

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

Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate)

FRANCILENE AMARAL DA SILVA

Porto Alegre, 2007

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

Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate)

**Tese apresentada por
FRANCILENE AMARAL DA SILVA para
obtenção do título de DOUTOR
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Orientadora: Prof. Dra. Valquiria Linck Bassani

Co-orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Tese defendida e aprovada em 11 de outubro de 2007, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, perante comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dr. ÂNGELA MACHADO DE CAMPOS
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. FABIO KLAMT
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. HELGA WINGE
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. LETÍCIA SCHERER KOESTER
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

S586a Silva, Francilene Amaral da
Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate). Porto Alegre: UFRGS, 2007. –xx, 243p. :graf., tab.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Ilex paraguariensis*. 2. Erva-mate. 3. Polifenóis. 4. Antioxidante. 5. Produtos secos. I. Bassani, Valquiria Linck. II. Moreira, José Cláudio Fonseca. III. Título

CDU:615.4:582.766

Bibliotecária Responsável:

Margarida Maria C. F. Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo do Departamento de Bioquímica da UFRGS e no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFG, com financiamento do CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos do CNPq.

Não estamos mais cansados por causa do ontem.

*Somos outros, não mais quem
éramos antes.*

*As calamidades de ontem, as
dificuldades de ontem, eram válidas
para o dia de ontem.*

Não para o dia de hoje!”

Cinema Uenebê

*À minha família: Meu esposo Marcus
que sempre entendeu e apoiou meu sonho, mesmo que isso implicasse na
ausência.
Meu filho Davi,
por ser o grande estímulo para a conclusão de mais esta etapa.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por Ser presença constante em minha vida.

À professora Dr. Valquiria Linck Bassani não apenas por ter concedido, a mim, a oportunidade de desenvolver este trabalho, mas principalmente pela orientação, exemplo profissional e pessoal, pela atenção, convivência produtiva, confiança, ensinamentos que certamente procurarei transmiti-los. A ti, meu profundo respeito, admiração e amizade.

Ao Professor Dr. José Cláudio Fonseca Moreira, do Centro de Estudo em Estresse Oxidativo do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pela orientação, oportunidade e atenção com que me recebeu em seu laboratório.

Ao Professor Dr. Pedro Ros Petrovick, pelo exemplo ético e docente, bem como auxílio e disponibilidade de seu laboratório e equipamentos.

A todos os professores da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pelos ensinamentos e valores partilhados ao longo destes anos.

Às professoras Dr. Eliana Martins Lima e Danielle Guimarães Almeida Diniz do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFG, pelo auxílio na obtenção dos espectros de CLAE MS/MS.

Aos amigos de ontem, hoje e amanhã do Laboratório de Desenvolvimento Galênico, minha casa durante onze anos. Tantos são, que seria injusto citar nomes. Obrigada pelo convívio, auxílio e amizade!

Aos colegas do Laboratório 32 do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pelo convívio, auxílio e momentos de descontração proporcionados.

Aos amigos Virgínia Kappel e Gustavo Scola pelo auxílio no aprendizado das técnicas de avaliação da atividade antioxidante.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pela disponibilidade e amizade.

De forma especial aos amigos Cabral Pavei, Deise Réus, Cléverson Vigo, Edson Carvalho, Greice Borghetti, Kellen Souza, Sotero Mengue, Luiz Alberto Soares, Roseli do Nascimento, Tatiane de Souza, Tania Amador, Wellington Barros pela amizade que, certamente, atravessa o tempo e a distância.

A todos os amigos adquiridos em Porto Alegre, gaúchos e nordestinos, pela convivência e amizade criada, que tornaram este período muito mais agradável.

Carinhosamente à Karina e Sidnei (“...só vocês...”), amigos, irmãos, padrinhos e compadres, pela amizade ao longo de tantos anos.

Ao meu irmão do coração Diogo, sempre presente, pela amizade e carinho.

Aos meus pais Maria e José e a minha irmã Ivana pelo amor incondicional.

