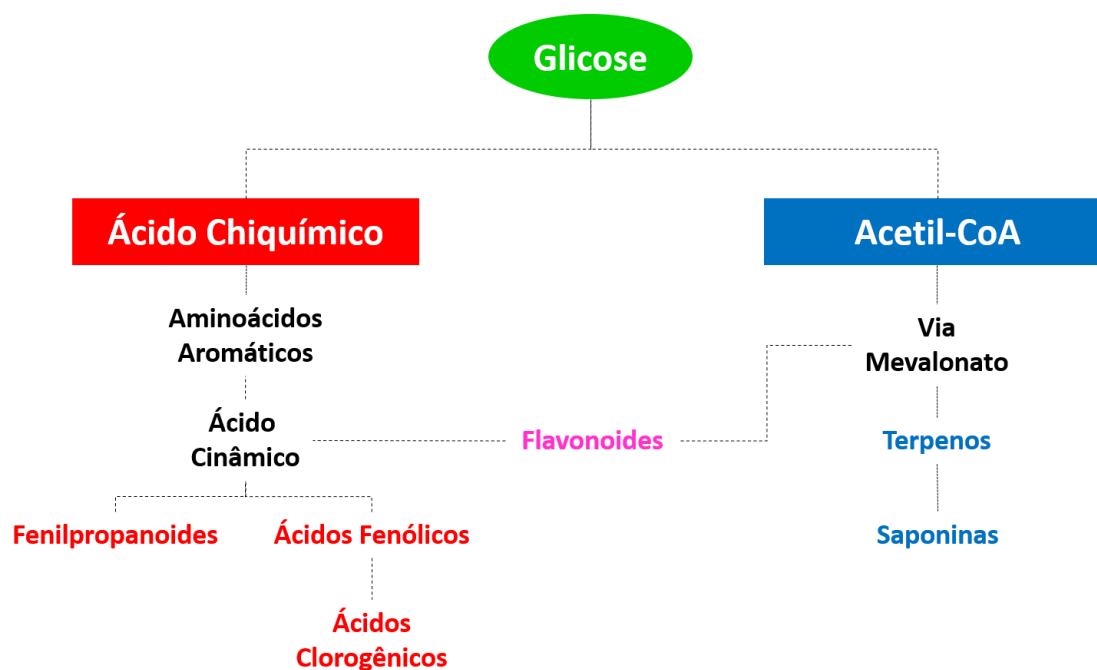


Figura 8: Resumo da biossíntese de alguns metabólitos secundários da erva-mate.

2.1.7.1. Terpenos

Os terpenos, também denominados terpenoides, consistem em compostos que constituem uma classe de produtos naturais, formados pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos, que apresentam uma grande variedade estrutural e funcional. A classificação dos terpenos pode ser feita de acordo com o número de unidades de isopreno que vão se ligando entre si, orientadas em sentido cabeça-cauda, podendo ser: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), entre outros. Contudo, embora o isopreno seja produzido naturalmente, ele não está envolvido diretamente na formação dos terpenos, sendo um produto oriundo do metabolismo da acetilcoenzima A (acetil-CoA).¹¹⁹⁻¹²²

Conforme pode ser visualizado na **Figura 9**, a acetil-CoA pode sofrer uma condensação aldólica com uma molécula de acetoacetil-CoA, seguida de uma hidrólise à 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA, que é reduzida a mevalonato. Este, por sua vez, após sofrer reações de piro-fosforilação, descarboxilação e desidratação, é convertido a isopentenil-pirofosfato (IPP, do inglês *Isopentenyl*

Pyrophosphate), chamado também de isopreno ativo, a unidade básica na formação de terpenoides e esteroides. A condensação da molécula de IPP com seu isômero dimetilalil-pirofosfato (DMAPP, do inglês *Dimethylallyl Pyrophosphate*), mediante a ação catalítica da enzima pirofosfato de geranila sintase, forma *trans*-geranil-pirofosfato (GPP, do inglês *Geranyl Pyrophosphate*), que, por meio da ação enzimática das monoterpeno sintases, forma toda a diversidade de monoterpenos (C10).^{102,123,124}

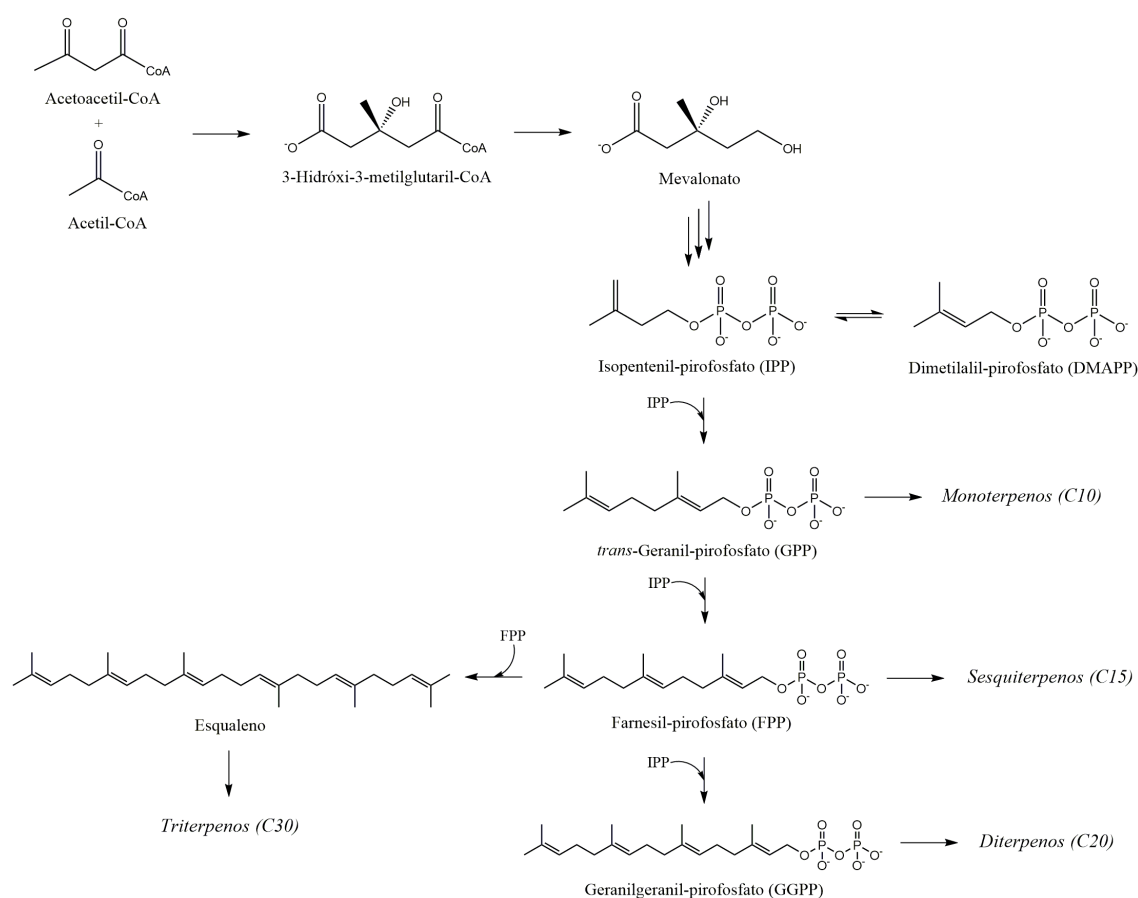


Figura 9: Biossíntese dos terpenos e esteroides. Adaptado de Simões (2007).

Os mecanismos de reação (**Figura 10**) de todas as monoterpeno sintases iniciam-se com a ionização do substrato de GPP. O carbocátion geranil resultante pode sofrer uma série de ciclizações, trocas de hidretos e rearranjos antes que a reação seja terminada por desprotonação ou adição de um nucleófilo. Neste contexto, para que ocorra a formação de monoterpenos cíclicos, primeiramente é necessário que haja a isomerização do cátion geranil a

um intermediário catiônico linalil que, por sua vez, possui capacidade de ciclizar. A partir da síntese da espécie cíclica inicial, o cátion α -terpinil, iniciam-se as possibilidades de ciclizações secundárias, responsáveis pela formação dos terpenos cíclicos. Entretanto, aproximadamente um terço das enzimas monoterpene sintases convertem o substrato GPP em produtos acíclicos. O mecanismo dessas reações também procede pela formação do cátion geranyl, entretanto, é seguido de perda de prótons para formar (*E*)- β -ocimeno e mirceno, por exemplo, ou adição de água para formar geraniol ou linalol. Além disso, o linalol, mirceno e (*E*)- β -ocimeno podem ser formados a partir do cátion linalil. Devido seu baixo peso molecular, os monoterpene costumam ser voláteis, sendo um dos principais constituintes dos óleos essenciais e das essências voláteis, podendo ser isolados mediante hidrodestilação. Atualmente, são conhecidos mais de 1.000 monoterpeneídeos de ocorrência natural.^{102,123,124}

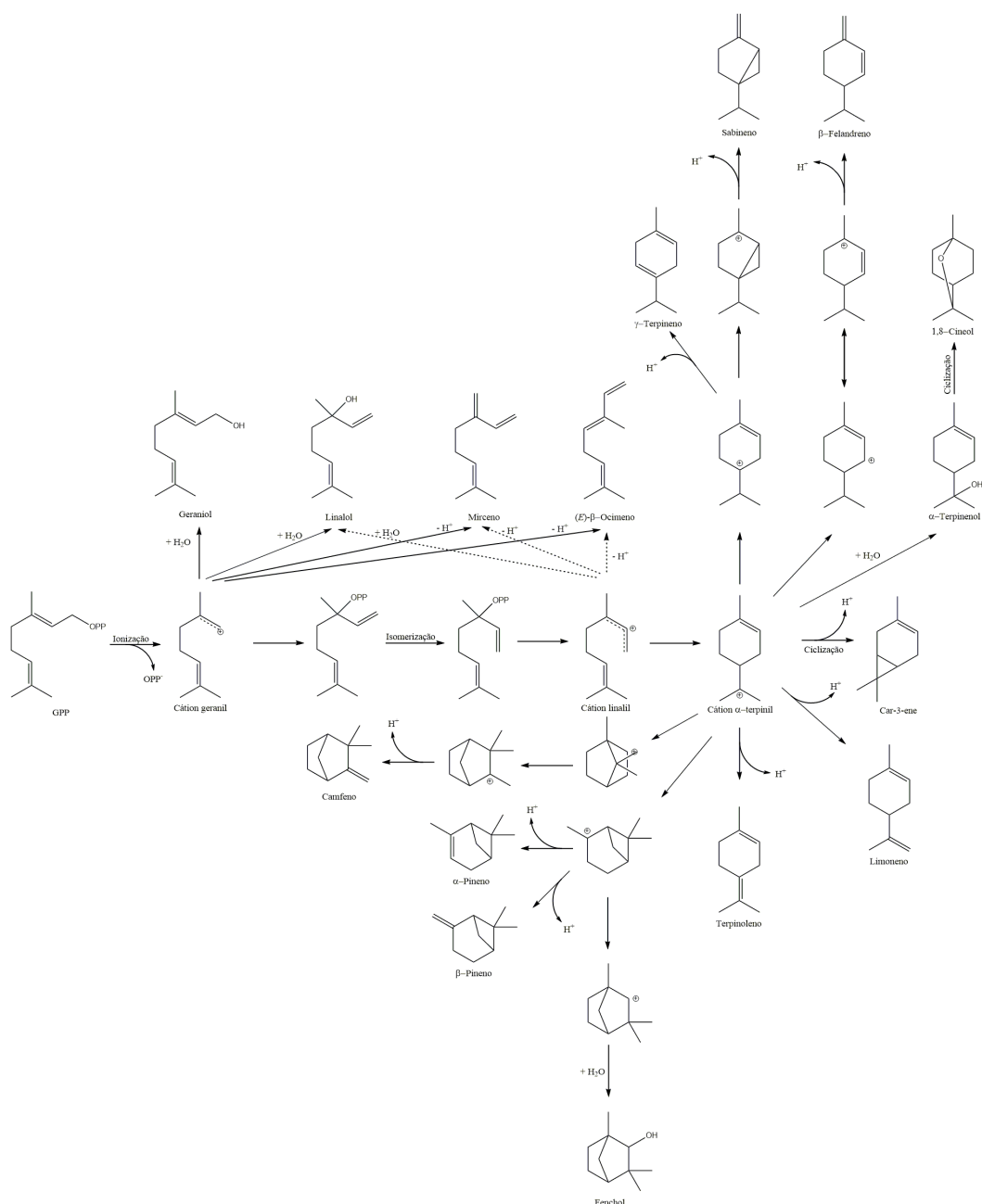


Figura 10: Rotas biossintéticas de alguns monoterpenos cíclicos e acíclicos. ¹²³

O GPP, ainda, pode reagir com IPP, resultando em farnesil-pirofosfato (FPP, do inglês *Farnesyl Pyrophosphate*), precursor de sesquiterpenos. A formação destes, a partir de FPP, é catalisado por enzimas sesquiterpeno sintases, empregando mecanismos de reação similares aos da formação de monoterpenos. No entanto, a cadeia carbônica mais longa do FPP e a presença de três ligações duplas, em vez de duas, aumentam bastante a diversidade estrutural dos sesquiterpenos, quando comparados aos monoterpenos, sendo

conhecidos mais de 5000 sesquiterpenos na natureza. Vale destacar que, assim como os monoterpenos, os sesquiterpenos são uma das principais substâncias que compõem os óleos voláteis de plantas, importantes nas indústrias de fragrâncias, alimentícia e farmacêutica, devido sua reconhecida atividade biológica.^{102,123,124}

Por fim, se mais uma molécula de IPP for adicionada ao FPP, ocorrerá a formação de geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP, do inglês *Geranylgeranyl Pyrophosphate*), a partir do qual formam-se os diterpenos. Paralelamente, se ocorrer a dimerização de FPP, ocorre a produção de esqualeno, precursor da maioria dos triterpenos, tais como as saponinas.^{102,124}

As saponinas são um grupo de compostos formados por um esqueleto lipofílico, que pode ser esteroidal (encontrada principalmente em monocotiledôneas) ou triterpênico (comum em dicotiledôneas), e uma porção hidrofílica, formada por um ou mais açúcares e/ou ácidos urônicos. As saponinas são caracterizadas por serem altamente solúveis em água, possuindo sabor amargo, e sua natureza anfipática confere a esta classe a capacidade de redução da tensão superficial da água e sua ação detergente, além de sua propriedade emulsificante e formadora de micelas.¹²⁵

Na erva-mate, aproximadamente 5 a 10% da massa das folhas secas são de saponinas. Além disso, uma característica que permite diferenciar as saponinas de *Ilex paraguariensis* das outras espécies do gênero *Ilex*, é o fato de que as saponinas encontradas nas folhas da primeira contém, principalmente, núcleos de ácido ursólico (**Figura 11a**) e oleanólico (**Figura 11b**).¹²⁶

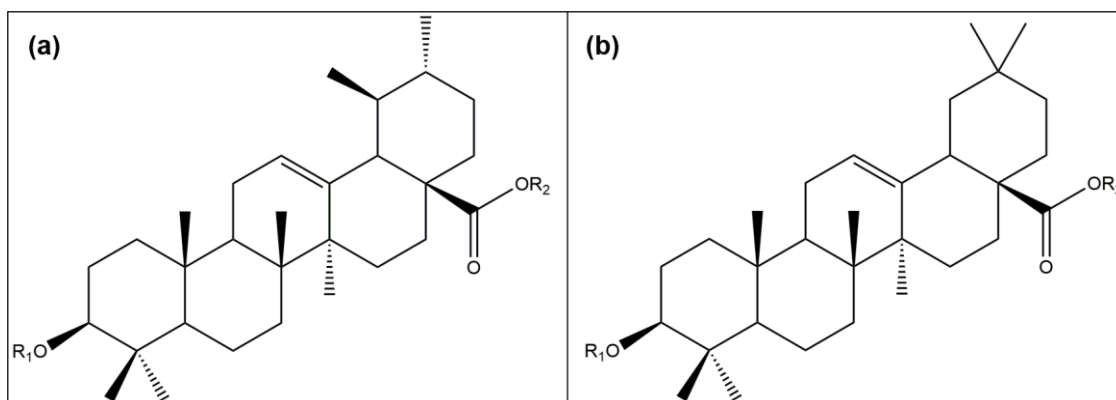


Figura 11: Agliconas das saponinas de *Ilex paraguariensis*, derivadas do (a) ácido ursólico e (b) oleanólico.

2.1.7.2. Fenilpropanoides

Os fenilpropanoides consistem em metabólitos secundários derivados do metabolismo da glicose (**Figura 12**). Mediante a condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato, é formado o ácido chiquímico. Este, por sua vez, pode reagir com uma molécula de fosfoenolpiruvato, formando ácido corísmico, precursor do aminoácido aromático fenilalanina. Este, pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), perde uma molécula de amônia, originando o ácido cinâmico, que é o precursor da maioria dos compostos classificados como fenilpropanoides (ArC3). Esta classe consiste em compostos aromáticos com uma cadeia lateral de 3 de carbonos, presentes em óleos voláteis.¹⁰²

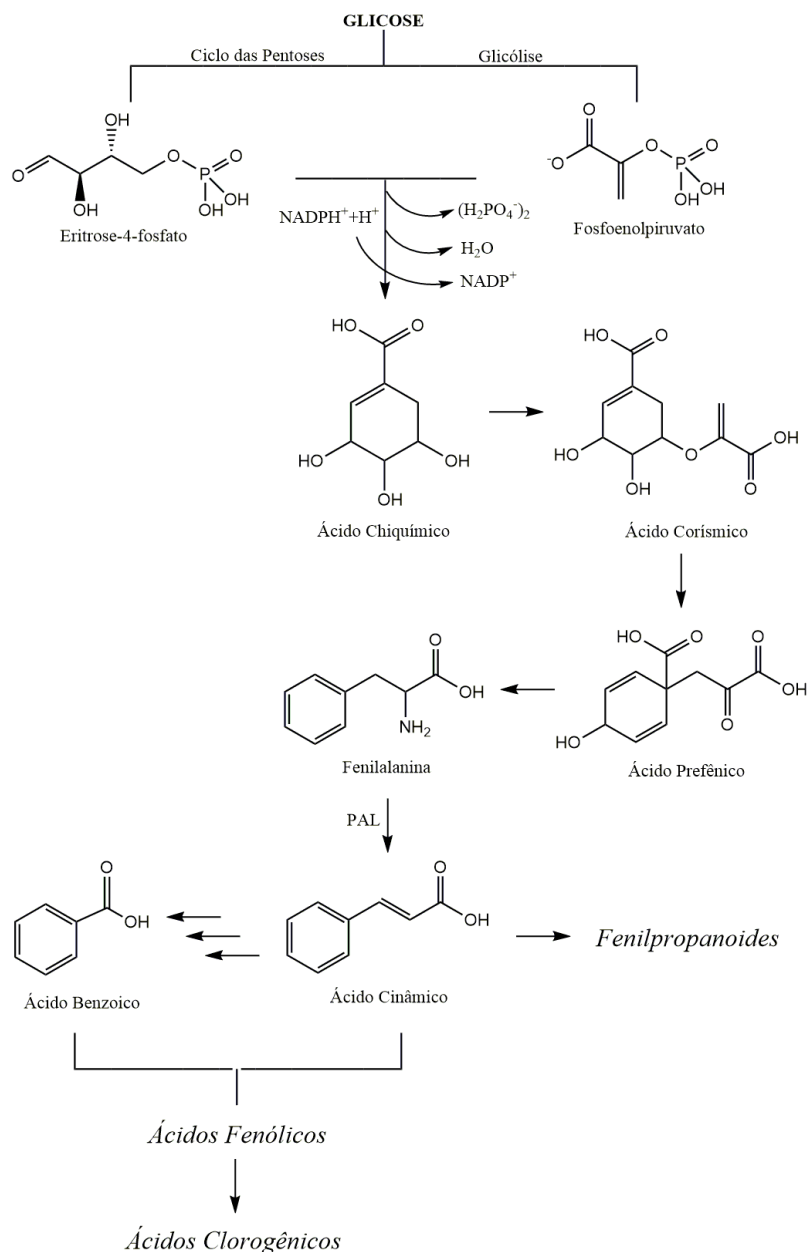


Figura 12: Metabólitos secundários oriundos do metabolismo da glicose via ácido chiquímico.¹⁰²

Muitos fenilpropanoides podem atuar como antioxidantes devido aos múltiplos grupos hidroxila e ligações duplas insaturadas presentes nas suas estruturas podendo, desta forma, reagir com radicais e íons oxidativos nas células. O anel benzênico nos fenilpropanoides permite a estes compostos cruzar membranas celulares e exercer suas atividades biológicas e, por esta razão, muitos medicamentos modernos são derivados de compostos fenólicos de plantas.¹²⁷

2.1.7.3. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis, compreendem um grupo complexo de metabólitos secundários presentes no reino vegetal. Esta classe abrange, aproximadamente, 8000 compostos de ocorrência natural, todos possuindo uma característica estrutural comum, um anel aromático (C₆), no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila.^{3,102,128,129} Neste contexto, os polifenóis apresentam propriedades de óxido-redução, atuando na absorção e neutralização de radicais livres, uma vez que possuem elétrons π em sua estrutura que estabilizam o radical formado pela oxidação do fenol.¹³⁰

Estes compostos desempenham diversos papéis na fisiologia da planta e estão, geralmente, relacionados às funções alelopáticas, como defesa contra a radiação ultravioleta e agentes patogênicos e ataque de herbívoros. Os compostos fenólicos também estão envolvidos no crescimento e morfogênese da planta, entre outras funções. De um ponto de vista sensorial, os polifenóis influenciam na qualidade dos alimentos de origem vegetal, afetando variáveis como amargor, adstringência, sabor, odor, cor e estabilidade oxidativa.¹³¹⁻¹³⁴

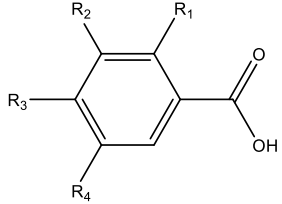
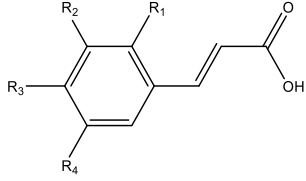
De acordo com a estrutura química, podem ser realizadas distinções entre os tipos de compostos fenólicos e estes podem ser classificados em 2 grandes grupos: os ácidos fenólicos e os flavonoides.¹⁰²

2.1.7.3.1. Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos distinguem-se em duas classes: os derivados do ácido benzoico e os derivados do ácido cinâmico (**Tabela III**). Os derivados do ácido benzoico incluem, por exemplo, os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatequínico, vanílico e sirínico, que possuem em comum a estrutura C₆-C₁. Os derivados do ácido cinâmico consistem em compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos (C₆-C₃), tendo os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico como principais representativos da classe.¹³⁵⁻¹³⁹ Vale ressaltar que os ácidos cinâmicos possuem uma ligação dupla, podendo existir

sob duas formas isoméricas, por exemplo, ácido *cis*-cinâmico (isômero *Z*) e ácido *trans*-cinâmico (isômero *E*). Os derivados do ácido cinâmico mais encontrados na natureza possuem conformação *trans* e são os mais estáveis. No entanto, esses dois isômeros podem se transformar um no outro pela influência da luz em meio aquoso.¹⁰²

Tabela III: Subclasses de ácidos fenólicos.¹⁴⁰

Classes	Exemplos	Estrutura
Ácidos benzoicos	Ácido Salicílico: $R_1 = OH$	
	Ácido Gentísico $R_1 = R_4 = OH$	
	Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzoico: $R_3 = OH$	
	Ácido Protocatequínico: $R_2 = R_3 = OH$	
	Ácido Vanílico: $R_2 = OCH_3, R_3 = OH$	
	Ácido Gálico: $R_2 = R_3 = R_4 = OH$	
Ácido Siríngico: $R_2 = R_4 = OCH_3, R_3 = OH$		
Ácidos Cinâmicos	Ácido <i>trans</i> -Cinâmico: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$	
	Ácido <i>o</i> -Cumárico: $R_1 = OH$	
	Ácido <i>m</i> -Cumárico: $R_2 = OH$	
	Ácido <i>p</i> -Cumárico: $R_3 = OH$	
	Ácido Cafeico: $R_2 = R_3 = OH$	
	Ácido Ferúlico: $R_2 = OCH_3, R_3 = OH$	
Ácido Sinápico: $R_2 = R_4 = OCH_3, R_3 = OH$		

Os ácidos fenólicos, além de ocorrerem sob sua forma natural, podem também ligar-se entre si ou com outros compostos. A família de compostos mais importantes destas combinações, devido a sua alta bioatividade, são os ácidos clorogênicos (CGAs, do inglês *chlorogenic acids*), que surgem da reação de esterificação do ácido quínico com um dos derivados do ácido cinâmico, sendo os mais comuns: ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico (**Figura 13**).¹⁴¹⁻

145

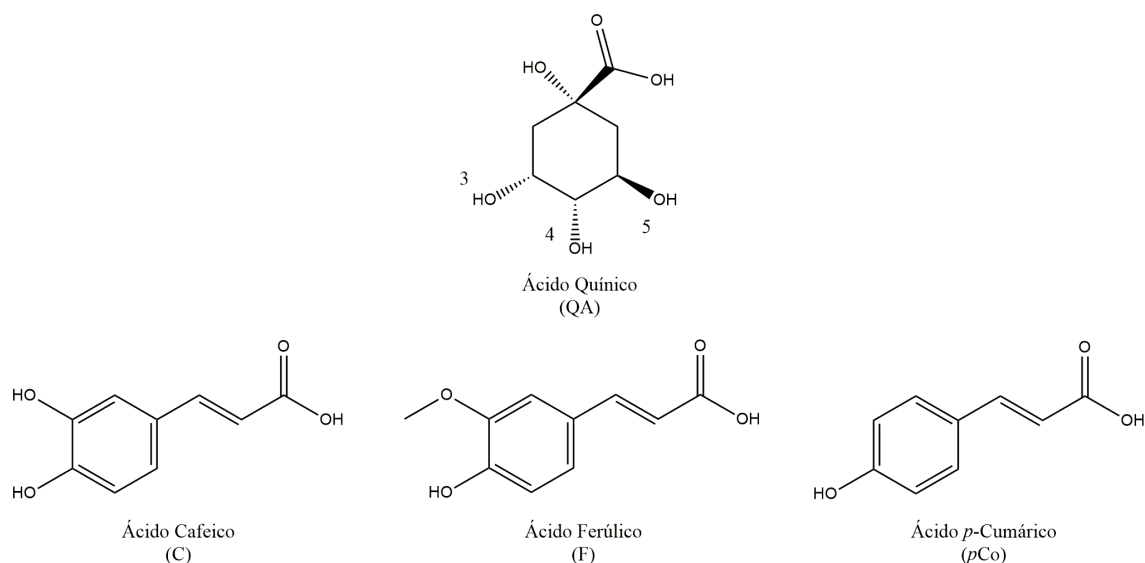


Figura 13: Ácido cinâmico com indicação das posições de esterificação e principais derivados cinâmicos para produção de CGAs: ácido cafeico (C), ácido ferúlico (F) e ácido *p*-cumárico (*p*Co).

O grupo de ácidos clorogênicos mais abundante na natureza são os isômeros do ácido cafeoilquínico (CQA, do inglês *caffeoylquinic acid*), formados pela esterificação em diferentes posições do ácido quínico com o ácido cafeico, que forma os seguintes isômeros (**Figura 14**): ácido 3-*O*-cafeoilquínico (3-CQA), ácido 4-*O*-cafeoilquínico (4-CQA) e ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA).¹⁴⁶ O 5-*O*-cafeoilquínico é o representante mais abundante e mais importante da série dos CGA, sendo encontrado em grande concentração em muitos vegetais. Neste contexto, estima-se que uma pessoa consome, em média, 1 g de 5-CQA por dia, uma vez que encontra-se presente em infusões e em vários alimentos.¹⁴⁷

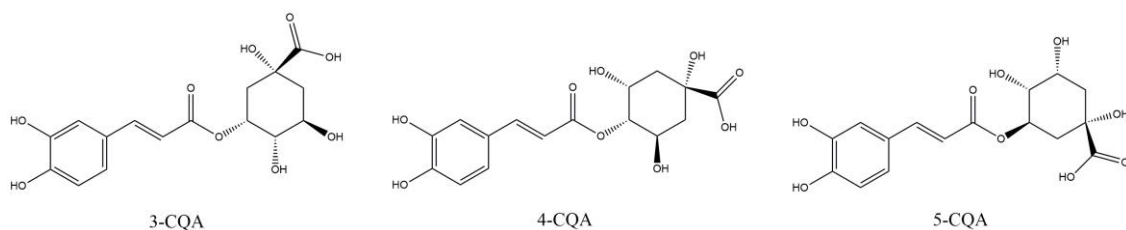


Figura 14: Ácidos cafeoilquínicos (CQAs).

Outro grupo de ácidos clorogênicos são aqueles formados pela reação de esterificação entre os ácidos quínico e ferúlico, que formam três isômeros do

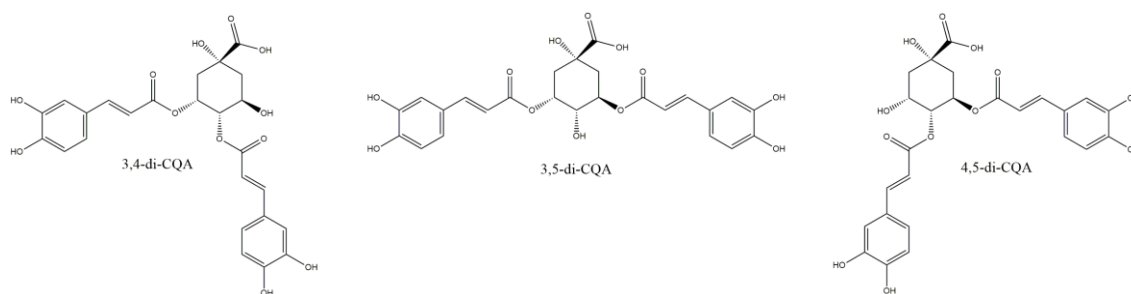


Figura 17: Ácidos dicafeoilquínicos (di-CQAs).

De forma análoga, a reação também pode ocorrer entre duas moléculas de ácido ferúlico e uma de ácido quínico, formando os isômeros do ácido diferuloilquínico (di-FQAs, do inglês *diferuloylquinic acids*): ácido 3,4-di-O-diferuloilquínico (3,4-di-FQA), ácido 3,5-di-O-diferuloilquínico (3,5-di-FQA) e ácido 4,5-di-O-diferuloilquínico (4,5-di-FQAs).¹⁴⁶

Existem diferentes propostas descrevendo a via biossintética dos ácidos clorogênicos, considerando que estes metabólitos secundários façam parte da via dos fenilpropanoides, conforme pode ser conferida na **Figura 13**, na seção **2.1.7.2**. Neste contexto, alguns estudos demonstram que a produção de fenilpropanoides em diferentes tecidos vegetais seja estimulada, principalmente, pela incidência de raios UV, podendo também ser alterada pela disponibilidade hídrica. A incidência de raios UV e altas temperaturas influenciam a expressão gênica de enzimas da via biossintética dos fenilpropanoides, como a PAL, primeira enzima desta via, gerando acúmulo de substâncias C6-C3 e, conseqüentemente, de ácidos clorogênicos.^{148–153}

De um ponto de vista econômico, os ácidos clorogênicos possuem grande importância, estando presentes em diversos vegetais, e sendo responsáveis por características organolépticas relevantes em determinados alimentos, como, por exemplo, o amargor característico da erva-mate. Além disso, compostos naturais com alta atividade antioxidante, como os CGAs, possuem potencial para serem utilizados como conservantes em alimentos e cosméticos.¹⁵⁴ Embora os antioxidantes sintéticos sejam eficazes na inibição do processo oxidativo, diversos efeitos adversos têm sido associados à sua ingestão.¹⁵⁵ Os antioxidantes sintéticos mais utilizados, como hidroxitolueno butilado e hidroxianisol butilado, estão relacionados a danos à saúde, como o aumento

hepático e da atividade enzimática microssomal, além de converterem algumas substâncias ingeridas a tóxicas e cancerígenas.¹⁵⁶

No que diz respeito aos efeitos benéficos à saúde, atividades farmacológicas também foram atribuídas aos ácidos clorogênicos, tanto na ingestão pela dieta, quanto na administração terapêutica. Neste contexto, diversos estudos relatam propriedades como ação antioxidante,¹⁵⁷⁻¹⁶⁰ hepatoprotetora,¹⁶¹⁻¹⁶³ cardioprotetora,^{164,165} antidiabética,^{166,167} anti-inflamatória,¹⁶⁸⁻¹⁷² neuroprotetora,¹⁷³⁻¹⁷⁶ antiartrítica,^{177,178} anti-HIV¹⁷⁹ e anticarcinogênica.¹⁸⁰⁻¹⁸² Esses compostos já evidenciaram a capacidade de modificar o metabolismo da glicose e lipídios, podendo inclusive atuar em sua absorção.¹⁸³⁻¹⁸⁹ Também foi constatada a ação dos ácidos clorogênicos em atenuar o estresse oxidativo e a inflamação na nefropatia diabética, atuando na proteção contra lesões renais diabéticas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.¹⁶⁶ Também foi verificado efeitos benéficos no gerenciamento de disfunções auditivas neurais causadas por diabetes em estudo realizado com ratos.¹⁹⁰ Ainda relacionado ao tratamento de diabetes, os ácidos clorogênicos possuem múltiplos mecanismos de ação propícios para o desenvolvimento de tratamentos altamente eficientes contra doenças metabólicas como essa, principalmente devido sua ação reguladora da glicose.¹⁹¹

Portanto, as principais propriedades medicinais da erva-mate são atribuídas ao seu alto conteúdo de compostos fenólicos.¹⁹²⁻¹⁹⁴ Cerca de 10% do peso do seu extrato seco são de derivados cafeoilquínicos, especialmente CQAs e di-CQAs.¹⁹⁵

2.1.7.3.2. Flavonoides

Os flavonoides constituem um dos grupos mais importantes e amplamente distribuídos de polifenóis na natureza. Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas e, dentre elas, podem-se citar: proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra o ataque de insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de polinizadores; antioxidantes; controle hormonal da planta; agentes alelopáticos; e inibidores de enzimas. Neste contexto, devido sua abundância relativa em quase todo o reino

vegetal, os flavonóides podem ser utilizados como marcadores taxonômicos e, como extensão dessa aplicação, podem ser utilizados na determinação do parentesco de híbridos e em determinação de novos cultivares.^{102,196-198}

Os flavonóides são encontrados em diversas formas estruturais, podendo ser divididos em até 13 classes com mais de 5000 compostos diferentes. Entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, que apresenta uma estrutura química difenilpropano (C6-C3-C6), que consiste em dois anéis aromáticos (A e B) unidos por um anel heterocíclico oxigenado (C), conforme pode ser observado na **Figura 18**. Os átomos de carbono desta estrutura recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C, e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o núcleo B.¹⁰²

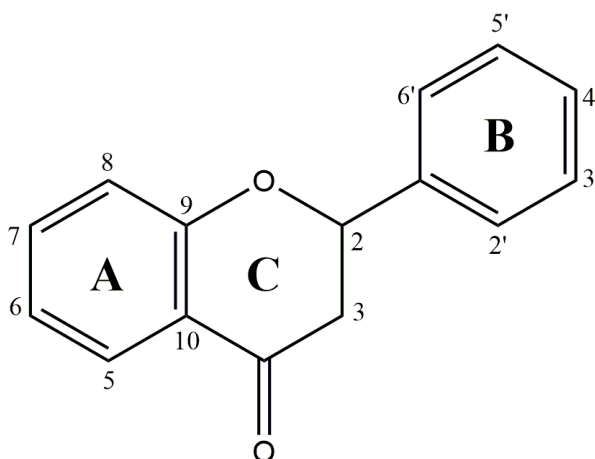


Figura 18: Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.¹⁰²

O esqueleto básico dos flavonóides resulta de duas rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico, via fenilpropanoides, e a do acetato, via ácido malônico. Conforme pode ser observado na **Figura 19**, a primeira rota produz a fenilalanina, precursora do ácido cinâmico que, conforme já mencionado, forma o ácido *p*-cumárico que, por sua vez é, responsável por um dos anéis aromáticos (anel B) e a ponte de três carbonos. A segunda rota, a do acetato, resulta no outro anel aromático (anel A) do esqueleto básico dos flavonóides.^{102,139,199,200}

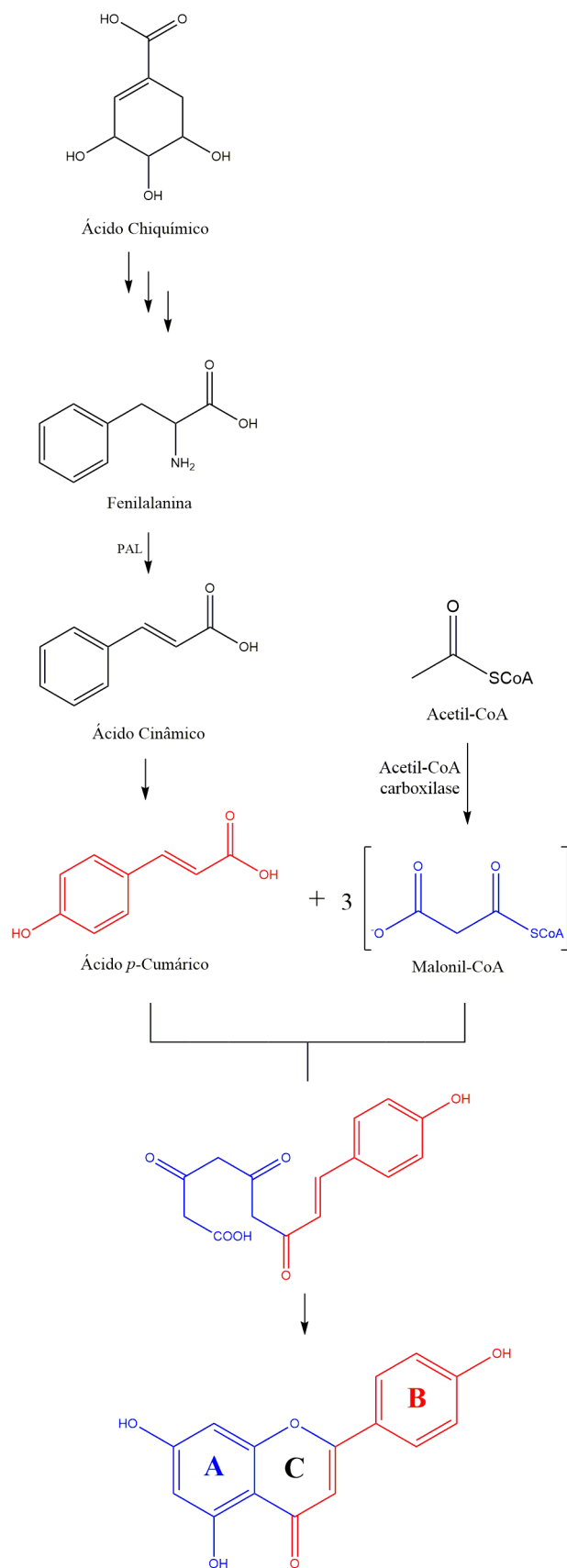


Figura 19: Biossíntese do núcleo fundamental dos flavonoides.¹⁰²

Os flavonoides apresentam grande diversidade estrutural que ocorrem em decorrência das pequenas modificações químicas na estrutura básica destes compostos, que podem ser por meio de hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, hidrogenação, malonilações e sulfatações. Em decorrência desta diversidade, os flavonoides são subdivididos em subclasses como, por exemplo, flavonas, flavononas, flavonóis, antocianidinas, isoflavonas, catequinas, entre outras (**Figura 20**).^{102,201-204}

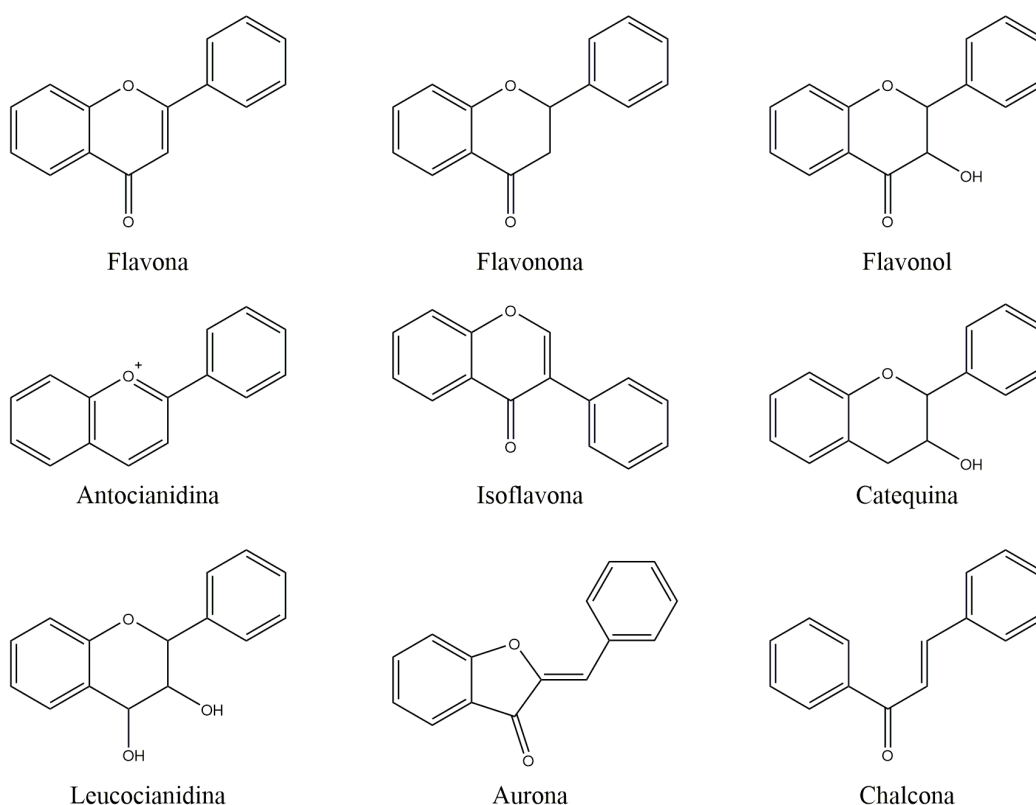


Figura 20: Estruturas genéricas das principais classes de flavonoides.²⁰⁵

Os flavonoides, com exceção às catequinas, são encontrados nas plantas principalmente na sua forma glicosilada, ou seja, ligados a moléculas de açúcares, geralmente com a molécula de açúcar ligada ao grupo hidroxila na posição C3 ou C7, enquanto as moléculas desprovidas de açúcares são denominadas agliconas.¹⁰²

Na erva-mate, os principais flavonoides relatados na literatura são a rutina, a quercetina, e o campferol, cujas propriedades farmacológicas envolvem efeitos antioxidantes e anticarcinogênica, além da redução de apetite.²⁰⁶

Também, cabe destacar a presença dos flavonóides glicosilados isoquercitrina, campferol-3-O-glicosídeo e campferol-3-O-rutinosídeo, que também apresentam atividade anticarcinogênica e antimutagênica.²⁰⁷

2.1.8. Metilxantinas

Metilxantinas são constituintes químicos importantes, presentes em vários alimentos estimulantes, como café, chá-da-índia, guaraná, erva-mate e chocolate. Nas folhas de erva-mate, especificamente, a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é a principal metilxantina (0,89 - 1,73%), seguida da teobromina - 3,7-dimetilxantina - (0,26 - 0,88%) e, em menor quantidade, um isômero da teobromina, a teofilina (1,3- dimetilxantina) (**Figura 21**),²⁰⁸ embora as condições e métodos de extração possuem uma forte influência no teor mensurado desses compostos.¹¹¹ Esses constituintes presentes na erva-mate, são responsáveis principalmente pela atividade estimulante ao sistema nervoso central¹⁰² e pelo aumento da utilização de gordura como fonte energética.²⁰⁹ O teor de cafeína presente na erva-mate também pode ser o responsável pela redução do peso corporal e da gordura abdominal de ratos.²⁰⁹

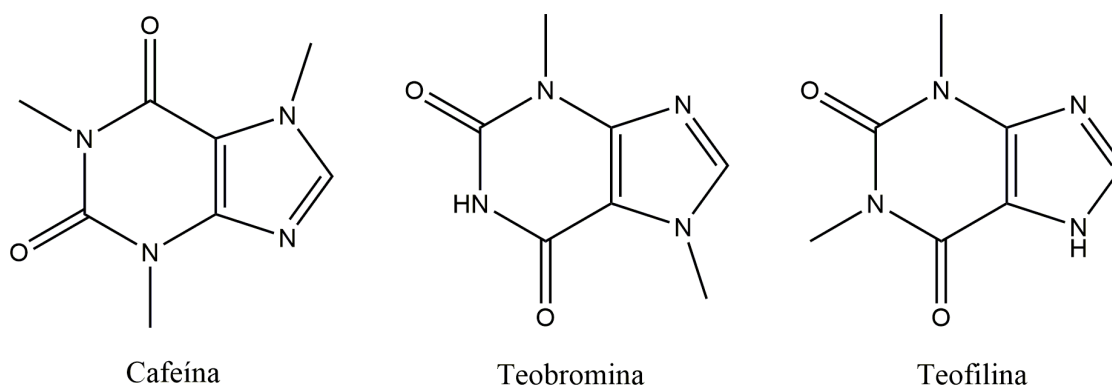


Figura 21: Metilxantinas da erva-mate: cafeína, teobromina e teofilina.

Dentre as metilxantinas, a cafeína destaca-se por ser mais estudada, sendo a substância psicoativa mais consumida no mundo.²¹⁰ Além da propriedade estimulante, a cafeína apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetiva,²¹¹ vasoconstritora periférica, relaxante muscular e

estimulante do miocárdio.²¹² A indústria de cosméticos utiliza a cafeína em produtos com ação anticelulite, por aumentar a microcirculação do sangue, e em produtos capilares, por estimular o crescimento de cabelo.²¹⁰

No que diz respeito a sua origem biogenética, uma vez que as metilxantinas não provém do metabolismo de aminoácidos, mas de bases púricas, apresentando caráter anfótero, as metilxantinas são geralmente consideradas como pseudoalcaloides. Em contrapartida, em decorrência de sua atividade biológica marcante, distribuição restrita e presença de nitrogênio heterocíclico, muitos autores classificam as metilxantinas como alcaloides purínicos.¹⁰²

2.1.9. Atividade Antioxidante da erva-mate

Uma das principais e mais conhecidas atividade biológica da erva-mate é a atividade antioxidante.²¹³ A oxidação da matéria orgânica ocorre, principalmente, mediante radicais livres, em um processo denominado autoxidação (**Figura 22**).²¹⁴ Este processo ocorre de forma similar, tanto em produtos orgânicos (alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos), quanto em organismos vivos. Os produtos da autoxidação (radicais livres e moléculas) são chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*).^{214,215}

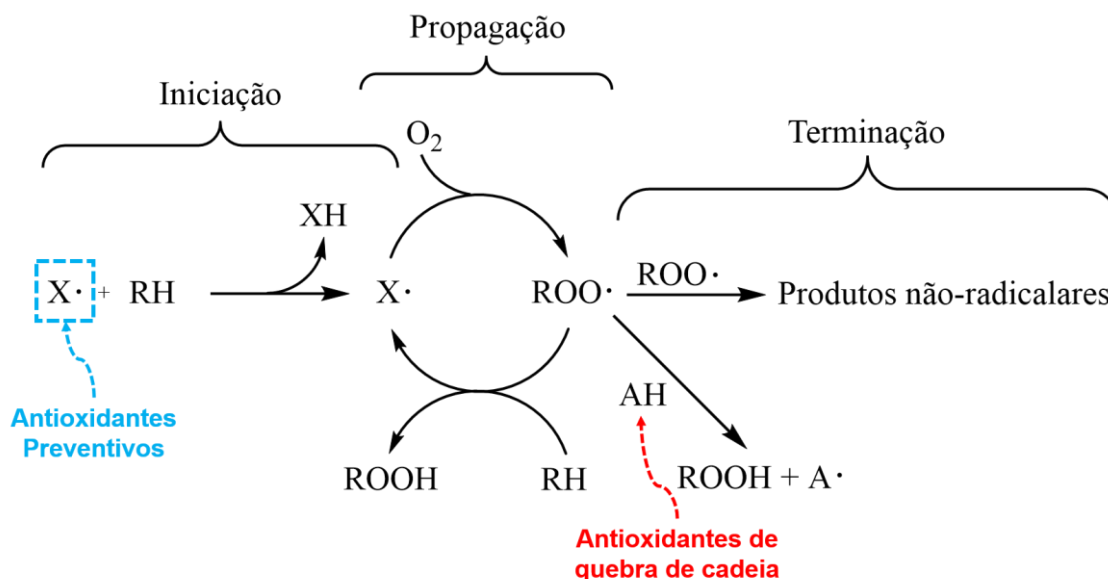


Figura 22: Reações do processo de autoxidação.²¹⁴

O processo de autoxidação é sempre iniciado por uma espécie radicalar $X\cdot$, com habilidade para reagir com um substrato RH , normalmente por abstração de um átomo de hidrogênio, gerando o radical alquílico $R\cdot$.^{214,216} Na etapa seguinte, denominada de propagação, a espécie radicalar formada irá reagir com oxigênio, gerando o radical peróxido ($ROO\cdot$) que, por sua vez, atacará outra molécula de substrato, dando origem ao hidroperóxido orgânico $ROOH$ (substrato oxidado) e um novo radical alquílico. Esta etapa de propagação é cíclica, e ocorre até o momento em que dois radicais reagem entre si, formando produtos estáveis, findando o processo, na etapa de terminação.²¹⁴

As ROS são produtos do metabolismo celular de plantas e animais, nos quais desempenham papéis fundamentais para a sobrevivência celular.²¹⁵ Entretanto, o desequilíbrio entre sua produção e eliminação gera o processo denominado estresse oxidativo. Neste contexto, o estresse oxidativo contínuo pode levar à inflamação crônica, e esta, por sua vez, a uma série de processos fisiopatológicos como o envelhecimento, o câncer, a diabetes, a aterosclerose, as doenças cardiovasculares, neurológicas e pulmonares, entre outros.^{214,215} Diante disso, a maneira mais efetiva de proteger as moléculas da reatividade do oxigênio é mediante a utilização de antioxidantes,¹⁵⁶ que consistem em substâncias endógenas ou exógenas que, mesmo em quantidades relativamente

pequenas, tem a habilidade de retardar ou inibir a autoxidação de moléculas oxidáveis, tais como lipídeos, proteínas e carboidratos.²¹⁴

Compostos antioxidantes podem ser classificados como diretos ou indiretos. Dessa forma, antioxidantes diretos consistem em espécies capazes de interromper ou prejudicar o processo de autoxidação.²¹⁴ Estes podem atuar preventivamente, interferindo na etapa de iniciação da reação, ou ainda, interrompendo a reação, competindo com os reagentes do estágio de propagação, porém de forma mais rápida que o substrato oxidável. Entretanto, vale notar que os produtos reacionais dos antioxidantes não propagam a cadeia da autoxidação.^{156,214} Em contrapartida, os indiretos atuam induzindo a expressão de antioxidantes endógenos, por exemplo, a expressão de enzimas antioxidantes.²¹⁴

Neste contexto, apesar dos componentes celulares do corpo humano apresentar mecanismos endógenos para combater o estresse oxidativo, esse sistema de defesa antioxidante nem sempre é suficiente para neutralizar os agentes oxidantes.²¹⁷ Dessa forma, a utilização de antioxidantes exógenos derivados da dieta, como os compostos fenólicos presentes na erva-mate, consiste em uma importante estratégia na proteção contra doenças crônicas,²¹⁸ sendo os antioxidantes naturais diretos mais importantes e efetivos.²¹⁴ Devido a sua estrutura química, cada molécula desta classe tem a capacidade de sequestrar duas moléculas radicalares peroxil, atuando como antioxidantes diretos.^{128,214}

Vários autores pesquisaram a atividade antioxidante e quimioprotetora de extratos a base de erva-mate, relacionada à presença de derivados cafeicos e outros polifenóis. Estes estudos demonstram que o consumo agudo de infusão de erva-mate inibe a propagação da oxidação de lipoproteínas de alta densidade (HDL, do inglês *High Density Lipoproteins*), induzida pelos radicais peroxil, mediante a inibição da peroxidação de lipídios^{219,220}, bem como a oxidação do DNA.¹ A atividade antioxidante promovida pelo consumo agudo da infusão de erva-mate demonstra um aumento na capacidade antioxidante e na resistência à peroxidação lipídica em indivíduos saudáveis.²²¹ O consumo de erva-mate atenua o estresse oxidativo em indivíduos diabéticos e pré-diabéticos,

contribuindo, assim, para a prevenção das complicações relacionadas à enfermidade.²²²

2.2. EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

2.2.1. Extração Assistida por Ultrassom

O ultrassom consiste em uma das tecnologias ditas emergentes, desenvolvidas a fim de minimizar o processamento, maximizar a qualidade e garantir a segurança na indústria alimentícia.²² Esta técnica mostra-se eficiente em processos de extração, emulsificação, homogeneização, desidratação, pasteurização, desgaseificação, ativação e inativação de enzimas, entre outros.¹⁹ A indústria alimentícia vem aplicando processos assistidos por ultrassom desde os anos cinquenta, utilizando a tecnologia, atualmente, para a extração de alimentos, aditivos farmacêuticos e produção de bebidas.^{20,22}

Neste contexto, a extração assistida por ultrassom (UAE, do inglês *Ultrasound-Assisted Extraction*) consiste em uma técnica verde e viável economicamente, que reduz drasticamente os tempos de extração, além de elevar o rendimento e a qualidade dos produtos, quando comparada às técnicas clássicas de extração sólido-líquido.²⁰ Portanto, devido suas diversas vantagens, a técnica tem sido aplicada à extração de compostos bioativos de plantas, tais como os compostos fenólicos e as metilxantinas, substituindo métodos convencionais que, muitas vezes, levam horas ou dias para completar o procedimento extrativo.¹⁹⁻²¹

A técnica de UAE consiste no emprego da energia de ondas acústicas, transmitidas a uma frequência acima de 20 kHz que, a partir da propagação destas no líquido extrator, criam variações de pressão, mediante um ciclo de compressão e expansão, provocando o fenômeno de formação espontânea de bolhas em um líquido abaixo do seu ponto de ebulição, denominado cavitação acústica (**Figura 23**). Durante a cavitação, ocorre a gênese, expansão e implosão de microbolhas de vapor e gases no líquido. Esta implosão gera rápida compressão adiabática dos gases e vapores dentro das bolhas e, como consequência, ocorre a elevação da temperatura e pressões do meio. Em

extrações de matrizes vegetais, esse fenômeno gera a ruptura das paredes celulares das plantas, facilitando o acesso ao conteúdo celular, o aumento da solubilidade do analito, a penetração do solvente extrator na matriz da amostra e a maior superfície de contato entre a fase sólida e líquida, promovendo uma maior transferência de calor e massa, obtendo uma melhor extração. Neste contexto, a eficiência da UAE é influenciada por fatores como: temperatura, natureza do solvente e tempo de extração.²³⁻²⁵

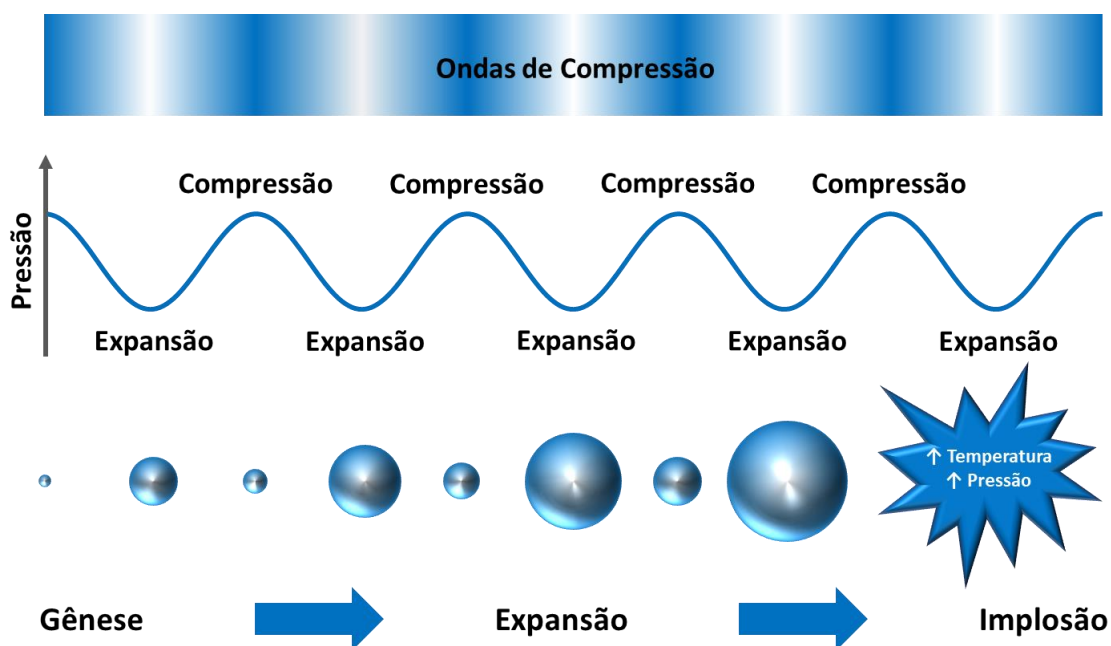


Figura 23: Princípio da cavitação ultrassônica.

2.2.2. Extração por Hidrodestilação

O princípio da técnica de hidrodestilação baseia-se na Lei de Dalton, que estabelece que a pressão de vapor total de um sistema composto por dois líquidos imiscíveis é igual à soma das suas pressões de vapor parciais. Dessa forma, como os líquidos são imiscíveis, cada qual exerce a mesma pressão de vapor que exerceria sozinho, quaisquer que sejam as suas quantidades relativas. Logo, sob pressão constante, o sistema é mais volátil do que qualquer um de seus componentes e sua temperatura de ebulição é inferior à temperatura de ebulição dos componentes puros.²²³

Em um sistema constituído por água e óleo essencial, o ponto de ebulição da mistura sob pressão atmosférica será um pouco menor do que 100 °C. Neste contexto, quando uma mistura de material vegetal e água entra em ebulição, os vapores liberados são posteriormente condensados, e os produtos obtidos são o óleo volátil e a fração aquosa, imiscíveis e separados pela sua diferença de massa específica.¹⁰² Portanto, a hidrodestilação consiste em uma técnica simples e de baixo custo, que utiliza somente água como solvente. Em escala laboratorial, o equipamento de Clevenger (**Figura 24**) é um dos mais utilizados para extrações de óleos voláteis.^{224–233}

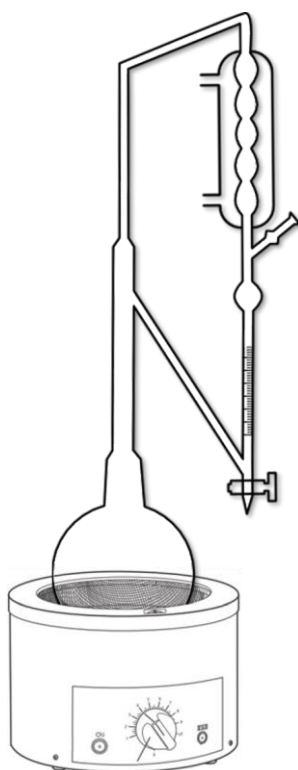


Figura 24: Esquema representativo de um aparato de Clevenger.

2.3. ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Existem vários métodos analíticos utilizados para o estudo dos metabólitos secundários de produtos naturais. Entre as técnicas principais, destacam-se a espectrofotometria, a espectrometria de massas e a cromatografia.

2.3.1. Métodos Espectrofotométricos

A interação da radiação eletromagnética com o analito constitui o princípio de todas as técnicas espectrofotométricas, que por sua vez possuem, intensa e diversa utilização, tanto na análise química qualitativa, quanto quantitativa.

2.3.1.1. Espectrofotometria de absorção no Ultravioleta e Visível

A espectrofotometria de absorção no Ultravioleta e Visível (UV-Vis) consiste em um método de análise qualitativo e quantitativo simples, rápido e de baixo custo, com grande número de aplicações e que apresenta bons resultados. Esta técnica baseia-se na propriedade de alguns compostos absorverem determinada quantidade de radiação eletromagnética, cuja faixa espectral corresponda a, aproximadamente, o intervalo de 180 a 800 nm.²³⁴ Neste contexto, a espectrofotometria fundamenta-se na lei de Lambert-Beer, que estabelece uma relação de proporcionalidade da absorbância à concentração do analito e à distância da luz quando ela atravessa a amostra durante a análise, que pode ser descrita pela equação:

$$A = \varepsilon \times b \times c \quad (1)$$

onde: A corresponde à absorbância; ε ao coeficiente molar de absorbância, em $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$; b à distância percorrida pelo feixe através da cubeta contendo a amostra; e c à concentração do analito absorvente.

2.3.1.1.1. Determinação do Conteúdo de Flavonoides Totais (TFC)

A determinação do Conteúdo de Flavonoides Totais (TFC, do inglês *Total Flavonoid Content*)²³⁵ é um método considerado de alta especificidade. Este método espectrofotométrico baseia-se na complexação do cátion alumínio (Al^{+3}) com as moléculas de flavonóides presentes na amostra, formando um complexo estável flavonoide- Al^{+3} (**Figura 25**) de coloração amarela, provocando um

deslocamento batocrômico no comprimento de onda de absorção máxima dos flavonoides, bem como uma intensificação da absorção, o que permite sua identificação sem interferência dos outros compostos fenólicos presentes na amostra.

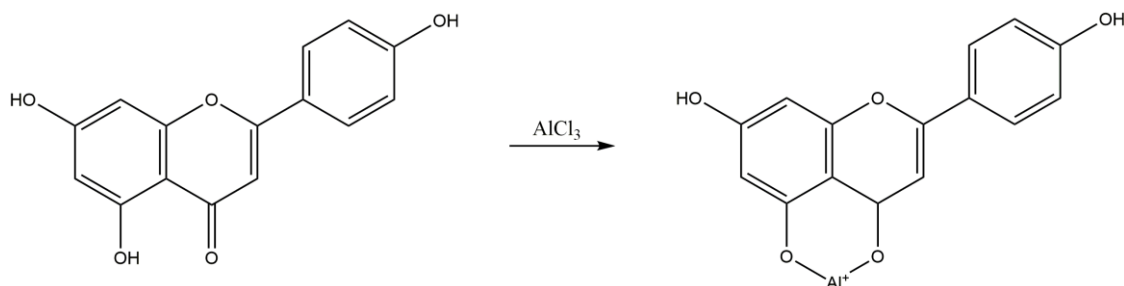


Figura 25: Reação de complexação de flavonoide com Al^{+3} .

2.3.1.1.2. Determinação do Conteúdo Fenólico Total (TPC)

A determinação Conteúdo Fenólico Total (TPC, do inglês *Total Phenolic Content*) pode ser realizada mediante uma variedade de métodos. Entretanto, o ensaio espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu é o mais extensivamente utilizado para mensurar os fenólicos totais em produtos naturais, tendo como mecanismo básico uma reação de oxirredução. Neste contexto, o reagente de Folin-Ciocalteu consiste em mistura dos ácidos fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) e fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI), apresentando cor amarela. Porém, em meio alcalino e na presença de certos agentes redutores, como compostos fenólicos, a mistura dos ácidos que constituem o reagente se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, formando os óxidos tungstênio (W_8O_{23}) e de molibdênio (Mo_8O_{23}), de cor azul, que possuem absorção máxima no comprimento de onda de 760 nm. Dessa forma, a concentração de compostos fenólicos pode ser determinada pela concentração dos óxidos formados, mediante uma curva de calibração, usando ácido gálico como padrão.²³⁶⁻²³⁸

Entretanto, esse método apresenta limitações, pois o reagente Folin-Ciocalteu pode reagir, também, com outros compostos redutores presentes na matriz, gerando, assim, resultados superestimados. Portanto, o método Folin-Ciocalteu é mais adequado para ser utilizado como um indicativo da capacidade redutora da amostra analisada do que propriamente do teor de compostos fenólicos, que deve ser determinado por métodos mais elaborados, como a cromatografia líquida.²³⁹

2.2.1.1.3. Método do DPPH para Determinação do Potencial Antioxidante

Os efeitos antioxidantes de uma substância são medidos indiretamente, pelos seus efeitos em um sistema, substrato ou sistema biológico onde tais efeitos possam ser monitorados. Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos de plantas, entretanto o método do sequestro do radical estável DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) destaca-se pela sua simplicidade, sendo o mais utilizado em avaliações preliminares acerca da atividade antioxidante, tanto de compostos isolados quanto de extratos vegetais.^{240,241}

O radical DPPH• possui coloração violácea e absorção máxima no λ de 517 nm, contudo, na presença de um antioxidante doador de hidrogênio (X-H), o radical se reduz a DPPH-H (**Figura 26**), com decorrente mudança da coloração para amarelo.²⁴² A capacidade de eliminar o radical DPPH• (% de atividade antioxidante), ou seja, a quantidade relativa de DPPH• consumido, pode ser calculada mediante comparação da descoloração violácea com um controle, utilizando espectrofotometria. Quanto maior o consumo de DPPH• pela amostra, maior será a sua atividade antioxidante.²⁴³

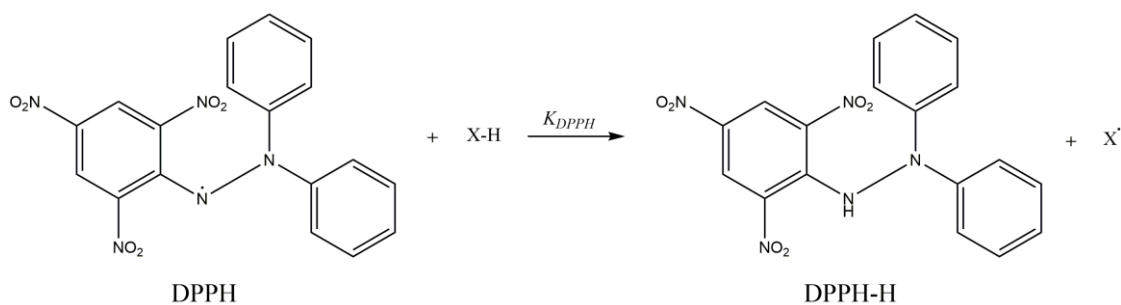


Figura 26: Reação entre o DPPH• e um composto antioxidante.

2.3.1.2. Espectrometria de Fluorescência Molecular

A fluorescência consiste na emissão de luz (luminescência) em decorrência da absorção de radiação ultravioleta ou luz visível de uma molécula ou subestrutura fluorescente, denominada fluoróforo. Logo, o fluoróforo absorve energia na forma de luz, em um comprimento de onda específico, e libera energia mediante emissão de luz em um comprimento de onda específico mais alto (ou seja, com energia mais baixa). Esse fenômeno pode ser visualizado no diagrama da **Figura 27**.²⁴⁴

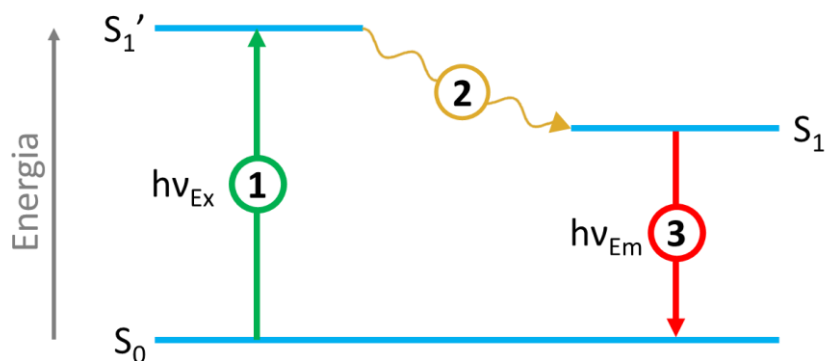


Figura 27: Diagrama representativo do princípio da espectroscopia de fluorescência.²⁴⁴

Durante a excitação (1), processo no qual a luz é absorvida pela molécula, esta passa a ocupar um estado eletronicamente excitado, ou seja, um elétron passa do estado fundamental, S_0 , para um estado excitado, S_1' . Na sequência, ocorre um relaxamento vibracional (2), no qual a molécula sofre uma transição

de um estado eletronicamente excitado superior para um inferior, S_1 , sem emitir radiação. Finalmente, ocorre a emissão (3), quando o elétron retorna ao seu estado fundamental mais estável, S_0 , emitindo luz em um comprimento de onda de acordo com a diferença de energia entre os dois estados eletrônicos.²⁴⁴

Entretanto, cada estado eletrônico de uma molécula possui vários estados vibracionais associados. No estado fundamental, quase todas as moléculas ocupam o nível vibracional mais baixo. Pela excitação é possível promover a molécula para um dos vários níveis vibracionais associados ao nível eletronicamente excitado. Isso implica que a emissão não ocorre apenas em um único comprimento de onda, mas sim em uma distribuição de comprimentos de onda correspondentes a várias transições vibracionais como componentes de uma única transição eletrônica.²⁴⁴

Embora muitas moléculas sejam capazes de absorver raios ultravioleta e luz, apenas algumas moléculas, chamadas de fluoróforos, retornam ao estado fundamental estável mediante emissão de luz. A fluorescência é mais frequentemente observada em moléculas orgânicas altamente conjugadas e aromáticas, com esqueletos moleculares rígidos. Quanto menor liberdade vibracional e rotacional, maior é a possibilidade de que a diferença de energia entre o estado excitado e o estado eletrônico fundamental seja suficientemente grande para que ocorra luminescência.²⁴⁴

A configuração básica de um espectrofluorômetro está representado na **Figura 28**. Esse instrumento consiste basicamente em: uma fonte de luz; um monocromador para selecionar os comprimentos de onda de excitação; um compartimento de amostra; um monocromador para selecionar os comprimentos de onda de emissão; um detector que converte a luz emitida em sinal elétrico; e uma unidade para aquisição e análise de dados.²⁴⁴

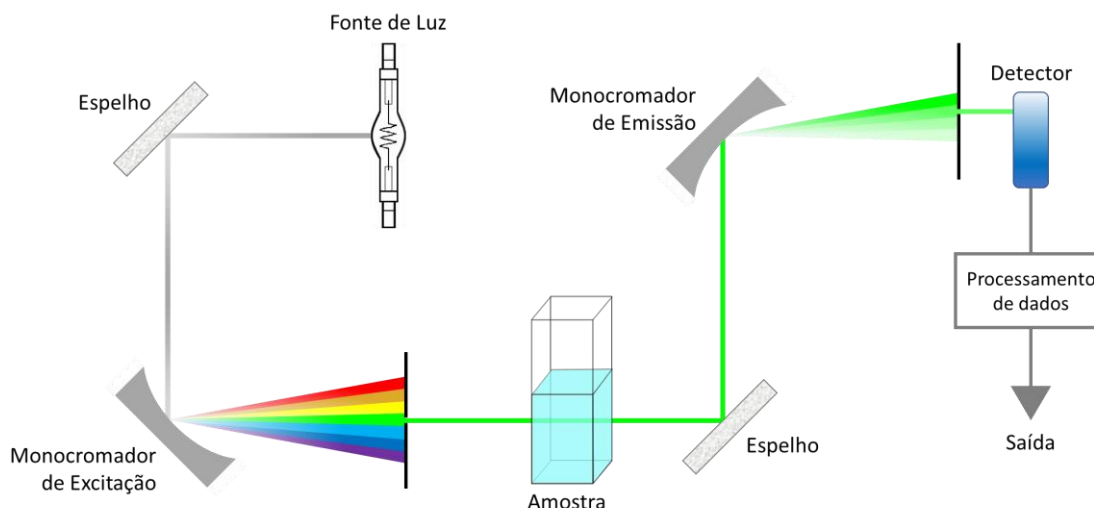


Figura 28: Diagrama representativo de um espectrofluorômetro.²⁴⁵

Normalmente, são registrados apenas espectros de emissão ou excitação em um único comprimento de onda, contudo, pode ser mais informativo obter toda a superfície de fluorescência para encontrar os máximos exatos de excitação e emissão, bem como a correta estrutura dos picos. Além disso, facilita a análise mais apropriada de dados de fluorescência de amostras complexas com mais fluoróforos presentes.²⁴⁴

Ao medir a fluorescência, a dispersão da luz incidente pode afetar o sinal de fluorescência obtido. A luz espalhada pode ser classificada em espalhamento Rayleigh e espalhamento Raman (**Figura 29**), de acordo com sua natureza.²⁴⁴

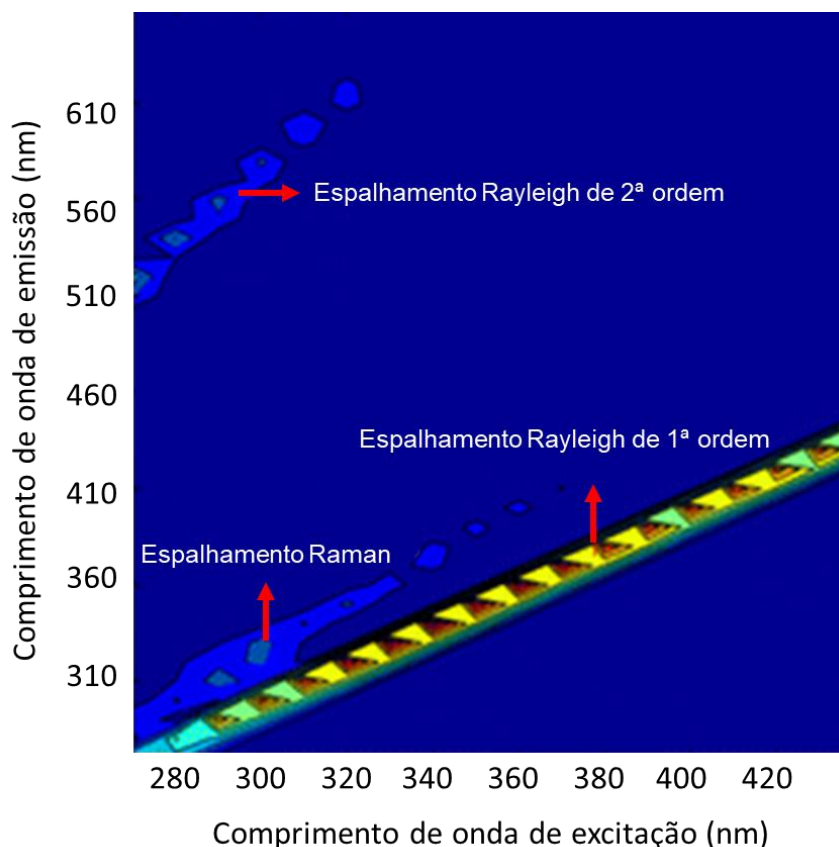


Figura 29: Espectro de fluorescência de uma amostra de água, onde os espalhamentos de luz estão indicados.²⁴⁶

O espalhamento Rayleigh consiste na dispersão da luz por partículas e moléculas menores que o comprimento de onda da luz incidente. Trata-se de um espalhamento elástico, ou seja, não ocorre nenhuma perda de energia, de modo que o comprimento de onda da luz espalhada é a mesma que da luz incidente. Logo, o espalhamento Rayleigh pode ser observado como uma linha diagonal em superfícies de fluorescência. Devido à construção de monocromadores de grade usados para excitação na maioria dos espectrofluorômetros, alguma luz no comprimento de onda duplo ao escolhido para a excitação passará para a amostra. Por esta razão, uma banda extra de espalhamento Rayleigh, chamada Rayleigh de 2ª ordem, normalmente aparecerá em medição de fluorescência para comprimentos de onda de emissão em duas vezes o dado comprimento de onda de excitação.²⁴⁴

O espalhamento Raman é um espalhamento inelástico, devido à absorção e reemissão de luz acoplada a estados vibracionais. Uma perda de energia

constante ocorrerá para o espalhamento Raman, o que significa que a luz espalhada terá um comprimento de onda maior que a luz de excitação, com uma diferença constante nos números de onda.²⁴⁴

Em diversas abordagens analíticas, tanto o espalhamento Rayleigh quanto o Raman não são desejáveis, uma vez que apenas a intensidade de fluorescência é de interesse. Enquanto o espalhamento Raman pode, na maioria dos casos, ser negligenciado devido à sua escassa contribuição, o espalhamento Rayleigh pode ser desconsiderado avaliando apenas o sinal de fluorescência entre o espalhamento de 1ª e 2ª ordem.²⁴⁴

2.3.2. Métodos Cromatográficos

As técnicas cromatográficas estão entre as principais técnicas de separação em química analítica, especialmente no que tange a análise de substâncias presentes em matrizes complexas, sendo que a escolha da técnica se baseia nas características físico-químicas dos analitos.²⁴⁷

2.3.2.1. Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) vem sendo aplicada com sucesso na separação de constituintes de misturas complexas, como amostras ambientais, biológicas, farmacêuticas e de alimentos, obtendo-se elevado grau de resolução, e permitindo a análise de compostos pouco voláteis e sensíveis à temperatura.^{248,249}

O mecanismo da LC moderna pode ser resumido em uma fase móvel líquida (FM), também chamada de eluente, na qual é injetada a amostra, que é bombeada a um determinado fluxo por partículas empacotadas em uma coluna, nas quais estão ligadas uma fase estacionária (FE) polar ou apolar. Os componentes químicos da amostra são retidos diferencialmente pelas partículas sorventes da FE e movem-se lentamente com o fluxo da FM. Logo, os componentes eluem da coluna seletivamente, com diferentes tempos de retenção, podendo ser detectados, e analisados qualitativa e, quando possível,

quantitativamente.^{250,251} No que diz respeito ao mecanismo de separação nas colunas cromatográficas, o método mais utilizado atualmente é o de cromatografia em fase reversa, que utiliza colunas apolares, enquanto a FM utilizada consiste em uma mistura de solventes polares.²⁴⁷

A cromatografia líquida de ultra alta pressão (UHPLC, do inglês *Ultra-high Pressure Liquid Chromatography*), por sua vez, utiliza colunas cromatográficas com dimensões menores que as convencionais contendo fases estacionárias com tamanho de partículas inferiores a 3 µm. Mediante a operação em elevadas pressões, essa técnica apresenta menores tempo de análise, além de melhores resolução e detectabilidade, economia de fase móvel, redução no volume de amostra e, conseqüentemente, menor geração de resíduos, quando comparado à técnica convencional.

Quanto à detecção em LC, assim como na GC, ela é realizada após a eluição pela coluna cromatográfica, monitorando o efluente desta. Os principais detectores utilizados em LC são baseados na absorção de energia ultravioleta e luz visível, como os detectores DAD (detector de arranjo de diodos, do inglês *Diode Array Detector*), capazes de detectar e quantificar compostos que possuem grupos cromóforos, ou seja, que absorvem a regiões específicas do espectro UV-Vis.^{250,251} Entretanto, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/MS) é a técnica analítica mais recomendada para a identificação de metabólitos secundários em plantas, devido à quantidade de informações estruturais fornecida.

Os analisadores de massa consistem em sistemas capazes de separar e calcular a relação m/z dos íons formados a partir dos analitos presentes na amostra. O analisador do tipo triplo-quadrupolo (QqQ) é uma abordagem comumente utilizada, porém possui capacidade limitada na identificação de compostos desconhecidos pois apresenta resolução de massa unitária. Em contrapartida, a espectrometria de massas de alta resolução (HRMS, do inglês *high-resolution mass spectrometry*) consiste em uma técnica poderosa para a identificação de compostos desconhecidos. Combinado à LC, possibilita o registro de cromatogramas no modo de varredura completa (*full-scan*), com elevada exatidão mássica, possibilitando a identificação dos compostos

mediante sua massa exata. Nessa classe encontram-se os analisadores quadrupolo – tempo de voo (QTOF).

2.3.2.1.1. Cromatografia líquida de ultra alta pressão acoplada à espectrometria de massas por quadrupolo - tempo de voo (UHPLC-QTOF-MS)

No contexto da identificação de metabólitos secundários em plantas, a cromatografia líquida de ultra alta pressão acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo (UHPLC-QTOF-MS) apresenta um elevado potencial na análise qualitativa e confirmatória de tais analitos. A elevada exatidão de massa, juntamente à aquisição de um conjunto de dados completo em relação aos componentes da amostra, facilita a realização de análises tanto do tipo *untargeted*. Além disso, o modo de operação bbCID (*broad band collision induced dissociation*) possibilita obter dados de fragmentação dos compostos, que podem ser utilizados na identificação de espécies químicas desconhecidas presentes na amostra. Neste contexto, a análise de compostos no modo bbCID gera fragmentos de íons continuamente, usando dissociação por colisão induzida. Durante o processo completo de aquisição, o QTOF alterna rapidamente entre ciclos de baixa energia de colisão (TOF-MS) e elevada energia de colisão (bbCID), possibilitando a obtenção do íon precursor e seus fragmentos de massa exata em uma única análise, sem comprometimento de sensibilidade ou resolução.

2.3.2.2. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC)

A cromatografia gasosa bidimensional abrangente, introduzida por Liu e Phillips no início da década de noventa, consiste em uma técnica analítica de grande capacidade de separação.²⁵² Esta ferramenta caracteriza-se pela utilização sequencial de duas colunas cromatográficas conectadas em série, uma de tamanho convencional e outra mais curta, similar às utilizadas em *fast-GC*. A **Figura 30** apresenta um diagrama representativo de um sistema de GC×GC. Geralmente, utiliza-se uma coluna contendo uma fase estacionária apolar na primeira dimensão (1D) e polar (ou de polaridade intermediária) na

segunda dimensão (2D), de forma que os mecanismos de separação promovidos por elas sejam estatisticamente distintos. Dessa forma, a separação obtida na 1D refletirá as diferenças de volatilidade dos analitos e a 2D , a diferença de polaridade (interações π - π , ligações de hidrogênio ou efeitos estéricos), permitindo um grande avanço na elucidação da composição de misturas complexas.²⁵³⁻²⁵⁶ Neste contexto, o termo “abrangente” é utilizado para designar que todos os constituintes da amostra devem ser submetidos a dois mecanismos de separação, sendo que, a separação obtida na 1D e o perfil de eluição de ambas dimensões devem ser preservados.^{253,257,258}

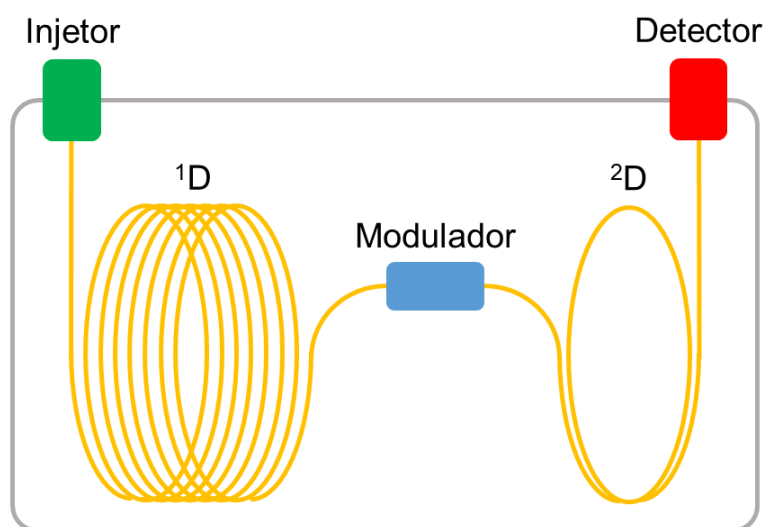


Figura 30: Representação esquemática do sistema de cromatografia gasosa bidimensional abrangente.²⁵⁹

Existe uma relação direta entre a ortogonalidade de um sistema de GCxGC e o aumento na capacidade de pico, que representa o número máximo de compostos que podem ser colocados lado a lado em um espaço de separação com uma dada resolução e em um determinado intervalo de tempo, frente à cromatografia monodimensional ($1D$ -GC, do inglês *One Dimensional Gas Chromatography*). A separação nas duas colunas, mediante diferentes mecanismos de interação entre o analito e a fase estacionária, faz com que a capacidade de pico teórica na GCxGC seja igual ao produto das capacidades de pico das duas dimensões.^{260,261}

Entre as duas colunas cromatográficas fica posicionado o modulador, que possui a função de coletar continuamente frações do eluato da 1^{D} , focalizá-las e injetá-las rapidamente na 2^{D} , na forma de um pulso cromatográfico, a uma frequência que permita a preservação da resolução cromatográfica obtida na 1^{D} . O tempo dedicado a cada ciclo de operações realizado pelo modulador é denominado “período de modulação”, e é configurado a fim de corresponder ao tempo de separação de cada fração injetada na segunda dimensão (de 3 a 10 s), ou seja, a separação de uma fração na 2^{D} deve ter finalizado antes da injeção da subsequente fração da 1^{D} , de forma a não ocorrer interferências mútuas entre as frações.^{253,262,263} Cabe destacar que a modulação produz um aumento da relação sinal/ruído (S/N), uma vez que as frações oriundas da primeira coluna serão concentradas mediante sua focalização no modulador, causando um decréscimo nos limites de detecção, elevando a detectabilidade da GCxGC frente à 1D-GC.^{253,261,262,264}

A **Figura 31** sumariza como ocorre o processo de aquisição de dados durante uma análise por GCxGC e apresenta algumas das formas de visualização dos resultados obtidos. Toma-se como exemplo uma banda cromatográfica hipotética (a), de grande largura de base, composta por três analitos que não foram resolvidos na primeira coluna, que sofre a ação do modulador, sendo fracionada e injetada na segunda coluna na forma de pulsos cromatográficos estreitos e periódicos. Em cada fração da banda injetada na segunda coluna, os analitos co-eluídos na 1^{D} passarão por um novo mecanismo de separação, sendo finalmente resolvidos. Os picos cromatográficos resultantes desse processo possuem agora uma largura de base muito inferior à original, graças à focalização realizada na modulação, gerando sinais cromatográficos muito mais intensos e, portanto, conferindo maior detectabilidade à técnica. O registro digitalizado dos sinais do detector será uma sequência contínua dos cromatogramas da 2^{D} obtidos para cada fração, resultando no chamado cromatograma bruto da 2^{D} (b). O cromatograma bruto é seccionado, pela ação de um *software*, em intervalos correspondentes ao período de modulação (c), separando, dessa forma, os diversos cromatogramas da 2^{D} . Cada seção é alinhada paralelamente com a subsequente (d), espaçadas pelo valor correspondente ao período de modulação. Novamente pela ação do

software, os picos cromatográficos serão reconstruídos, sendo gerado um diagrama do sinal do detector versus tempo de retenção na primeira dimensão ($1^{\text{t}}t_R$) versus tempo de retenção na segunda dimensão ($2^{\text{t}}t_R$), que pode ser visualizado na forma de diagramas de cores (e), de contorno (f) ou de tridimensional.^{265,266}

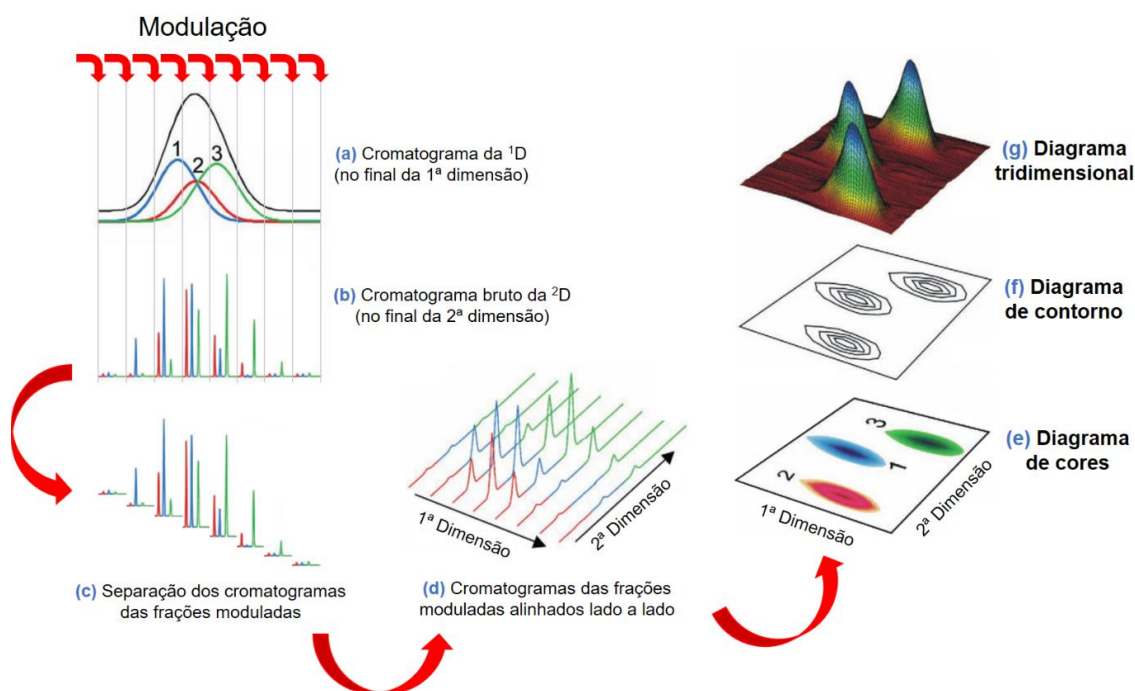


Figura 31: Representação esquemática do registro dos dados obtidos por GCxGC. Adaptado de Dallüge *et al.*, 2003.²⁶⁶

A ação do modulador, aliada à rapidez na separação na segunda dimensão, produzem bandas cromatográficas de largura de base muito pequena, na ordem de milissegundos (geralmente 50-300 ms), podendo ser de 5 a 1000 vezes mais estreitas que as obtidas na 1D-GC. Logo, a GCxGC demanda a utilização de detectores com elevada taxa de aquisição (ou frequência de aquisição) de dados, a fim de obter-se um número suficiente de registros ao longo do pico para representá-lo adequadamente.^{265,266}

O detector de ionização em chama possui uma posição especial como detector em GCxGC, pois possui uma elevada frequência de aquisição, que varia de 50 a 200 Hz (ou *scans/s*), além de apresentar uma boa resposta para quase todos os compostos orgânicos e boa performance em análises

quantitativas, tendo sido o primeiro detector a ser utilizado em GC×GC, dominando o cenário dos detectores para esta técnica durante toda a década de 1990.^{252,267}

Entretanto, com a popularização da GC×GC, o seu acoplamento com a espectrometria de massas, a fim de possibilitar a obtenção de informações estruturais para a identificação dos muitos compostos resolvidos pela técnica cromatográfica, tornou-se indispensável. Neste contexto, o acoplamento da técnica com a espectrometria de massas com analisadores por tempo de voo, a GC×GC/TOFMS, possui uma frequência de aquisição de dados elevada, variando de 50 a 500 Hz, tornando este analisador o preferido para o acoplamento.^{258,264,265,267–269}

2.4. QUIMIOMETRIA

A quimiometria consiste na obtenção de informações sobre o estado de um sistema ou processo químico mediante a aplicação de métodos matemáticos e estatísticos. Com o avanço da instrumentação e automação analítica, uma grande quantidade de dados passou a ser gerada rapidamente, que nem sempre podem ser facilmente tratados pelas estratégias de análise univariada convencionais que, por sua vez, podem fornecer informações incompletas. Neste contexto, a quimiometria tornou-se uma ferramenta indispensável para mineração e análise de dados químicos, aproveitando-se da capacidade de processamento dos computadores atuais.²⁷⁰

O escopo de trabalho da quimiometria pode ser dividido, basicamente, em três ramos: o planejamento de experimentos, que visa modelar as variáveis de um dado sistema em estudo a fim de maximizar ou minimizar uma dada resposta; o reconhecimento de padrões, que consiste no uso de medidas químicas para encontrar similaridades e dissimilaridades entre um conjunto de amostras e/ou alocar em grupos pré-determinados amostras desconhecidas; e a calibração, que correlaciona um ou múltiplos sinais analíticos a uma dada propriedade.²⁷⁰

2.4.1. Delineamento de Experimentos

O Delineamento de Experimentos (DOE, do inglês *Design of Experiments*) consiste em uma técnica utilizada para se planejar experimentos, estabelecendo um plano formal para a condução do procedimento experimental. Neste contexto, os experimentos são conduzidos de forma planejada, onde os fatores (variáveis independentes) são alterados de modo a avaliar seu impacto sobre a resposta (variável dependente).²⁷¹

Haaland (1989)²⁷² apresenta três metodologias para a condução de um procedimento experimental: análise univariada, matriz com todas as combinações e Delineamento Composto Central (CCD, do inglês *Central Composite Design*). A **Figura 32** representa a aplicação destas três estratégias na condução de um experimento com 3 variáveis independentes.