Ao meu amado Marcus, obrigada pela amizade, paciência, companheirismo, carinho...enfim, pelo amor, hoje frutificado em nosso filho Davi.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, auxiliaram para que este trabalho fosse realizado, os meus profundos sentimentos de gratidão e respeito.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1: <i>Ilex paraguariensis</i>: desenvolvimento e caracterização tecnológica de frações polifenólicas e produtos secos por <i>spray-drying</i>, em escala semi-industrial.	
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	
3.1. Aspectos botânicos.....	12
3.2. Aspectos fitoquímicos e analíticos.....	12
3.3. Aspectos tecnológicos.....	14
4. MATERIAIS EMPREGADOS	
4.1. Equipamentos e acessórios.....	17
4.2. Solventes, reagentes e soluções.....	17
4.3. Adjuvantes farmacêuticos.....	18
4.4. Substâncias referência.....	18
5. METODOLOGIA	
5.1. Preparação e caracterização da matéria-prima vegetal.....	19
5.1.1. Coleta e Identificação botânica.....	19
5.1.2. Determinação da perda por dessecação.....	19
5.1.3. Determinação do teor de extrativos.....	19
5.1.4. Análise granulométrica por tamisação.....	20
5.2. Preparação e caracterização da solução extrativa (SEI).....	20
5.2.1. Preparação da solução extrativa.....	20
5.2.2. Determinação do resíduo seco.....	21
5.2.3. Determinação do pH.....	21
5.2.4. Determinação da densidade.....	21
5.3. Validação de metodologia analítica para doseamento dos constituintes polifenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	22
5.3.1. Equipamentos.....	22
5.3.2. Condições cromatográficas.....	22
5.3.3. Validação do método analítico.....	23
5.3.4. Identificação dos picos.....	25
5.3.5. Análise quantitativa.....	25
5.4. Fracionamento e purificação das frações polifenólicas presentes no extrato seco liofilizado.....	26

5.4.1.	Preparação do extrato seco liofilizado (ESLI).....	26
5.4.2.	Caracterização do extrato seco liofilizado (ESLI).....	27
5.4.2.1	Determinação da perda por dessecação.....	27
5.4.2.2.	Rendimento do processo de liofilização.....	27
5.4.2.3.	Determinação do pH.....	27
5.4.2.4.	Análise quantitativa por CLAE.....	27
5.4.3.	Preparação do extrato para fracionamento.....	27
5.4.4.	Caracterização das frações.....	28
5.4.4.1.	Determinação do pH.....	28
5.4.4.2.	Avaliação macroscópica.....	28
5.4.4.3.	Análise qualitativa por CLAE.....	28
5.4.4.3.1.	Preparação das amostras.....	28
5.5.	Produção e caracterização dos produtos secos por <i>spray-drying</i>	28
5.5.1.	Preparo das dispersões a partir da solução extrativa.....	28
5.5.2.	Caracterização dos produtos PSI-A, PSI-B, PSI-C e PSI-D.....	29
5.5.2.1.	Determinação da perda por dessecação.....	29
5.5.2.2.	Avaliação do rendimento da operação de secagem.....	29
5.5.2.3.	Avaliação por microscopia eletrônica de varredura.....	30
5.5.2.4.	Avaliação do ângulo de repouso.....	30
5.5.2.5.	Determinação das densidades brutas e de compactação, fator de Hausner, índice de compressibilidade e de densificação.....	31
5.5.2.6.	Análise das partículas por microscopia eletrônica de varredura	31
5.6.	Validação de método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para doseamento de constituintes polifenólicos presentes nos produtos secos por <i>spray-drying</i>	32
5.6.1.	Condições cromatográficas.....	32
5.6.2.	Validação do método analítico.....	32
5.6.2.1	Curva padrão.....	32
5.6.2.2.	Curva de calibração do PSI-A.....	32
5.6.2.3.	Repetibilidade.....	32
5.6.2.4.	Precisão intermediária.....	33
5.6.2.5.	Limite de detecção.....	33
5.6.2.6.	Limite de quantificação.....	33
5.6.2.7	Exatidão.....	33
5.6.3	Identificação dos picos.....	33

5.6.4.	Análise quantitativa.....	34
5.6.4.1.	Condições cromatográficas.....	34
5.6.4.2.	Preparação das amostras.....	34
5.7.	Avaliação da estabilidade frente à luz UV (254 nm e 352 nm).....	34
5.7.1.	Características Sensoriais.....	35
5.7.2.	Avaliação da perda por dessecação.....	35
5.7.3.	Avaliação dos polifenóis por CLAE.....	35
5.7.3.1.	Condições cromatográficas.....	35
5.7.3.2.	Preparação das amostras.....	35
5.8	Produção e caracterização de produto seco por spray-drying para a realização dos ensaios <i>in vivo</i>	36
5.8.1	Caracterização do produtos PSI-A L02	36
5.8.1.1	Determinação da perda por dessecação.....	36
5.8.1.2	Avaliação do rendimento da operação de secagem.....	36
5.8.1.3	Avaliação do ângulo de repouso	36
5.8.1.4	Determinação das densidades brutas e de compactação, fator de Hausner, índice de compressibilidade e de densificação.....	36
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
6.1.	Preparação e caracterização da matéria-prima vegetal de <i>Ilex paraguariensis</i>	37
6.2.	Preparação e caracterização da solução extrativa de <i>Ilex paraguariensis</i>	39
6.3.	Validação da metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência.....	40
6.4.	Obtenção de frações polifenólicas a partir de extrato seco liofilizado de <i>Ilex paraguariensis</i> (ESLI).....	47
6.5.	Produção e caracterização dos produtos secos por <i>spray-drying</i>	54
6.5.1.	Validação de método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para doseamento de constituintes polifenólicos presentes nos produtos secos por <i>spray-drying</i>	62
6.5.2.	Avaliação preliminar da estabilidade frente à luz.....	68
6.5.3.	Produção e caracterização de produto seco por <i>spray-drying</i> para realização dos ensaios <i>in vivo</i>	75
7.	CONCLUSÕES.....	78
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