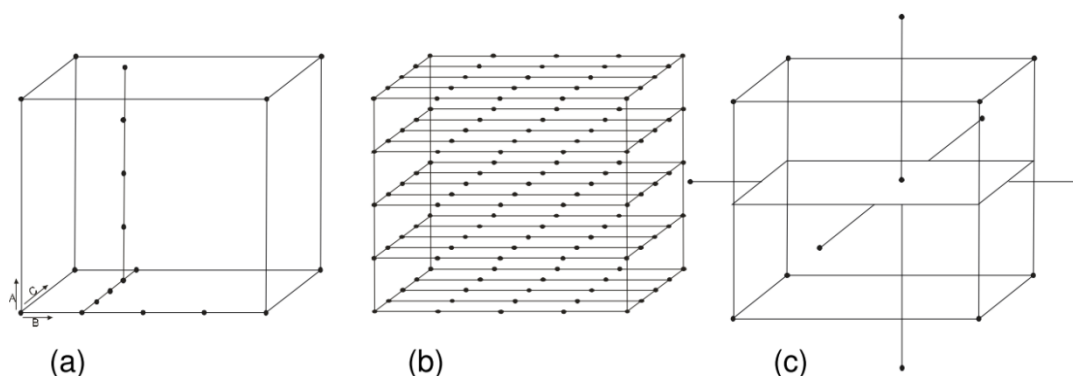


Figura 32: (a) Análise univariada; (b) matriz com todas as combinações; e (c) delineamento composto central.

A análise univariada (**Figura 32a**), conhecida como *one-at-a-time*, é o procedimento experimental mais difundido, no qual enquanto avalia-se uma das variáveis, as demais são fixadas. Embora esse método possa ser utilizado, trata-se de uma abordagem bastante ineficiente, uma vez que não possibilita a detecção dos efeitos de interações entre as variáveis, além de restringir os resultados à uma região muito limitada do espaço experimental. Em contrapartida, o estudo da matriz com a combinação de todos os fatores (**Figura 32b**) explora o espaço experimental de forma abrangente, porém tem a grande desvantagem de necessitar um número elevado de medidas. Além disso, por

não possuir ensaios repetidos, não possibilita estimar o erro puro inerente às manipulações e medidas experimentais. Por fim, a condução do procedimento experimental mediante um delineamento composto central (**Figura 32c**) permite explorar o espaço experimental de modo abrangente, utilizando um número reduzido de medidas, quando comparado ao método anterior. Esse delineamento permite estimar o erro puro, mediante repetição de, ao menos, 3 vezes o ensaio na condição experimental central. Outra vantagem desse delineamento é a possibilidade de elaborar um modelo matemático empírico que, quando validado estatisticamente, pode ser traduzido em uma superfície de resposta.^{271,272}

2.4.1.1. Delineamento Composto Central

O CCD consiste em um dos delineamentos experimentais mais apropriados para ajustar modelos polinomiais completos a dados experimentais que apresentam curvatura. O CCD foi introduzido por Box e Wilson, em 1951,²⁷³ como uma alternativa aos planejamentos fatoriais de três níveis, que demandavam muitos experimentos para um pequeno número de fatores, mesmo quando se empregavam planejamentos fracionários. Para sua construção, deve-se definir o número de fatores a serem otimizados (k), sendo formado por três partes: **(1)** a fatorial, no qual as variáveis independentes são estudadas em 2 níveis (2^k), baixo ($x_i = -1$) e alto ($x_i = +1$), para todos $i = 1, \dots, k$; **(2)** $2k$ pontos axiais (ou estrela), com todas as coordenadas nulas, exceto uma, que é igual à um valor α (onde, $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$, para planejamentos rotáveis), ou $-\alpha$; **(3)** o ponto central ($x_1 = \dots = x_k = 0$), que deverá ser replicado ao menos 3 vezes para fins de estimativa de erro puro. A forma dos CCD para quando $k=2$ e $k=3$ podem ser visualizadas nas **Figuras 33a e 33b**, respectivamente.²⁷⁴

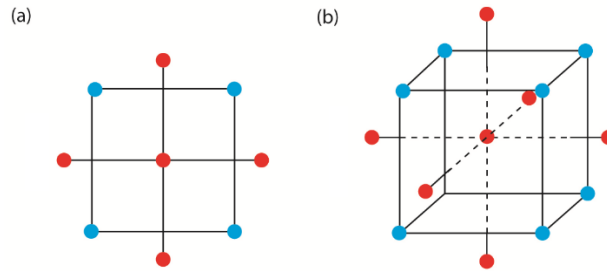


Figura 33: (a) CCD para dois fatores ($k=2$ e $\alpha = \sqrt{2}$); (b) CCD para três fatores ($k=3$ e $\alpha = \sqrt[4]{8}$).

2.4.1.2. Metodologia de Superfície de Resposta

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM, do inglês *Response Surface Methodology*) trata-se de uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais que foi introduzida por Box na década de 1950.²⁷⁴ Esse método baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos, geralmente empregando funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado,²⁷⁵ oferecendo condições de explorar o sistema até a sua otimização. De maneira geral, a RSM tem por objetivo relacionar e identificar a relação existente entre fatores controláveis (variáveis independentes) e as respostas (variáveis dependentes) do sistema analisado. A superfície de resposta consiste em um gráfico que descreve o comportamento da resposta em função de fatores, tomados dois a dois, permitindo analisar os fatores que afetam o sistema.^{271,272,274} A função matemática que descreve a superfície de resposta é dada pela Equação 2 onde x_1, x_2, \dots, x_k representam os fatores experimentais, y é a variável dependente (resposta), k é o número de variáveis independentes estudadas e ε é o erro aleatório associado à determinação experimental:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon \quad (2)$$

Para determinar a superfície de resposta é necessário determinar a relação matemática entre a variável dependente e as variáveis independentes. Neste contexto, modelos quadráticos, representados pelo polinômio de segunda

ordem (3), costumam ser eficientes para descrever respostas quando há curvatura na superfície experimental:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

Como supracitado, a determinação experimental possui sempre um erro aleatório intrínseco. Dessa forma, o modelo a ser traçado será aquele no qual a soma dos quadrados dos resíduos, ou seja, as diferenças entre os valores observados e as suas estimativas de acordo com o modelo ($\sum e_i^2$, onde $e_i = y_i - \hat{y}_i$, sendo e_i o resíduo do modelo, y_i é o valor de uma medida experimental i e \hat{y}_i refere-se ao valor previsto pelo modelo) é mínima, razão pela qual esse método é chamado ajuste por mínimos quadrados, também conhecido como análise de regressão.²⁷⁴

2.4.1.3. Ajuste por Mínimos Quadrados

Usando matrizes, podemos descrever um modelo como:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad (4)$$

onde:

$$\mathbf{y} = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{bmatrix}, \quad \boldsymbol{\beta} = \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_k \end{bmatrix}, \quad \boldsymbol{\varepsilon} = \begin{bmatrix} \varepsilon_0 \\ \varepsilon_1 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{bmatrix}$$

e \mathbf{X} representa a matriz das variáveis independentes. Como os valores de \mathbf{y} já são conhecidos de antemão, os resíduos irão depender apenas dos valores estipulados para os coeficientes. Logo, o método de ajuste por mínimos quadrados tem por objetivo estimar os coeficientes, $\boldsymbol{\beta}$, de maneira que a soma

do quadrados dos erros, $\sum_{j=1}^n \varepsilon_i^2$, seja minimizada (daí o nome “mínimos quadrados”).²⁷⁴

No método dos mínimos quadrados assume-se que os erros apresentam um perfil de distribuição aleatória e variância desconhecida comum e que esses erros são independentes uns dos outros. Desta forma, a variância estimada para cada componente do vetor \mathbf{b} é comumente obtida por repetições autênticas do ponto central de acordo com a Equação 5:²⁷⁴

$$\hat{V}(\mathbf{b}) = (\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1}\mathbf{s}^2 \quad (5)$$

Portanto, a extração da raiz quadrada para cada componente de \hat{V} permite a obtenção dos erros padrão para os coeficientes \mathbf{b} que compõem a equação da superfície de resposta, permitindo a avaliação de sua significância. Existem diversos métodos descritos na literatura para se verificar a significância dos coeficientes, entre os mais usados destaca-se a análise de variância (ANOVA, do inglês *analysis of variance*), o gráfico de probabilidade normal (distribuição normal) e a comparação dos coeficientes com uma medida independente da variabilidade.²⁷⁶

2.4.1.4 Avaliação do modelo matemático ajustado

A avaliação do modelo matemático ajustado deve ser realizada para certificar que ele é adequado na descrição do comportamento dos dados experimentais. A maneira mais confiável de se avaliar a qualidade de ajuste do modelo é empregando a ANOVA. Comparando-se a variação devido à mudança na combinação dos níveis das variáveis com a flutuação aleatória das respostas obtidas (erros puros). Mediante essa comparação, torna-se possível avaliar a significância da regressão usada e a qualidade de seu ajuste às respostas.^{274,276}

Na ANOVA, as somas de quadrados de desvios costumam ser chamadas de somas quadráticas (SQ). A variação total da resposta é definida pela soma quadrática de dois componentes: SQ da regressão (SQ_R) e SQ dos resíduos (SQ_r).^{274,276} Logo, a soma quadrática da variação total, corrigida para a média (SQ_T) pode ser escrita como:

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r \quad (6)$$

A SQ_r , por sua vez, pode ser entendida como

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj} \quad (7)$$

onde, SQ_{ep} corresponde à soma quadrática devida ao erro puro e SQ_{faj} à soma quadrática devida à falta de ajuste. Enquanto a SQ_{ep} está relacionada aos erros aleatórios das replicatas, a SQ_{faj} da falta de ajuste diz respeito à medida da discrepância entre a resposta prevista pelo modelo estatístico e a média obtida das replicatas realizadas no conjunto de condições experimentais. Logo, altos valores de SQ_R e pequenos valores de SQ_r são indicativos de que os modelos descrevem com exatidão os dados experimentais obtidos.²⁷⁴

Entretanto, apenas a avaliação das somas quadráticas poderia levar ao erro de considerar somente a contribuição do polinômio ajustado na qualidade do modelo. Com este raciocínio, quanto maior for a SQ_R melhor seria o modelo e, conseqüentemente, o melhor modelo seria aquele que tivesse a equação mais longa. No entanto, cada termo acrescentado ao polinômio tira do modelo um grau de liberdade, pois o número de parâmetros estatísticos a serem avaliados diminui em relação às determinações independentes. Como os números de graus de liberdade devem ser levados em conta nos argumentos estatísticos, para avaliar se o termo adicionado à função matemática compensa o grau de liberdade perdido e contribui na melhor explicação da variação dos dados se adota um novo termo chamado de média quadrática (MQ).²⁷⁴

As MQ são calculadas dividindo-se as SQ de cada fonte de variação pelo seu respectivo número de graus de liberdade. Logo, para cada fonte de variação (regressão, resíduos, falta de ajuste, erro puro e total) é necessário obter o número de graus de liberdade, em que p é o número de parâmetros (coeficientes) do modelo, n é o número total de observações (ensaios) e m é o número de níveis do planejamento. A razão entre a média quadrática da regressão (MQ_R) pela média quadrática dos resíduos (MQ_r), que nada mais é do que a razão entre duas variâncias, pode ser usada para comparar tais fontes de

variação mediante o teste F (distribuição de Fisher), levando em consideração seus respectivos números de graus de liberdade. O mesmo pode ser feito para a razão entre a média quadrática da falta de ajuste (MQ_{fa}) pela média quadrática do erro puro (MQ_{ep}).^{274,276}

Em termos práticos, um bom modelo necessita ter uma regressão significativa ($F_{calculado} > F_{tabelado}$) e uma falta de ajuste não significativa ($F_{calculado} < F_{tabelado}$), o que equivale a dizer que a maior parte da variação total das observações em torno da média deve ser descrita pela equação de regressão, enquanto o restante ficará com os resíduos. Da variação associada aos resíduos é esperado que a maior parte fique com o erro puro (erro aleatório intrínseco ao procedimento experimental) e não com a falta de ajuste, que está diretamente relacionada com o modelo.^{274,276}

Outro parâmetro para observar se toda variação em torno da média foi explicada pela regressão é o valor do coeficiente de variação R^2 , cujo valor representa a fração da variação que é explicada pela falta de ajuste do modelo. Quanto mais próximo de 1 o valor do coeficiente estiver, melhor estará o ajuste do modelo às respostas observadas.²⁷⁴

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} \quad (8)$$

Contudo, uma vez que o erro puro não está relacionado ao modelo, o valor máximo possível de R^2 (máxima variação explicável) é:

$$\text{Máx. Variação explicável (\%)} = \frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T} \quad (9)$$

A ANOVA, de acordo com as equações descritas para avaliação do modelo, está resumida na **Tabela IV**:

Tabela IV: Análise de variância para regressão múltipla.²⁷⁴

Fonte de variação	Soma Quadrática (SQ)	Nº de g. l.	Média Quadrática (MQ)	F
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$	$\frac{MQ_R}{MQ_r}$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$	
Falta de Ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$	$\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$	
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$		
% Variação Explicada:	$\frac{SQ_R}{SQ_T}$			
% Máxima Variação Explicada:	$\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T}$			

Regressão: quantidade de variação explicada pelo modelo; **Resíduo:** estimativa do erro experimental; **Falta de ajuste:** medida da discrepância entre a resposta prevista pelo modelo estatístico e a média obtida das replicatas realizadas no conjunto de condições experimentais; **Erro puro:** erro aleatório das replicatas; y_i : valor experimental observado na variável resposta (variável dependente), em função do nível da variável independente; \bar{y}_i : valor médio de y_i ; \hat{y}_i : valor previsto pelo modelo ajustado para a variável resposta em função do nível do fator SQ_R : soma quadrática da regressão; SQ_r : soma quadrática do resíduo; SQ_{faj} : soma quadrática da falta de ajuste; SQ_{ep} : soma quadrática do erro puro; n_i : número de repetições no nível i ; p : número de parâmetros do modelo; $n = \sum n_i$: número total de experimentos; m : número de níveis distintos da variável independente; MQ_R : média quadrática da regressão; MQ_r : média quadrática do resíduo; MQ_{faj} : média quadrática da falta de ajuste; MQ_{ep} : média quadrática do erro puro.

Além da ANOVA, a análise visual dos gráficos de resíduos também pode gerar informações valiosas sobre a adequação do modelo aos dados experimentais. Se o modelo matemático estiver bem ajustado, seu gráfico de resíduos apresentará um comportamento que irá sugerir uma distribuição normal dos dados. Ademais, se o modelo gerar resíduos de grande magnitude, ele não

estará sendo adequado para fazer inferências precisas sobre o comportamento dos dados.²⁷⁷

2.4.2. Reconhecimento de Padrões

Métodos quimiométricos utilizados para diferenciar amostras fundamentam-se na identificação de tendências e formação de agrupamentos. Semelhanças e diferenças com relação à procedência e processamento da erva-mate, por exemplo, podem refletir propriedades químicas do conjunto de amostras em estudo. Além disso, esses métodos permitem a visualização de um grande volume de dados em um espaço bi- ou tridimensional.²⁷⁰

2.4.2.1. Análise de Componentes Principais

A base para a maioria dos métodos estatísticos multivariados é a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Components Analysis*), cujo objetivo consiste em reduzir o espaço multidimensional das informações para melhor visualização e compreensão do conjunto de dados. Essa redução do espaço multidimensional é obtida mediante a combinação de variáveis correlacionadas em um novo conjunto de coordenadas, chamadas componentes principais (PCs). Cada novo eixo calculado será ortogonal a seu antecessor (bem como aos demais) e, progressivamente, compreenderá toda variância que explica o sistema.²⁷⁸

Nesse novo sistema de eixos, cada uma das PCs é gerada a partir da combinação linear das m -variáveis originais. Conforme a Equação 10 e a **Figura 34**, a matriz dos dados originais \mathbf{X} é decomposta em vetores das componentes principais (\mathbf{t} , \mathbf{I}) e a matriz de resíduos \mathbf{E} . Os pesos \mathbf{I} (*loadings*) são vetores de coeficiente da regressão, ajustados para minimizar a soma dos quadrados das distâncias ponto-plano. Ao passo que os escores \mathbf{t} são a combinação linear da contribuição i das J variáveis. Em outras palavras, os escores representam a projeção das amostras no novo sistema de coordenadas e os pesos são os cossenos dos ângulos entre a PC e os eixos das variáveis originais, medindo a importância de cada variável original em cada PC. Quanto mais próximo de ± 1 ,

maior será a influência de uma determinada variável na descrição dessa PC; quanto mais próximo de zero, menor será sua influência.²⁷⁸

$$X = \sum_{a=1}^A \begin{bmatrix} t_a \end{bmatrix} [l_a^T] + E \quad (10)$$

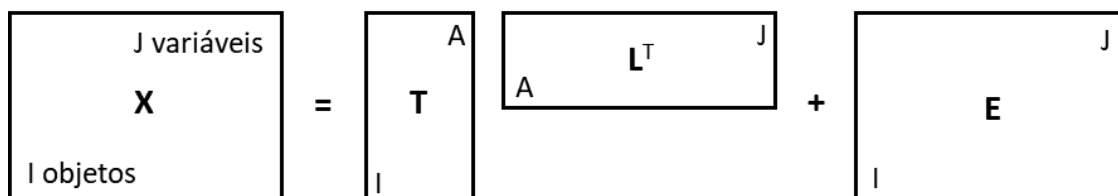


Figura 34: Representação da decomposição da matriz de dados em PCA.²⁷⁸

O posto A corresponde ao número de PCs suficiente para explicar o sistema. A interpretação do modelo depende da quantidade A dessas componentes, que explicitam o sentido químico, mas que não causem um sobreajuste. Assim, a variância atribuída aos ruídos e informações sistemáticas irrelevantes é designada à matriz E ($I \times J$).²⁷⁸

Em suma, a PCA permite transformar grandes matrizes de dados em matrizes menores, que podem ser mais facilmente examinadas, plotadas e interpretadas. As PCs descrevem as interações multivariadas entre as variáveis medidas e revelam tendências subjacentes dos dados. A primeira componente principal (PC1) é definida pela direção dos dados originais que descreve a máxima variância. Na sequência, repete-se esse procedimento para as demais PCs, garantindo a ortogonalidade entre elas. Dessa forma, as primeiras PCs acumularão a maior parte da variância do sistema, reduzindo a dimensionalidade necessária para visualizá-lo. A escolha do número de PCs a ser utilizado na construção do modelo é efetuada considerando o seu percentual de variância total explicada.²⁷⁰

2.4.3. Métodos Quimiométricos de Segunda Ordem

Os métodos de calibração utilizados em química analítica podem ser classificados de acordo com a dimensão dos dados analisados. Métodos de ordem zero são usados para tratar dados univariados, como os gerados por pHmetros, por exemplo, quando a resposta medida para cada amostra é um valor escalar (tensor de ordem zero). Estes métodos não fornecem resultados aceitáveis na presença de interferentes, pois demandam total seletividade para o analito de interesse.²⁷⁹

Métodos de primeira ordem podem ser usados para tratar dados multivariados, como os gerados por cromatógrafos, cujas respostas fornecem um vetor (tensor de primeira ordem) de dados para cada amostra. Nesses casos, é possível a calibração na presença de interferentes, desde que estes estejam presentes no conjunto de calibração usado para construir o modelo.²⁷⁹

Dados de segunda ordem são obtidos quando o instrumento analítico fornece como resposta uma matriz (tensor de segunda ordem) de dados para cada amostra. Exemplos clássicos de dados de segunda ordem são os obtidos por GC-MS e HPLC-DAD, e as matrizes de excitação/emissão obtidas por espectroscopia molecular de fluorescência. Métodos de calibração de segunda ordem são aplicados a este tipo de dados, possibilitando a obtenção de uma série de vantagens. Uma destas vantagens é a possibilidade de obtenção dos espectros (ou outros sinais, dependendo da técnica empregada) puros de cada componente do sistema, aplicando um número mínimo de restrições ao modelo. Uma outra vantagem importante é a possibilidade de calibração na presença de interferentes desconhecidos, que não estejam presentes no conjunto de calibração, a chamada “vantagem de segunda ordem”.²⁷⁹

2.4.3.1. Métodos Quimiométricos em Função da Ordem dos Dados

Para a aplicação adequada de um método, é fundamental sua compatibilidade com a natureza dos dados. Enquanto os métodos de primeira ordem são baseados em modelos bilineares, a maioria dos métodos de segunda ordem baseiam-se em modelos trilineares.²⁸⁰

A propriedade de bilinearidade/trilinearidade dos dados está ligada à instrumentação analítica e às peculiaridades do sistema químico sob estudo. A bilinearidade pode ser entendida como a possibilidade de interpretar que a função resposta instrumental $X(r_1, r_2)$ pode ser separada no produto de duas funções independentes $X_1(r_1)$ e $X_2(r_2)$. Como exemplo de um dado bilinear, tome uma matriz excitação emissão (EEM, do inglês *emission-excitation matrix*) para um sistema constituído de um único fluoróforo. O perfil de um modo é independente do outro modo, ou seja, o perfil espectral de emissão não depende do comprimento de onda de excitação.²⁸¹

2.4.3.2. Modelos de Tucker

Nos anos 60, Tucker desenvolveu os modelos atualmente conhecidos como Tucker1, Tucker2 e Tucker3. O modelo Tucker1 corresponde ao simples desdobramento (*unfolding*) do arranjo de dados tridimensional $\underline{\mathbf{X}}$ (o sublinhado indica uma matriz tridimensional) em uma matriz bidimensional, seguido de uma decomposição bilinear usando PCA. O desdobramento de um arranjo de dados de dimensões $I \times J \times K$ em uma matriz de dimensões $I \times JK$ é representado na **Figura 35**. O Tucker1, também conhecido como *unfolded-PCA*, ignora a estrutura trilinear dos dados, decompondo-os com um método bilinear. O modelo Tucker2 é um caso particular do Tucker3, em que uma das dimensões é mantida fixa durante a decomposição.^{282,283}

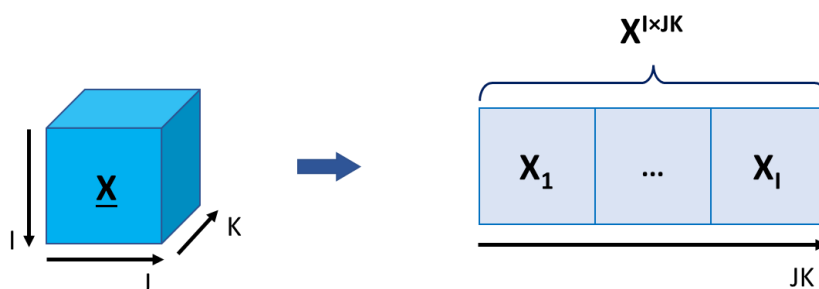


Figura 35: Representação do desdobramento de um arranjo de dados tridimensional em uma matriz.²⁸⁴

O mais importante dos modelos de Tucker é o Tucker3, cuja base estrutural é dada pela Equação 11:

$$\underline{X} = \underline{A}\underline{G}(\underline{C}\otimes\underline{B})^T + \underline{E} \quad (11)$$

onde as matrizes **A** ($I \times D$), **B** ($J \times E$) e **C** ($K \times F$) contêm os pesos do modelo relativos às três dimensões dos dados, respectivamente; a matriz **G** ($D \times EF$), produto do rearranjo do tensor **G** ($D \times E \times F$) é a matriz central ou conectora (*core matrix*); o tensor **E** ($I \times J \times K$) contêm os erros do modelo e o símbolo “ \otimes ” representa o produto de Kronecker.²⁸⁵ D, E e F indicam o número de fatores em cada dimensão e podem possuir valores diferentes, ou seja, o número de fatores decompostos pode ser diferente em cada dimensão. A matriz **G** indica a interação entre cada dimensão, ou seja, um valor próximo a zero indica pouca interação entre as dimensões. A restrição que **A**, **B** e **C** são ortogonais é usual. Uma representação da decomposição dos dados por Tucker3 é apresentada na **Figura 36**.²⁸⁴

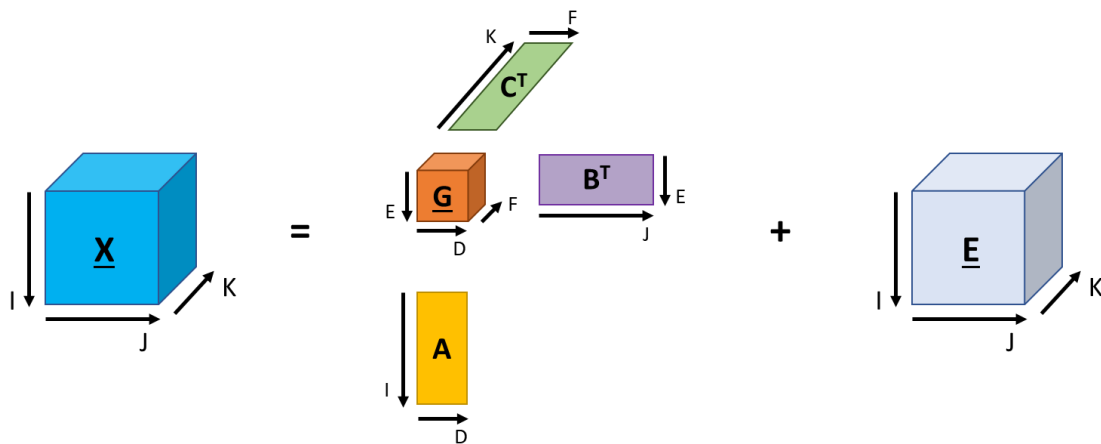


Figura 36: Representação gráfica do modelo Tucker3.²⁸⁴

2.4.3.3. Análise de fatores paralelos (PARAFAC)

A análise de fatores paralelos (PARAFAC, do inglês *PARAllel FACtor analysis*)²⁸⁶ consiste em um método trilinear para decomposição de dados de ordem superior em matrizes de pesos **A**, **B** e **C**, que contêm os elementos a_{if} , b_{jf}

e c_{kf} , respectivamente, relativos às três dimensões dos dados. O modelo é ajustado de forma a minimizar a soma dos quadrados dos resíduos e_{ijk} , de acordo com a Equação 12:

$$X_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (12)$$

onde F é o número de fatores (ao contrário do Tucker3, este número é igual em todas as dimensões). A **Figura 37** demonstra graficamente a Equação 13, indicando a decomposição de um arranjo de dados tridimensional em F tríades de vetores pesos, onde cada tríade equivale a um fator do modelo PARAFAC. Alternativamente, o modelo pode ser representado pela equação:

$$\underline{X} = \underline{A}(\underline{C}|\otimes|\underline{B})^T + \underline{E} \quad (13)$$

onde as matrizes **A**, **B** e **C** têm dimensões $I \times F$, $J \times F$ e $K \times F$, respectivamente, e o símbolo “ $|\otimes|$ ” representa o produto de Khatri-Rao.^{284,287}

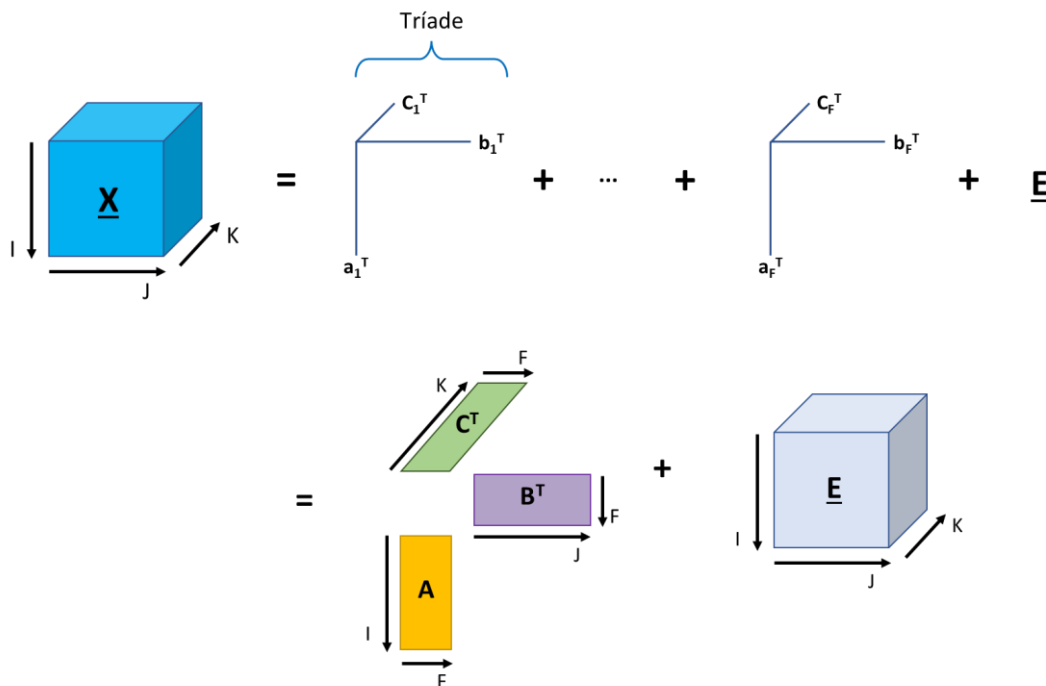


Figura 37: Representação gráfica do modelo PARAFAC: decomposição de um arranjo de dados tridimensional em F tríades de vetores peso.²⁸⁴

De um ponto de vista matemático, o PARAFAC pode ser considerado uma generalização da PCA para dados multidimensionais, ou ainda, uma versão restrita do método Tucker²⁸⁸ com uma matriz central superidentidade, ou seja, o primeiro fator de uma dimensão só se relaciona com os primeiros fatores das outras e assim, sucessivamente.²⁸⁴

Qualquer conjunto de dados que puder ser modelado adequadamente com o PARAFAC, também poderá ser modelado com o Tucker3 ou com a PCA, porém utilizando um maior número de graus de liberdade,²⁸⁶ que tende a ser usado para modelar ruído ou variância sistemática de uma maneira redundante. Além disso, o PARAFAC fornece solução única, independente de rotações, ou seja, o modelo estimado não pode sofrer rotação sem perda de ajuste.²⁸⁴

A escolha do número de fatores F consiste em uma etapa crucial da análise, não existindo um critério absoluto para isso. Essa escolha pode ser realizada baseada na variância explicada pelo modelo, no conhecimento químico do sistema, ou no teste de consistência trilinear (CORCONDIA, do inglês *COR* *CON*sistency *DI*agnostic), que consiste na interpretação do PARAFAC como um modelo Tucker3 restrito. O Tucker3 é aplicado aos parâmetros do modelo PARAFAC estimado e, se houver consistência trilinear, espera-se que os elementos da superdiagonal do tensor central (**G**) tenham valores próximos a 1, enquanto os demais elementos tenham valores próximos a zero. A definição matemática é expressa pela equação:

$$CORCONDIA = 100 \times \left(1 - \frac{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F (g_{def} - h_{def})^2}{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F h_{def}^2} \right) \quad (14)$$

onde g_{def} são os elementos da matriz central calculada com o Tucker3 a partir dos pesos do PARAFAC, h_{def} são elementos de uma hiperidentidade perfeita e F é o número de fatores do modelo. O valor de CORCONDIA para um modelo estimado com um número de componentes menor que o real estará próximo a 100%, pois a estrutura de tal modelo será trilinear. Logo, o modelo adequado será aquele com maior número de componentes e que preserve a estrutura

trilinear. A literatura recomenda valores acima de 60% como indicativo aceitável da consistência trilinear dos dados.²⁸⁴

Uma característica importante do PARAFAC é a possibilidade do uso de restrições (*constraints*), como não-negatividade e unimodalidade, sendo a primeira usualmente adotada na resolução de espectros, já que parâmetros espectrais negativos não possuem significado físico. Embora o ajuste de um modelo restrito seja inferior ao de um modelo não restrito, uma vez que este possui menor variância explicada, essa perda de ajuste é compensada pela obtenção de um modelo mais facilmente interpretável e realista.²⁸⁴

Vale ressaltar que o pré-processamento de dados multidimensionais é mais complexo que o de dados bidimensionais. Uma centralização na média os dados em

uma das dimensões, por exemplo, incorre em alterações no escalamento em qualquer outra dimensão. Portanto, não é usual efetuar pré-processamentos ao aplicar o PARAFAC na resolução de espectros.²⁸⁹

As principais aplicações de PARAFAC na área de química analítica são a resolução de curvas, a calibração multivariada e a análise exploratória.^{280,290,291} Dados tridimensionais de fluorescência molecular (excitação/emissão) é um exemplo claro da aplicação do PARAFAC, que faz uso de dados trilineares.²⁸⁴ Neste contexto, a intensidade de fluorescência de um determinado fluoróforo pode ser expressa em função da sua concentração e dos perfis espectrais de excitação e emissão do composto. Sob condições ideais, a intensidade será linearmente dependente da concentração e os espectros de excitação e emissão serão independentes um do outro. Assumindo que a fluorescência total de uma mistura de fluoróforos é igual à soma do sinal das suas contribuições individuais, dados de fluorescência podem ser considerados trilineares. Portanto, dados de fluorescência podem ser expressos pelo modelo PARAFAC, no qual os escores da matriz **A** representam a concentração para cada fluoróforo, enquanto os pesos presentes nas matrizes **B** e **C** representam seus perfis de excitação e emissão. Assim, o modelo PARAFAC pode ser usado para uma decomposição única dos dados de fluorescência de uma amostra complexa em um conjunto de fatores PARAFAC, tanto para facilitar a análise de medidas de fluorescência de

amostras complexas, quanto para aplicações exploratórias, quando os fenômenos de fluorescência contidos são, *a priori*, desconhecidos.²⁸⁴

2.4.3.3.1. Mínimos Quadrados Alternados

O algoritmo comumente utilizado para a resolução do PARAFAC é o dos mínimos quadrados alternados (ALS, do inglês *Alternating Least Squares*), que se baseia no princípio de que duas das matrizes de pesos devem ser conhecidas para que se possa estimar a matriz desconhecida. O ALS pode ser iniciado a partir de valores aleatórios ou algum tipo de decomposição dos dados, e converge iterativamente até atingir um critério de convergência ou um número de iterações previamente definidos.^{284,292}

Chamando $(\mathbf{B}|\otimes|\mathbf{C})$ de \mathbf{Z} , temos que o modelo PARAFAC pode ser representado por $\mathbf{X}=\mathbf{AZ}$ e \mathbf{A} é estimado por $\mathbf{A}=\mathbf{XZ}^T (\mathbf{ZZ}^T)^{-1}$. O algoritmo de ALS pode ser descrito nas seguintes etapas:

1. Decide-se o número de fatores F ;
2. Inicializa-se \mathbf{B} e \mathbf{C} ;
3. Estima-se \mathbf{A} por um ajuste de mínimos quadrados;
4. Estima-se \mathbf{B} analogamente;
5. Estima-se \mathbf{C} analogamente;
6. Repetem-se as etapas de 3 a 5 até a convergência.

Depois de inicializar o ALS, iterações serão executadas até que seja atingido um critério de convergência estabelecido, como quando a mudança relativa no ajuste entre duas iterações é inferior a um determinado valor.^{284,292}

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ETAPAS EXPERIMENTAIS

A primeira etapa experimental consistiu no preparo das amostras de erva-mate (secagem, moagem e pesagem). Na sequência, os procedimentos experimentais seguiram por duas rotas distintas. A rota dos não-voláteis consistiu, primeiramente, na otimização de uma metodologia de UAE, monitorando como variáveis dependentes o rendimento mássico da extração, o TFC e TPC e percentual de inibição de DPPH dos extratos obtidos, e a área total obtida mediante análise por HPLC-DAD dos extratos. Utilizando as condições otimizadas na etapa anterior, foi realizada, em triplicata, a UAE de 17 amostras de erva-mate processada, oriundas de diferentes países, com características específicas. Os extratos obtidos foram submetidos a análise por fluorescência molecular e por cromatografia líquida. Os resultados obtidos na análise de fluorescência foram processados e interpretados utilizando PARAFAC. As análises por cromatografia líquida foram divididas em duas etapas: a caracterização química por UHPLC-QTOF-MS e a quantificação dos metabólitos identificados por HPLC-DAD. Além disso, os resultados obtidos na última etapa foram processados e interpretados com o auxílio da PCA. Em paralelo, a rota dos voláteis consistiu na extração da fração volátil de folhas *in natura* e processadas de erva-mate, mediante hidrodestilação, seguido pela caracterização química por GCxGC/TOFMS, utilizando ferramentas auxiliares como a deconvolução espectral e os LTPRI, estimados para cada pico cromatográfico detectado. As quantidades relativas dos compostos identificados foram estimadas mediante normalização de área. Um fluxograma representando as etapas experimentais do presente estudo pode ser visualizado na **Figura 38**.

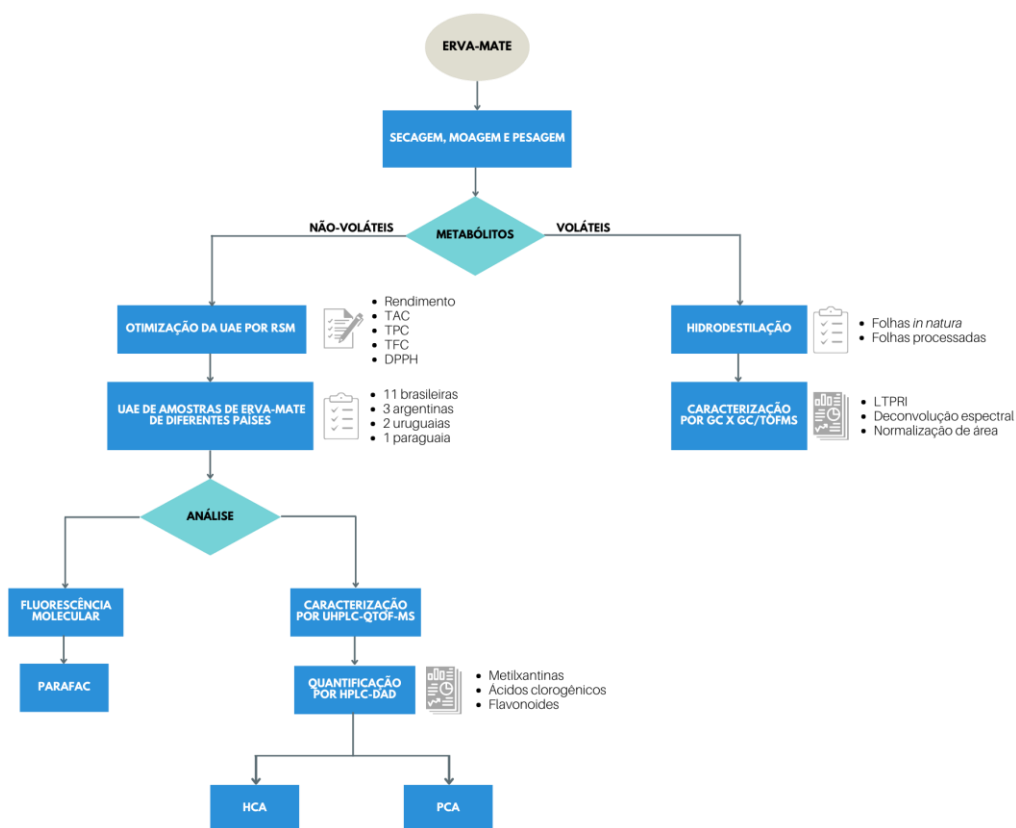


Figura 38: Fluxograma das etapas experimentais realizadas no presente estudo.

3.1. REAGENTES, SOLVENTES E PADRÕES

Os solventes orgânicos diclorometano, hexano, etanol, metanol, acetonitrila, grau HPLC, e o ácido fórmico, grau para análise, foram adquiridos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os padrões utilizados foram o ácido gálico (97% de pureza), ácido 5-cafeoilquínico (95% de pureza), rutina (95% de pureza), quercetina (95% de pureza), cafeína (99% de pureza), teobromina (99% de pureza), mistura de alcanos lineares da série C₆-C₃₀, DPPH (98% de pureza) e reagente de Folin-Ciocalteu, adquiridos da empresa Sigma Aldrich (Milwaukee, EUA). Os reagentes sulfato de sódio, carbonato de sódio, nitrito de sódio, cloreto de alumínio e hidróxido de sódio foram adquiridos da empresa Synth (São Paulo, Brasil). Para todas as preparações foi utilizada água ultrapura, purificada por sistema Milli-Q, adquirido da empresa Millipore (Darmstadt, Alemanha).

Os gases utilizados para as análises cromatográficas, hélio e nitrogênio, de pureza superior a 99,999%, bem como o nitrogênio líquido utilizado no modulador do sistema GCxGC, foram adquiridos da Linde Gases (Canoas, RS, Brasil).

3.2. PREPARO DAS AMOSTRAS

A amostragem da erva-mate processada envolveu 51 amostras, oriundas de 17 produtos comerciais. As características específicas de cada produto, bem como a codificação utilizada neste estudo são apresentadas na **Tabela V**:

Tabela V: Identificação das amostras de erva-mate analisadas, país de origem e descrição fornecida pelo fabricante.

País	Código	Descrição
Brasil	Br1	
	Br2	Folhas nativas, destinadas ao preparo de tererê.
	Br3	
	Br4	
	Br5	Folhas nativas.
	Br6	
	Br7	
	Br8	
	Br9	Folhas cultivadas.
	Br10	
	Br11	
Paraguai	Pg	Folhas cultivadas, estacionados;
Uruguai	Uru1	Folhas cultivadas na Argentina, estacionadas.
	Uru2	Folhas cultivadas no Brasil, estacionadas.
Argentina	Arg1	
	Arg2	Folhas cultivadas, estacionadas;
	Arg3	

As amostras processadas oriundas do mercado brasileiro, bem como as folhas de erva-mate *in natura*, foram cedidas pela ervateira Barão, no município

de Barão de Cotegipe (RS), enquanto as demais foram adquiridas no comércio local.

As amostras foram previamente liofilizadas em um liofilizador ModulyoD da Thermo Fisher (Waltham, EUA). Em seguida, as amostras foram moídas utilizando-se um moinho de facas MA340MF da Marconi (São Paulo, Brasil) e peneiradas a uma granulometria de -20+100 (partículas entre 0,84 e 0,15 mm), utilizando peneiras granulométricas da empresa Bertel (São Paulo, Brasil).

3.3. METABÓLITOS NÃO-VOLÁTEIS

3.3.1. Extração Assistida por Ultrassom

As extrações foram realizadas em um banho de ultrassom USC 1800 da Unique (São Paulo, Brasil). Para cada extração, utilizou-se 50 mL de solvente extrator hidroetanólico e 2,00 g (\pm 0,01 g) de erva-mate, pesada em balança analítica modelo Adventurer, da Ohaus (Pine Brook, EUA). Optou-se por trabalhar com uma fase extratora hidroetanólica devido à sua baixa toxicidade e elevada capacidade de extração de compostos fenólicos de plantas relatada na literatura.²⁹³⁻²⁹⁶ Cada extrato obtido foi filtrado à vácuo e, em seguida, centrifugado por 2 minutos em uma centrífuga Excelsa i 2206 da Fanem (São Paulo, Brasil), a 5000 rpm. Na sequência, os extratos foram filtrados em filtros (0,20 μ m, 25 mm) de politetrafluoretileno/teflon (PTFE) para seringa, adquiridos da empresa Macherey Nagel (Duren, Alemanha), e posteriormente transferidas para frascos de vidro âmbar.

3.3.1.1. Otimização dos Parâmetros da UAE

Tendo em vista uma avaliação mais detalhada da influência dos parâmetros utilizados no processo de extração assistida por ultrassom dos metabólitos secundários das erva-mate, utilizou-se o Delineamento Composto Central (CCD). Os resultados obtidos foram avaliados mediante a aplicação de Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) e Análise de Variância (ANOVA). Seguiu-se as seguintes etapas para a otimização da extração:

a) optou-se pelo CCD para três variáveis, consistindo em um planejamento fatorial 2^3 com oito ensaios fatoriais, mais seis pontos axiais e três pontos centrais, totalizando 17 experimentos, para avaliar a influência das variáveis independentes selecionadas, que foram: tempo (11,6 – 28,4 min) e temperatura de extração (30 – 80 °C), e percentual de etanol na fase extratora hidroalcolica (8 – 92%). Para análise dos dados, foi utilizado o *software* STATISTICA 10;

b) os experimentos foram realizados e adquiriu-se como variáveis dependentes o rendimento mássico da extração, além do TPC, TFC, atividade antioxidante dos extratos (mensurada por ensaio de DPPH), e área total integrada do TAC (cromatograma de absorbância total, do inglês *total absorbance chromatogram*);

c) Foram calculados os efeitos das variáveis dependentes, os respectivos erros e verificou-se sua significância estatística a um nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$);

d) verificou-se a significância do ajuste dos modelos, baseados na ANOVA, determinando o coeficiente de determinação (R^2) e realizando-se Testes *F* para avaliar se a regressão foi significativa ou não;

e) se a regressão fora significativa, procedeu-se à verificação da parametricidade dos resíduos deixados pelo modelo ajustado;

f) as superfícies de respostas foram geradas e, mediante as derivadas parciais da função obtida, definiu-se as condições operacionais ótimas de cada variável na UAE da erva-mate;

Os valores codificados e decodificados dos fatores (variáveis independentes) selecionados seguem nas **Tabela VI** e **Tabela VII**, respectivamente. Os ensaios foram realizados em ordem aleatória.

Tabela VI: Ensaios para o delineamento composto central na ordem padrão.

Ensaio	x ₁	x ₂	x ₂
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Tabela VII: Variáveis e níveis decodificados do delineamento composto central.

Variável	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Independente					
x₁: Tempo (min)	11,6	15	20	25	28,4
x₂: Temperatura (°C)	30	40	55	70	80
x₃: %EtOH	8	25	50	75	92

3.3.2. Avaliação do Rendimento Mássico

O rendimento mássico foi determinado retirando-se uma alíquota de 10 mL de cada extrato e evaporando-se o solvente. O rendimento foi calculado como a porcentagem em massa do extrato seco referente à massa de amostra utilizada na extração.

3.3.3. Ensaio Espectrofotométrico

3.3.3.1. Conteúdo Fenólico Total (TPC)

A determinação de compostos fenólicos totais nos extratos hidroalcoólicos de erva-mate foi realizada utilizando um método adaptado de Folin-Ciocalteu, segundo a metodologia descrita por Singleton (1999).²⁹⁷ Para tanto uma alíquota de 500 µL do extrato foram misturados, em frasco âmbar, a 2 mL de água ultrapura, seguido de 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e 5 mL de uma solução aquosa de Na₂CO₃ (7% m/v). Em seguida, foram adicionados 4 mL de água ultrapura, totalizando 12 mL de mistura. Esta solução foi então centrifugada por 5 minutos a 2500 rpm, e mantida em repouso e na ausência de luz por 150 minutos, à temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram realizadas medidas de absorvância em um espectrofotômetro UV-6100S da Global Trade Technology (São Paulo, Brasil), no comprimento 760 nm, em cubeta de vidro com caminho óptico de 1 cm, contra um branco, preparado de modo similar, substituindo o volume de extrato pela mesma quantidade de solvente.

Para a quantificação, foi utilizado como padrão o ácido gálico, nas concentrações de 40, 60, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, para construção da curva analítica (**Figura 39**). O mesmo processo descrito para as amostras foi realizado com as soluções-padrão. A partir da equação da curva de calibração, foi realizado o cálculo do conteúdo fenólico total, expresso em mg de equivalente de ácido gálico por grama de erva-mate seca (mg EAG g⁻¹).

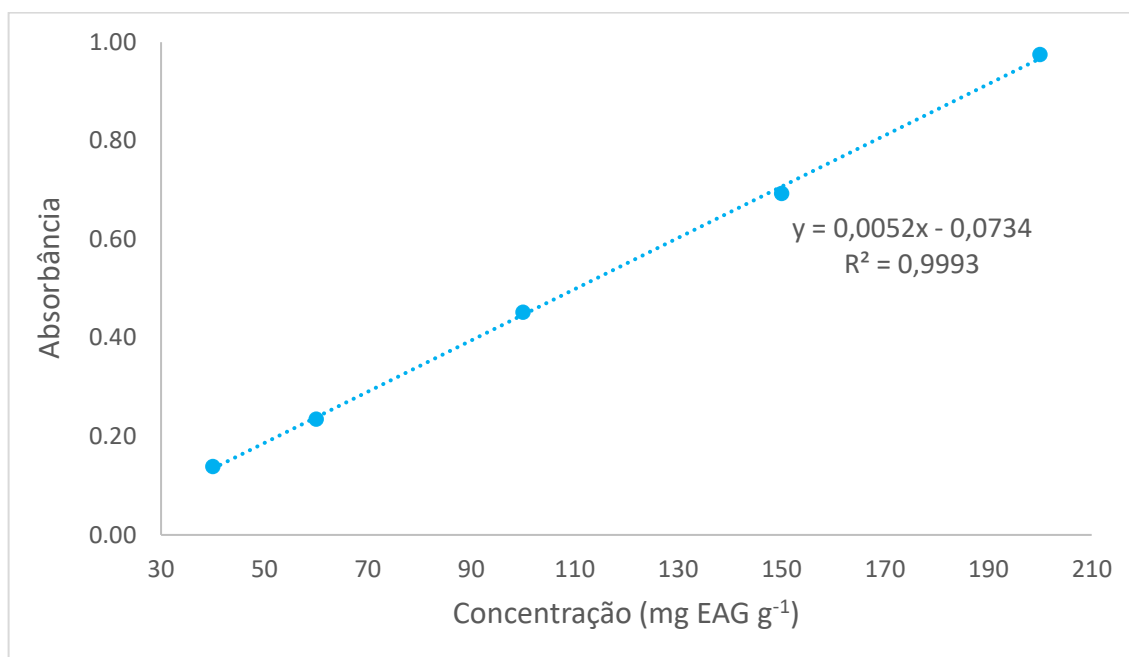


Figura 39: Curva de calibração com ácido gálico para os ensaios de quantificação de fenólicos totais.

3.3.3.2. Conteúdo de Flavonoides Totais (TFC)

Para a determinação de flavonoides totais, foi utilizada a metodologia descrita por Zhishen *et al.* (1999).²⁹⁸ Uma alíquota de 1 mL do extrato foi misturada a 4 mL de água ultrapura e 300 μ L de uma solução aquosa a 5% (m/v) de nitrito de sódio (NaNO_2), em um frasco âmbar, e a mistura foi deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 300 μ L de uma solução aquosa de AlCl_3 (10% m/v). A amostra permaneceu em repouso por mais 5 minutos e, na sequência, foram adicionados 2 mL de solução de NaOH 1 mol L⁻¹. Por fim, foram realizadas medidas de absorbância em um espectrofotômetro, no comprimento de onda de 510 nm, em cubeta de vidro com caminho óptico de 1 cm, contra um branco, preparado de modo similar, substituindo o volume de extrato pela mesma quantidade de solvente.

A construção da curva de calibração (**Figura 40**) foi realizada a partir de um padrão de rutina, nas concentrações de 40, 60, 100, 150 e 200 mg L⁻¹. O mesmo processo descrito para as amostras foi realizado com as soluções-padrão. A partir da equação da curva de calibração, foi realizado o cálculo de flavonoides totais, expresso em mg de equivalente de rutina por grama de erva-mate seca (mg ER g⁻¹).

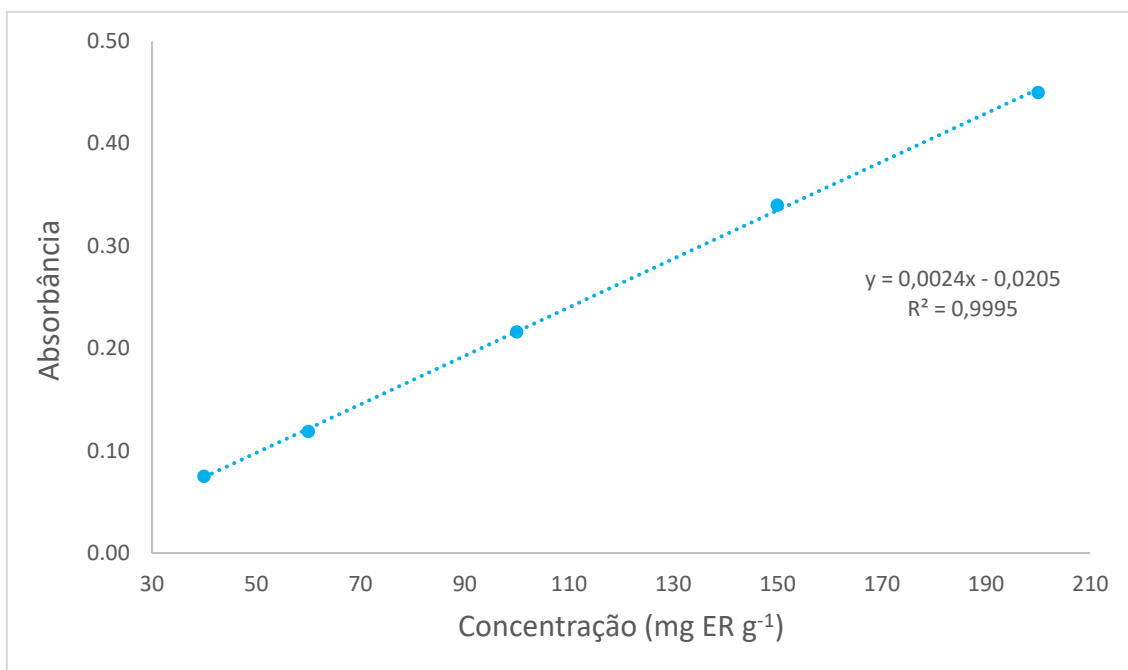


Figura 40: Curva de calibração com rutina para os ensaios de quantificação de flavonoides totais.

3.3.3.3. Atividade Antioxidante: Método do DPPH

A determinação da atividade antioxidante foi realizada mediante o método do DPPH, que consiste na observação da captura do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) por antioxidantes presentes na amostra. A análise foi baseada na metodologia descrita por Brand-Williams *et al.* (1995),²⁹⁹ com adaptações feitas por Rufino *et al.* (2007).³⁰⁰

Para realizar o experimento, uma solução metanólica de DPPH• a 0,06 mM foi preparada solubilizando-se 2,4 mg de DPPH• em 100 mL de álcool metílico grau HPLC em um balão volumétrico de vidro âmbar. Os extratos, por sua vez, foram diluídos 2% v/v em metanol.

Em ambiente escuro, 100 µL de cada amostra diluída a 2% foi misturada com 3,9 mL da solução de DPPH• a 0,06 mM e agitada com o auxílio de um agitador de tubos tipo Vortex VTX2500-220 da Biomixer (São Paulo, Brasil). Também foi preparada uma solução controle de forma similar, substituindo o volume de amostra por uma solução aquosa de etanol 50% v/v. O branco utilizado foi álcool metílico puro.

Após um período de repouso de 45 minutos, ao abrigo da luz, realizaram-se as leituras no espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 517 nm. A atividade antioxidante foi expressa como percentual de inibição (%I) em relação ao controle negativo, de acordo com a equação:

$$\%I = \left(\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \times 100 \quad (15)$$

Onde $A_{controle}$ refere-se à absorbância da solução de DPPH sem a amostra, enquanto $A_{amostra}$ refere-se à absorbância da amostra com o DPPH.

3.3.4. Análises por Espectrometria de Fluorescência Molecular

Todas as medidas foram realizadas em um espectrômetro de fluorescência Perkin Elmer LS-55. usando uma cubeta de quartzo de 1 × 1 cm. Foram obtidos espectros de emissão molecular (EEM) na faixa de 500 a 750 nm, com incremento de 1 nm, com excitação iniciada em 370 a 490 nm, com incremento de 10 nm, e velocidade de *scan* de, aproximadamente 600 nm.min⁻¹. Para cada amostra foi gerada uma matriz de dimensões 351 × 13 ($\lambda_{emissão} \times \lambda_{excitação}$) que, empilhadas, formam um tensor tridimensional de dimensões 51 × 351 × 13 (amostra × $\lambda_{emissão} \times \lambda_{excitação}$). As medidas foram realizadas em triplicata para cada extrato de obtido pela UAE das amostras de erva-mate processada.

3.3.5. Análises Cromatográficas por HPLC-DAD

O sistema de HPLC utilizado foi adquirido da Shimadzu (Quioto, Japão), contendo os seguintes módulos: duas bombas LC-20AD, provido de amostrador SIL-20A, desgaseificador de fase móvel DGU-20A3, forno de coluna CTO-20A e detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, adquirido da empresa Shimadzu (Quioto, Japão).

A coluna cromatográfica utilizada nas análises foi uma Zorbax Bonus-RP da Agilent, de comprimento 250 mm; diâmetro 4,6 mm e tamanho de partícula

3.5 μm . Os compostos foram separados utilizando duas fases móveis: uma fase móvel A composta por água ultrapura acidificada a 0,5% (v/v) com ácido fórmico; e uma fase móvel B composta por acetonitrila acidificada a 0,5% (v/v) com ácido fórmico. A eluição ocorreu a uma vazão constante de 0,7 mL.min⁻¹, em modo gradiente, iniciando em 10 % de fase B, aumentando a 60% de 0 a 45 min, permanecendo assim por 5 minutos, voltando a 10 % de B de 50 a 52 minutos e permanecendo assim por 15 minutos. A temperatura do forno foi mantida em 29°C e o volume de injeção foi de 10 μL . Para a detecção dos compostos, foram obtidos os espectros UV-Vis entre 200 e 800 nm. Os dados cromatográficos foram adquiridos e processados pelo *software* LCsolution, versão 1.25, da Shimadzu (Quioto, Japão).

3.3.6. Análises Cromatográficas por UHPLC-QTOF-MS

Duas amostras de extratos de erva-mate processada (uma brasileira e uma argentina), e uma amostra de extrato de folhas verdes, escolhidas arbitrariamente, foram analisadas por UHPLC-QTOF-MS.

O sistema de UHPLC-QTOF-MS utilizado consiste em um cromatógrafo a líquido, modelo Nexera 2 da Shimadzu, acoplado a um espectrômetro de massa da Bruker Daltonics, modelo Impact II, com analisador de massa híbrido: quadrupolo e tempo de voo, disponível no Laboratório de Técnicas Cromatográficas acopladas a espectrometria de massa do IQ - UFRGS. O espectrômetro de massa é equipado com um sistema de ionização por eletronebulização (ESI), operando nos modos de ionização negativo e positivo.

O volume de injeção de amostra foi de 10 μL . As condições de análises do espectrômetro de massa foram: tensões capilares de 500 e 2500 V, pressão do nebulizador de 9 bar de gás N₂, fluxo de gás N₂ de 9 L min⁻¹ e temperatura da fonte de 200 °C. O espectrômetro de massa operou no modo de aquisição *broadband collision induced ionization* (bbCID) e registrou espectros com razão m/z de 100 - 1500 a uma taxa de varredura de 2 Hz em ambos os modos. As energias de colisão foram de 4 eV para aquisição dos espectros de MS e, uma rampa de 25 eV a 50 eV, para obtenção dos espectros de MS/MS.

A calibração do espectrômetro de massa foi realizada no início de cada corrida cromatográfica, a partir da injeção de uma solução de formiato de sódio 10 mM, em uma mistura de água/isopropanol (1:1).

A análise dos dados foi realizada no *software* Compass DataAnalysis 4.2, da Bruker Daltonik.

3.3.7. Análises Quimiométricas

Todos os cálculos quimiométricos envolvendo a modelagem PARAFAC foram realizados em ambiente MATLAB R2015a, utilizando o pacote *The N-way Toolbox*, implementado por Rasmus Bro (2022), disponível para *download* em <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/1088-the-n-way-toolbox>.³⁰¹ A PCA foi realizada utilizando o *software* ChemoStat® V2.

3.4. METABÓLITOS VOLÁTEIS

3.4.1. Hidrodestilação

As amostras da fração volátil das folhas verdes e processadas de erva-mate foram obtidas a partir de 100 g de amostra, hidrodestiladas por 4 h, utilizando um aparelho do tipo Clevenger, seguindo a metodologia recomendado pela Farmacopeia Oficial Brasileira V.³⁰² As folhas verdes e processadas foram escolhidas arbitrariamente. Os óleos essenciais foram secos com sulfato de sódio anidro, avolumados a 1 mL de diclorometano em frascos âmbar, e armazenados a -4 °C para análise posterior.

3.4.2. Análises Cromatográficas por GC×GC/TOFMS

As amostras da fração volátil de erva-mate foram analisadas por GC×GC/TOFMS, utilizando um cromatógrafo a gás Agilent 6890N acoplado a um espectrômetro de massas por tempo de voo, modelo Pegasus IV, LECO (St. Joseph, MI, EUA), com modulador criogênico de quatro jatos (quadrijet) com N₂

resfriado por nitrogênio líquido.

A separação cromatográfica da primeira dimensão foi realizada em uma coluna capilar DB-5, 5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano, com 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,10 µm de espessura de fase estacionária. Na segunda dimensão, foi utilizada uma coluna capilar DB-17, 50%-fenil-50%-dimetilpolisiloxano, com 2,15 m de comprimento, 0,18 mm de diâmetro interno e 0,18 µm de espessura de fase estacionária. Ambas as colunas foram adquiridas da Agilent Technologies - J&W Scientific (Palo Alto, CA, EUA).

O gás de arraste utilizado foi hélio ultrapuro, a uma vazão de 1 mL.min⁻¹. O volume de injeção foi de 1 µL, no modo *splitless*, realizado em injetor automático. As temperaturas do injetor, da interface e da fonte de íons foram mantidas a 280 °C. A energia para ionização por impacto eletrônico foi de 70 eV. O intervalo de massas de íons detectados foi de 45 a 450 Daltons e a voltagem do detector foi de 1,4 kV. A programação de temperatura do forno foi de: temperatura inicial (45 °C), mantida por 5 min, seguido de aquecimento a 3 °C.min⁻¹, até 295 °C. O forno secundário foi mantido 10 °C acima da temperatura do forno primário. O período de modulação foi de 6 s, com período de jato quente correspondente a 40% do período de modulação.

3.4.2.1. Tratamento de Dados

Para o tratamento dos dados cromatográficos bidimensionais, foi utilizado o *software* ChromaTOF 3.32. A identificação tentativa dos compostos foi realizada mediante a comparação dos espectros de massas obtidos para os analitos com os presentes na biblioteca NIST, versão 05. Foram considerados apenas os compostos que apresentaram similaridade espectral com a biblioteca de no mínimo 70%, para a análise bidimensional. Para aumentar a confiabilidade na identificação dos compostos, foram calculados, mediante a equação de Van den Dool e Kratz³⁰³ (Equação 16), os índices de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI, do inglês *linear temperature programmed retention index*) para os compostos detectados. Para tanto, foi realizada a análise de uma mistura de padrões de alcanos lineares (C₆-C₃₀), preparada em hexano destilado, na concentração de 1% v/v, nas mesmas condições cromatográficas

utilizadas nas análises das amostras estudadas. Os LTPRI obtidos experimentalmente foram comparados com os reportados na literatura científica.³⁰⁴

$$LTPRI = 100 \times \left(n + \frac{t_{R(i)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}} \right) \quad (16)$$

Na qual:

- $LTPRI$ é o índice de retenção com programação linear de temperatura
- $t_{R(i)}$ é o tempo de retenção do composto desconhecido;
- $t_{R(n)}$ é o tempo de retenção do alcano linear menos retido pela fase estacionária do que o composto i ;
- $t_{R(n+1)}$ é o tempo de retenção do alcano linear mais retido pela fase estacionária do que o composto i ;

Os compostos foram considerados tentativamente identificados por LTPRI apenas quando o valor da diferença (em módulo) entre o LTPRI da literatura e o experimental foi menor ou igual a 20 unidades.³⁰⁵ As quantidades relativas de compostos individuais foram calculadas com base na área de pico sem o uso de um fator de correção.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. METABÓLITOS NÃO-VOLÁTEIS

4.1.1. Otimização dos Parâmetros da UAE

Mediante a técnica estatística de metodologia de superfície de resposta, a partir de um CCD 2^3 rotativo, é possível obter a relação matemática das variáveis dependentes com as variáveis independentes por regressão múltipla, ou seja, adquirir equações empíricas de previsão das respostas em função das variáveis estudadas. Além disso, a MSR permite identificar os efeitos das variáveis estudadas de forma isolada, assim como a interação entre elas e suas contribuições quadráticas.

Para execução do CCD 2^3 rotativo e otimização da UAE da erva-mate, foram consideradas o tempo e a temperatura de extração (x_1 e x_2 , respectivamente), e o percentual de etanol na fase extratora hidroetanólica (x_3) como variáveis independentes. Paralelamente, as variáveis dependentes estudadas foram rendimento mássico (y_1), conteúdo fenólico e de flavonoides totais (y_2 e y_3 , respectivamente), percentual de inibição de DPPH (y_4), e área total integrada do TAC (y_5). Os níveis estudados das variáveis independentes, bem como os valores obtidos para cada variável dependente em cada um dos ensaios realizados no CCD, são demonstrados na **Tabela VIII**.

Tabela VIII: Variáveis e níveis utilizados (valores codificados e decodificados) para o CCD e as respostas obtidas para a UAE da erva-mate, na ordem padrão.

Ensaio	Variáveis Independentes			Variáveis Dependentes				
	t (min)	T (°C)	%EtOH	Rd ^a	TPC ^b	TFC ^c	%I ^d	TAC ^e
	x ₁	x ₂	x ₃	y ₁	y ₂	y ₃	y ₄	y ₅
1	-1 (15,0)	-1 (40)	-1 (25)	34,3	66,47	33,42	36,2	27,0
2	+1 (25,0)	-1 (40)	-1 (25)	33,3	78,55	39,30	43,4	29,1
3	-1 (15,0)	+1 (70)	-1 (25)	35,8	77,51	38,54	47,3	27,3
4	+1 (25,0)	+1 (70)	-1 (25)	32,5	71,99	35,56	35,2	26,1
5	-1 (15,0)	-1 (40)	+1 (25)	28,7	64,78	33,56	28,0	23,2
6	+1(25,0)	-1 (40)	+1 (75)	30,0	68,39	37,03	44,8	25,1
7	-1 (15,0)	+1 (70)	+1 (75)	32,0	71,75	38,54	46,1	26,8
8	+1(25,0)	+1 (70)	+1 (75)	30,7	65,98	33,42	40,9	21,4
9	-1,68 (11,6)	0 (55)	0 (50)	32,7	74,39	37,60	43,4	27,9
10	+1,68 (28,4)	0 (55)	0 (50)	33,5	78,47	38,34	42,9	28,6
11	0 (20,0)	-1,68 (30)	0 (50)	32,9	79,19	43,29	46,7	27,7
12	0 (20,0)	+1,68 (80)	0 (50)	35,0	81,59	43,48	48,9	28,7
13	0 (20,0)	0 (55)	-1,68 (8)	32,8	71,27	30,18	34,3	24,4
14	0 (20,0)	0 (55)	+1,68 (92)	25,9	57,47	26,43	28,2	17,4
15	0 (20,0)	0 (55)	0 (50)	32,9	77,51	41,77	51,3	28,0
16	0 (20,0)	0 (55)	0 (50)	33,0	76,31	40,11	47,2	28,7
17	0 (20,0)	0 (55)	0 (50)	33,8	79,83	39,79	52,0	28,8

a: Rendimento (%); b: conteúdo fenólico total (mg EAG g⁻¹); c: conteúdo de flavonoides totais (mg ER g⁻¹); d: percentual de inibição de DPPH; e: área total integrada do TAC.

Conforme pode ser visualizado na tabela acima, o rendimento da UAE da erva-mate, por exemplo, variou de 25,9% a 35,8%. Estes valores foram consideravelmente superiores aos obtidos por Tilili e Sarikurkcu,³⁰⁶ que obtiveram um rendimento mássico de 17,08% mediante uma extração sólido-líquido convencional, evidenciando a maior transferência de massa que ocorre devido à cavitação.

Aos conjuntos de respostas de cada variável dependente, ajustou-se um modelo polinomial de segunda ordem, ou ainda, o modelo quadrático (Equação 17):

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (17)$$

Pode-se escrever a equação acima na forma matricial:

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{X}\mathbf{b} \quad (18)$$

onde $\hat{\mathbf{y}}$ e \mathbf{b} são as matrizes contendo respectivamente os valores previstos pelo modelo e os estimadores dos parâmetros:

$$\hat{\mathbf{y}} = \begin{bmatrix} \hat{y}_1 \\ \hat{y}_2 \\ \vdots \\ \hat{y}_{17} \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \mathbf{b} = \begin{bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_{11} \\ b_{22} \\ b_{33} \\ b_{12} \\ b_{13} \\ b_{23} \end{bmatrix}$$

Para calcular os elementos de \mathbf{b} , cujos valores representam os estimadores para os coeficientes dos modelos, utiliza-se a Equação 19:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}^t\mathbf{y} \quad (19)$$

Além disso, dos três ensaios repetidos no ponto central, calculou-se uma estimativa da variância das observações para cada variável dependente. Resolvendo-se a Equação 19 e utilizando o teste t de Student, verifica-se a significância estatística a um nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) dos coeficientes obtidos para cada modelo (**Tabela IX**).

Tabela IX: Coeficientes significativos dos modelos ajustados.

Coeficientes	Erro	t_{calculado}	p
<i>Rendimento mássico</i>			
b_0	33,3 ± 0,3	116,9	0,00007
b_2	0,6 ± 0,1	4,5	0,04
b_3	-1,9 ± 0,1	14,3	0,005
b_{33}	-1,4 ± 0,1	9,2	0,01
<i>TPC</i>			
b_0	78,1 ± 1,0	75,7	0,0002
b_3	-3,4 ± 0,5	7,1	0,02
b_{33}	-5,4 ± 0,5	10,1	0,01
b_{12}	-3,4 ± 0,6	5,3	0,033
<i>TFC</i>			
b_0	40,6 ± 0,6	66,3	0,0002
b_{33}	-4,4 ± 0,3	13,8	0,005
b_{12}	-2,2 ± 0,4	5,8	0,03
<i>%I</i>			
b_0	50,2 ± 1,5	33,2	0,0009
b_{33}	-6,7 ± 0,8	8,5	0,013
b_{12}	-5,2 ± 0,9	5,6	0,03
<i>TAC</i>			
b_0	28,5 ± 0,2	116,7	0,00005
b_3	-1,8 ± 0,1	15,7	0,004
b_{33}	-2,7 ± 0,1	21,2	0,002
b_{12}	-1,3 ± 0,1	8,8	0,01

Por conseguinte, negligenciando-se os coeficientes que não apresentaram significância estatística ao nível de 95% de confiança, obtém-se as seguintes equações, em valores codificados, para os modelos quadráticos ajustados:

$$\hat{y}_1 = 33,2 + 0,6x_2 - 1,9x_3 - 1,4x_3^2$$

$$\hat{y}_2 = 78,1 - 3,4x_3 - 5,4x_3^2 - 3,4x_{12}$$

$$\hat{y}_3 = 40,6 - 4,4x_3^2 - 2,2x_{12}$$

$$\hat{y}_4 = 50,2 - 6,7x_3^2 - 5,2x_{12}$$

$$\hat{y}_5 = 28,5 - 1,8x_3 - 2,7x_3^2 - 1,3x_{12}$$

4.1.1.1. Validação dos Modelos

Um bom modelo de regressão deve explicar satisfatoriamente as variações da variável dependente nos ensaios. Logo, realizou-se análises de variância (**Tabela X**) para a confirmação da significância estatística dos modelos propostos.

Tabela X: Análise de variância para o modelo quadrático.

Fonte de variação	SQ	Nº de g. l.	MQ	F	F _{Tab}	p
Rendimento Mássico						
Regressão	89,0	9	9.9	25,5	2,7	0,0002
Resíduos	2,7	7	0.4			
Falta de Ajuste	2,2	5	0.4	1,8	9,3	0,4
Erro Puro	0,5	2	0.2			
Total	91,7	16				
% Variação Explicada:	97,0	% Máx. Variação Explicável:				99,5
TPC						
Regressão	654,4	9	72.7	11.0	2,7	0.002
Resíduos	46,4	7	6.6			
Falta de Ajuste	40,0	5	8.0	2.5	9,3	0.3
Erro Puro	6,4	2	3.2			
Total	700,7	16				
% Variação Explicada:	93,4	% Máx. Variação Explicável:				99,1
TFC						
Regressão	327,8	9	36.4	68.2	2,7	0,000006
Resíduos	3,7	7	0.5			
Falta de Ajuste	1,5	5	0.3	0.3	9,3	0,9
Erro Puro	2,3	2	1.1			
Total	331,5	16				
% Variação Explicada:	98,9	% Máx. Variação Explicável:				99,3
%I						
Regressão	832,2	9	92.5	19.7	2,7	0,0004
Resíduos	32,9	7	4.7			
Falta de Ajuste	19,2	5	3.8	0.6	9,3	0,7
Erro Puro	13,7	2	6.9			
Total	865,2	16				
% Variação Explicada:	96,2	% Máx. Variação Explicável:				98,4
TAC						
Regressão	152,7	9	17,0	21,4	2,7	0,0003
Resíduos	5,6	7	0,8			
Falta de Ajuste	5,2	5	1,0	5,8	9,3	0,2
Erro Puro	0,4	2	0,2			
Total	158,3	16				
% Variação Explicada:	96,5	% Máx. Variação Explicável:				99,8

SQ: soma quadrática da regressão; *MQ*: média quadrática da regressão.

Pela ANOVA, fica evidente que os modelos quadráticos ajustados não apresentam evidência de falta de ajuste, demonstrado mediante teste F envolvendo esta fonte de variação, ao nível de 95% de confiança ($p > 0,05$). Além disso, os modelos quadráticos ajustados explicam entre 93,4% e 98,9% da variação em torno da média, com valores próximos ao percentual máximo de variação explicável. A variação em torno da média devido aos parâmetros de regressão foi significativa para todos os modelos, verificada mediante o teste F , à um nível de confiança superior a 99%, uma vez que esta fonte de variação apresentou um valor de p inferior a 0,01 para todas as regressões. Finalmente, a relação entre os valores preditos pelos experimentos e os valores experimentais (**Figura 41**) aproximam-se da reta identidade, demonstrando a eficiência dos ajustes aos dados experimentais.

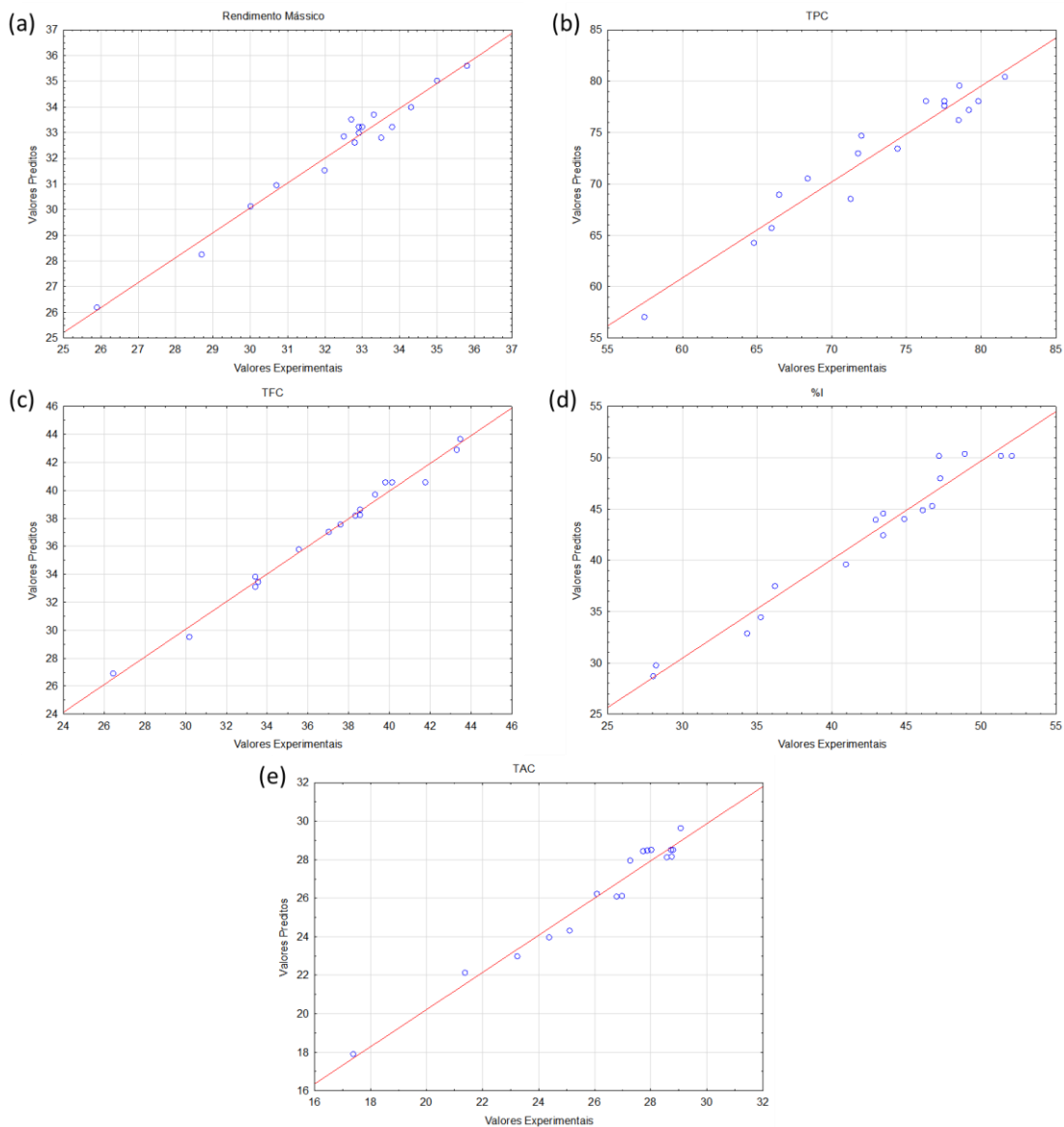


Figura 41: Gráficos de Valores Preditos x Observados para os modelos referentes ao (a) rendimento mássico, (b) TPC, (c) TFC, (d) %I, e (e) TAC.

Como o modelo utilizado neste trabalho tem como base a estatística paramétrica, um pressuposto importante que deve ser verificado é a normalidade dos resíduos das regressões. A **Figura 42** mostra que os resíduos se distribuem razoavelmente próximos da normalidade, representada pela reta no gráfico, não comprometendo o pressuposto de parametricidade da ANOVA.

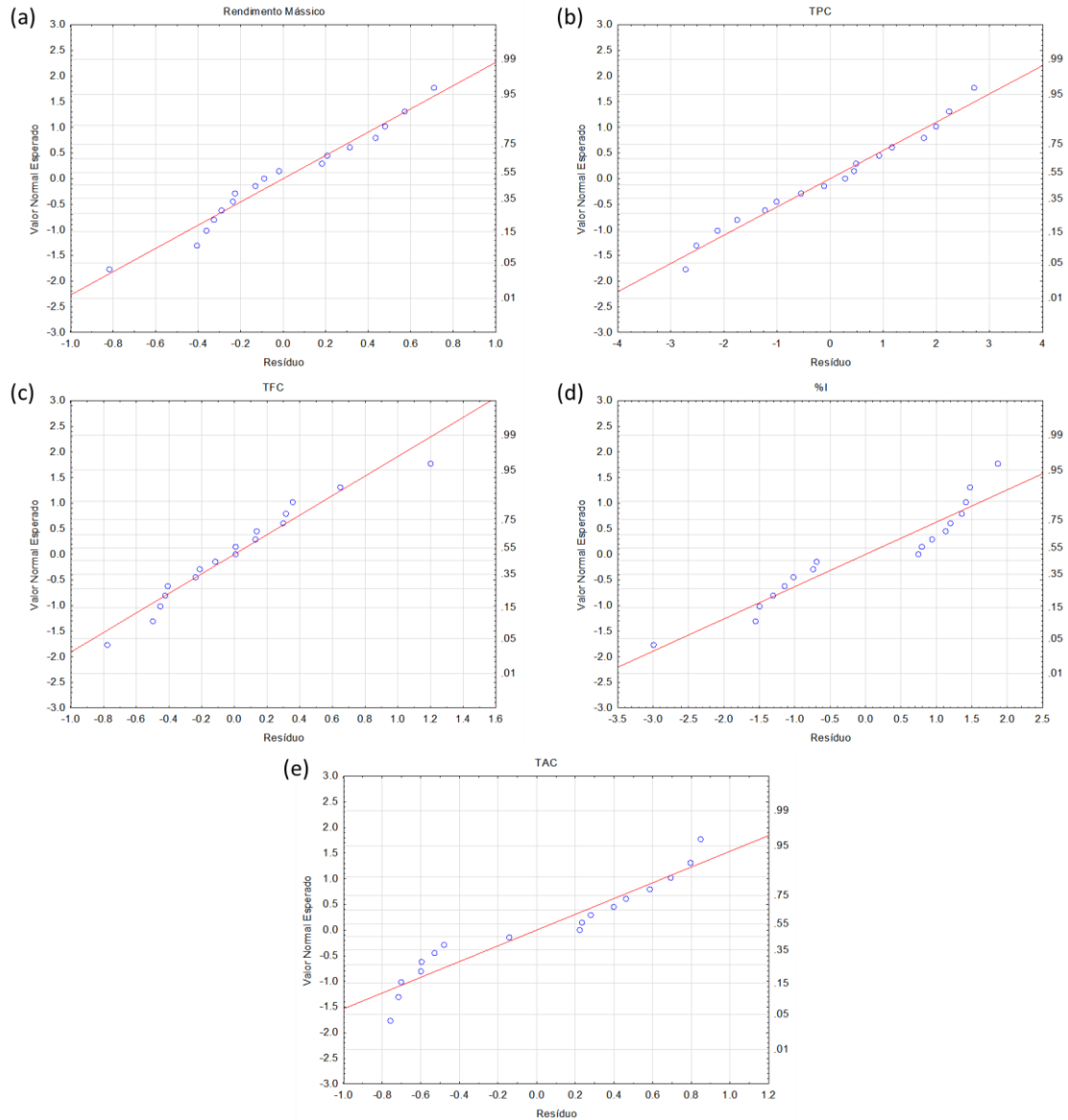


Figura 42: Gráficos de Valores Normais Esperados x Resíduos para os modelos referentes ao (a) rendimento mássico, (b) TPC, (c) TFC, (d) %I, e (e) TAC.

4.1.1.2. Análise das Superfícies de Resposta

A partir do polinômio de cada modelo quadrático ajustado construiu-se as superfícies de resposta correspondentes, em função das variáveis codificadas.

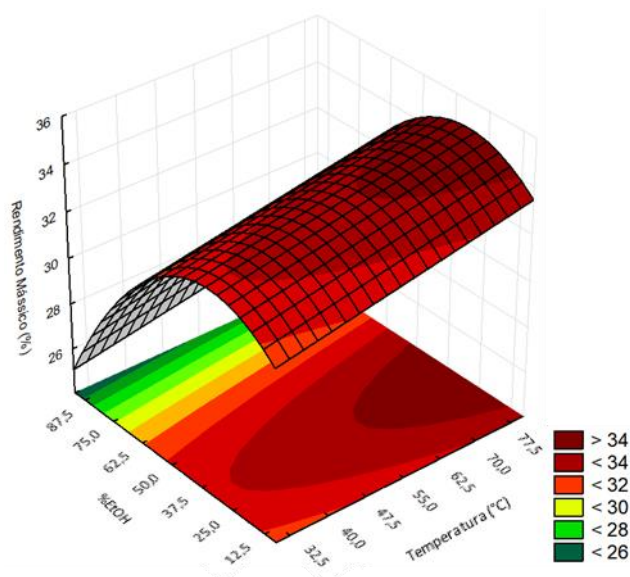


Figura 43: Superfície de resposta do modelo quadrático ajustado para o rendimento mássico.

Analisando os coeficientes do modelo quadrático ajustado e a superfície de resposta correspondente ao rendimento mássico da UAE (**Figura 43**), verifica-se que o aumento da temperatura proporciona uma maior eficiência na extração. Este efeito pode ser atribuído ao fato que, ao elevar a temperatura, aumenta-se os coeficientes de solubilidade e difusão dos compostos que serão extraídos, bem como ocorre a redução da viscosidade do solvente extrator, facilitando a transferência de massa do sistema. Além disso, verifica-se que o rendimento da extração é favorecido quando utilizadas concentrações intermediárias de etanol no solvente extrator. O melhor desempenho observado para essas concentrações intermediárias justifica-se, pois, uma elevada concentração de água, embora possua uma polaridade favorável à extração, confere ao meio extrator uma alta viscosidade, que dificulta uma penetração eficiente do solvente na matriz vegetal. Em contrapartida, altas concentrações de etanol desnatura proteínas e impede a dissolução dos compostos fenólicos.³⁰⁷ Logo, essas características contribuem para que uma concentração intermediária de etanol possua um melhor desempenho extrativo. Isto torna-se mais evidente ao analisar-se as curvas de teor de fenóis e flavonóides totais, bem como as de percentual de inibição de DPPH e área total do cromatograma de absorvância total, em relação ao percentual de etanol na fase extratora (**Figura 44**). Nestas curvas também se observa uma concordância com os

resultados obtidos para o rendimento, uma vez que concentrações intermediárias de etanol favoreceram a recuperação de metabólitos secundários e, conseqüentemente uma maior concentração de antioxidantes no extrato.