CAPÍTULO 2 : Avaliação da atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* e frações polifenólicas de *Ilex paraguariensis*.

1.	INTRODUÇÃO.....	91
2.	OBJETIVOS.....	94
3.	REVISÃO DE LITERATURA	
3.1.	Estresse Oxidativo e Defesas Antioxidantes e Espécies redoxi-ativas	95
3.2.	Atividade antioxidante de polifenóis.....	101
3.3.	Atividade antioxidante de <i>Ilex paraguariensis</i>	105
4.	MATERIAL	
4.1.	Equipamentos e acessórios.....	108
4.2.	Solventes, reagentes e soluções.....	108
4.3.	Adjuvantes.....	108
4.4.	Substâncias de referência.....	109
4.5.	Material biológico.....	109
5.	METODOLOGIA	
5.1.	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do PSI-A, PSI-B, PSI-C, PSI-D e FPI.....	110
5.1.1.	Potencial Antioxidante Total (TRAP).....	110
5.1.2.	Medida da lipoperoxidação (TBARS) <i>in vitro</i>	111
5.1.3.	Ensaio da atividade <i>scavenger</i> de radicais hidroxila (\bullet OH).....	113
5.2.	Avaliação da atividade antioxidante <i>ex vivo</i> dos PSI e FPI.....	115
5.2.1.	Material biológico.....	115
5.2.2.	Obtenção de fatias de fígado e preparação do homogeneizado.....	115
5.2.3.	Ensaio de citotoxicidade via estresse oxidativo - quantificação da lactato-desidrogenase (LDH).....	118
5.2.4.	Medida da lipoperoxidação (TBARS).....	119
5.2.5.	Dano protéico.....	120
5.3.	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i> do PSI.....	121
5.3.1.	Material biológico.....	121
5.3.2.	Preparação das amostras e tratamento dos animais.....	121
5.3.3.	Preparação do homogeneizado.....	122
5.3.4.	Medida da lipoperoxidação (TBARS).....	123
5.3.5.	Dano protéico.....	123
5.3.6.	Medida da atividade enzimática.....	123
5.4.	Análise estatística.....	125
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	126
7.	CONCLUSÕES.....	142

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
DISCUSSÃO GERAL	151
CONCLUSÕES GERAIS	157
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161
ANEXOS	
Anexo 1 – Artigo publicado: Validation of a LC method for polyphenol assay in extractive solution from <i>Ilex paraguariensis</i> (Mate).....	167
Anexo 2 - Tabelas de distribuição granulométrica dos produtos secos por <i>spray-drying</i> por microscopia óptica.....	183
Anexo 3 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS.....	191
Anexo 4 – Tabelas de Protocolos de Tratamento no ensaio de atividade antioxidante <i>in vivo</i>	195
PARECERES DA BANCA EXAMINADORA	201
BIOGRAFIA	207