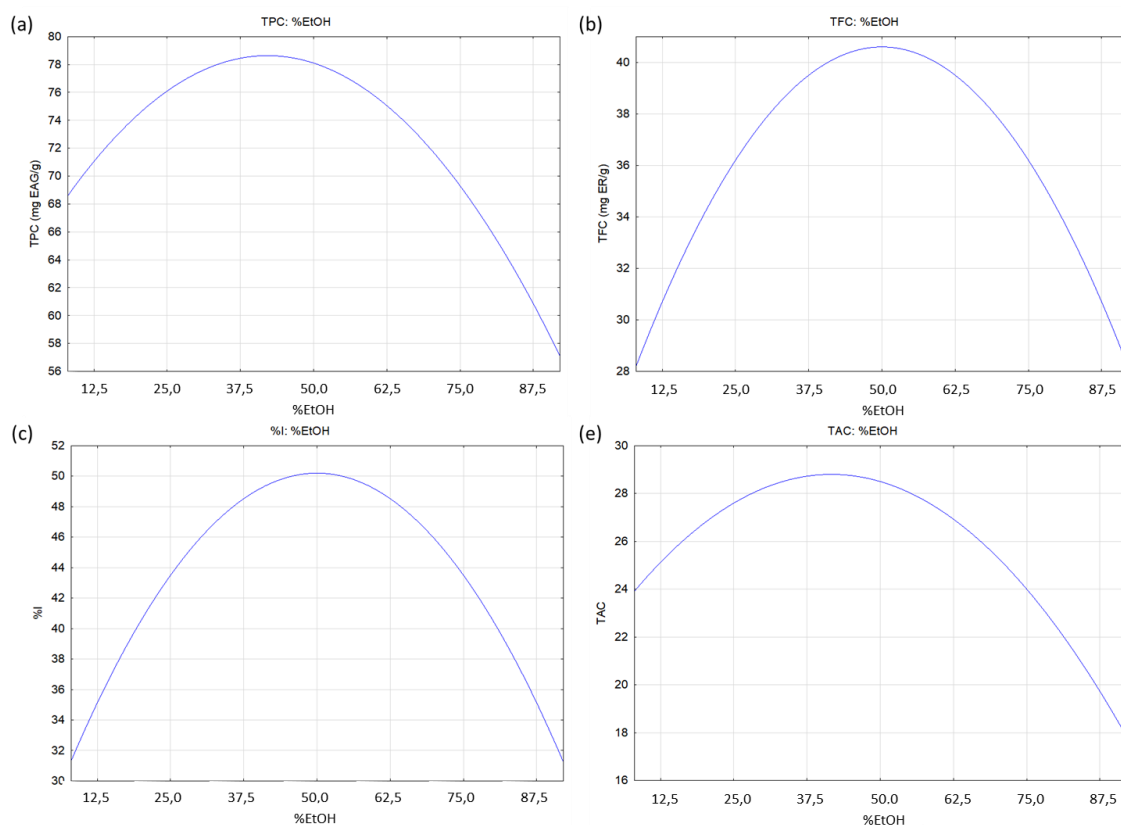


Figura 44: Curvas de (a) rendimento mássico, (b) TPC, (c) TFC, (d) %I, e (e) TAC em relação ao %EtOH na fase extratora.

Em contrapartida, ao avaliar-se as superfícies de respostas para o TPC e TFC, bem como as de percentual de inibição de DPPH e área total do cromatograma de absorbância total, em relação ao tempo e temperatura de extração (**Figura 45**), fica claro a existência de uma interação antagônica significativa das variáveis independentes mencionadas. Sob temperaturas mais baixas, verifica-se um aumento na recuperação de metabólitos secundários ao utilizar-se tempos de extração mais elevados. Contudo, o efeito contrário é observado sob elevadas temperaturas, demonstrando que a condução de extrações sob tempos e temperaturas elevadas provoca uma redução na concentração de compostos fenólicos antioxidantes no extrato e, conseqüentemente, uma redução de sua capacidade antioxidante. Este efeito

pode estar relacionado à degradação térmica de compostos fenólicos antioxidantes. Este resultado apresenta concordância com efeitos similares relatados na literatura. Toh *et al.*³⁰⁸ descrevem uma relação consistente entre tempos de extração prolongados com a redução da atividade antioxidante mediante a polimerização dos compostos fenólicos. Além disso, Wong *et al.*³⁰⁹ alerta que tempos de extração prolongados favorecem a exposição indesejável de compostos fenólicos à fatores como aquecimento, luz e oxigênio, que provocam a redução da atividade antioxidante, devido à oxidação destes compostos.

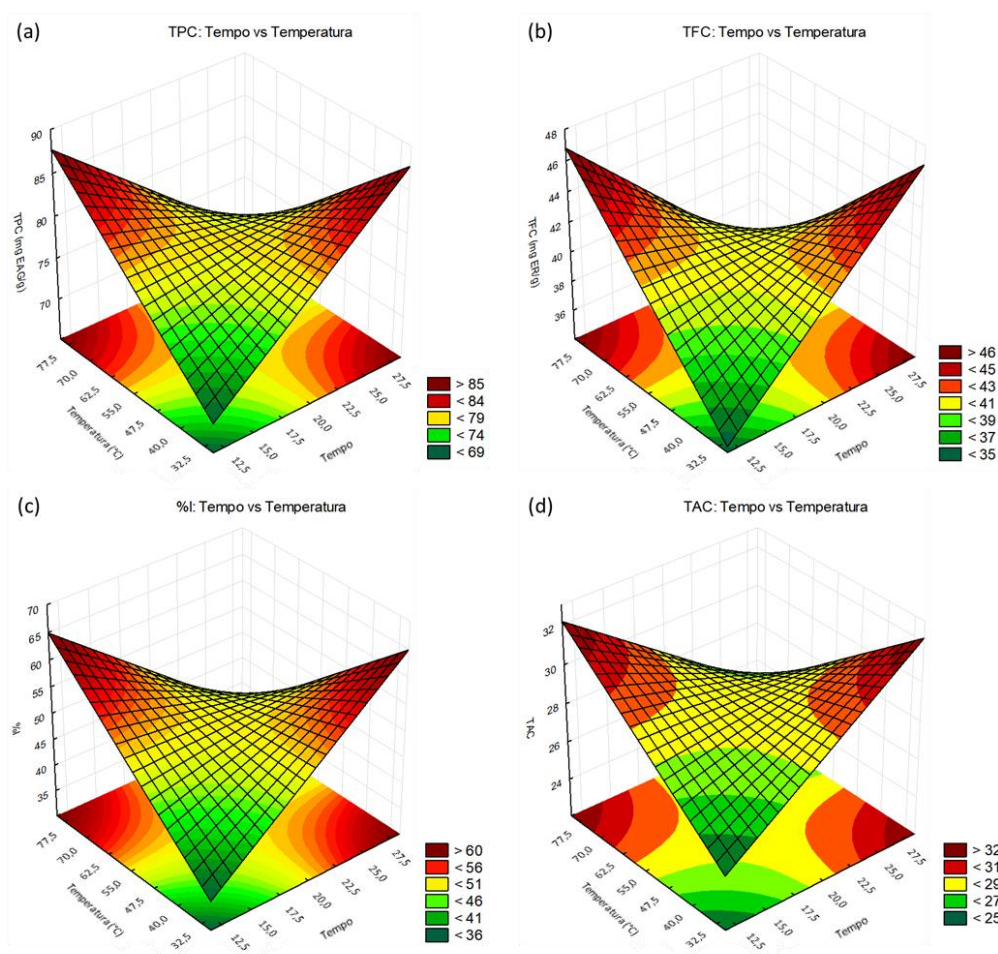


Figura 45: Superfícies de resposta do modelo quadrático ajustado para o TPC (a) e TFC (b), bem como as de percentual de inibição de DPPH (c) e área total do cromatograma de absorvância total (d), em relação ao tempo e temperatura de extração.

4.1.1.3. Maximização das Respostas

A partir dos modelos quadráticos ajustados obtidos, para calcular o valor das variáveis independentes que maximizarão as respostas, é preciso verificar seu valor no ponto estacionário da superfície onde, do cálculo diferencial, sabe-se que a primeira derivada parcial da função em relação a essa variável é igual a zero. Contudo, o ponto estacionário de uma variável dependente só estará presente no modelo se seu coeficiente quadrático for estatisticamente significativo. Para fatores em que apenas seus coeficientes lineares foram determinados com validade estatística, avaliou-se o sinal da sua respectiva primeira derivada, de modo a avaliar se seu efeito para a variável dependente é positivo ou negativo. Nos casos em que o efeito foi positivo, tomou-se como condição ótima para este fator o seu valor no nível mais alto avaliado. Similarmente, para casos de efeitos negativos, tomou-se o valor da variável no nível mais baixo. Para os casos em que o efeito de interação teve uma magnitude superior aos efeitos individuais, considerou-se se a interação foi sinérgica ou antagônica para definir os níveis ótimos. Dessa forma, as condições otimizadas para cada modelo estão presentes na **Tabela XI**.

Tabela XI: Condições otimizadas para UAE de folhas de erva-mate.

	t (x ₁)	T (x ₂)	%EtOH (x ₃)
Rendimento Mássico	ns	80 °C	33%
TPC	¬T	¬t	42%
TFC	¬T	¬t	50%
%I	¬T	¬t	50%
TAC	¬T	¬t	42%
Condição Otimizada	11,6 min	80 °C	43%

ns: não significativo a 95% de confiança; ¬x: efeito antagônico à variável x.

Conforme pode ser visualizado na tabela acima, o percentual de etanol ótimo na fase extratora (43%) foi definido a partir da média de valores que otimizam cada variável dependente estudada. As variáveis independentes temperatura e tempo de extração possuem efeito antagônico entre si para todas

as variáveis dependentes, à exceção do rendimento mássico, que atinge os maiores valores no nível mais alto da variável temperatura (80 °C), enquanto o efeito do tempo de extração não possui significância estatística na faixa estudada, à um nível de confiança de 95%. Portanto, optou-se por trabalhar no nível mais alto da variável temperatura e no mais baixo da variável tempo (11,6 min).

Tendo em vista a validação experimental do modelo, foram realizados mais 3 experimentos, desta vez utilizando as condições de trabalho escolhidas. Os resultados obtidos para cada variável dependente, bem como o valor predito pelo respectivo modelo estão descritos na **Tabela XII**. Os resultados obtidos experimentalmente não diferem significativamente dos valores preditos, a um nível de confiança de 95%.

Tabela XII: Valores preditos das variáveis dependentes estudadas na condição de trabalho escolhida e valores experimentais obtidos nestas condições.

Variável dependente	y_{Exp}	y_{Predito}
Rendimento (%)	35,3 ± 0,7	35,0
TPC (mg EAG g⁻¹)	86,7 ± 1,4	87,3
TFC (mg ER g⁻¹)	45,4 ± 0,8	44,5
%I	63,2 ± 2,8	61,4
TAC	32,4 ± 0,4	32,1

As técnicas de extração convencionais (extração por solvente) foram as mais aplicadas nos estudos acerca dos compostos não voláteis da erva-mate.^{14,16–18,310–314} Nos processos tradicionais, a eficiência da extração baseia-se no poder de extração do solvente e na aplicação de aquecimento e/ou agitação.³¹⁵ Neste contexto, os resultados obtidos no presente estudo indicam uma eficiência de extração expressivamente superior às relatadas para extrações convencionais, quando comparados aos resultados de TPC e TFC com a literatura pertinente.^{14,16–18,310–314} Esse desempenho superior poder ser explicado tanto pela utilização de uma metodologia moderna de extração, quanto pela abordagem multivariada de otimização, que possibilitaram uma alta

eficiência na extração de compostos fenólicos, utilizando um tempo de extração relativamente baixo.

O presente estudo representa a primeira abordagem de otimização multivariada de UAE para fins de extração de metabólitos secundários não-voláteis de folhas de erva-mate, e o segundo a aplicar a UAE para os mesmos fins. O estudo anterior, publicado em 2009 por Dugo *et al.*³¹⁶ propõe a utilização de metanol como solvente extrator, com um tempo de extração de 75 °C, por 180 min. Contudo, os autores não realizaram uma avaliação quantitativa do método de extração, tornando-se impossível uma comparação mais detalhada entre as metodologias propostas.

Diante dessas evidências, as amostras de erva-mate processada foram extraídas por UAE, em triplicata, utilizando a metodologia de extração desenvolvida.

4.1.2. Espectrometria de Fluorescência Molecular e PARAFAC

Os extratos obtidos a partir da UAE das amostras processadas de erva-mate foram submetidos à análise de espectrometria de fluorescência molecular. Foram obtidos os espectros de emissão molecular (EEM) na faixa de 500 a 750 nm, com incremento de 1 nm, com excitação iniciada em 370 a 490 nm, com incremento de 10 nm, e velocidade de *scan* de, aproximadamente 600 nm.min⁻¹. Para cada amostra foi gerada uma matriz de dimensões 351 × 13 ($\lambda_{\text{emissão}} \times \lambda_{\text{excitação}}$) que, empilhadas, formam um tensor tridimensional de dimensões 51 × 351 × 13 (amostra × $\lambda_{\text{emissão}} \times \lambda_{\text{excitação}}$).

De modo geral, a decomposição de sinais de fluorescência de amostras de padrões, cuja composição é conhecida, constitui uma tarefa complexa. No presente estudo, um desafio ainda maior foi proposto: resolver EEMs de fluorescência contendo uma variedade de compostos de identidade desconhecida. Neste contexto, a aplicação do algoritmo de PARAFAC apresenta-se como uma estratégia promissora para resolver os sinais das amostras sem a necessidade utilizar-se padrões.

Entretanto, antes de proceder com a análise, o sinal de espalhamento Rayleigh foi removido das matrizes de fluorescência (**Figura 46**), dado que esse

viola a trilinearidade exigida pelo algoritmo PARAFAC. Para tanto, desprezou-se a região das matrizes contendo este sinal de espalhamento, analisando-se apenas as emissões de 500-750 nm. As matrizes de todas as análises de fluorescência das amostras de erva-mate processada foram ordenadas, uma em cima da outra, em um único cubo de dados, formando um tensor tridimensional de tamanho $51 \times 252 \times 13$ (amostra $\times \lambda_{\text{emissão}} \times \lambda_{\text{excitação}}$). Posteriormente, este cubo de dados foi analisado com PARAFAC, sob restrição de não negatividade nos três modos e critério de convergência de 10^{-6} para a resolução do ALS.

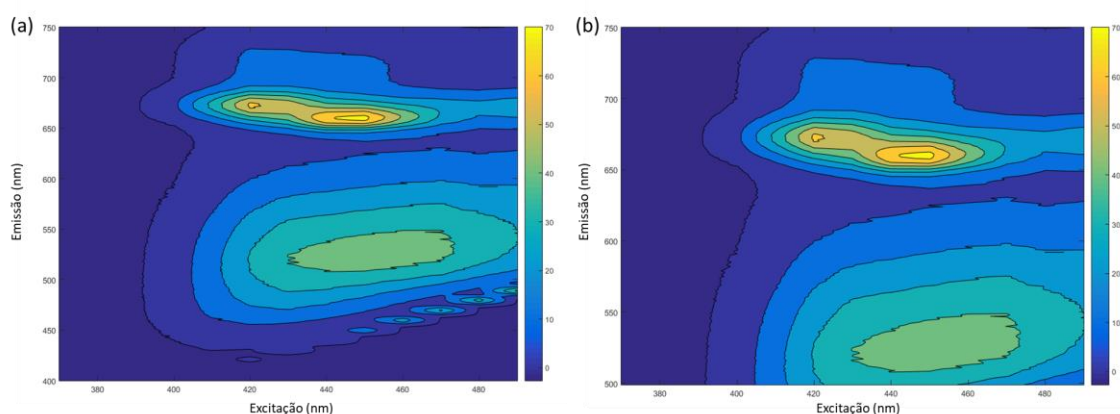


Figura 46: Demonstração da remoção do espalhamento de Rayleigh mediante a visualização dos diagramas de contorno das matrizes referentes a análise de fluorescência da amostra de erva-mate para tererê (a) antes e (b) após a remoção.

Para estimar o número de componentes PARAFAC, os valores de CORCONDIA foram calculados para um número crescente de componentes, obtendo valores de 100,00%; 99,99%; 74,88%; 46,32% e 1,95% de consistência de trilinearidade de 1 a 5 componentes, respectivamente. Observa-se que, para 4 ou mais fatores ocorre uma expressiva perda de trilinearidade. Portanto, com cerca de 75% de consistência de trilinearidade (**Figura 47**), 3 representa o melhor número de fatores para este modelo PARAFAC, que explicou 99,39% da variância do sistema.

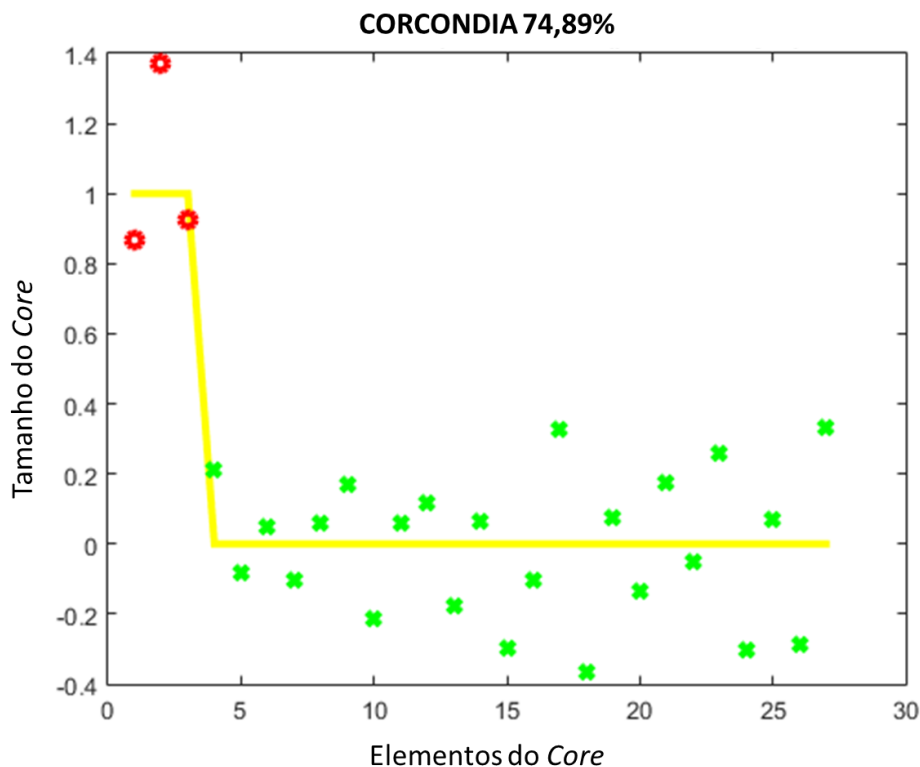


Figura 47: Resultado do teste CORCONDIA: pontos vermelhos indicam os elementos da superdiagonal, que devem ser próximos do valor unitário, e os pontos em verde são os demais elementos do tensor e devem ter valores próximos de zero. A linha amarela indica a trilinearidade perfeita.

A partir das matrizes de peso **B** e **C** é possível recuperar os perfis de emissão (**Figura 48a**) e excitação (**Figura 48b**), respectivamente, dos três fatores que contribuem com informações relevantes sobre os principais fluoróforos e seus respectivos comprimentos de onda máximos de excitação e emissão. Esses perfis apresentaram emissão máxima em 543 nm, 660 nm e 675 nm, com excitação máxima em 470 nm, 450 nm e 420 nm para o primeiro, segundo e terceiro fatores, respectivamente.

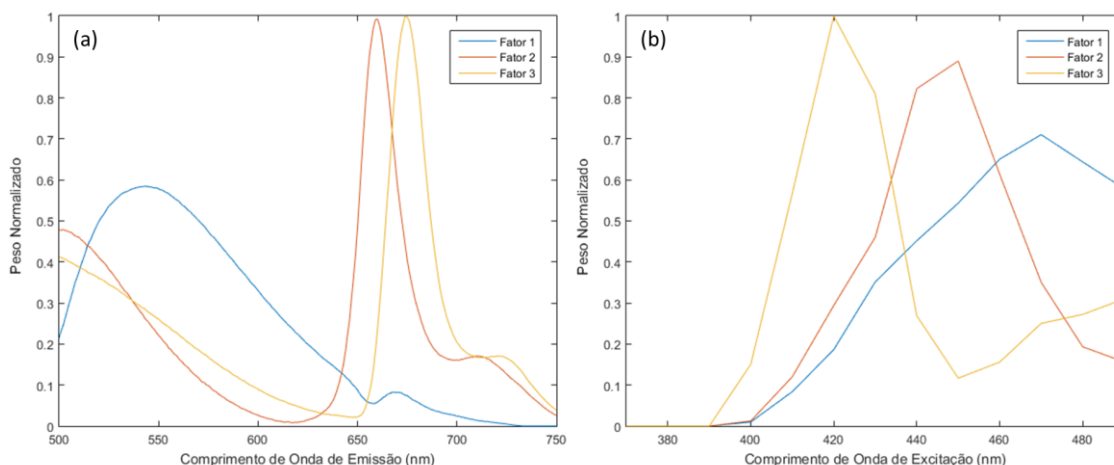


Figura 48: Perfis recuperados por PARAFAC em ambos os modos, (a) emissão e (b) excitação.

Em um estudo recente desenvolvido por Santos *et al.*,³¹⁷ os autores alertam sobre a dificuldade na identificação dos fluoróforos da erva-mate, em razão da escassez de estudos sobre esse assunto. Embora uma biblioteca de fluoróforos em alimentos tenha sido recentemente desenvolvida,²⁴⁴ os fluoróforos de erva-mate não foram explorados. Contudo, algumas inferências podem ser realizadas a partir dos perfis recuperados por PARAFAC. Vale ressaltar que, em decorrência da complexa variedade de compostos fluorescentes nas folhas de erva-mate, os perfis recuperados de emissão e excitação representam a soma das contribuições de moléculas fluorescentes similares.

O primeiro fator PARAFAC apresenta uma excitação máxima em torno de 470 nm e uma emissão máxima em 543 nm. De acordo com Santos *et al.* e outros relatos da literatura, esse fator pode estar relacionado a compostos fenólicos, presentes naturalmente nas folhas de erva-mate.^{317–319} Mais especificamente, esse fator pode estar relacionado a presença de ácidos cafeoilquínicos, conhecidos por sua abundância nas folhas de erva-mate.^{244,320} O segundo e terceiro fator PARAFAC, que apresentam máximos de excitação e emissão em 450/660 nm e 420/675 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), respectivamente, podem ser devido à presença de compostos como feofitina e a clorofila A, conforme achados de Santos *et al.* e Jakob Christensen.^{244,317,321}

Uma vez que o ambiente molecular influencia significativamente os perfis de emissão e excitação, e tendo em vista a escassez bibliográfica acerca do assunto, os resultados do presente estudo contribuem para um melhor entendimento dos fluoróforos presentes naturalmente nas folhas de erva-mate.

4.1.2.1. Análise Exploratória por PARAFAC

A partir da matriz de escores **A**, ou seja, para valores dos fatores PARAFAC para cada amostra analisada, foi construído um gráfico de dispersão tridimensional, que pode ser visualizado na **Figura 49**.

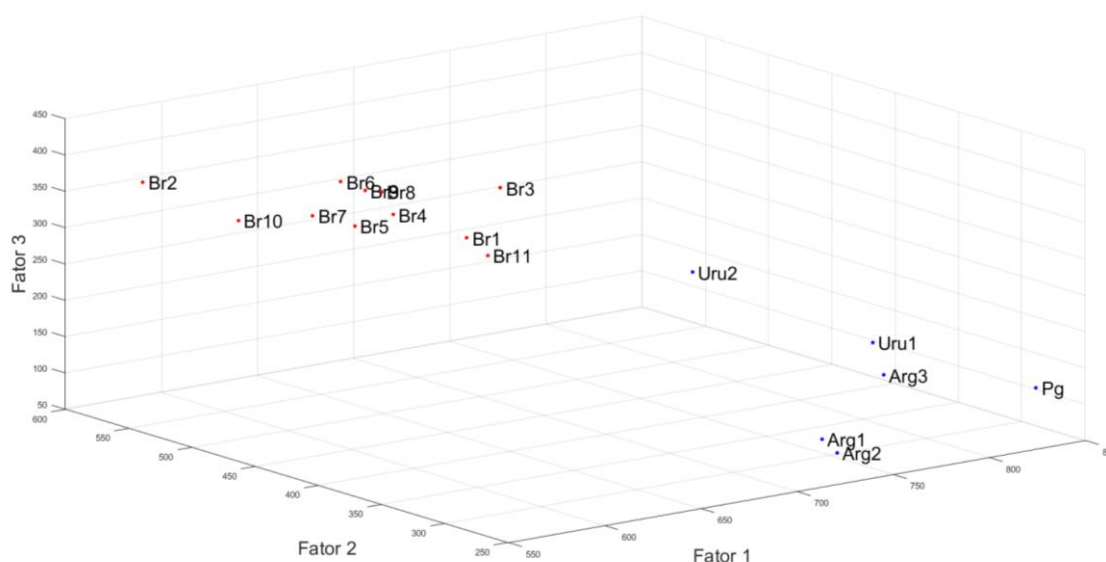


Figura 49: Gráfico de dispersão tridimensional dos escores obtidos para os três fatores PARAFAC.

Como pode ser observado, realizando-se uma análise não-supervisionada dos dados, obteve-se uma clara segregação do conjunto amostral em duas classes no espaço tridimensional: amostras destinadas ao mercado brasileiro, em vermelho, e amostras destinadas aos demais mercados consumidores dos países platinos (Argentina, Uruguai e Paraguai), em azul, que passam por uma etapa de estacionamento em seu processamento. Essa discriminação fica ainda mais evidente quando se observa as projeções

bidimensionais desses escores (**Figura 50**), nas quais podemos observar que todos os três fatores promovem essa segregação.

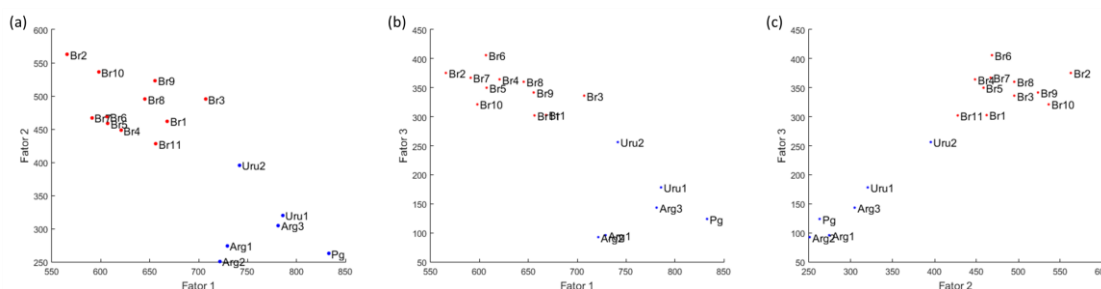


Figura 50: Gráficos de dispersão das projeções bidimensionais dos escores dos fatores PARAFAC. (a) fator 1 x fator 2; (b) fator 1 x fator 3; (c) fator 2 x fator 3.

Um ponto interessante de ser observado é a posição relativa da amostra Uru2 em relação a ambas as classes, ocupando uma posição intermediária em todos os três fatores. Essa amostra, embora seja destinada ao mercado externo e tenha passado pelo processo de estacionamento como as demais de sua classe, foi produzida no Brasil, a partir de folhas cultivadas no estado do Paraná. Esse fato, além de elucidar a sua posição no espaço tridimensional entre as duas classes, evidencia a contribuição edafoclimática para essa segregação.

Outra consideração relevante é o fato que as amostras que passaram pela etapa de estacionamento possuem escores inferiores para os fatores 2 e 3, quando comparadas às amostras da outra classe. Conforme descrito anteriormente, esses fatores estão possivelmente relacionados à presença de feofitina e clorofila. Neste contexto, a literatura relacionada corrobora essa hipótese. Em 2014, Valduga e colaboradores³²² demonstraram a redução nos teores destes pigmentos após o período de estacionamento, comportamento análogo ao observado no presente estudo para os fatores 2 e 3. Os autores relatam, ainda, um aumento na atividade de água e uma redução do pH ao longo do período de estacionamento. Além disso, Schmalko e Alzamora (2005) descrevem um aumento na cinética de degradação da clorofila sob alta atividade de água, enquanto Koca *et al.*³²³ demonstraram que a meia-vida da clorofila foi reduzida em pH baixo. A diminuição dos níveis de clorofila e feofitina também foi observada durante a vida de prateleira do produto.³²⁴

Por fim, avaliando os escores para o fator 1, observa-se que as amostras dos países platinos possuíram valores superiores às amostras brasileiras, indicando uma presença mais elevada de compostos fenólicos nestas amostras. Contudo, não há relatos científicos conclusivos publicados acerca dessa dissimilaridade metabólica, sendo necessários mais estudos para corroborar os achados da presente pesquisa.^{15,325}

4.1.3. Caracterização Química por UHPLC-QTOF-MS

Os extratos obtidos mediante a UAE das folhas de erva-mate foram caracterizados por UHPLC-QTOF-MS para cada modo de ionização do espectrômetro de massas de alta resolução: positiva e negativa (**Figura 51**).

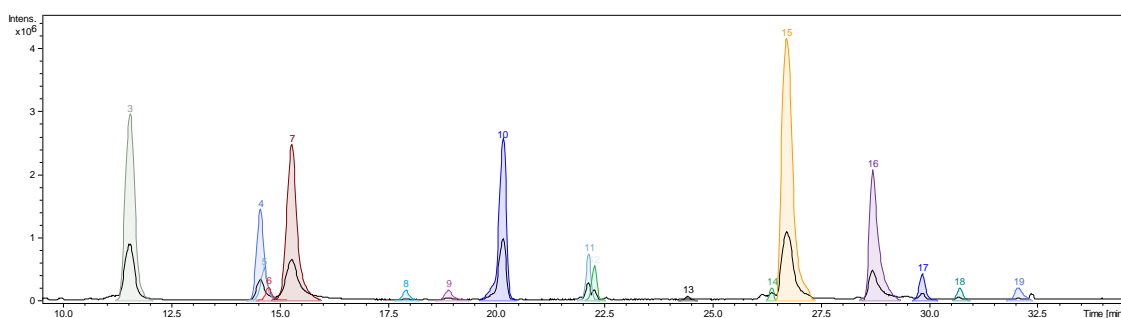


Figura 51: Cromatograma do pico base (BPC, do inglês *base peak chromatogram*), em preto, obtido na análise por UHPLC-QTOF-MS (modo negativo), e cromatogramas dos compostos detectados por deconvolução espectral e identificados.

A estratégia de identificação dos analitos presentes nos extratos foi realizada baseando-se nos seguintes parâmetros de aceitação: massa exata, mSigma (medida de concordância entre o padrão isotópico teórico e o mensurado, combinando o desvio padrão das massas e intensidades para todos os picos isotópicos, ou seja, valores mais baixos indicam melhor ajuste), tempo de retenção e perfil de fragmentação característico. Logo, a identificação dos compostos foi realizada mediante a verificação de todos esses parâmetros, composto por composto, mediante o uso do *software* Compass DataAnalysis.

A **Figura 52** ilustra um exemplo do processo de identificação positiva, ou seja, quando as informações sobre o tempo de retenção e fragmentos característicos estão disponíveis, além do conhecimento da fórmula molecular e

massa exata, para um composto analisado no modo negativo. Observou-se um pico cromatográfico com tempo de retenção de 15,3 min, o qual corresponde, possivelmente, ao 5-CQA. O espectro de massas (**Figura 52b**) apresentou um sinal com m/z 353,0881 Da que corresponde à molécula desprotonada do 5-CQA ($C_{16}H_{17}O_9$)⁻, e que possui um erro de massa de 0,8 ppm em relação à massa exata teórica, e um erro, em relação ao perfil isotópico teórico, de 0,9 (**Figura 52c**). O principal fragmento característico do 5-CQA (191,0556), correspondente a ($C_7H_{11}O_6$)⁻, observado no espectro obtido com a função bbCID foi extraído e apresentou o mesmo tempo de retenção que o 5-CQA (**Figura 52a**), erro de massa muito baixo (0,7 ppm) e perfil isotópico similar ao teórico (**Figura 52d**). Portanto, a presença de 5-CQA pôde ser confirmada.

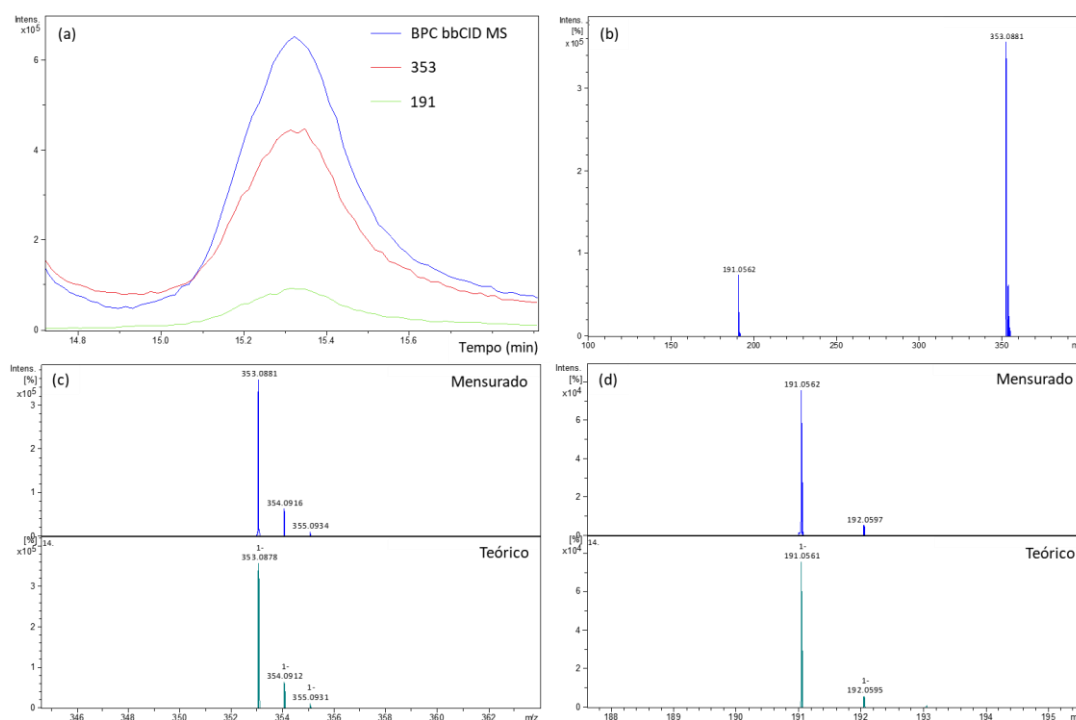


Figura 52: Identificação positiva de 5-CQA. (a) Cromatogramas extraídos dos íons 353 e 191, sobreposto ao cromatograma da função bbCID. (b) Espectro de massas obtido para o pico em 15,3 min. (c) e (d) Comparação dos perfis isotópicos mensurados com os teóricos para as espécies ($C_{16}H_{17}O_9$)⁻ e ($C_7H_{11}O_6$)⁻, respectivamente.

Em contrapartida, para compostos cujos padrões analíticos não estavam disponíveis, foi realizada uma identificação tentativa. Para exemplificar este processo, citamos como exemplo o pico presente em 11,6 minutos, cujo espectro

de massas apresentou um sinal com m/z 353,0880 Da que corresponderia à molécula desprotonada ($C_{16}H_{17}O_9$)⁻, com um erro de massa de 0,5 ppm, e 5,2 em relação ao perfil isotópico, o que indicaria tratar-se de um ácido cafeoilquínico. Avaliando-se os principais fragmentos, verifica-se a presença dos sinais em 191,0561, 179,0349 e 135,0453 m/z , que corresponderiam às espécies ($C_7H_{11}O_6$)⁻, ($C_9H_7O_4$)⁻ e ($C_8H_7O_2$)⁻, respectivamente. Comparando a ordem de eluição dos ácidos clorogênicos reportada na literatura e o padrão de fragmentação obtida com a registrada no *MassBank* para o 3-CQA, verifica-se uma notória similaridade (**Figura 53**). Logo, esse composto foi tentativamente identificado como 3-CQA.

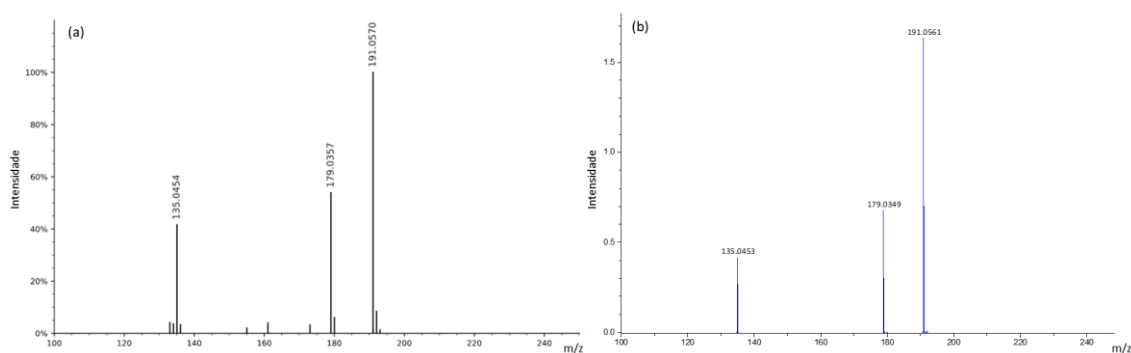


Figura 53: Identificação tentativa de 3-CQA. (a) Espectro de massas dos fragmentos de 3-CQA obtido na literatura. (b) Espectro de massas dos fragmentos do composto presente em 11,6 min.

A **Tabela XIII** resume todos os compostos identificados nas amostras dos extratos:

Tabela XIII: Compostos identificados nas amostras de erva-mate por UHPLC-QTOF-MS.

#	Composto	t _R (min)	Fórmula	m/z Calculado	m/z Observado	Erro (ppm)	Fragmentos MS ²
1	Teobromina ¹	3,3	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	181,0725	181,0726	0,6	
2	Cafeína ¹	10,5	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	195,0882	195,0869	3,6	
3	3-CQA	11,6	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878	353,0880	0,5	191, 179, 135
4	4-CQA	14,6	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878	353,0877	0,4	173, 179, 135
5	3-FQA	14,7	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1035	367,1034	0,2	179, 173
6	3- <i>p</i> CoQA	14,8	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337,0929	337,0928	0,4	173
7	5-CQA ¹	15,3	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878	353,0511	0,8	191
8	4-FQA	18,0	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1035	367,1030	1,3	191, 173
9	5-FQA	18,9	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,1035	367,1033	0,5	191
10	Rutina ¹	20,2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1461	609,1451	1,5	300
11	Campferol-3-O-rutinosídeo	22,2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1512	593,1500	1,7	285
12	Quercetina-glucosídeo	22,3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882	463,0875	1,4	300
13	Campferol-3-O-glicosídeo	24,4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0923	447,0931	1,3	284
14	3,4-di-CQA	26,4	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1195	515,1183	2,4	353, 179, 173
15	3,5-di-CQA	26,7	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1195	353,0871	2,2	353, 191, 179, 173
16	4,5-di-CQA	28,7	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1195	353,0874	1,5	353, 173, 179, 135
17	3C, 4F-QA	29,9	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂	529,1351	529,1341	1,9	367
18	3F, 5C-QA	30,7	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂	529,1351	529,1341	1,2	367
19	4C,5F-QA	32,1	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂	529,1351	529,1340	0,7	367

¹: identificado positivamente, com auxílio de padrão analítico.

A análise dos extratos hidroalcoólicos de erva-mate pela técnica de UHPLC-QTOF-MS possibilitou a identificação de 19 componentes, divididos nas seguintes classes: ácidos clorogênicos (13 compostos), glicosídeos flavonóides (3 compostos), metilxantinas (2 compostos) e flavonoide (1 composto). Todos os componentes foram detectáveis no modo de ionização negativo, exceto as metilxantinas que foram ionizadas apenas no modo positivo.

O grupo de ácidos clorogênicos foi composto, predominantemente, por ésteres de ácido cafeico (principalmente ácidos mono e dicafeoilquínicos). Entre os monoésteres cafeoilquínicos, foram identificados o 3-CQA, 4-CQA e o 5-CQA, enquanto os dicafeoilquínicos incluíram 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA e 4,5-di-CQA. Além desses compostos, as amostras continham os derivados feruloilquínicos 3-FQA, 4-FQA, e 5-FQA, e o derivado *p*-cumaroilquínicos 3-*p*CoQA. Outros CGAs identificados foram o 3C,4F-QA, 3F,5C-QA e 4C,5F-QA.

De maneira geral, os extratos obtidos por UAE de erva-mate tiveram um perfil qualitativo semelhante aos descritos na literatura, que também relatam a

presença dos ácidos clorogênicos identificados neste estudo, bem como das metilxantinas cafeína e teobromina e do flavonoide rutina.^{18,71,316,326-328}

4.1.4. Quantificação das metilxantinas e dos compostos fenólicos

Embora as amostras analisadas por UHPLC-QTOF-MS tenham se mostrado qualitativamente similares, podem ser observadas diferenças na concentração dos compostos. Neste contexto, a técnica de HPLC-DAD foi utilizada para a quantificação dos compostos fenólicos e metilxantinas presentes nos extratos obtidos por UAE, identificados pela técnica de UHPLC-QTOF-MS. Para tanto, foram utilizadas três abordagens: (I) método da padronização externa, aplicado aos compostos: cafeína, teobromina, rutina e 5-CQA; (II) quantificação em termos de equivalentes de 5-CQA, aplicada aos ácidos clorogênicos tentativamente identificados nos extratos; (III) quantificação em termos de equivalentes de rutina, aplicada aos flavonoides: campferol-3-O-rutinosídeo, campferol-3-O-glicosídeo e quercetina-glucosídeo.

Para a padronização externa, as figuras de mérito seletividade, linearidade, precisão e limites de detecção e quantificação foram avaliadas. A seletividade foi comprovada mediante injeção de soluções padrão dos quatro analitos identificados, sem co-eluição com outros compostos presentes na matriz. Os intervalos de concentração avaliados para os analitos apresentaram linearidade, uma vez que, os incrementos de concentração utilizados na construção das curvas de calibração (**Figura 54**) obtiveram áreas cromatográficas diretamente proporcionais, com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,99.

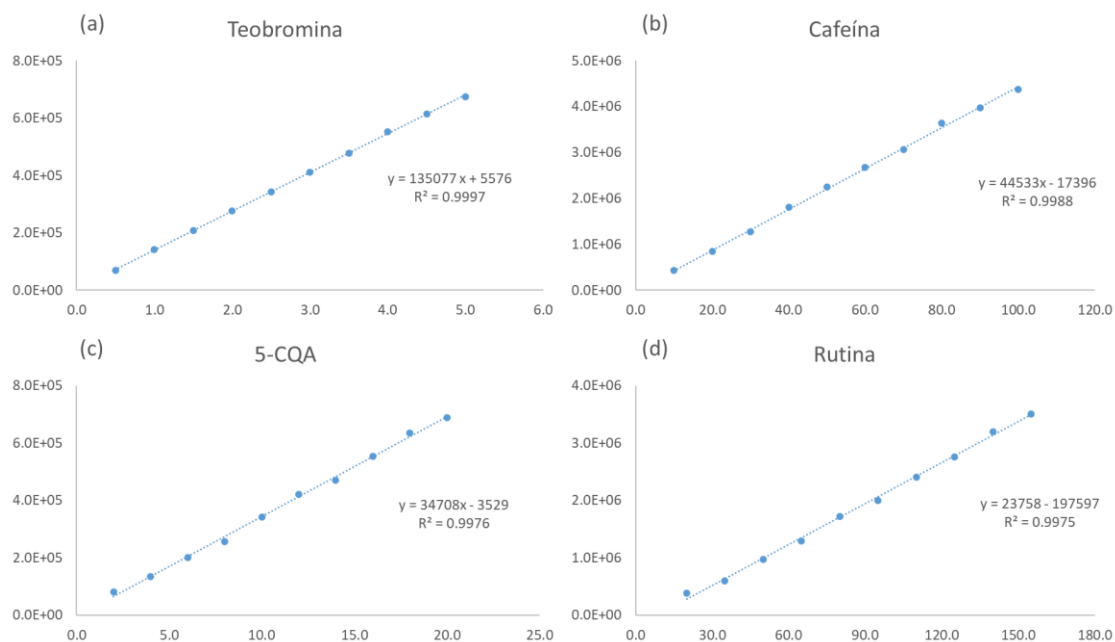


Figura 54: Curvas de calibração com (a) teobromina, (b) cafeína, (c) 5-CQA e (d) rutina para a quantificação por HPLC-DAD.

Os resultados obtidos para a precisão e o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos a partir da curva analítica e estão apresentados na **Tabela XIV**. Os valores de LD e LQ são adequados para a determinação dos compostos nas amostras estudadas, pois as concentrações obtidas nas amostras avaliadas são superiores aos limites determinados. Para o cálculo da precisão, obteve-se valores de coeficiente de variação percentual entre 0,10 e 2,39%. Estes valores comprovam a precisão instrumental, pois não excederam 5% de variação.

Tabela XIV: Resultados dos ensaios de precisão, limite de detecção e limite de quantificação

Analito	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	CV (%)
Teobromina	0,06	0,20	0,27
Cafeína	0,42	1,40	0,10
5-CQA	1,91	6,35	2,39
Rutina	2,20	7,32	0,29

Logo, a **Tabela XV** apresenta os resultados obtidos para a quantificação dos compostos.

Tabela XV: Concentração dos compostos identificados nos extratos de erva-mate obtidos por UAE, em base seca (mg g⁻¹ folha seca).

	3-CQA	3-FQA	3-pCoQA	4-CQA	5-CQA	4-FQA	5-FQA	3,4-di-CQA	3,5-di-CQA	4,5-di-CQA
<i>Concentrações (média ± DP), n = 3</i>										
Br1	32,749 ± 0,061	0,138 ± 0,007	0,154 ± 0,002	11,934 ± 0,016	21,443 ± 0,076	0,487 ± 0,010	0,387 ± 0,016	33,888 ± 0,052	7,179 ± 0,045	14,014 ± 0,256
Br2	29,816 ± 0,011	0,156 ± 0,004	0,180 ± 0,002	12,187 ± 0,014	20,616 ± 0,067	0,373 ± 0,001	0,452 ± 0,012	30,386 ± 0,062	8,156 ± 0,039	17,637 ± 0,234
Br3	30,663 ± 0,011	0,127 ± 0,004	0,145 ± 0,002	11,954 ± 0,023	21,380 ± 0,049	0,489 ± 0,005	0,368 ± 0,006	31,068 ± 0,067	6,799 ± 0,029	14,739 ± 0,506
Br4	34,956 ± 0,128	0,135 ± 0,004	0,167 ± 0,003	13,175 ± 0,070	22,847 ± 0,055	0,392 ± 0,007	0,419 ± 0,082	35,270 ± 0,074	8,679 ± 0,041	18,528 ± 0,414
Br5	33,736 ± 0,063	0,153 ± 0,002	0,167 ± 0,004	12,464 ± 0,014	20,441 ± 0,038	0,418 ± 0,007	0,427 ± 0,005	37,191 ± 0,048	9,025 ± 0,053	20,571 ± 0,618
Br6	32,405 ± 0,159	0,113 ± 0,009	0,148 ± 0,006	11,768 ± 0,034	21,976 ± 0,078	0,355 ± 0,014	0,416 ± 0,017	41,442 ± 0,124	9,391 ± 0,106	21,683 ± 0,194
Br7	37,811 ± 0,075	0,109 ± 0,009	0,155 ± 0,003	12,291 ± 0,058	21,665 ± 0,088	0,365 ± 0,023	0,495 ± 0,024	42,695 ± 0,275	10,202 ± 0,213	18,566 ± 0,762
Br8	32,792 ± 0,089	0,138 ± 0,002	0,157 ± 0,002	11,879 ± 0,042	21,062 ± 0,062	0,400 ± 0,016	0,404 ± 0,075	34,078 ± 0,144	8,461 ± 0,057	18,661 ± 0,366
Br9	34,521 ± 0,105	0,132 ± 0,003	0,162 ± 0,001	11,892 ± 0,018	20,075 ± 0,019	0,403 ± 0,004	0,409 ± 0,014	37,286 ± 0,089	10,716 ± 0,007	19,962 ± 1,700
Br10	34,446 ± 0,127	0,141 ± 0,005	0,172 ± 0,001	12,082 ± 0,014	22,409 ± 0,040	0,357 ± 0,008	0,483 ± 0,092	46,612 ± 0,135	10,316 ± 0,101	22,446 ± 0,790
Br11	32,578 ± 0,164	0,137 ± 0,008	0,154 ± 0,006	12,185 ± 0,034	19,962 ± 0,065	0,432 ± 0,013	0,402 ± 0,005	43,329 ± 0,148	9,919 ± 0,076	23,322 ± 0,564
Pg	28,936 ± 0,126	0,146 ± 0,002	0,161 ± 0,004	16,429 ± 0,048	21,562 ± 0,071	0,823 ± 0,006	0,509 ± 0,001	39,916 ± 0,037	10,104 ± 0,082	25,957 ± 0,643
Uru1	36,088 ± 0,352	0,113 ± 0,014	0,144 ± 0,009	14,791 ± 0,069	21,669 ± 0,111	0,597 ± 0,056	0,429 ± 0,020	38,948 ± 0,224	9,087 ± 0,082	22,051 ± 0,142
Uru2	30,201 ± 0,165	0,119 ± 0,003	0,155 ± 0,001	12,652 ± 0,062	20,919 ± 0,094	0,485 ± 0,011	0,383 ± 0,009	30,512 ± 0,167	7,816 ± 0,067	17,976 ± 0,389
Arg1	28,894 ± 0,133	0,134 ± 0,004	0,160 ± 0,004	15,536 ± 0,075	23,402 ± 0,346	0,526 ± 0,002	0,511 ± 0,003	32,958 ± 0,106	8,273 ± 0,128	23,363 ± 0,684
Arg2	32,076 ± 0,043	0,139 ± 0,002	0,163 ± 0,002	17,723 ± 0,065	25,419 ± 0,342	0,594 ± 0,002	0,553 ± 0,002	38,507 ± 0,091	9,300 ± 0,043	29,562 ± 0,408
Arg3	31,898 ± 0,137	0,108 ± 0,002	0,151 ± 0,003	18,284 ± 0,020	23,701 ± 0,014	0,565 ± 0,002	0,553 ± 0,005	39,580 ± 0,032	9,827 ± 0,041	32,818 ± 0,204

DP: desvio padrão

Continuação da Tabela XIV

	3C,4F-QA	3F,5C-QA	4C,5F-QA	Teobromina	Cafeína	Rutina	Campferol-3-O-Rutinosídeo	Quercetina-Glucosídeo	Campferol-3-O-Glicosídeo
Concentrações (média ± DP), n = 3									
Br1	1,428 ± 0,002	0,982 ± 0,006	0,855 ± 0,008	0,628 ± 0,002	8,642 ± 0,011	8,801 ± 0,019	2,501 ± 0,088	3,724 ± 0,039	3,213 ± 0,046
Br2	0,771 ± 0,005	0,645 ± 0,001	0,794 ± 0,007	0,331 ± 0,005	8,049 ± 0,015	7,973 ± 0,021	2,495 ± 0,126	3,861 ± 0,073	3,019 ± 0,102
Br3	0,962 ± 0,004	0,629 ± 0,003	0,676 ± 0,019	0,433 ± 0,006	7,898 ± 0,018	8,302 ± 0,019	2,487 ± 0,068	3,528 ± 0,048	3,147 ± 0,097
Br4	0,723 ± 0,008	0,494 ± 0,001	0,620 ± 0,011	0,799 ± 0,002	12,201 ± 0,048	7,347 ± 0,018	2,560 ± 0,059	4,172 ± 0,044	2,944 ± 0,046
Br5	0,744 ± 0,001	0,501 ± 0,002	0,684 ± 0,008	0,685 ± 0,001	10,550 ± 0,014	7,719 ± 0,031	2,640 ± 0,020	4,617 ± 0,077	2,749 ± 0,125
Br6	0,660 ± 0,003	0,434 ± 0,003	0,635 ± 0,002	0,647 ± 0,001	11,590 ± 0,022	6,472 ± 0,024	2,589 ± 0,026	3,795 ± 0,080	2,873 ± 0,167
Br7	0,885 ± 0,003	0,456 ± 0,004	0,588 ± 0,015	0,861 ± 0,007	16,054 ± 0,015	7,059 ± 0,017	2,603 ± 0,009	4,833 ± 0,056	2,303 ± 0,026
Br8	0,706 ± 0,002	0,452 ± 0,004	0,622 ± 0,034	0,795 ± 0,008	8,870 ± 0,031	7,873 ± 0,011	2,627 ± 0,039	4,054 ± 0,027	3,140 ± 0,014
Br9	0,829 ± 0,001	0,518 ± 0,003	0,718 ± 0,006	1,082 ± 0,012	9,657 ± 0,025	7,817 ± 0,005	2,550 ± 0,063	3,866 ± 0,067	2,919 ± 0,020
Br10	0,807 ± 0,004	0,558 ± 0,005	0,772 ± 0,001	0,714 ± 0,003	8,614 ± 0,018	9,086 ± 0,024	2,623 ± 0,042	3,706 ± 0,044	3,243 ± 0,144
Br11	0,764 ± 0,000	0,528 ± 0,007	0,718 ± 0,008	0,706 ± 0,005	11,238 ± 0,040	7,448 ± 0,023	2,560 ± 0,025	3,998 ± 0,016	2,960 ± 0,025
Pg	1,059 ± 0,006	0,803 ± 0,001	0,941 ± 0,012	0,371 ± 0,007	11,036 ± 0,035	9,956 ± 0,033	2,477 ± 0,091	3,789 ± 0,045	3,246 ± 0,086
Uru1	0,849 ± 0,005	0,551 ± 0,006	0,719 ± 0,023	0,437 ± 0,001	10,601 ± 0,011	9,408 ± 0,035	2,636 ± 0,008	4,181 ± 0,064	3,106 ± 0,082
Uru2	0,713 ± 0,002	0,468 ± 0,005	0,648 ± 0,006	0,826 ± 0,005	9,076 ± 0,038	7,705 ± 0,040	2,542 ± 0,043	3,770 ± 0,029	2,915 ± 0,040
Arg1	0,812 ± 0,002	0,551 ± 0,004	0,780 ± 0,007	0,658 ± 0,011	10,716 ± 0,031	9,968 ± 0,036	2,501 ± 0,037	3,627 ± 0,089	3,458 ± 0,103
Arg2	0,962 ± 0,003	0,746 ± 0,007	0,992 ± 0,016	0,815 ± 0,006	13,802 ± 0,025	10,491 ± 0,004	2,535 ± 0,004	3,772 ± 0,012	3,366 ± 0,056
Arg3	0,919 ± 0,008	0,743 ± 0,009	1,032 ± 0,014	0,636 ± 0,003	11,914 ± 0,009	9,101 ± 0,011	2,447 ± 0,095	3,708 ± 0,040	3,249 ± 0,063

DP: desvio padrão

Conforme pode ser observado na tabela acima, as concentrações de metilxantinas nas amostras analisadas variaram entre 0,33 e 1,08 mg.g⁻¹ para a teobromina e 7,90 e 16,05 mg.g⁻¹ para a cafeína. A concentração do flavonoide rutina nas amostras analisadas variaram de: 6,47 mg.g⁻¹ a 10,49 mg.g⁻¹. Por fim, as concentrações determinadas para os principais ácidos clorogênicos variaram de: 28,89 a 37,81 mg.g⁻¹ para o 3-CQA; 11,77 a 18,28 mg.g⁻¹ para o 4-CQA; 19,96 a 25,42 mg.g⁻¹ para o 5-CQA; 0,11 a 0,66 mg.g⁻¹ para o 3-FQA; 0,35 a 0,82 mg.g⁻¹ para o 4-FQA; 0,37 a 0,55 mg.g⁻¹ para o 5-FQA; 30,39 a 46,61 mg.g⁻¹ para o 3,4-di-CQA; 6,80 a 10,72 mg.g⁻¹ para o 3,5-di-CQA; e 14,01 a 32,82 mg.g⁻¹ para o 4,5-di-CQA.

Avaliando-se a literatura científica pertinente, encontram-se diversos estudos envolvendo a quantificação de compostos fenólicos e metilxantinas em diferentes tipos de extratos. Em 2018, Mateos *et al.*³²⁷ analisaram quantitativamente compostos presentes em extratos de diferentes marcas de erva-mate, obtidos por extração sólido-líquido a temperatura ambiente utilizando uma solução extratora composta por acetona:água (50:50 v/v). Os autores relatam concentrações das metilxantinas variando de 0,95 a 1,16 mg.g⁻¹ para a teobromina e de 7,16 a 8,95 mg.g⁻¹ para a cafeína. Embora a faixa de concentração de teobromina reportada pelos autores seja razoavelmente similar à encontrada no presente estudo, a concentração de cafeína obtida neste trabalho foi ligeiramente superior. Os autores relatam faixas de concentração de CQAs, di-CQAs, e rutina, inferiores aos reportados no presente estudo.

Em um estudo anterior, Dartora *et al.* (2011)³²⁸ analisaram extratos aquosos de amostras de erva-mate oriundas de diferentes regiões e etapas de seu processamento industrial. O teor de teobromina reportado ficou entre 1,63 e 4,61 mg.g⁻¹, enquanto o teor de cafeína ficou entre 4,68 e 18,9 mg.g⁻¹, e o de rutina entre 1,21 e 5,73 mg.g⁻¹. Portanto, embora o teor de teobromina determinado no presente estudo seja ligeiramente inferior ao obtido por Dartora *et al.*, os teores de cafeína foram similares e os de rutina foram superiores nesta presente investigação. A concentração dos ácidos clorogênicos determinadas na presente tese foram expressivamente superiores aos reportados por Dartora *et al.*

Essas diferenças reportadas nos estudos anteriores sobre o tema estão possivelmente relacionadas ao método extrativo e solventes utilizados. Além disso, a cavitação promovida pela UAE e as temperaturas mais elevadas, ambas utilizadas no presente estudo, intensificam a transferência de massa da matriz para o meio extrator.

Por fim, vale ressaltar que inferências mais detalhadas acerca das similaridades e dissimilaridades entre as amostras analisadas neste estudo tornam-se difíceis e morosas, em decorrência da quantidade elevada de amostras e variáveis analisadas. Logo, a utilização de uma ferramenta quimiométrica que auxilie a explicitar a variância contida neste sistema torna-se altamente recomendável.

4.1.4.1. Análise por componentes principais

A fim de explorar as similaridades e as dissimilaridades entre as amostras das diferentes regiões estudadas, foi realizado um processo de reconhecimento de padrões pelo método não-supervisionado de análise por componentes principais (PCA). Para tanto, os dados previamente autoescalados, dando o mesmo peso a todas as variáveis, realizando-se a PCA na sequência. A primeira componente obtida (PC1) explicou 36,14% da variabilidade dos dados, enquanto a PC2 explica 24,81%, somando mais de 60% da variância do sistema nas duas primeiras novas dimensões. Os escores da PCA para a PC1 e PC2 estão apresentados na **Figura 55a**.

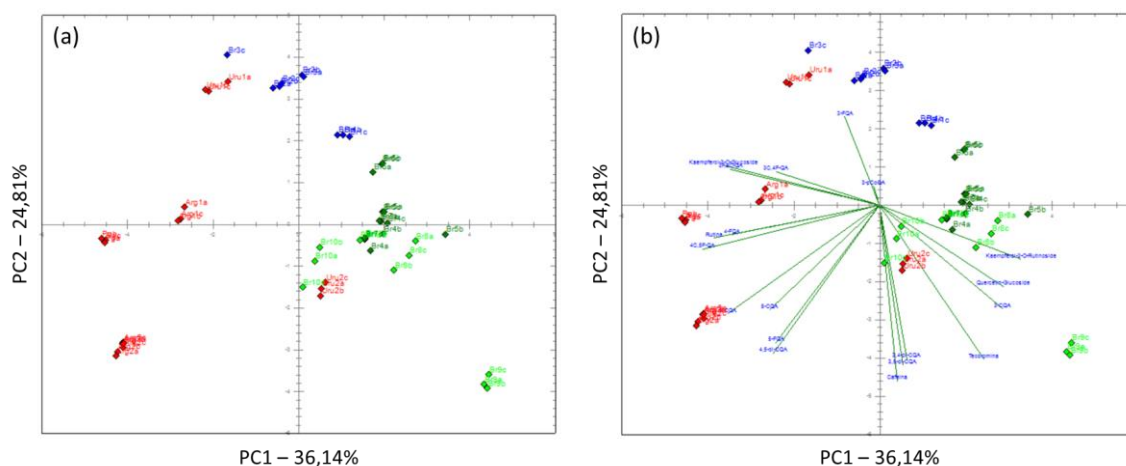


Figura 55: (a) Gráfico de escores e (b) gráfico *biplot* de pesos e escores para a PC1 e PC2.

Observa-se que a maioria das amostras oriundas da Argentina, Paraguai e Uruguai (pontos vermelhos) encontram-se dispersas no lado esquerdo do gráfico, ou seja, com valores de escore negativos na PC1, mas com valores tanto positivos quanto negativos na PC2. Em contrapartida, as amostras brasileiras (pontos azuis, verde claro e escuro) encontram-se dispersas no lado direito do gráfico, ou seja, com valores de escore positivos na PC1, mas com valores tanto positivos quanto negativos na PC2. Portanto, a PC1 parece conter as informações que discriminam a origem geográfica das folhas. Essa constatação ganha ainda mais força ao avaliar-se a posição das amostras Uru2 que, embora sejam de um produto destinando ao mercado consumidor uruguaio, foram produzidas a partir de folhas cultivadas no Brasil.

Paralelamente, ao observar-se o grupo de amostras oriundas do Brasil, podemos perceber alguns agrupamentos, ainda que com alguma sobreposição, que refletem a natureza do cultivo e processamento da matéria-prima. Amostras brasileiras produzidas a partir de folhas de ervais nativos (pontos azuis e verde escuro) assumiram, majoritariamente, valores de escores na PC2 superiores aos das amostras produzidas a partir de folhas de ervais cultivados (pontos em verde claro). Ademais, dentro do grupo de amostras de folhas nativas, as amostras de erva-mate destinadas ao preparo de tererê, que possuem um perfil granulométrico similar aos utilizados nos produtos destinados aos países latinos, o que explicaria sua posição relativamente próxima às amostras Uru1.

Avaliando o gráfico *biplot* de escores e pesos (**Figura 55b**), bem como o gráfico de pesos para a PC1 e PC2 (**Figura 56a e 56b**, respectivamente), observa-se que valores positivos na PC1 estão associados à uma quantidade elevada de metilxantinas e dos flavonoides campferol-3-O-rutinosídeo e quercetina-glucosídeo, enquanto valores negativos nessa PC indicam uma maior quantidade de ácidos clorogênicos, à exceção do 3-CQA., 3,4-di-CQA e 3,5-di-CQA. Em contrapartida, escores negativos na PC2 indicam maiores concentrações de metilxantinas, ácidos clorogênicos e flavonoides, à exceção de algumas espécies minoritárias, como o 3-FQA, por exemplo.

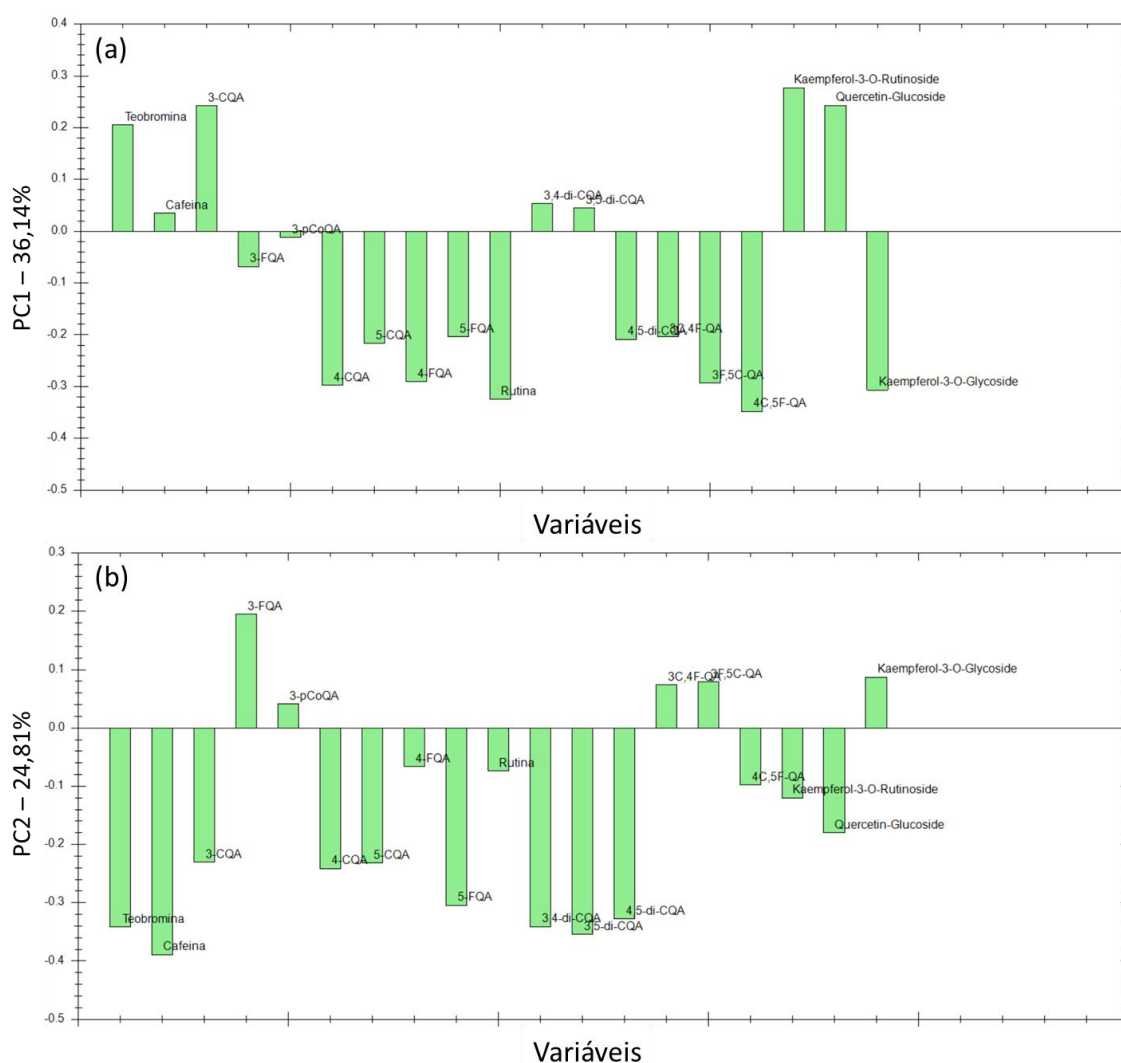


Figura 56: Pesos de cada variável nas (a) PC1 e (b) PC2.

A partir destas informações, verifica-se que as folhas de erva-mate produzidas a partir de ervais cultivados possuem uma quantidade mais elevada de ácidos clorogênicos. Sabe-se da literatura que ervais nativos possuem cobertura vegetal, ou seja, são sombreados, enquanto os cultivados não possuem essa cobertura, ou seja, as plantas recebem uma maior incidência de luz solar. Além disso, a literatura científica tem reportado que a exposição à luz solar promove um aumento da produção de compostos fenólicos em plantas, protegendo-a da exposição à radiação UV.^{329,330} Esses relatos explicariam os baixos valores de escores na PC2 e, por conseguinte, a maior concentração de ácidos clorogênicos e flavonoides em amostras de produtos produzidos a partir de folhas oriundas de ervais nativos. Além disso, essa concentração mais elevada de ácidos clorogênicos pode estar relacionada ao sabor do produto, uma vez que a erva-mate produzida a partir de folhas cultivadas possuem um sabor mais “amargo” que os produtos provenientes de plantas nativas.^{69,70}

No que diz respeito aos escores na PC1 para amostras brasileiras e de países platinos, os resultados apontam uma maior concentração da maioria dos ácidos clorogênicos e flavonoides em amostras dos países platinos. Esses resultados corroboram com os obtidos com a técnica de fluorescência molecular aliada à modelagem PARAFAC. Contudo, estudos mais aprofundados, com um maior conjunto amostral devem ser conduzidos para investigar essa constatação, uma vez que não há relatos científicos conclusivos acerca dessa dissimilaridade metabólica.^{15,325}

4.2. METABÓLITOS VOLÁTEIS

A GC/qMS, apesar de apresentar-se como uma técnica amplamente utilizada para fins de caracterização de compostos voláteis, não possui o poder de resolução e análise capaz de elucidar de forma detalhada a composição química desses. Neste contexto, a GC×GC/TOFMS apresenta-se como uma ferramenta analítica poderosa, devido a sua maior capacidade de pico, seletividade, detectabilidade, eluição estruturalmente organizada dos analitos no plano bidimensional, entre outros aspectos.^{258,331}

Dessa forma, as frações voláteis obtidas a partir da hidrodestilação de folhas *in natura* e processadas de erva-mate foram submetidas à análise por GCxGC/TOFMS. Os diagramas de cores obtidos para as amostras de folhas frescas e processadas (**Figura 57**) ilustram a melhor separação obtida. Pode-se observar nestes diagramas que ambas as amostras contêm uma mistura complexa de compostos que, por sua vez, possuem uma razoável similaridade de seus dados espectrais.

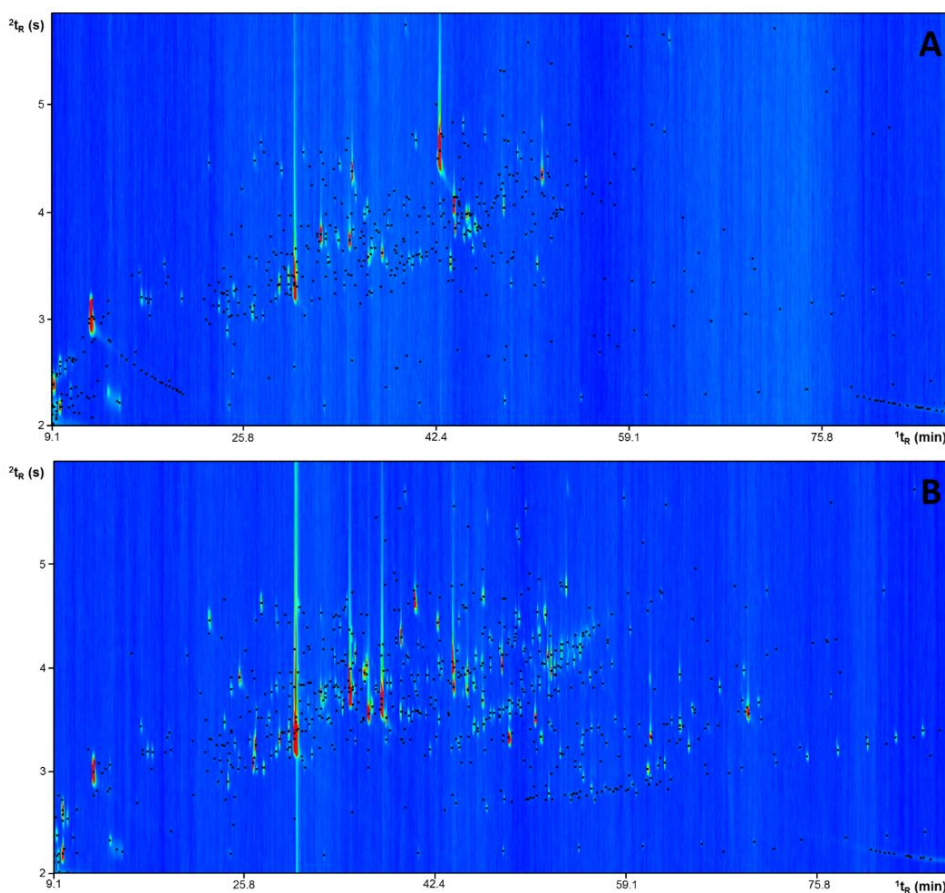


Figura 57: Diagramas de cores referentes aos cromatogramas de corrente iônica total das análises por GCxGC/TOFMS de óleos essenciais de (a) folhas frescas e (b) processadas de erva-mate.

Os compostos detectados foram tentativamente identificados mediante a combinação de seus dados de similaridade espectral com a literatura e LTPRI. A **Tabela XVI** apresenta os compostos tentativamente identificados, bem como suas áreas percentuais, LTPRI da literatura (LTPRI_{Lit}) e a diferença entre o valor calculado e o de referência ($\Delta\text{LTPRI} = \text{LTPRI}_{\text{Exp}} - \text{LTPRI}_{\text{Lit}}$). Para avaliar a

contribuição de cada composto para a área cromatográfica total, foi utilizada uma abordagem semiquantitativa, que desconsidera o fator de resposta de cada composto e apenas considera a diferença de área entre os picos. Nessa abordagem, a soma de todas as áreas dos picos detectados (desconsiderando-se as áreas correspondentes à sangria da coluna e solvente) foi considerada 100% da amostra e, para cada pico, foi calculada a área percentual relativa (a razão entre a área do pico e a área total, multiplicada por 100).

Tabela XVI: Resultados da análise por GC×GC/TOFMS para a fração volátil de folhas de erva-mate frescas e processadas.

Compostos	LTPRI _{Lit}	Folhas Frescas		Folhas Processadas		
		Δ LTPRI	A%	Δ LTPRI	A%	
1	3-Metil-hexano	673	10	1,37	10	0,515
2	<i>trans</i> -1,3-Dimetil-ciclopentano	684	-1	1,61	-1	0,517
3	Ciclohexeno	678	10	3,20	12	0,278
4	1-Penten-3-ona	687	n.i.	n.i.	6	0,155
5	Pentanal	700	n.i.	n.i.	0	0,145
6	Heptano	700	2	1,93	2	1,056
7	2-Etil-furano	705	-3	0,658	-3	1,041
8	Tetrahydro-2,5-dimetil-furano	727	-15	0,363	-15	0,290
9	2,4-Dimetilfurano	729	-15	0,097	n.i.	n.i.
10	Metil-ciclohexano	725	-1	0,225	-1	0,157
11	2,4-Dimetil-hexano	736	-7	0,033	-5	0,143
12	3-Metil-1-hepteno	743	2	0,009	n.i.	n.i.
13	(<i>E</i>)-2-Pentenal	754	n.i.	n.i.	1	0,145
14	2-Metil-heptano	762	0	0,014	n.i.	n.i.
15	3-Metil-heptano	771	0	0,037	n.i.	n.i.
16	<i>cis</i> -1,3-Dimetilciclohexano	777	2	0,022	n.i.	n.i.
17	3-Hexanona	783	n.i.	n.i.	0	0,148
18	2-Hexanona	790	n.i.	n.i.	0	0,140
19	Octano	800	n.i.	n.i.	0	0,283
20	2-Hexanol	800	2	0,049	0	0,156
21	Hexanal	802	n.i.	n.i.	-2	0,177
22	Furfural	836	n.i.	n.i.	0	0,158
23	1,6-Dimetilhepta-1,3,5-trieno	837	n.i.	n.i.	8	0,152
24	2-Hexenal	855	-4	0,138	-4	0,225
25	(<i>Z</i>)-3-Hexen-1-ol	857	-2	1,009	-2	0,148
26	2-(2-Propenil)-furano	857	n.i.	n.i.	-2	0,149
27	Etilbenzeno	862	n.i.	n.i.	0	0,215
28	1-Hexanol	871	-3	0,084	-3	0,149
29	<i>p</i> -Xileno	870	n.i.	n.i.	0	0,222
30	2-Heptanona	891	n.i.	n.i.	0	0,147

31	<i>o</i> -Xileno	894	n.i.	n.i.	0	0,154
32	(<i>Z</i>)-4-Heptenal	898	n.i.	n.i.	0	0,155
33	Nonano	900	0	0,042	0	0,149
34	Heptanal	902	n.i.	n.i.	-2	0,156
35	Formato de (<i>Z</i>)-3-hexenila	920	0	0,271	n.i.	n.i.
36	α -Pino	930	n.i.	n.i.	6	0,146
37	6-Metil-2-heptanona	955	n.i.	n.i.	0	0,143
38	(<i>E</i>)-2-Heptenal	958	n.i.	n.i.	-2	0,145
39	Benzaldeído	960	2	0,250	2	0,445
40	1-Heptanol	965	-1	0,016	4	0,147
41	Propanoato de pentila	973	n.i.	n.i.	0	0,144
42	2,6,6-Trimetoxi-2-viniltetrahidropirano	971	n.i.	n.i.	4	0,157
43	1-Octen-3-ol	979	-1	0,400	-1	0,152
44	Sabineno	975	n.i.	n.i.	5	0,141
45	2,3-Octanediona	983	-1	0,019	-1	0,147
46	3-Octanona	985	0	0,010	0	0,141
47	6-Metil-5-hepten-2-ona	988	-3	0,060	-3	0,256
48	Benzonitrila	986	n.i.	n.i.	-1	0,140
49	β -Pino	991	0	0,222	0	0,307
50	2-Pentil-furano	991	0	0,183	0	0,172
51	2-Octanona	991	0	0,051	n.i.	n.i.
52	3-Octanol	995	0	0,202	n.i.	n.i.
53	1,2,3-Trimetil-benzeno	996	n.i.	n.i.	0	0,145
54	(<i>E,E</i>)-2,4-Heptadienal	998	0	0,019	-2	0,253
55	2-Octanol	998	n.i.	n.i.	0	0,146
56	Decano	1000	0	0,087	0	0,148
57	2,6-Dimetil-2,6-octadieno	990	n.i.	n.i.	12	0,147
58	(<i>E</i>)-2-Pentenilfurano	1002	0	0,404	n.i.	n.i.
59	Octanal	999	n.i.	n.i.	3	0,176
60	Acetato de (<i>Z</i>)-3-hexen-1-ol	1005	1	0,011	n.i.	n.i.
61	α -Felandreno	1003	5	0,005	5	0,154
62	(<i>E,E</i>)-2,4-Heptadienal	1008	n.i.	n.i.	1	0,697
63	α -Terpineno	1017	n.i.	n.i.	2	0,156
64	<i>o</i> -Cimeno	1026	0	0,027	0	0,191
65	1,2,4-Trimetil-benzeno	1026	n.i.	n.i.	0	0,143
66	Limoneno	1029	3	0,529	3	0,653
67	β -Felandreno	1030	4	0,012	4	0,149
68	3-Etil-2-metil-1,3-hexadieno	1030	n.i.	n.i.	4	0,146
69	1,8-Cineol	1031	5	0,108	5	0,931
70	Álcool benzílico	1032	4	0,374	4	0,177
71	(<i>Z</i>)- β -Ocimeno	1037	1	0,040	1	0,184
72	2,6,6-Trimetilciclohexanone	1036	2	0,083	n.i.	n.i.
73	2-Hidroxi-benzaldeído	1041	n.i.	n.i.	4	0,170
74	Benzoacetaldeído	1042	3	0,161	3	0,403
75	(<i>E</i>)- β -Ocimeno	1050	-1	0,135	-1	0,278
76	Melonal	1044	n.i.	n.i.	11	0,140
77	(<i>E</i>)-2-Octenal	1058	0	0,053	0	0,197
78	γ -Terpineno	1060	2	0,021	2	0,161

79	Octanol	1069	1	0,136	1	0,242
80	(<i>E,E</i>)-3,5-Octadien-2-ona	1068	n.i.	n.i.	2	0,212
81	<i>m</i> -Tolualdeído	1069	3	0,003	3	0,211
82	Óxido de <i>trans</i> -linalol	1073	1	0,053	2	0,487
83	Formato benzílico	1081	-2	0,294	n.i.	n.i.
84	2-Etil-3,6-dimetilpirazina	1082	n.i.	n.i.	-1	0,147
85	<i>p</i> -Tolualdeído	1082	n.i.	n.i.	3	0,141
86	Óxido de <i>cis</i> -linalol	1087	4	0,985	4	0,429
87	<i>o</i> -Guaiacol	1089	n.i.	n.i.	2	0,152
88	Terpinoleno	1089	3	0,114	3	0,227
89	<i>p</i> -Cimeno	1091	n.i.	n.i.	1	0,162
90	Fenchona	1087	n.i.	n.i.	5	0,189
91	3,5-Octadien-2-ona	1092	n.i.	n.i.	2	0,179
92	Undecano	1100	0	0,061	0	0,141
93	Linalol	1097	3	17,611	3	5,581
94	(<i>Z,Z</i>)-3,6-Nonadienal	1100	2	0,784	n.i.	n.i.
95	2,6-Dimetil-1,7-octadien-3-ol	1095	n.i.	n.i.	7	9,960
96	Nonanal	1102	2	0,180	n.i.	n.i.
97	Hotrienol	1108	-4	0,683	-2	0,878
98	6-Metil-(<i>E</i>)-3,5-heptadien-2-ona	1107	n.i.	n.i.	-1	0,241
99	(<i>E,E</i>)-2,4-Octadienal	1113	n.i.	n.i.	-3	0,155
100	2,5-Dimetilciclohexanol	1099	13	0,044	15	0,191
101	Álcool feniletílico	1116	0	0,254	9	0,140
102	Mircenol	1123	n.i.	n.i.	-3	0,148
103	α -Ciclocitral	1122	n.i.	n.i.	2	0,199
104	Isoforona	1121	n.i.	n.i.	3	0,150
105	Cetona dehidro-sabina	1121	n.i.	n.i.	5	0,176
106	(allo)-Ocimeno	1132	-2	0,060	-2	0,194
107	Cosmeno	1130	2	0,012	0	0,148
108	Isobutanoato de (<i>Z</i>)-3-hexenila	1145	-1	0,045	n.i.	n.i.
109	Neo-allo-ocimeno	1144	n.i.	n.i.	0	0,141
110	<i>trans</i> -Pinocarveol	1139	7	3,670	7	0,565
111	4-Oxoisoforona	1147	-1	0,029	-1	0,179
112	Ipsdienol	1145	n.i.	n.i.	3	0,147
113	<i>cis</i> -Verbenol	1141	n.i.	n.i.	9	0,389
114	(<i>Z</i>)-3-Nonen-1-ol	1156	-2	0,053	n.i.	n.i.
115	(<i>E,Z</i>)-2,6-Nonadienal	1154	0	0,552	0	0,232
116	Lilac aldeído B	1154	n.i.	n.i.	0	0,256
117	1,4-Dimetil- δ -3-tetrahydroacetofenona	1152	n.i.	n.i.	4	0,180
118	(<i>E,Z</i>)-3,6-Nonadien-1-ol	1156	2	0,316	n.i.	n.i.
119	Óxido de nerol	1158	n.i.	n.i.	0	0,178
120	(<i>E</i>)-2-Nonenal	1160	0	0,125	-2	0,176
121	Mirtanal	1180	n.i.	n.i.	-18	0,179
122	Ocimenol	1155	n.i.	n.i.	9	0,157
123	Ácido Octanoico	1156	n.i.	n.i.	10	0,155
124	3-Etil-benzaldeído	1168	0	0,036	0	0,152
125	Propiofenona	1164	n.i.	n.i.	4	0,153
126	1-Nonanol	1172	-2	0,011	-1	0,148

127	Lilac aldeído D	1169	n.i.	n.i.	1	0,239
128	Pinocarvona	1165	5	0,054	5	0,179
129	Sulfureto de metilbenzila	1176	n.i.	n.i.	-4	0,148
130	2-Metoxi-3-(1-metilpropil)-pirazina	1173	n.i.	n.i.	1	0,142
131	<i>trans</i> -2-Caren-4-ol	1178	n.i.	n.i.	-2	0,240
132	Óxido de <i>trans</i> -linalol	1173	3	0,816	n.i.	n.i.
133	Formato β -fenílico	1178	0	0,292	n.i.	n.i.
134	2,4-Dimetilbenzaldeído	1180	n.i.	n.i.	0	0,196
135	Isopinocanfona	1173	n.i.	n.i.	9	0,154
136	Terpinen-4-ol	1177	7	0,076	7	0,348
137	Butirato de <i>trans</i> -3-hexenila	1185	1	0,081	n.i.	n.i.
138	1-(2-Furanilmetil)-1H-pirrol	1185	n.i.	n.i.	1	0,156
139	<i>p</i> -Cimen-8-ol	1183	n.i.	n.i.	5	0,176
140	<i>m</i> -Metilacetofenona	1183	n.i.	n.i.	5	0,146
141	Naftaleno	1181	n.i.	n.i.	11	0,181
142	α -Terpineol	1189	7	2,986	7	4,667
143	Isocreosol	1202	n.i.	n.i.	-6	0,140
144	(<i>Z</i>)-4-Decenal	1194	n.i.	n.i.	4	0,140
145	Dodecane	1200	0	0,024	0	0,143
146	Salicilato de metila	1198	2	5,362	8	0,293
147	Mirtenol	1196	6	0,217	6	0,330
148	Estragol	1199	n.i.	n.i.	3	0,199
149	Decanal	1202	4	0,027	4	0,175
150	Safranal	1197	9	0,300	9	0,446
151	<i>trans</i> -Piperitol	1208	n.i.	n.i.	5	0,158
152	(<i>E,E</i>)-2,4-Nonadienal	1217	0	0,042	0	0,151
153	Coumaran	1223	n.i.	n.i.	-6	0,147
154	7-Metil-3-metileno-6-octen-1-ol	1222	-1	0,063	-1	0,145
155	2-Oxocineol	1217	n.i.	n.i.	4	0,141
156	<i>trans</i> -Carveol	1217	n.i.	n.i.	6	0,585
157	<i>p</i> -Ment-1-en-9-al	1232	-9	0,422	6	0,631
158	Citronelol	1226	2	0,039	n.i.	n.i.
159	<i>cis</i> -Carveol	1229	n.i.	n.i.	-1	0,183
160	β -Ciclocitral	1226	2	0,475	-6	0,537
161	3-Fenil-furano	1228	n.i.	n.i.	0	0,142
162	Nerol	1230	0	1,225	2	1,988
163	Isovalerato de (<i>Z</i>)-3-hexenila	1238	-6	0,057	n.i.	n.i.
164	Valerato de (<i>Z</i>)-3-hexenila	1236	0	0,072	n.i.	n.i.
165	Neral	1245	0	0,086	7	0,196
166	Benzenopropanenitrilo	1244	n.i.	n.i.	1	0,144
167	Carvona	1243	n.i.	n.i.	8	0,149
168	Geraniol	1253	2	1,593	0	4,004
170	(<i>E</i>)-3,7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol	1260	n.i.	n.i.	-5	3,985
171	(<i>Z</i>)-Anetol	1253	n.i.	n.i.	4	0,154
172	(<i>E</i>)-Mirtanol	1260	0	0,046	n.i.	n.i.
173	γ -Octalactona	1262	n.i.	n.i.	0	0,138
174	<i>p</i> -Anisalaldeído	1250	n.i.	n.i.	12	0,150
175	Ácido nonanoico	1275	n.i.	n.i.	-11	0,186

176	(E)-2-Decenal	1254	10	0,281	n.i.	n.i.
177	β -Homociclocitral	1261	5	0,156	5	0,229
178	α -Ioneno	1266	4	0,052	4	0,210
179	Geranial	1267	5	0,033	5	0,235
180	Éter salicílico	1270	7	0,039	n.i.	n.i.
181	α -Etilidenbenzeno acetaldeído	1281	n.i.	n.i.	-2	0,145
182	<i>p</i> -Etilguaiacol	1282	n.i.	n.i.	1	0,169
184	Indanone	1292	n.i.	n.i.	-3	0,146
185	Formato de geranila	1298	-15	0,005	-7	0,143
186	(E)-Anetol	1285	n.i.	n.i.	6	1,223
187	2-Undecanona	1294	0	0,008	0	0,145
188	(E,Z)-2,4-Decadienal	1293	n.i.	n.i.	3	0,153
189	Indol	1291	n.i.	n.i.	7	0,191
190	Tridecano	1300	n.i.	n.i.	0	0,138
191	<i>m</i> -tert-Butilfenol	1296	n.i.	n.i.	6	0,152
192	<i>p</i> -Ment-1-en-9-ol	1295	7	0,010	n.i.	n.i.
193	Dihidroedulano	1300	5	0,222	7	0,254
194	Álcool perílico	1295	10	0,039	10	0,184
195	α -Metilnaftaleno	1305	n.i.	n.i.	0	0,158
196	Undecanal	1307	n.i.	n.i.	2	0,144
197	Teaspirano	1305	6	0,218	-2	0,152
198	Furanona de menta	1314	n.i.	n.i.	2	0,146
199	<i>p</i> -Vinilguaiacol	1317	1	0,376	0	1,276
200	(E,E)-2,4-Decadienal	1317	3	0,013	3	0,197
201	Edulano I	1315	n.i.	n.i.	8	0,151
202	β -Metilnaftaleno	1315	n.i.	n.i.	8	0,150
203	<i>p</i> -sec-Butilfenol	1318	n.i.	n.i.	7	0,161
204	<i>p</i> -Menta-1,4-dien-7-ol	1333	n.i.	n.i.	1	0,150
205	Benzoato de isobutila	1331	3	0,002	n.i.	n.i.
206	Ácido Gerânico	1355	n.i.	n.i.	-5	0,165
207	1,1,4,6-Tetrametil-indano	1350	n.i.	n.i.	9	0,162
208	Ácido n-Decanoico	1368	n.i.	n.i.	-7	0,160
209	Eugenol	1359	2	0,451	5	0,451
210	2-Undecenal	1365	n.i.	n.i.	1	0,219
211	Dehidro-ar-ioneno	1364	2	0,117	7	0,231
212	3-Allilguaiacol	1362	4	28,630	n.i.	n.i.
213	1,1,4,5-Tetrametilindano	1355	13	0,072	n.i.	n.i.
214	γ -Nonanolido	1368	0	0,046	n.i.	n.i.
215	(Z)- β -Damascenona	1364	9	0,060	6	0,218
216	Farnesano	1376	n.i.	n.i.	1	0,146
217	Hexanoato de <i>cis</i> -3-hexenila	1380	2	0,020	n.i.	n.i.
218	Acetato de geranila	1381	n.i.	n.i.	3	0,143
219	α -Ionol	1387	-1	1,024	-1	0,148
220	α -Copaeno	1377	n.i.	n.i.	14	0,167
221	Bifenila	1377	n.i.	n.i.	14	0,143
222	(E)-5-Tetradeceno	1391	n.i.	n.i.	2	0,142
223	(E)- β -Damascenona	1385	8	4,162	8	3,027
224	β -Metilindol	1395	n.i.	n.i.	0	0,152

225	n-Tetradecano	1400	0	0,002	0	0,154
226	Isovalerato benzílico	1395	5	0,035	n.i.	n.i.
227	β -Bourboneno	1388	n.i.	n.i.	12	0,158
228	β -Elemeno	1391	n.i.	n.i.	14	0,187
229	6-Metil-5-(1-metiletilideno)-6,8-nonadien-2-ona	1389	n.i.	n.i.	16	0,168
230	Hexahidropseudoionona	1408	n.i.	n.i.	-1	0,197
231	Dodecanal	1409	n.i.	n.i.	1	0,154
232	2-Dodecanol	1417	n.i.	n.i.	-5	0,144
233	Éter difenílico	1405	n.i.	n.i.	7	0,146
234	(Z)-Isoeugenol	1407	7	0,043	7	0,149
235	1,7-Dimetilnaftaleno	1419	n.i.	n.i.	-2	0,156
236	4-(2,4,4-Trimetil-ciclohexa-1,5-dienil)-but-3-en-2-one	1423	n.i.	n.i.	-4	0,235
237	(E)- β -Damascona	1414	10	0,995	10	0,498
238	α -Gurjuneno	1410	n.i.	n.i.	16	0,151
239	6-Metil-6-(5-metilfuran-2-il)-heptan-2-ona	1426	n.i.	n.i.	3	0,181
240	(E)- α -Ionona	1430	6	0,926	6	0,318
241	1,5-Dimetilnaftaleno	1439	n.i.	n.i.	-3	0,160
242	(E)-Cariofileno	1419	19	0,027	19	0,313
243	α -Bergamoteno	1440	0	0,123	n.i.	n.i.
244	Benzoato de isopentila	1441	4	0,057	n.i.	n.i.
245	Dihidrodehidro- β -ionona	1425	23	0,087	15	0,146
246	β -Humuleno	1439	n.i.	n.i.	6	0,215
247	Acetona geranólica	1455	0	0,167	0	0,452
248	Allo-Aromadendreno	1460	n.i.	n.i.	-3	0,272
249	(E)-Isoeugenol	1451	6	0,276	6	0,402
250	(E)- β -Farneseno	1457	3	0,004	3	0,149
251	(Z,Z)- α -Farneseno	1465	n.i.	n.i.	-3	0,153
252	(E)-2-Dodecenal	1466	n.i.	n.i.	3	0,149
253	α -Humuleno	1455	n.i.	n.i.	16	0,197
254	1-Undecanol	1474	n.i.	n.i.	0	0,140
255	Germacreno D	1485	n.i.	n.i.	-6	0,186
256	α -Curcumeno	1486	n.i.	n.i.	4	0,213
257	Dehidro- β -ionona	1485	n.i.	n.i.	5	0,203
258	(E)- β -Ionona	1489	6	1,145	6	0,807
259	Epóxido de β -ionona	1488	7	0,269	7	0,331
260	Isovalerato fenetílico	1488	9	0,011	n.i.	n.i.
261	Tiglato benzílico	1497	0	0,032	n.i.	n.i.
262	(Z,E)- α -Farneseno	1496	n.i.	n.i.	2	0,153
263	Pentadecano	1500	0	0,014	0	0,171
264	α -Selineno	1498	n.i.	n.i.	7	0,163
265	(E,E)- α -Farneseno	1506	4	0,162	4	0,913
266	(Z)-Nerolidol	1516	-3	0,047	n.i.	n.i.
267	α -Muroleno	1500	n.i.	n.i.	13	0,295
268	2,4-di-t-Butilfenol	1513	n.i.	n.i.	2	0,156
269	β -Bisaboleno	1506	n.i.	n.i.	12	0,147

270	Dibenzofurano	1526	n.i.	n.i.	7	0,184
271	α -Cadineno	1539	n.i.	n.i.	-3	0,251
272	(<i>E,Z</i>)-Pseudoionona	1535	n.i.	n.i.	1	0,187
273	<i>cis</i> -Calameneno	1540	n.i.	n.i.	-2	0,187
274	Dihidroactinolida	1538	11	0,050	11	0,175
275	3,3,5,6-Tetrametil-1-indanona	1555	n.i.	n.i.	1	0,142
276	n-Nonilciclohexano	1556	n.i.	n.i.	3	0,139
277	Ácido dodecanoico	1559	n.i.	n.i.	0	0,155
278	α -Calacoreno	1546	n.i.	n.i.	13	0,181
279	Elemol	1550	n.i.	n.i.	12	0,170
280	(<i>E</i>)-Nerolidol	1563	6	0,613	6	0,651
281	Hexa-hidro-farnesol	1571	n.i.	n.i.	1	0,157
282	Epiglobulol	1580	n.i.	n.i.	-1	0,190
283	<i>cis</i> -Hexenil-3-benzoato	1580	-1	2,639	-1	0,337
284	Benzoato de hexila	1576	9	0,049	n.i.	n.i.
285	<i>trans</i> - ψ -Ionona	1589	n.i.	n.i.	1	0,193
286	Benzoato de <i>trans</i> -2-hexenila	1591	1	0,038	n.i.	n.i.
287	Óxido de cariofileno	1583	n.i.	n.i.	14	0,614
288	Hexadecano	1600	n.i.	n.i.	0	0,219
289	Viridiflorol	1593	n.i.	n.i.	12	0,455
290	Tetradecanal	1613	n.i.	n.i.	1	0,150
291	Epóxido de (<i>E</i>)- β -farneseno	1624	n.i.	n.i.	-2	0,179
292	Laurato de isopropila	1627	n.i.	n.i.	0	0,238
293	τ -Murolol	1640	n.i.	n.i.	19	0,222
294	3-Metil-hexadecano	1673	n.i.	n.i.	0	0,144
295	Óxido de bisabolol II	1658	15	0,055	15	0,146
296	α -Cadinol	1654	n.i.	n.i.	19	0,337
297	Salicilato de <i>cis</i> -3-hexenila	1670	11	0,182	n.i.	n.i.
298	α -Bisabolol	1686	n.i.	n.i.	11	0,212
299	Heptadecano	1700	0	0,009	0	0,217
300	(2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-Farnesol	1701	n.i.	n.i.	5	0,141
301	Pristano	1707	n.i.	n.i.	1	0,166
302	Pentadecanal	1717	n.i.	n.i.	0	0,156
303	Farnesal	1730	n.i.	n.i.	-8	0,162
304	Miristato de metila	1725	n.i.	n.i.	0	0,145
305	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-Farnesol	1725	n.i.	n.i.	3	0,156
306	Ácido tetradecanoico	1751	n.i.	n.i.	7	0,192
307	Undecil-ciclohexano	1760	n.i.	n.i.	7	0,143
308	2-Metil-heptadecano	1765	n.i.	n.i.	7	0,141
309	Benzoato de benzila	1765	16	0,154	13	0,170
310	(<i>E</i>)-3-Octadeceno	1795	n.i.	n.i.	-3	0,150
311	Miristato de etila	1793	-1	0,043	-1	0,143
312	Octadecano	1800	-3	0,007	0	0,183
313	Fitano	1809	n.i.	n.i.	0	0,165
314	Hexadecanal	1818	n.i.	n.i.	0	0,156
315	Acetona hexahidrofarnesílica	1848	-3	0,095	0	0,546
316	Nonadecano	1900	0	0,004	0	0,150
317	Palmitato de metila	1926	n.i.	n.i.	-1	0,447

318	Acetona farnesílica	1919	n.i.	n.i.	6 0,306
319	Isofitol	1949	n.i.	n.i.	1 0,304
320	Ácido n-hexadecanoico	1958	n.i.	n.i.	1 0,220
321	Eicosano	2000	0	0,009	0 0,142
322	Heneicosano	2100	-3	0,036	-3 0,158
323	Linolenato de metila	2105	n.i.	n.i.	-2 0,191
324	Fitol	2116	1	0,008	1 0,916
325	1-Docoseno	2195	n.i.	n.i.	-2 0,152
326	Docosano	2200	0	0,044	0 0,151
327	Tricosano	2300	-4	0,072	-4 0,224
328	4,8,12,16-Tetrametilheptadecan-4-olida	2364	n.i.	n.i.	-2 0,185
329	Tetracosano	2400	0	0,049	0 0,234
330	Pentacosano	2500	0	0,097	0 0,270
331	Hexacosano	2600	0	0,070	-4 0,176
332	Heptacosano	2700	-4	0,075	-4 0,253
333	Octacosano	2800	-4	0,042	-4 0,220
334	Equaleno	2835	n.i.	n.i.	0 0,927

n.i.: Não identificado.

A relação linear entre os LTPRI obtidos experimentalmente por GCxGC/TOFMS e os LTPRI de referência de 1D-GC em coluna apolar pode ser visualizada na **Figura 58**. O coeficiente de determinação (R^2) para este modelo foi de 0,9999. Portanto, podemos inferir que há uma correspondência de, aproximadamente, 99,99% entre os valores experimentais e de referência, ou seja, a equação linear obtida ($y = 1,0003x + 0,4927$) aproxima-se muito da identidade.

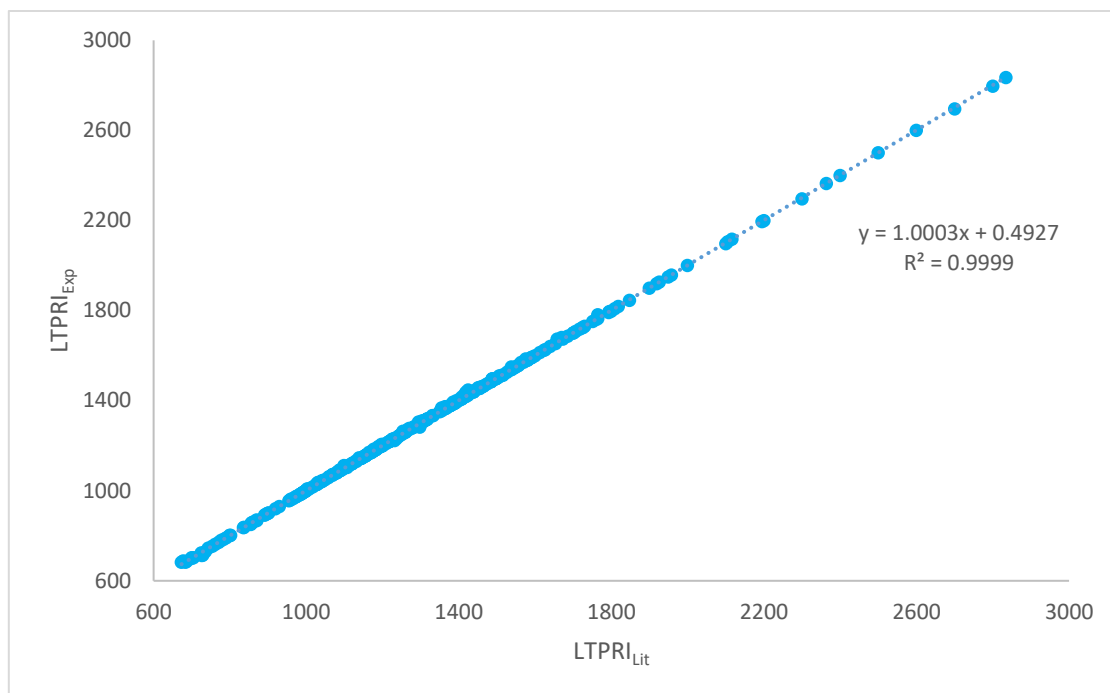


Figura 58: Comparação entre os LTPRI obtidos experimentalmente por GCxGC/TOFMS e os LTPRI de referência de 1D-GC em coluna apolar.

Dessa forma, um total de 157 e 291 compostos foram tentativamente identificados nas amostras de folhas *in natura* e processadas, respectivamente, com similaridades espectrais satisfatórias e boa concordância entre os valores de LTPRI obtidos experimentalmente para os compostos e os reportados na literatura.^{332,333}

Nas folhas frescas, foram identificados os seguintes compostos (**Figura 61**): 28 hidrocarbonetos alifáticos e 3 aromáticos, 12 álcoois alifáticos, 11 aldeídos alifáticos, 5 cetonas alifáticas, 8 ésteres alifáticos, 5 furano(na)s, 25 fenilpropanoides, 18 norisoprenoides, 11 monoterpenos, 23 monoterpenos oxigenados, 4 sesquiterpenos, 3 sesquiterpenos oxigenados e 1 diterpeno oxigenado. Os principais constituintes das folhas frescas foram o 3-alilguaiaicol (28,63%), o monoterpeno oxigenado linalol (17,61%) e o fenilpropanoide salicilato de metila (5,36%), entre outros (**Figura 59**). O linalol é reconhecido por exibir várias atividades biológicas, como efeitos antibacterianos e anti-inflamatórios.³³⁴ Vale notar que as folhas frescas e processadas exibiram diferenças significativas entre seus perfis químicos. Neste contexto, 43 dos 157 compostos identificados nas folhas frescas não foram identificados nas folhas

processadas, entre os quais o 3-alilguaiacol e o geraniol (1,59%) foram os mais representativos, sendo o segundo conhecido por sua atividade antibacteriana e antifúngica.³³⁵

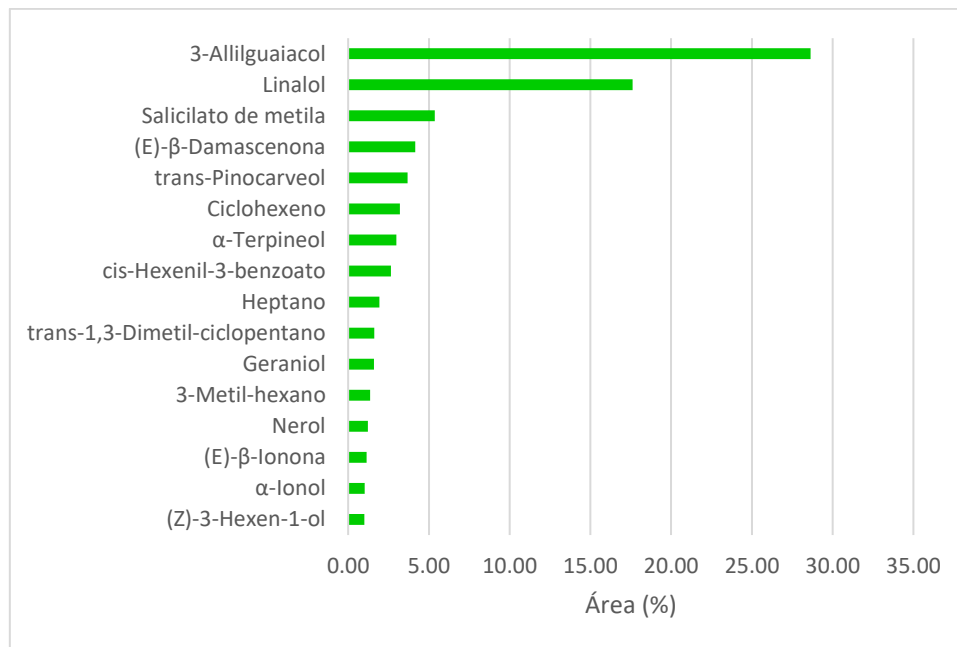


Figura 59: Distribuição por percentual de área dos 16 compostos majoritários (área percentual superior a 1% na amostra) identificados na fração volátil das folhas frescas de erva-mate por GCxGC/TOFMS.

Nas folhas processadas, foram identificados os seguintes compostos (**Figura 61**): 38 hidrocarbonetos alifáticos e 14 aromáticos, 11 álcoois alifáticos, 26 aldeídos alifáticos, 12 cetonas alifáticas, 7 ésteres alifáticos, 8 furano(na)s, 6 ácidos, 2 éteres, 3 fenóis, 28 fenilpropanoídes, 31 norisoprenoídes, 18 monoterpenos, 44 monoterpenos oxigenados, 20 sesquiterpenos, 14 sesquiterpenos oxigenados e 2 diterpenos oxigenados, 6 compostos nitrogenados e 1 composto sulfurado. Os principais componentes foram os monoterpenos oxigenados 2,6-dimetil-1,7-octadien-3-ol (9,96%), linalol (5,58%), α-terpineol (4,67%) e geraniol (4,00%), entre outros (**Figura 60**), sendo o α-terpineol descrito na literatura como um excelente agente antibacteriano.³³⁶ Um grupo de 178 compostos, incluindo 2,6-dimetil-1,7-octadien-3-ol, geraniol e 3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol (3,99%), foram identificados apenas na erva-mate processada.

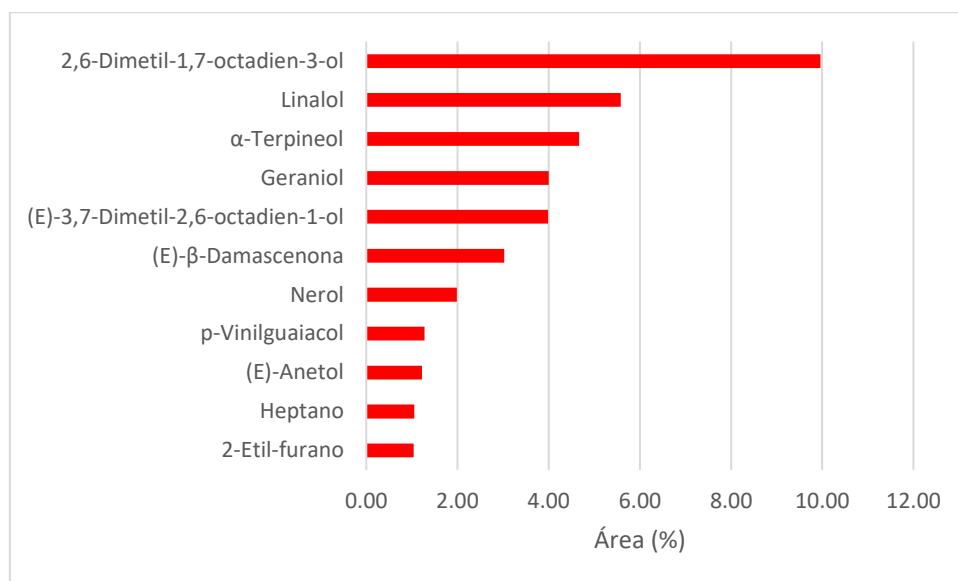


Figura 60: Distribuição por percentual de área dos 11 compostos majoritários (área percentual superior a 1% na amostra) identificados na fração volátil das folhas processadas de erva-mate por GCxGC/TOFMS.

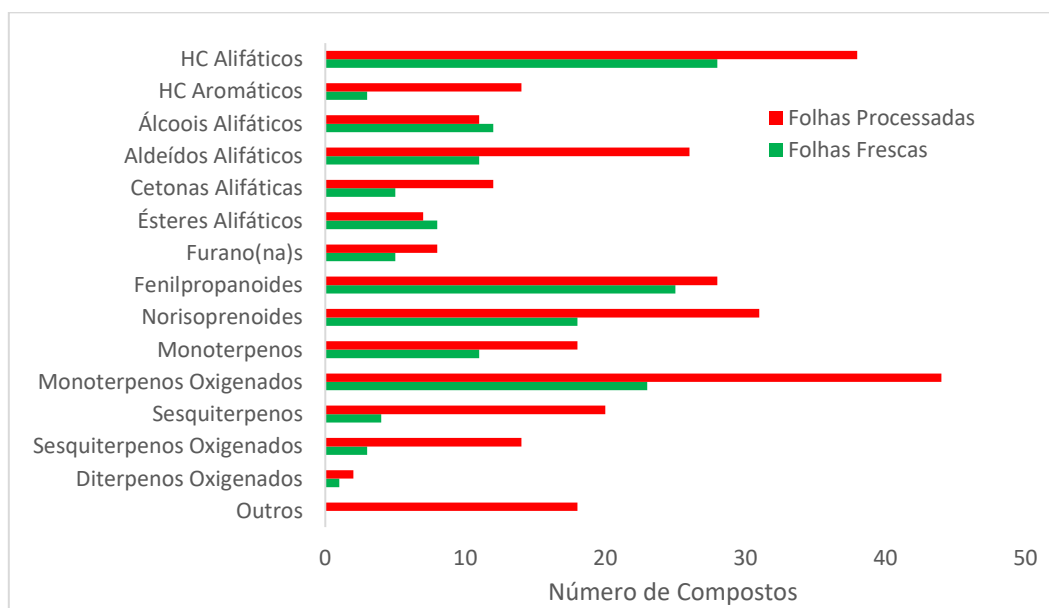


Figura 61: Distribuição dos compostos identificados nas amostras de fração volátil de folhas de erva-mate frescas e processadas, analisadas por GCxGC/TOFMS, nas suas respectivas classes químicas.

O aumento no número de compostos após o processamento das folhas pode ser devido ao processo de sapeco e secagem, que produz vários produtos

de degradação. Por exemplo, a elevada quantidade de norisoprenoides observada nas folhas processadas (10,43%), como (*E*)- β -damascenona (3,03%) e (*E*)- β -ionona (0,81%), pode ser devido a degradação de carotenoides durante o processamento.

Comparando os resultados apresentados com os relatados na literatura, observam-se algumas correspondências. Em 1991, Kawakami *et al.*¹¹⁸ investigaram os compostos voláteis, obtidos por destilação a vapor, na erva-mate processada e no chá mate, usando GC/qMS. De acordo com os autores, foram tentativamente identificados 172 compostos. Desses, 69 também foram identificados no presente estudo, incluindo o linalol, α -terpineol e geraniol. Além disso, Bastos *et al.*²¹³ avaliaram por GC/qMS o óleo obtido a partir da erva-mate processada. Conforme descrito por estes autores, foram identificados 22 compostos, dentre os quais 19 também foram identificados no presente estudo, como o limoneno (0,65%), linalol e a acetona geranílica (0,45%). Em 2009, Purcaro *et al.* utilizaram GCxGC/qMS para investigar a fração volátil (obtida por SPME) da erva-mate processada, e 241 compostos foram identificados, dentre os quais, 91 também foram identificados na presente pesquisa.³³⁷

Apesar dessas semelhanças com os resultados relatados na literatura científica, 168 compostos identificados no presente estudo estão sendo descritos pela primeira vez na erva-mate processada, como, por exemplo, os monoterpenos oxigenados 2,6-dimetil-1,7-octadien-3-ol e (*E*)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol e o norisoprenoide (*E*)- β -damascenona (3,03%), entre outros.

A **Figura 62** apresenta uma comparação gráfica da distribuição em área percentual das classes químicas identificadas nos óleos investigados. A fração volátil das folhas frescas foi caracterizada pelo predomínio da classe fenilpropanoide (39,97%), com 3-alilguaiacol, salicilato de metila e *cis*-hexenil-3-benzoato (2,64%) detectados com maiores áreas relativas. Embora a área relativa de monoterpenos oxigenados tenha aumentado com o processamento da erva-mate (41,46%), a porcentagem de linalol diminuiu significativamente, de 17,61% na folha fresca para 5,5% erva processada. Além disso, é notório o aumento na área relativa de furano(na)s após o processamento da erva-mate. Esse aumento, quando comparado à folha fresca, pode ser devido à formação desses compostos pela reação de Maillard durante o processo de secagem.

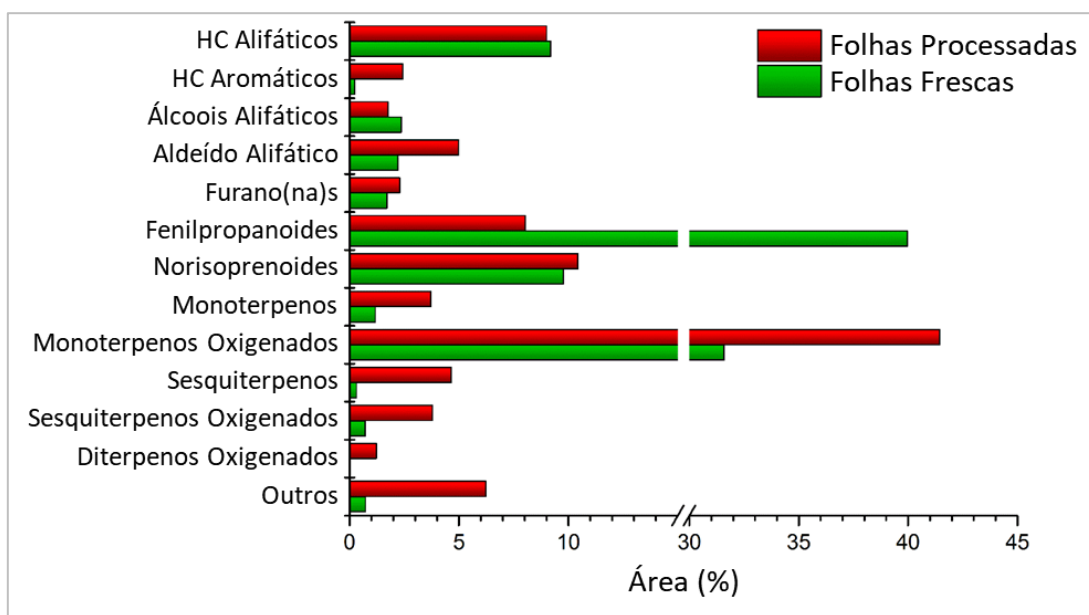


Figura 62: Distribuição percentual dos compostos tentativamente identificados na fração volátil das folhas frescas e processadas de erva-mate analisadas por GCxGC/TOFMS.

No que diz respeito ao uso da técnica de GCxGC, esta proporcionou uma elevada eficiência de análise, principalmente no que tange os compostos minoritários. Os resultados apresentados mostram um evidente aumento na quantidade de compostos detectados quando comparados aos estudos prévios, que utilizaram a 1D-GC como técnica de análise. Esses dados são consequência de vários fatores, sendo um deles a combinação de duas colunas com modos de retenção diferentes usadas na GCxGC. Além disso, a análise por GCxGC fornece uma relação sinal/ruído (S/N) mais elevada quando comparada à 1D-GC, devido ao aprisionamento criogênico pelo modulador. Durante o processo de modulação, pequenas frações eluídas da primeira coluna são capturadas, focadas e reinjetadas na segunda coluna, proporcionando picos mais estreitos e intensos, melhorando, portanto, a S/N. Uma consequência da modulação, combinada à resolução aprimorada da GCxGC, é a maior pureza espectral, em comparação com a análise por GC convencional. Esta característica fornece uma identificação mais precisa, juntamente a um aumento expressivo no número de compostos identificados.

O algoritmo de deconvolução espectral do *software* LECO ChromaTOF fornece uma solução elegante para resolver co-eluições cromatográficas, permitindo extrair o espectro puro de cada analito. Dois exemplos de co-eluição são apresentados na **Figura 63**, na qual o TIC apresenta apenas dois picos definidos. Apesar da aparente simetria de pico, a deconvolução espectral permitiu a detecção de dois pares de picos coeluentes - os monoterpênicos oxigenados *trans*-carveol e *p*-menth-1-en-9-al, e *cis*-carveol e β -ciclocitral. Os espectros brutos obtidos a partir desses picos não são representativos de nenhum desses compostos devido à sua co-eluição com o outro componente. Isso interferiria na identificação desses compostos sem a deconvolução espectral que, por sua vez, permite a extração dos espectros individuais. Mesmo na co-eluição do *cis*-carveol com β -ciclocitral, na qual a área do primeiro foi quase quatro vezes maior do que a do segundo composto, o *software* foi capaz de produzir espectros de massa de alta qualidade para ambos analitos após a deconvolução.

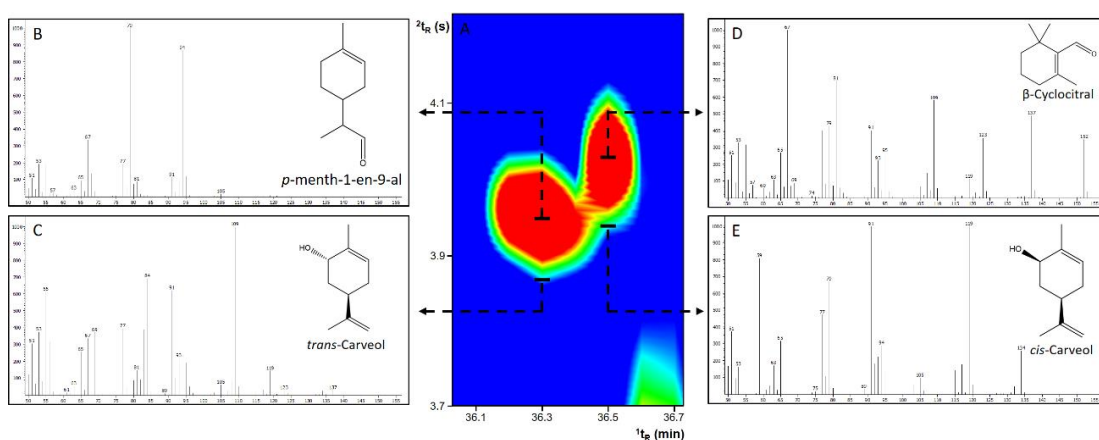


Figura 63: (A) Expansão de uma região do cromatograma. O algoritmo de deconvolução é aplicado, permitindo a detecção de dois pares de picos co-eluido: (B) *p*-menth-1-en-9-al / (C) *trans*-carveol e (D) β -ciclocitral / (E) *cis*-carveol.

Purcaro *et al.*³³⁷ observaram a preocupante presença de hidrocarbonetos e HPA's (em particular HPA's alquilados) na erva-mate processada. Neste contexto, o presente estudo é consistente com estes resultados. No total, 38 hidrocarbonetos alifáticos foram identificados neste estudo, compreendendo 9,01% da área cromatográfica identificada. Além disso, foram identificados 14 hidrocarbonetos aromáticos, representando 2,43% da área cromatográfica

identificada. Entre esses hidrocarbonetos aromáticos, 5 compostos (0,81%) são HPA's ou HPA's alquilados, como naftaleno (0,18%), 1,5-dimetilnaftaleno (0,16%) e α -metilnaftaleno (0,16%). A presença destes compostos pode estar relacionada ao processamento, que envolve a secagem do produto em fogo de lenha, que pode produzir os HPA's encontrados.

Uma vez que a literatura médica indica que os usuários de erva-mate têm um risco superior de desenvolver câncer oral e esofágico, quando comparado a uma população de controle, essa contaminação com HPA's pode estar relacionada com estes achados. Todavia, sabe-se que esse risco é devido à alta temperatura de consumo da bebida produzida a partir deste produto ou aos componentes cancerígenos presentes no mate.³³⁸ No entanto, mudanças nos métodos de secagem, como o emprego de processamento sem fumaça, poderiam mitigar estes riscos.³³⁸

CAPÍTULO V

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Esse estudo representa a primeira aplicação de uma metodologia multivariada de otimização aplicada à extração de metabólitos secundários não-voláteis de erva-mate por UAE. A aplicação de um planejamento experimental CCD 2³ permitiu avaliar a influência do percentual de etanol na fase extratora hidroetanólica, tempo e temperatura na UAE de erva-mate comercial. O ajuste de um modelo polinomial quadrático mostrou-se adequado e permitiu a determinação de um percentual de etanol ótimo na fase extratora de 43%, temperatura de 80 °C, e tempo de extração de 11,6 min. A eficiência de extração obtida mostrou-se expressivamente superior à obtida com técnicas convencionais descritas na literatura.

A utilização da técnica de fluorescência molecular, aliada à PARAFAC, permitiu a recuperação de 3 fatores, associados ao teor fenólico e de pigmentos nos extratos obtidos por UAE de folhas processadas de erva-mate. Realizando-se uma análise não-supervisionada dos dados, obteve-se uma clara segregação entre as amostras oriundas dos países platinos e as amostras brasileiras. Os resultados obtidos demonstram um teor de pigmentos mais elevado nas amostras brasileiras que nas demais amostras, possivelmente relacionado ao processo de estacionamento que as amostras platinas sofrem, e um teor fenólico superior nas amostras dos países platinos.

Os extratos foram caracterizados por UHPLC-QTOF-MS, que possibilitou a identificação de 19 componentes (3-CQA, 5-CQA, 3,4-di-CQA, rutina, cafeína, teobromina, entre outros metabólitos secundários), que foram quantificados por HPLC-DAD, sendo os majoritários: cafeína, rutina e 3-CQA. As elevadas concentrações obtidas evidenciaram a eficiência da UAE e da otimização multivariada executada. Esses resultados foram modelados mediante uma PCA, que evidenciou uma segregação entre as amostras brasileiras e as oriundas dos demais países. O grupo de amostras brasileiras apresentou, ainda, alguns agrupamentos de amostras de folhas cultivadas e nativas, bem como de amostras destinados ao preparo de tererê. Verificou-se que as folhas de erva-mate produzidas a partir de ervais cultivados possuem uma quantidade mais elevada de ácidos clorogênicos. Os resultados apontaram, ainda, uma maior

concentração da maioria dos ácidos clorogênicos e flavonoides em amostras dos países platinos, corroborando com os resultados obtidos na análise de fluorescência, aliada a modelagem PARAFAC. Esses resultados consistem na primeira aplicação bem-sucedida de segregação de amostras de erva-mate comercial, a partir de seu perfil metabólico não-volátil utilizando fluorescência molecular e cromatografia líquida, aliada às ferramentas quimiométricas PCA e PARAFAC.

A aplicação de GCxGC/TOFMS na análise das frações voláteis de folhas *in natura* e processadas de erva-mate mostrou-se adequada. A elevada eficiência de separação e a alta razão sinal-ruído obtidas possibilitaram uma caracterização química precisa, sendo tentativamente identificados 157 compostos nas folhas frescas de erva-mate e 291 para a erva-mate processada (168 dos quais foram relatados pela primeira vez). O uso de índices de retenção desempenhou um papel importante na identificação de compostos, uma vez que apenas os dados espectrais mostraram-se insuficientes para fornecer uma identificação confiável.

Verificou-se que o processamento industrial leva a alterações significativas na composição química da erva-mate. Os resultados adquiridos pela quantificação por normalização de área revelaram que a fração volátil das folhas frescas de erva-mate contém grandes porcentagens de fenilpropanoides, sua classe majoritária, enquanto os monoterpenos oxigenados foram classe predominante na erva-mate processada. Alguns compostos, como os furanos, foram formados após o processamento industrial. Além disso, HPA's e HPA's alquilados foram identificados na amostra de erva-mate processada, sugerindo a necessidade de utilizar métodos livres de fumaça no seu processamento.

Por fim, a presente pesquisa representa uma contribuição para o conhecimento detalhado das diferenças químicas dos metabólitos secundários presentes na erva-mate de diferentes países, formas de processamento e cultivo. Além disso, propõe a associação de estratégias quimiométricas e analíticas, a fim de se extrair de maneira célere e eficiente o máximo possível de informações da complexa estrutura de dados fornecidas por essas técnicas, dando suporte para futuras investigações acerca da composição química da erva-mate.

CAPÍTULO VI

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

6.1. ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS CIENTÍFICOS

1. **Polidoro A.S.**, Scapin E., Lazzari E., Silva A.N., dos Santos A.L., Caramão E.B., Jacques R.A. Valorization of coffee silverskin industrial waste by pyrolysis: From optimization of bio-oil production to chemical characterization by GC × GC/qMS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2018. DOI: 10.1016/j.jaap.2017.12.005.
2. **Polidoro A.S.**, Scapin E., Malmann M., do Carmo J.U., Machado M.E., Caramão E.B., Jacques R.A. Characterization of volatile fractions in green mate and mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC×GC/TOFMS). *Microchemical Journal*, 2016. DOI: 10.1016/j.microc.2016.03.019
3. Hoinacki Da Silva C.K., **Polidoro A.S.**, Cabrera Ruschel P.M., Thue P.S., Jacques R.A., Lima C., Bussamara R., Fernandes A.N. Laccase covalently immobilized on avocado seed biochar: A high-performance biocatalyst for acetaminophen sorption and biotransformation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, DOI: 10.1016/j.jece.2022.107731
4. Scapin E., Maciel G.P.S., **Polidoro A.S.**, Lazzari E., Benvenutti, E.V., Falcade T., Jacques R.A. Activated carbon from rice husk biochar with high surface area. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 2021, DOI: 10.33263/BRIAC113.1026510277
5. Castiglioni G.Z., Bettio G., Matte C.R., Jacques R.A., **Polidoro A.S.**, Rosa C.A., Ayub M.A.Z. Production of volatile compounds by yeasts using hydrolysed grape seed oil obtained by immobilized lipases in continuous packed-bed reactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2020. DOI: 10.1007/s00449-020-02334-4.
6. Barros L.A.B, Santos A.L., Polidoro A. S., Neubauer T. M., Santana A. A. M., Cardoso J. C., Jacques R. A., Krause L.C., Caramão E.B. Phytochemical analysis, antioxidant activity and in vitro ocular irritation of

- Hibiscus rosa-sinensis L. extracts. International Journal of Advanced Engineering Research and Science, 2020. DOI: 10.22161/ijaers.710.15
7. Lazzari E., **Polidoro A.S.**, Onorevoli B., Schena T., Silva A.N., Scapin E., Jacques R.A., Caramão E.B. Production of rice husk bio-oil and comprehensive characterization (qualitative and quantitative) by HPLC/PDA and GCxGC/qMS. *Renewable Energy*, 2019. DOI: 10.1016/j.renene.2018.12.053
 8. dos Santos A.L., **Polidoro A.S.**, Cardoso C.A.L., Batistote M., do Carmo Vieira M., Jacques R.A., Caramão E.B. GCxGC/qMS analyses of Campomanesia guazumifolia (Cambess.) O. Berg essential oils and their antioxidant and antimicrobial activity. *Natural Product Research*, 2019. DOI: 10.1080/14786419.2017.1399383.
 9. dos Santos, A.L., **Polidoro, A.S.**, Cardoso, C.A.L., Mota, J.S., Jacques, R.A., Caramão, E.B. Analysis of the seasonal variation in chemical profile of *Piper glabratum* Kunth essential oils using GCxGC/qMS and their antioxidant and antifungal activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2019. DOI: 10.21577/0103-5053.20190196
 10. dos Santos A.L., Novaes A.D.S., **Polidoro A.S.**, de Barros M.E., Mota J.S., Lima D.B.M., Krause L.C., Cardoso C.A.L., Jacques R.A., Caramão E.B. Chemical characterisation of Piper amalago (Piperaceae) essential oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with rapid-scanning quadrupole mass spectrometry (GCxGC/qMS) and their antilithiasic activity and acute toxicity. *Phytochemical Analysis*, 2018. DOI: 10.1002/pca.2747
 11. Onorevoli B., Machado M.E., **Polidoro A.S.**, Corbelini V.A., Caramão E.B., Jacques R.A. Pyrolysis of Residual Tobacco Seeds: Characterization of Nitrogen Compounds in Bio-oil Using Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detection. *Energy and Fuels*, 2017. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.7b00405

6.2. PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

1. **Polidoro A.S.**, Scapin E., Gomes A.A., Jacques R.A. Chromatographic fingerprint of Brazilian Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) by means MCR-ALS. Chromatographic fingerprint of Brazilian Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) by means MCR-ALS. XVII Latin American Symposium on Chromatography and Related Techniques (COLACRO XVI), Aracaju, Brasil, Julho de 2019.
2. dos Santos A.L., **Polidoro A.S.**, Dias B.B., Rodrigues E., Jacques R.A., Caramão E.B. Extraction of bioactive compounds from coffee silverskin. Chromatographic fingerprint of Brazilian Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) by means MCR-ALS. XVII Latin American Symposium on Chromatography and Related Techniques (COLACRO XVI), Aracaju, Brasil, Julho de 2019.

CAPÍTULO VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bracesco, N. *et al.* Antioxidant Activity of a Botanical Extract Preparation of *Ilex paraguariensis*: Prevention of DNA Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and Human Low-Density Lipoprotein Oxidation. *J. Altern. Complement. Med.* **9**, 379–387 (2003).
2. Meinhart, A. D. *et al.* Methylxanthines and Phenolics Content Extracted during the Consumption of Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 2188–2193 (2010).
3. Heck, C. I. & de Mejia, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J. Food Sci.* **72**, R138-51 (2007).
4. FAO. *FAOSTAT-Maté*. (2020).
5. Contreras, P. D. Desenvolvimento de bebida à base de subprodutos da indústria da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e verificação de sua atividade antioxidante. (Universidade Federal do Paraná, 2007).
6. Simões, L. L. & Lino, C. F. *Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais*. (SENAC, 2002).
7. AGENOR MACCARI JUNIOR. ANÁLISE DO PRÉ-PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE PARA CHIMARRÃO. (Universidade Estadual de Campinas, 2005).
8. da Croce, D. M. Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: erva-mate. 41 Preprint at (2000).
9. Rocha Júnior, W. F. Análise do agronegócio da erva-mate com o enfoque da nova economia institucional e o uso da matriz estrutural prospectiva. (Universidade Federal de Santa Catarina, 2001).
10. Mosele, S. H. A. A governança na cadeia agroindustrial da erva-mate na região do Alto Uruguai Rio Grandense. (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002).
11. Medrado, M. J. S. & Mosele, S. H. *O futuro da investigação científica em erva-mate*. (EMBRAPA, 2004).
12. Barboza, L. M. V. Desenvolvimento de bebida a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint. Hilaire) adicionada de fibra alimentar. (UFPR, 2006).

13. Esmelindro, Â. A., Dos Santos Girardi, J., Mossi, A., Jacques, R. A. & Dariva, C. Influence of Agronomic Variables on the Composition of Mate Tea Leaves (*Ilex paraguariensis*) Extracts Obtained from CO₂ Extraction at 30 °C and 175 bar. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1990–1995 (2004).
14. Kaltbach, P., Ballert, S., Gillmeister, M., Kabrodt, K. & Schellenberg, I. Mate (*Ilex paraguariensis*) tea preparations: Understanding the extraction of volatile and non-volatile compounds upon variations of the traditional consecutive infusions. *Food Chem.* **374**, 131756 (2022).
15. Kaltbach, P., Ballert, S., Kabrodt, K. & Schellenberg, I. New HPTLC methods for analysis of major bioactive compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) tea. *J. Food Compos. Anal.* **92**, 103568 (2020).
16. Jongberg, S., Racanicci, A. M. C. & Skibsted, L. H. Mate extract is superior to green tea extract in the protection against chicken meat protein thiol oxidation. *Food Chem.* **300**, 125134 (2019).
17. Colpo, A. C. *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food Chem.* **209**, 185–195 (2016).
18. Peres, R., Tonin, F., Tavares, M. & Rodriguez-Amaya, D. HPLC-DAD-ESI/MS Identification and Quantification of Phenolic Compounds in *Ilex paraguariensis* Beverages and On-Line Evaluation of Individual Antioxidant Activity. *Molecules* **18**, 3859–3871 (2013).
19. Picó, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* **43**, 84–99 (2013).
20. Chemat, F. *et al.* Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* **34**, 540–560 (2017).
21. Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D. & Youssef, M. M. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Res. Int.* **48**, 410–427 (2012).
22. Knorr, D. *et al.* Emerging Technologies in Food Processing. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2**, 203–235 (2011).

23. Martines, M. A. U., Davolos, M. R. & Jafelicci Júnior, M. O efeito do ultrassom em reações químicas. *Quím. Nova* **23**, 251–256 (2000).
24. Azmir, J. *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **117**, 426–436 (2013).
25. Tiwari, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends Anal. Chem.* **71**, 100–109 (2015).
26. Meurer, A. Z. Caracterização Química e Climática de Populações Naturais de Erva-Mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hill) no Planalto Norte Catarinense. (UFSC, 2012).
27. Atkins, P. W. *Físico-Química Vol. 1.* (LTC - Livros Técnicos e Científicos, 1999).
28. Aranda, D. *Antecedentes históricos de la yerba mate. Miscelanea nº 13* (INTA, 1986).
29. Altaki, M. S., Santos, F. J. & Galceran, M. T. Occurrence of furan in coffee from Spanish market: Contribution of brewing and roasting. *Food Chem.* **126**, 1527–1532 (2011).
30. Alsbou, E. & Helleur, B. Accelerated Aging of Bio-oil from Fast Pyrolysis of Hardwood. *Energy Fuels* **28**, 3224–3235 (2014).
31. Agterdenbos, J.; Van Noort, J.P.M.; Peters, F.F.; Bax, D. The determination of selenium with hydride generation AAS—III: The role of oxygen and of the cuvette wall. *Spectrochim Acta Part B* **41**, 283 (1986).
32. Achenbach, H., Fietz, W., Worth, J., Waibel, R. & Portecop, J. Constituents of tropical medicinal plants, IXX1 GC/MS-investigations of the constituents of Piper amalago – 30 new amides of the niperine-type. *Planta Med.* **52**, 12–18 (1986).
33. Berkai, D. & Braga, C. A. *500 Anos de história da erva-mate.* (Editora Cone Sul, 2000).
34. BORILLE, Â. M. W., REISSMANN, C. B. & DE FREITAS, R. J. S. RELAÇÃO ENTRE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS E O NITROGÊNIO EM MORFOTIPOS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St.Hil.). *Bol. Cent. Pesqui. Process. Aliment.* **23**, (2005).
35. Linhares, T. *História Econômica do Mate.* (Livraria José Olympio, 1969).

36. Osmar, D. *Erva-mate - Sistema de produção e processamento industrial. Ufgd* (UFGD, 2009). doi:616.89-008.47:616-.
37. Saint-Hilaire, A. de. *Viagem ao Rio Grande do Sul (1820-1821)*. (Companhia Editora Nacional, 1939).
38. Molina, J. E. & Molina, J. E. *El mate arte y traición*. (Eguiguren, 2004).
39. Mazuchowski, J. Z. & Rucker, N. G. A. *Erva-Mate - Prospecção Tecnológica da Cadeia Produtiva. Documento Executivo*. (Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná, 1997).
40. Corrêa, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas*. (Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984).
41. Carvalho, P. E. R. *Espécies Florestais Brasileiras*. (Embrapa Florestas, 2003).
42. Mazuchowski, J. Z. *Manual da erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hill.)*. (EMATER, 1989).
43. Valduga, E. Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate. (Universidade Federal do Paraná, 1995).
44. Mazuchowski, J. Z. *Manual da erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hill.)*. (EMATER, 1991).
45. Bragagnolo, N., Pan, W. & Filho, L. K. *Manual técnico da erva-mate*. (EMATER, 1980).
46. Ferreira Filho, J. C. *Cultura e preparo da erva-mate*. (Serviços de Informação Agrícola, 1948).
47. Valduga, A. T. Uso sustentado e processamento de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Erva-mate). (Universidade Federal de São Carlos, 2002).
48. UFRGS. *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. *Flora Digital* (2014).
49. Köhler, H. A. *Koehler's Medicinal-Plants*. (1887).
50. Maccari Junior, A. Análise do pré-processamento da erva-mate para chimarrão. (Universidade Estadual de Campinas, 2005).
51. Gilberti, G. C. *Ilex* en Sudamérica: florística, sistemática y potencialidades com relación a un banco de germoplasma para la yerba-mate. in *Erva-mate:*

- Biologia e Cultura no Cone Sul* 303–3012 (Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995).
52. Edwin, G. & Reitz, R. *Aquífoliáceas*. (1967).
53. Reitz, R., Klein, R. M. & Reis, A. *Projeto madeira de Santa Catarina*. (1978).
54. Schultz, A. R. *Introdução ao Estudo da Botânica Sistemática*. (Livraria do Globo, 1943).
55. Mattos, N. F. Revisão taxonômica da erva-mate – *Ilex paraguariensis* St. Hil. in *SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS – SILVICULTURA DA ERVA-MATE (Ilex paraguariensis St. Hil.)* 37–46 (EMBRAPA-CNPQ, 1983).
56. Coelho, G. C., Mariath, J. E. de A. & Schenkel, E. P. Populational Diversity on Leaf Morphology of Maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* **45**, 47–51 (2002).
57. da Croce, D. M. & Floss, P. A. *Cultura da Erva-Mate no Estado de Santa Catarina*. (1999).
58. Ferreira, A. G., Almeida, J. S. & Cunha, G. G. Fisiocologia de *Ilex paraguariensis* St. Hil. com ênfase na embriologia experimental. in *REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE* 161 (Fapergs, 1994).
59. Oliveira, Y. M. M. & Rotta, E. Área de Distribuição Natural de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill). in *SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS SILVICULTURA DA ERVA-MATE* 17–36 (EMBRAPA-CNPQ, 1985).
60. Carvalho, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. 639 Preprint at (1994).
61. Junior, C. K., Zarpellon, F. R., Dalazen, L. L. & Souza, A. A cultura da Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em sistema de cultivo convencional e orgânico como alternativa de renda ao pequeno proprietário rural. in *XXIV Congresso Brasileiro de Custos* 16 (2017).
62. Alegre, J. C., Vilcahuamán, L. J. M. & Corrêa, G. Geração da curva alométrica para avaliar as reservas de carbono em plantios de erva-mate, no sul do Brasil. 19 Preprint at (2007).

63. Higa, R. C. V. Propagação vegetativa da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). in *Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais* 119–123 (EMBRAPA-CNPQ, 1985).
64. Karas, A. C. *Autoecologia da erva-mate*. (UFPR, 1992).
65. Souza, R. de O. Cadeia Produtiva de erva-mate em Santa Catarina. 37 Preprint at (1996).
66. Medrado, M. J. S., Dalzoto, D. N., Olizeski, A. & Mosele, S. H. Recuperação de ervais degradados. 6 Preprint at (2002).
67. IBDF - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. *Erva-mate: origem, cultura e industrialização*. (IBDF, 1975).
68. Fossati, L. C. Avaliação do estado nutricional e da produtividade de erva-mate *Ilexparaguariensis* St. Hil., em função do sítio e da dióica. (UFPR, 1997).
69. Rakocevicz, M., Medrado, M. J. S., Lucambio, F. & Valduga, T. A. Influência do sexo, da sombra e da idade de folhas no sabor do chimarrão. in *40 CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE* 31–36 (INYM, INTA, UNaM, EPAGRI, 2006).
70. Rucker, N. G. A., Maccari, A. J. & Rocha, W. F. J. Agronegócio da erva-mate no Estado do Paraná: diagnóstico e perspectivas para 2003. Preprint at (2002).
71. Isolabella, S. *et al.* Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. *Food Chem.* **122**, 695–699 (2010).
72. Turner, S., Cogoi, L. & Isolabella, S. Evaluation of the antioxidant activity and polyphenols content of *Ilex paraguariensis* (mate) during industrialization. *Adv. J. Food Sci. Technol.* **3**, 23–30 (2011).
73. Fagundes, G. *Cevando Mate - no Rumo de uma Cultura Própria*. (Rigel, 1995).
74. Paula, R. D. G. *Novos estudos sobre o mate*. (Instituto Nacional de Tecnologia, Ministério da Indústria e do Comércio, 1968).
75. Alencar, F. R. *Erva-mate*. (1960).
76. Silva, S. M. Mate e Chimarrão. *Agropecuária Catarin.* **16**, 70 (2003).
77. Valduga, A. T., Finzer, J. R. D. & Mosele, S. H. *Processamento de Erva-Mate*. (EdiFAPES, 2003).

78. Känzig, R. G. Transformación primaria. in *Curso de Capacitación en Producción* 129–139 (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1996).
79. Muello, A. C. *Yerba mate su cultivo y explotación*. (Editorial Sudamericana, 1946).
80. Baldo. O Mate. <https://www.baldo.com.br/content/5-o-mate>.
81. mate in box. O que é uma erva-mate repousada? <https://mateinbox.com.br/blog/erva-mate-repousada/>.
82. Colpo, A. Z. C. PERFIL FITOQUÍMICO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A.St. Hill.). (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA, 2012).
83. Heinrichs, R. & Malavolta, E. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Ciênc. Rural* **31**, 781–785 (2001).
84. Berté, K. A. S. Tecnologia da erva-mate solúvel. (UFPR, 2011).
85. Lunceford, N. & Gugliucci, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia* **76**, 419–427 (2005).
86. Paula, M. L. & Chociai, J. G. Uso e aplicação industrial da erva-mate em cosméticos. in *Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate* 77–91 (Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate do Paraná, 2000).
87. Bastos, D. H. M. & Torres, E. A. F. S. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. *Nutr. Rev. Soc. Bras. Aliment.* **26**, 77–89 (2003).
88. Vieira, M. A. *et al.* Chemical Characterization of Candy Made of Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) Residue. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 4637–4642 (2008).
89. MELLO, A. C. B. *et al.* BEBIDA GASEIFICADA DE ERVA-MATE VERDE. *Bol. Cent. Pesqui. Process. Aliment.* **27**, (2009).
90. Bracesco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T. & Gugliucci, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J. Ethnopharmacol.* **136**, 378–384 (2011).
91. Faccin, C. *et al.* Bread with Yerba Mate Aqueous Extract (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). *Am. J. Food Technol.* **10**, 206–214 (2015).

92. Berté, K. A. S., Izidoro, D. R., Dutra, F. L. G. & Hoffmann-Ribani, R. Desenvolvimento de gelatina funcional de erva-mate. *Ciênc. Rural* **41**, 354–360 (2011).
93. Chiesa, L., Schlabit, C. & Souza, C. F. V. de. Efeito da adição de erva-mate nas características sensoriais e físico-químicas de barras de cereais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **71**, 105–110 (2012).
94. Medrado, M. J. S. *Trabalhador no cultivo de plantas industriais – Erva-Mate: Produção*. (SENAR – Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2003).
95. Holst, B. & Williamson, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**, 73–82 (2008).
96. Cardozo Junior, E. L. & Morand, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. *J. Funct. Foods* **21**, 440–454 (2016).
97. Maccari Junior, A. & Santos, A. P. R. O alimento erva-mate e a erva-mate em alimentos. in *Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate* 43–69 (Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate do Paraná, 2000).
98. Departamento de Economia Rural - DERAL. *Erva-Mate - Análise da Conjuntura – Safra 2019/20*. (2020).
99. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. *Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura*. (2018).
100. OEC: The Observatory of Economic. *OEC-Maté*. (2017).
101. Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. *Exportação e Importação Geral - Mate*. (2017).
102. Simões, C. M. O. *et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento*. (Editora da UFSC, 2007).
103. Dixon, R. A. Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**, 843–847 (2001).
104. Watson, J. D. *et al. Molecular Biology of the Gene*. (Pearson, 2014).
105. Waksmondzka-Hajnos, M., Sherma, J. & Kowalska, T. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. (CRC Press, 2008).
106. Bell, E. A. & Charlwood, B. V. Secondary plant products. in *Encyclopedia Plant Physiology* 674 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1980).

107. Gobbo-Neto, L. & Lopes, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím. Nova* **30**, 374–381 (2007).
108. Enfissi, E. M. A. *et al.* Integrative Transcript and Metabolite Analysis of Nutritionally Enhanced DE-ETIOLATED1 Downregulated Tomato Fruit. *Plant Cell* **22**, 1190–1215 (2010).
109. VALDUGA, E., FREITAS, R. J. S. DE, REISSMANN, C. B. & NAKASHIMA, T. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FOLHA DE *Ilex paraguariensis* St. Hil. (ERVA-MATE) E DE OUTRAS ESPÉCIES UTILIZADAS NA ADULTERAÇÃO DO MATE. *Bol. Cent. Pesqui. Process. Aliment.* **15**, (1997).
110. Esmelindro, M. C., Toniazzo, G., Waczuk, A., Dariva, C. & Oliveira, D. de. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. *Ciênc. E Tecnol. Aliment.* **22**, 199–204 (2002).
111. Gnoatto, S. C. B., Bassani, V. L., Coelho, G. C. & Schenkel, E. P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. St.-Hil., aquifoliaceae). *Quím. Nova* **30**, 304–307 (2007).
112. Gnoatto, S. C. B., Schenkel, E. P. & Bassani, V. L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. *J. Braz. Chem. Soc.* **16**, 723–725 (2005).
113. Gosmann, G., Guillaume, D., Taketa, A. T. C. & Schenkel, E. P. Triterpenoid Saponins from *Ilex paraguariensis*. *J. Nat. Prod.* **58**, 438–441 (1995).
114. Gosmann, G., Schenkel, E. P. & Seligmann, O. A New Saponin from Mate, *Ilex paraguariensis*. *J. Nat. Prod.* **52**, 1367–1370 (1989).
115. Filip, R., López, P., Giberti, G., Coussio, J. & Ferraro, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* **72**, 774–778 (2001).
116. Filip, R., Lopez, P., Coussio, J. & Ferraro, G. Mate substitutes or adulterants: study of xanthine content. *Phytother. Res.* **12**, 129–131 (1998).
117. Alikaridis, F. Natural constituents of *Ilex* species. *J. Ethnopharmacol.* **20**, 121–144 (1987).
118. Kawakami, M. & Kobayashi, S. Volatile Constituents of Green Mate and Roasted Mate. *J Agric Food Chem* **39**, 1275–1279 (1991).
119. Taiz, L. & Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. (Artmed, 2017).

120. PHILLIPS, M., LEON, P., BORONAT, A. & RODRIGUEZCONCEPCION, M. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends Plant Sci.* **13**, 619–623 (2008).
121. Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. *Biologia Vegetal*. (Guanabara Koogan, 2001).
122. Niero, R. & Malheiros, A. Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos. in *Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia* 239–257 (Editora Universidade do vale do Itajaí/Univali, 2007).
123. Degenhardt, J., Köllner, T. G. & Gershenzon, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* **70**, 1621–1637 (2009).
124. Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R. & Lewinsohn, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.* **54**, 712–732 (2008).
125. Güçlü-Üstündağ, Ö. & Mazza, G. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **47**, 231–258 (2007).
126. Pires, V. S., Guillaume, D., Gosmann, G. & Schenkel, E. P. Saponins from *Ilex dumosa*, an Erva-maté (*Ilex paraguariensis*) Adulterating Plant. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1027–1031 (1997).
127. Yu, O. & Jez, J. M. Nature's assembly line: biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. *Plant J.* **54**, 750–762 (2008).
128. Leopoldini, M., Russo, N. & Toscano, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* **125**, 288–306 (2011).
129. Halliwell, B. & Gutteridge, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. (Oxford University Press, 2007).
130. Horst, H. Análise química e biológica dos constituintes fenólicos de *Croton celtidifolius* baill. (UFSC, 2008).
131. Friedman, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 116–134 (2007).
132. NACZK, M. & SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A* **1054**, 95–111 (2004).

133. Cansian, R. L. *et al.* Semi-volatile compounds variation among Brazilian populations of *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **51**, 175–181 (2008).
134. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727–747 (2004).
135. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317–333 (2009).
136. Burns, J. *et al.* Extraction of Phenolics and Changes in Antioxidant Activity of Red Wines during Vinification. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5797–5808 (2001).
137. MELO, E. A. & GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol. Soc. Bras. Ciênc. E Tecnol. Aliment.* **36**, 1–11 (2002).
138. BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K. & SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191–203 (2006).
139. ANGELO, P. M. & JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **66**, 1–9 (2007).
140. Soares, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr* **15**, 71–81 (2002).
141. Brahem, M. *et al.* Characterization and quantification of fruit phenolic compounds of European and Tunisian pear cultivars. *Food Res. Int.* **95**, 125–133 (2017).
142. Maldini, M. *et al.* A new approach to discriminate *Rosmarinus officinalis* L. plants with antioxidant activity, based on HPTLC fingerprint and targeted phenolic analysis combined with PCA. *Ind. Crops Prod.* **94**, 665–672 (2016).
143. Naveed, M. *et al.* Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed. Pharmacother.* **97**, 67–74 (2018).
144. Wojdyło, A., Nowicka, P., Carbonell-Barrachina, Á. A. & Hernández, F. Phenolic compounds, antioxidant and antidiabetic activity of different cultivars of *Ficus carica* L. fruits. *J. Funct. Foods* **25**, 421–432 (2016).

145. Jaiswal, R., Müller, H., Müller, A., Karar, M. G. E. & Kuhnert, N. Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from *Lonicera henryi* L. (Caprifoliaceae) leaves by LC–MSn. *Phytochemistry* **108**, 252–263 (2014).
146. Maria, C. A. B. De & Moreira, R. F. A. MÉTODOS PARA ANÁLISE DE ÁCIDO CLOROGÊNICO. *Quím. Nova* **27**, 586–592 (2004).
147. Sefkow, M. First Efficient Synthesis of Chlorogenic Acid. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1137–1141 (2001).
148. Sampaio, B. L., Edrada-Ebel, R. & Da Costa, F. B. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Sci. Rep.* **6**, 29265 (2016).
149. Inostroza-Blancheteau, C. *et al.* Effects of UV-B radiation on anatomical characteristics, phenolic compounds and gene expression of the phenylpropanoid pathway in highbush blueberry leaves. *Plant Physiol. Biochem.* **85**, 85–95 (2014).
150. Payyavula, R. S. *et al.* Synthesis and regulation of chlorogenic acid in potato: Rerouting phenylpropanoid flux in HQT -silenced lines. *Plant Biotechnol. J.* **13**, 551–564 (2015).
151. Neugart, S., Krumbein, A. & Zrenner, R. Influence of Light and Temperature on Gene Expression Leading to Accumulation of Specific Flavonol Glycosides and Hydroxycinnamic Acid Derivatives in Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Front. Plant Sci.* **7**, (2016).
152. Zupan, A., Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F. & Veberic, R. Individual phenolic response and peroxidase activity in peel of differently sun-exposed apples in the period favorable for sunburn occurrence. *J. Plant Physiol.* **171**, 1706–1712 (2014).
153. Fukuoka, N., Suzuki, T., Minamide, K. & Hamada, T. Effect of Shading on Anthocyanin and Non-flavonoid Polyphenol Biosynthesis of *Gynura bicolor* Leaves in Midsummer. *HortScience* **49**, 1148–1153 (2014).
154. Peschel, W. *et al.* An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem.* **97**, 137–150 (2006).

155. Taghvaei, M. & Jafari, S. M. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 1272–1282 (2015).
156. Augustyniak, A. *et al.* Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. *Free Radic. Res.* **44**, 1216–1262 (2010).
157. Wongsap, P., Chaiwarit, J. & Zamaludien, A. In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chem.* **131**, 964–971 (2012).
158. Ohnishi, M. *et al.* Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry* **36**, 579–583 (1994).
159. Sato, Y. *et al.* In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm.* **403**, 136–138 (2011).
160. Iwahashi, H., Ishii, T., Sugata, R. & Kido, R. The effects of caffeic acid and its related catechols on hydroxyl radical formation by 3-hydroxyanthranilic acid, ferric chloride, and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **276**, 242–247 (1990).
161. Shi, H. *et al.* Chlorogenic acid against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **623**, 119–124 (2009).
162. Yun, N., Kang, J.-W. & Lee, S.-M. Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 1249–1255 (2012).
163. Ji, L. *et al.* Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 1911–1919 (2013).
164. Li, Y. *et al.* Chlorogenic acid prevents isoproterenol-induced hypertrophy in neonatal rat myocytes. *Toxicol. Lett.* **226**, 257–263 (2014).
165. Al-Rasheed, N. M. *et al.* Potential impact of silymarin in combination with chlorogenic acid and/or melatonin in combating cardiomyopathy induced by carbon tetrachloride. *Saudi J. Biol. Sci.* **21**, 265–274 (2014).
166. Bao, L. *et al.* Chlorogenic acid prevents diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress and inflammation through modulation of the Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways. *Int. Immunopharmacol.* **54**, 245–253 (2018).

167. Tajik, N., Tajik, M., Mack, I. & Enck, P. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *Eur. J. Nutr.* **56**, 2215–2244 (2017).
168. dos Santos, M. D., Almeida, M. C., Lopes, N. P. & de Souza, G. E. P. Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 2236–2240 (2006).
169. Shin, H. S. *et al.* Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chem.* **168**, 167–175 (2015).
170. Francisco, V. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- κ B pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid. *J. Ethnopharmacol.* **148**, 126–134 (2013).
171. Krakauer, T. THE POLYPHENOL CHLOROGENIC ACID INHIBITS STAPHYLOCOCCAL EXOTOXIN-INDUCED INFLAMMATORY CYTOKINES AND CHEMOKINES. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **24**, 113–119 (2002).
172. Hebeda, C. B. *et al.* Effects of chlorogenic acid on neutrophil locomotion functions in response to inflammatory stimulus. *J. Ethnopharmacol.* **135**, 261–269 (2011).
173. Qu, Z.-W., Liu, T.-T., Qiu, C.-Y., Li, J.-D. & Hu, W.-P. Inhibition of acid-sensing ion channels by chlorogenic acid in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* **567**, 35–39 (2014).
174. Shen, W. *et al.* Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons. *Brain Res. Bull.* **88**, 487–494 (2012).
175. Hara, K. *et al.* Chlorogenic acid administered intrathecally alleviates mechanical and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *Eur. J. Pharmacol.* **723**, 459–464 (2014).
176. Kwon, S.-H. *et al.* Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **649**, 210–217 (2010).

177. Chauhan, P. S. *et al.* Differential Effects of Chlorogenic Acid on Various Immunological Parameters Relevant to Rheumatoid Arthritis. *Phytother. Res.* **26**, 1156–1165 (2012).
178. Chen, W.-P. *et al.* Anti-arthritic effects of chlorogenic acid in interleukin-1 β -induced rabbit chondrocytes and a rabbit osteoarthritis model. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 23–28 (2011).
179. McDougall, B. *et al.* Dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 140–146 (1998).
180. Feng, R. *et al.* Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J. Biol. Chem.* **280**, 27888–27895 (2005).
181. Jin, U.-H. *et al.* A phenolic compound, 5-cafeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sci.* **77**, 2760–2769 (2005).
182. Lee, W. J. & Zhu, B. T. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis* **27**, 269–277 (2006).
183. Peng, B. J., Zhu, Q., Zhong, Y. L., Xu, S. H. & Wang, Z. Chlorogenic Acid Maintains Glucose Homeostasis through Modulating the Expression of SGLT-1, GLUT-2, and PLG in Different Intestinal Segments of Sprague-Dawley Rats Fed a High-Fat Diet. *Biomed. Environ. Sci. BES* **28**, 894–903 (2015).
184. Wang, Z., Clifford, M. N. & Sharp, P. Analysis of chlorogenic acids in beverages prepared from Chinese health foods and investigation, in vitro, of effects on glucose absorption in cultured Caco-2 cells. *Food Chem.* **108**, 369–373 (2008).
185. Rodriguez de Sotillo, D. V & Hadley, M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 717–726 (2002).

186. Ong, K. W., Hsu, A. & Tan, B. K. H. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 1341–1351 (2013).
187. McCarty, M. F. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. *Med. Hypotheses* **64**, 848–853 (2005).
188. LI, S.-Y., CHANG, C.-Q., MA, F.-Y. & YU, C.-L. Modulating Effects of Chlorogenic Acid on Lipids and Glucose Metabolism and Expression of Hepatic Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α in Golden Hamsters Fed on High Fat Diet. *Biomed. Environ. Sci.* **22**, 122–129 (2009).
189. Cho, A.-S. *et al.* Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 937–943 (2010).
190. Hong, B. N., Nam, Y. H., Woo, S. H. & Kang, T. H. Chlorogenic acid rescues sensorineural auditory function in a diabetic animal model. *Neurosci. Lett.* **640**, 64–69 (2017).
191. Sanchez, M. B. *et al.* Potential of the chlorogenic acid as multitarget agent: Insulin-secretagogue and PPAR α/γ dual agonist. *Biomed. Pharmacother.* **94**, 169–175 (2017).
192. Balzan, S. *et al.* Lipid-lowering effects of standardized extracts of *Ilex paraguariensis* in high-fat-diet rats. *Fitoterapia* **86**, 115–122 (2013).
193. Bravo, L. *et al.* Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. *Fitoterapia* **92**, 219–229 (2014).
194. Baeza, G., Sarriá, B., Mateos, R. & Bravo, L. Dihydrocaffeic acid, a major microbial metabolite of chlorogenic acids, shows similar protective effect than a yerba mate phenolic extract against oxidative stress in HepG2 cells. *Food Res. Int.* **87**, 25–33 (2016).
195. Filip, R. & Ferraro, G. E. Researching on new species of ‘Mate’: *Ilex brevicuspis*. *Eur. J. Nutr.* **42**, 50–54 (2003).
196. Harborne, J. B. Recent advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* **3**, 323 (1986).

197. Harborne, J. B. & Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481–504 (2000).
198. Li, Y.-L., Ma, S.-C., Yang, Y.-T., Ye, S.-M. & But, P. P.-H. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. *J. Ethnopharmacol.* **79**, 365–368 (2002).
199. Hertog, M. G. L. *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet* **342**, 1007–1011 (1993).
200. PETERSON, J. & DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity significance. *Rev. Nutr.* **56**, 317–333 (1998).
201. Claudot, A.-C., Ernst, D., Sandermann, H. & Drouet, A. Chalcone synthase activity and polyphenolic compounds of shoot tissues from adult and rejuvenated walnut trees. *Planta* **203**, 275–282 (1997).
202. KOSUGE, T. The role of phenolic in host response to infection. *Annu. Rev. Phytopatology* **7**, 195–222 (1969).
203. Herrmann, K. M. The Shikimate Pathway as an Entry to Aromatic Secondary Metabolism. *Plant Physiol.* **107**, 7–12 (1995).
204. PIETA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035–1042 (2000).
205. SHAHIDI, F. & NACZK, M. *Phenolics in food and nutraceuticals*. (CRC Press, 2004).
206. LOPES, R. M., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J. & PINTO, A. S. Flavonóides. Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. *Biotechnol. Ciênc. Desenvol.* **3**, 18–22 (2000).
207. Ohem, N. & Holzl, J. Some new investigations on *Ilex paraguariensis*: flavonoids and triterpenes. *Planta Med.* **54**, 576 (1988).
208. Clifford, M. N. & Ramirez-Martinez, J. R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of Maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. *Food Chem.* **35**, 13–21 (1990).
209. Silva, R. D. *et al.* The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. *Fitoterapia* **82**, 818–826 (2011).

210. Monteiro, J., Alves, M., Oliveira, P. & Silva, B. Structure-Bioactivity Relationships of Methylxanthines: Trying to Make Sense of All the Promises and the Drawbacks. *Molecules* **21**, 974 (2016).
211. Kolahdouzan, M. & Hamadeh, M. J. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci. Ther.* **23**, 272–290 (2017).
212. Mazur, L., Peralta-Zamora, P. G., Demczuk, B. & Hoffmann Ribani, R. Application of multivariate calibration and NIR spectroscopy for the quantification of methylxanthines in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *J. Food Compos. Anal.* **35**, 55–60 (2014).
213. Bastos, D. H. M., Ishimoto, E. Y., Ortiz M. Marques, M., Fernando Ferri, A. & Torres, E. A. F. S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 538–543 (2006).
214. Amorati, R. & Valgimigli, L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radic. Res.* **49**, 633–649 (2015).
215. Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. & Aggarwal, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1603–1616 (2010).
216. Carocho, M. & Ferreira, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **51**, 15–25 (2013).
217. Yang, J. & Liu, R. H. The phenolic profiles and antioxidant activity in different types of tea. *Int. J. Food Sci. Technol.* **48**, 163–171 (2013).
218. Filip, R., Lotito, S. B., Ferraro, G. & Fraga, C. G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutr. Res.* **20**, 1437–1446 (2000).
219. Gugliucci, A. Antioxidant Effects of *Ilex Paraguariensis*: Induction of Decreased Oxidability of Human LDLin Vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**, 338–344 (1996).
220. Menini, T., Heck, C., Schulze, J., de Mejia, E. & Gugliucci, A. Protective Action of *Ilex paraguariensis* Extract against Free Radical Inactivation of Paraoxonase-1 in High-Density Lipoprotein. *Planta Med.* **73**, 1141–1147 (2007).

221. da Silva, E. L., Neiva, T. J. C., Shirai, M., Terao, J. & Abdalla, D. S. P. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. *Food Res. Int.* **41**, 973–979 (2008).
222. Boaventura, B. C. B. *et al.* Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. *J. Funct. Foods* **5**, 1057–1064 (2013).
223. Pilla, L. *Físico-Química II*. (Editora da UFRGS, 2010).
224. Demirci, B., Demirci, F. & Başer, K. H. C. Headspace-SPME and hydrodistillation of two fragrant *Artemisia* sp. *Flavour Fragr. J.* **20**, 395–398 (2005).
225. Flamini, G., Cioni, P. L. & Morelli, I. Composition of the essential oils and in vivo emission of volatiles of four *Lamium* species from Italy: *L. purpureum*, *L. hybridum*, *L. bifidum* and *L. amplexicaule*. *Food Chem.* **91**, 63–68 (2005).
226. González, S. *et al.* Aromatic plants from Patagonia. Part I. Antimicrobial activity and chemical composition of *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera essential oil. *Flavour Fragr. J.* **19**, 36–39 (2004).
227. Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E. & Martínez, J. R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J. Chromatogr. A* **1025**, 93–103 (2004).
228. Tarantilis, P. A. & Polissiou, M. G. Isolation and Identification of the Aroma Components from Saffron (*Crocus sativus*). *J. Agric. Food Chem.* **45**, 459–462 (1997).
229. Wongpornchai, S., Sriseadka, T. & Choonvisase, S. Identification and Quantitation of the Rice Aroma Compound, 2-Acetyl-1-pyrroline, in Bread Flowers (*Vallisneria spiralis* L.). *J. Agric. Food Chem.* **51**, 457–462 (2003).
230. Giannoulis, K. D., Kamvoukou, C.-A., Gougoulis, N. & Wogiatzi, E. Irrigation and nitrogen application affect Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) dry biomass, essential oil yield and composition. *Ind. Crops Prod.* **150**, 112392 (2020).
231. Walia, S., Mukhia, S., Bhatt, V., Kumar, R. & Kumar, R. Variability in chemical composition and antimicrobial activity of *Tagetes minuta* L.

- essential oil collected from different locations of Himalaya. *Ind. Crops Prod.* **150**, 112449 (2020).
232. Tanoh, E. A. *et al.* Seasonal Effect on the Chemical Composition, Insecticidal Properties and Other Biological Activities of *Zanthoxylum leprieurii* Guill. & Perr. Essential Oils. *Foods* **9**, 550 (2020).
233. Patial, P. K. & Cannoo, D. S. Evaluation of volatile compounds, phenolic acids, antioxidant potential and DFT study of essential oils from different parts of *Araucaria columnaris* (G. Forst.) Hook. from India. *Food Chem. Toxicol.* **141**, 111376 (2020).
234. L.C. Passos, M. & M.F.S. Saraiva, M. L. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement* **135**, 896–904 (2019).
235. Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555–559 (1999).
236. SHAHIDI, F. & Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods* **18**, 757–781 (2015).
237. Monteiro, J. M. *et al.* The effects of seasonal climate changes in the caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Rev. Bras. Farmacogn.* **16**, 338–344 (2006).
238. Oliveira, A. C. de *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quím. Nova* **32**, 689–702 (2009).
239. Escarpa, A. & González, M. C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Anal. Chim. Acta* **427**, 119–127 (2001).
240. Caroch, M. & Ferreira, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **51**, 15–25 (2013).
241. Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M. & Mérillon, J.-M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of

- 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 1768–1774 (2009).
242. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **28**, 25–30 (1995).
243. Nascimento, J. *et al.* Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. *Rev. Bras. Farmácia* **92**, 327–332 (2011).
244. Jakob Christensen. Autofluorescence of Intact Food - An Exploratory Multi-way Study. (The Royal Veterinary and Agricultural University, 2005).
245. Gomes, A. J., Lunardi, C. N., Rocha, F. S. & Patience, G. S. Experimental methods in chemical engineering: Fluorescence emission spectroscopy. *Can. J. Chem. Eng.* **97**, 2168–2175 (2019).
246. Li, Y. *et al.* A novel method to handle Rayleigh scattering in three-way excitation-emission fluorescence data. *Anal. Methods* **4**, 3987 (2012).
247. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Dolan, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. (Wiley, 2009).
248. Robbins, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2866–2887 (2003).
249. Jeszka-Skowron, M., Zgoła-Grześkowiak, A. & Grześkowiak, T. Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. *Eur. Food Res. Technol.* **240**, 19–31 (2015).
250. Collins, C. H., Braga, G. L. & Bonato, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*. (2006).
251. Lanças, F. M. *Cromatografia Líquida Moderna: HPLC / CLAE*. (Editora Átomo, 2016).
252. Liu, Z. & Phillips, J. B. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography using an On-Column Thermal Modulator Interface. *J Chromatogr Sci* **29**, 227–231 (1991).
253. Adahchour, M., Beens, J., Vreuls, R. J. J. & Brinkman, U. A. Th. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC · GC)q I. Introduction and instrumental set-up. *TrAC Trends Anal. Chem.* **25**, 438–454 (2006).

254. Adam, F. *et al.* Comprehensive two-dimensional gas chromatography for enhanced analysis of naphthas: new column combination involving permethylated cyclodextrin in the second dimension. *J. Chromatogr. A* **1178**, 171–7 (2008).
255. Murray, J. A. Qualitative and quantitative approaches in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **1261**, 58–68 (2012).
256. Welthagen, W., Schnelle-Kreis, J. & Zimmermann, R. Search criteria and rules for comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry analysis of airborne particulate matter. *J. Chromatogr. A* **1019**, 233–249 (2003).
257. Von Mühlen, C., Zini, C. A., Caramão, E. B. & Marriott, P. J. Caracterização de amostras petroquímicas e derivados utilizando cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC). *Química Nova* **29**, 765–775 (2006).
258. Zini, C. A. Cromatografia Gasosa Bidimensional. *Sci. Chromatogr.* **1**, 31–49 (2009).
259. Introduction to GC - Chromedia.
<http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=xqegzCsHonOvmOIIEcCzB&subNav=tlpbfDsHonOvmOIIEcCzBsB>.
260. Mondello, L., Casilli, A., Tranchida, P. Q., Dugo, P. & Dugo, G. Detailed analysis and group-type separation of natural fats and oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **1019**, 187–196 (2003).
261. L. Mondello. Fundamental Principles of Comprehensive 2D GC. *GCxGC Handb.* 1–29 (2012).
262. Marriott, P. J., Chin, S.-T. T., Maikhunthod, B., Schmarr, H.-G. G. & Bieri, S. Multidimensional gas chromatography. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **34**, 1–20 (2012).
263. Marriott, P. & Shellie, R. Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **21**, 573–583 (2002).
264. Adahchour, M., Beens, J., Vreuls, R. J. J. & Brinkman, U. A. Th. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography

- (GCxGC) II. Modulation and detection. *TrAC Trends Anal. Chem.* **25**, 540–553 (2006).
265. Pedroso, M. P. Detecção em cromatografia gasosa rápida e cromatografia gasosa bidimensional abrangente. *Sci. Chromatogr.* **3**, 145–154 (2011).
266. Dallüge, J., Beens, J. & Brinkman, U. A. T. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. *J. Chromatogr. A* **1000**, 69–108 (2003).
267. Beens, J., Boelens, H., Tijssen, R. & Blomberg, J. Quantitative Aspects of Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography (GCxGC). *J. High Resolut. Chromatogr.* **21**, 47–54 (1998).
268. Purcaro, G. *et al.* Performance evaluation of a rapid-scanning quadrupole mass spectrometer in the comprehensive two-dimensional gas chromatography analysis of pesticides in water. *J. Sep. Sci.* **34**, 2411–2417 (2011).
269. Adahchour, M. *et al.* Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to a rapid-scanning quadrupole mass spectrometer: principles and applications. *J. Chromatogr. A* **1067**, 245–254 (2005).
270. Márcia Miguel Castro Ferreira. *Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações*. (Editora da Unicamp, 2015).
271. Rodrigues, M. I. & Iemma, A. F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos*. (Casa do Pão Editora, 2005).
272. Haaland, P. D. *Experimental Design in Biotechnology*. (CRC Press, 1989).
273. Box, G. E. P. & Wilson, K. B. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **13**, 1–38 (1951).
274. Neto, B. de B., Scarminio, I. S. & Bruns, R. E. *Como fazer experimentos*. (Bookman, 2010).
275. Teófilo, R. F., Reis, E. L., Reis, C., Silva, G. A. da & Kubota, L. T. Experimental design employed to square wave voltammetry response optimization for the glyphosate determination. *J. Braz. Chem. Soc.* **15**, 865–871 (2004).

276. Teófilo, R. F. & Ferreira, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quimica Nova* **29**, 338–350 (2006).
277. Novaes, C. G. *et al.* Optimization of analytical methods using response surface methodology part i: Process variables. *Rev. Virtual Química* **9**, 1184–1215 (2017).
278. Bro, R. & Smilde, A. K. Principal component analysis. *Anal Methods* **6**, 2812–2831 (2014).
279. Booksh, K. S. & Kowalski, B. R. Theory of Analytical Chemistry. *Anal. Chem.* **66**, 782A-791A (1994).
280. Bro, R. Multivariate calibration. *Anal. Chim. Acta* **500**, 185–194 (2003).
281. Wilson, B. E. & Kowalski, B. R. Quantitative analysis in the presence of spectral interferents using second-order nonbilinear data. *Anal. Chem.* **61**, 2277–2284 (1989).
282. Everitt, B. S. & Kroonenberg, P. M. Three-Mode Principal Component Analysis. *Biometrics* **42**, 224 (1986).
283. Tucker, L. R. Some mathematical notes on three-mode factor analysis. *Psychometrika* **31**, 279–311 (1966).
284. Sena, M. M., Trevisan, M. G. & Poppi, R. J. PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. *Quím. Nova* **28**, 910–920 (2005).
285. Graham, A. *Kronecker products & matrix calculus with applications*. (Dover Publications, Inc, 2018).
286. Bro, R. PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **38**, 149–171 (1997).
287. Rao, C. R. & Mitra, S. K. *Generalized inverse of matrices and its applications*. (Wiley, 1971).
288. Kiers, H. A. L. Hierarchical relations among three-way methods. *Psychometrika* **56**, 449–470 (1991).
289. Bro, R. & Smilde, A. K. Centering and scaling in component analysis. *J. Chemom.* **17**, 16–33 (2003).

290. Munck, L., Nørgaard, L., Engelsen, S. B., Bro, R. & Andersson, C. A. Chemometrics in food science—a demonstration of the feasibility of a highly exploratory, inductive evaluation strategy of fundamental scientific significance. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **44**, 31–60 (1998).
291. Bro, R. & Jakobsen, M. Exploring complex interactions in designed data using GEMANOVA. Color changes in fresh beef during storage. *J. Chemom.* **16**, 294–304 (2002).
292. Smilde, A. K., Bro, R. & Geladi, P. *Multi-way analysis with applications in the chemical sciences*. (J. Wiley, 2004).
293. Woloszyn, N. *et al.* Use of pressurized liquid extraction technique to obtain extracts with biological and antioxidant activity from *Mentha pulegium*, *Equisetum giganteum* and *Sida cordifolia*. *Chem. Pap.* **76**, 5775–5788 (2022).
294. Zar Kalai, F. *et al.* Phenolic compounds and biological activities of different organs from aerial part of *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch.: effects of solvents. *Int. J. Food Prop.* **25**, 1524–1538 (2022).
295. Duque-Soto, C. *et al.* Potential Antioxidant and Antiviral Activities of Hydroethanolic Extracts of Selected Lamiaceae Species. *Foods* **11**, 1862 (2022).
296. Erragued, R., Braga, M. E. M., Bouaziz, M. & Gando-Ferreira, L. M. Integration of solvent extraction and membrane processes to produce an oleuropein extract from olive leaves. *Sep. Purif. Technol.* **299**, 121751 (2022).
297. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. in 152–178 (1999). doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
298. Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555–559 (1999).
299. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **28**, 25–30 (1995).

300. Rufino, M. S. M. *et al.* *Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical ABTS+*. (2007).
301. Rasmus Bro. *The N-way Toolbox*. (2022).
302. Brazilian Health Surveillance Agency. *Brazilian Official Pharmacopoeia (FBRAS)*. (2010).
303. van Den Dool, H. & Dec. Kratz, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A* **11**, 463–471 (1963).
304. National Institute of Standards and Technology. NIST WebBook. <http://webbook.nist.gov/>.
305. Polidoro, A. dos S. *et al.* Characterization of volatile fractions in green mate and mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC×GC/TOFMS). *Microchem. J.* **128**, 118–127 (2016).
306. Tlili, N. & Sarikurkcu, C. Bioactive compounds profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of water extracts from five selected medicinal plants. *Ind. Crops Prod.* **151**, 112448 (2020).
307. Galvan d’Alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, I. & Dimitrov, K. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Sep. Purif. Technol.* **93**, 42–47 (2012).
308. Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Applied Sciences, UCSI University, Kuala Lumpur, Malaysia *et al.* Optimization of extraction parameters on the antioxidant properties of banana waste. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **15**, 65–78 (2016).
309. Wong, Y. S. *et al.* Influence of extraction conditions on antioxidant properties of passion fruit (*Passiflora edulis*) peel. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **13**, 257–265 (2014).
310. Zielinski, A. A. F. *et al.* A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *Food Res. Int.* **60**, 246–254 (2014).
311. Vieira, T. F., Makimori, G. Y. F., dos Santos Scholz, M. B., Zielinski, A. A. F. & Bona, E. Chemometric Approach Using ComDim and PLS-DA for

- Discrimination and Classification of Commercial Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Food Anal. Methods* **13**, 97–107 (2020).
312. Schmite, B. de F. P. *et al.* In vitro bioaccessibility of Al, Cu, Cd, and Pb following simulated gastro-intestinal digestion and total content of these metals in different Brazilian brands of yerba mate tea. *Food Chem.* **281**, 285–293 (2019).
313. da Silveira, T. F. F., Meinhart, A. D., de Souza, T. C. L., Teixeira Filho, J. & Godoy, H. T. Phenolic compounds from yerba mate based beverages – A multivariate optimisation. *Food Chem.* **190**, 1159–1167 (2016).
314. Lima, J. de P., Farah, A., King, B., de Paulis, T. & Martin, P. R. Distribution of Major Chlorogenic Acids and Related Compounds in Brazilian Green and Toasted *Ilex paraguariensis* (Maté) Leaves. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 2361–2370 (2016).
315. Wang, L. & Weller, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 300–312 (2006).
316. Dugo, P. *et al.* High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. *J. Chromatogr. A* **1216**, 7213–7221 (2009).
317. Santos, M. C. D., Azcarate, S. M., Lima, K. M. G. & Goicoechea, H. C. Fluorescence spectroscopy application for Argentinean yerba mate (*Ilex paraguariensis*) classification assessing first- and second-order data structure properties. *Microchem. J.* **155**, 104783 (2020).
318. Airado-Rodríguez, D., Durán-Merás, I., Galeano-Díaz, T. & Wold, J. P. Front-face fluorescence spectroscopy: A new tool for control in the wine industry. *J. Food Compos. Anal.* **24**, 257–264 (2011).
319. Ríos-Reina, R. *et al.* Characterization and authentication of Spanish PDO wine vinegars using multidimensional fluorescence and chemometrics. *Food Chem.* **230**, 108–116 (2017).
320. Mondolot, L. *et al.* Evolution in Caffeoylquinic Acid Content and Histolocalization During *Coffea canephora* Leaf Development. *Ann. Bot.* **98**, 33–40 (2006).

321. Squeo, G. *et al.* Evaluation of total phenolic content in virgin olive oil using fluorescence excitation–emission spectroscopy coupled with chemometrics. *J. Sci. Food Agric.* jsfa.9461 (2018) doi:10.1002/jsfa.9461.
322. Zaions, I., Picolo, A. P., Gonçalves, I. L., Borges, A. C. P. & Valduga, A. T. Physico-chemical characterization of *Ilex paraguariensis* St. Hil. during the maturation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **57**, 663–667 (2014).
323. Koca, N., Karadeniz, F. & Burdurlu, H. S. Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. *Food Chem.* **100**, 609–615 (2007).
324. Malheiros, Gisela Cabral. Estudo da alteração da cor e degradação da clorofila durante armazenagem de erva-mate tipo chimarrão. (UFSM, 2007).
325. Rzaşa-Duran, E. *et al.* Yerba Mate as a Source of Elements and Bioactive Compounds with Antioxidant Activity. *Antioxidants* **11**, 371 (2022).
326. Paluch, E. *et al.* Composition and Antimicrobial Activity of *Ilex* Leaves Water Extracts. *Molecules* **26**, 7442 (2021).
327. Mateos, R., Baeza, G., Sarriá, B. & Bravo, L. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. *Food Chem.* **241**, 232–241 (2018).
328. Dartora, N. *et al.* UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. *Food Chem.* **129**, 1453–1461 (2011).
329. Mazzafera, P; Yamaoka-Yano, D. M.; Vitória, A. P. Para que serve a cafeína em plantas? *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **8**, 67–74 (1996).
330. Heck, C. I., Schmalko, M. & Gonzalez de Mejia, E. Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). *J. Agric. Food Chem.* **56**, 8394–8403 (2008).
331. Phillips, J. B. & Beens, J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a hyphenated method with strong coupling between the two dimensions. *J. Chromatogr. A* **856**, 331–347 (1999).
332. NIST 11 Mass Spectral Library.

333. Adams, R. P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. (Allured, 2007).
334. Kamatou, G. P. P. & Viljoen, A. M. Linalool – a Review of a Biologically Active Compound of Commercial Importance. *Nat. Prod. Commun.* **3**, 1934578X0800300727 (2008).
335. Lira, M. H. P. de *et al.* Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. *J. Essent. Oil Res.* **32**, 187–197 (2020).
336. Li, L. *et al.* Antibacterial activity of α -terpineol may induce morphostructural alterations in *Escherichia coli*. *Braz. J. Microbiol.* **45**, 1409–1413 (2015).
337. Purcaro, G. *et al.* Characterization of the yerba mate (*Ilex paraguariensis*) volatile fraction using solid-phase microextraction-comprehensive 2-D GC-MS. *J. Sep. Sci.* **32**, 3755–3763 (2009).
338. Golozar, A. *et al.* Significant variation in the concentration of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in yerba mate samples by brand, batch, and processing method. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 13488–13493 (2012).