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema geral das etapas de produção e avaliação tecnológica e farmacológica de produtos de <i>Ilex paraguariensis</i>	05
Figura 1.1.	Distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal <i>Ilex paraguariensis</i> , folhas e talos.....	38
Figura 1.2.	(A) Perfil cromatográfico das substâncias de referência, ácido clorogênico (ACLO) e rutina (RUT). (B) Perfil cromatográfico da solução extrativa (SEI) de <i>Ilex paraguariensis</i>	41
Figura 1.3.	Espectro de massas dos picos P1, P3, P4, P5 e P6 presentes solução extrativa (SEI) de <i>Ilex paraguariensis</i>	42
Figura 1.4.	Perfil cromatográfico de extrato seco liofilizado (ESLI) de <i>Ilex paraguariensis</i> , obtido a partir de solução extrativa preparada por decocção.....	48
Figura 1.5.	Perfis cromatográficos comparativos das frações obtidas pela separação em fase sólida, em diferentes sistemas de eluição, no fracionamento preliminar do extrato seco liofilizado de <i>Ilex paraguariensis</i> (ESLI).....	51
Figura 1.6.	Aspecto macroscópico dos produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>Ilex paraguariensis</i> , preparados com diferentes adjuvantes de secagem.....	58
Figura 1.7.	Fotomicrografia eletrônica de varredura de produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>Ilex paraguariensis</i> (PSI) (aumento 500 x), preparados com diferentes adjuvantes de secagem.....	59
Figura 1.8.	Fotomicrografia eletrônica de varredura de produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>Ilex paraguariensis</i> (PSI) (aumento 2500 x), preparados com diferentes adjuvantes de secagem.....	60
Figura 1.9.	Distribuição granulométrica dos produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>Ilex paraguariensis</i> , preparados com diferentes adjuvantes de secagem.....	61
Figura 1.10.	Perfil cromatográfico da solução extrativa aquosa (SEI) (A) e dos produtos secos por <i>spray-drying</i> (PSI) de <i>Ilex paraguariensis</i> (B) obtidos com diferentes adjuvantes de secagem.....	63
Figura 1.11.	Polifenóis em produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>Ilex paraguariensis</i> em teste de fotoestabilidade: exposição à luz, 254 nm.....	69
Figura 1.12.	Polifenóis em produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>Ilexparaguariensis</i> , em teste de fotoestabilidade: exposição à luz, 254 nm.....	70
Figura 1.13.	Polifenóis em produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>Ilexparaguariensis</i> , em teste de fotoestabilidade: exposição à luz, 352 nm.....	72

Figura 1.14.	Polifenóis em produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>Ilexparaguariensis</i> , em teste de fotoestabilidade: exposição à luz, 352 nm.....	73
Figura 1.15.	Distribuição granulométrica do produto seco por <i>spray-drying</i> de <i>Ilex paraguariensis</i> PSI-A lote 02, produzido em escala semi-industrial.....	76
Figura 2.1.	Reações de formação do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$).	96
Figura 2.2.	Vias de geração de espécies redoxi-ativas e mecanismo de defesa enzimática.	97
Figura 2.3.	Representação esquemática das reações de iniciação e propagação da LPO.....	101
Figura 2.4.	Núcleo fundamental dos flavonóides (A) e ácidos cafeoilquínicos (B).....	102
Figura 2.5.	Cinética antioxidante, <i>in vitro</i> , dos produtos secos de <i>Ilex paraguariensis</i> , medida por quimiluminescência.....	127
Figura 2.6.	Cinética antioxidante, <i>in vitro</i> , do produto seco liofilizado e frações polifenólicas, medida por quimiluminescência.....	128
Figura 2.7.	Inibição da peroxidação lipídica em homogeneizado de gema de ovo.....	130
Figura 2.8.	Porcentagem de inibição da peroxidação lipídica em homogeneizado de gema de ovo.....	131
Figura 2.9.	Substâncias geradas pela reação de Fenton na presença de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	133
Figura 2.10.	Capacidade <i>scavenger</i> de radical hidroxila pelos produtos secos.....	134
Figura 2.11.	Capacidade <i>scavenger</i> de radical hidroxila pelo produto seco liofilizado e frações polifenólicas.....	135
Figura 2.12.	Níveis de TBARS em homogeneizado de fatias de fígado.....	137
Figura 2.13.	Efeito do produto seco por <i>spray-drying</i> PSI-A na peroxidação lipídica hepática induzida por CCl_4	139
Figura 2.14.	Efeito do produto seco por <i>spray-drying</i> nos níveis de carbonilação protéica hepática induzida por CCl_4	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Descrição do gradiente de eluição em função do tempo.....	23
Tabela 1.2	Condições operacionais empregadas na liofilização da solução extrativa aquosa de <i>Ilex paraguariensis</i>	26
Tabela 1.3	Composição percentual dos produtos secos de <i>Ilex paraguariensis</i>	29
Tabela 1.4.	Características da matéria-prima vegetal de <i>Ilex paraguariensis</i> , após secagem e moagem.....	37
Tabela 1.5.	Características da solução extrativa de <i>Ilex paraguariensis</i>	39
Tabela 1.6.	Parâmetros de linearidade para as substâncias de referência ácido clorogênico (ACLO) e rutina (RUT), analisadas por CLAE.....	43
Tabela 1.7.	Parâmetros de linearidade na análise de solução extrativa de <i>Ilex paraguariensis</i> por CLAE.....	44
Tabela 1.8.	Precisão intermediária, na análise por CLAE das substâncias de referência e solução extrativa de <i>Ilex paraguariensis</i>	45
Tabela 1.9.	Repetibilidade na análise por CLAE das substâncias de referência e solução extrativa de <i>Ilex paraguariensis</i>	45
Tabela 1.10.	Resultado do ensaio de exatidão do ácido clorogênico.....	46
Tabela 1.11.	Resultado do ensaio de exatidão da rutina.....	46
Tabela 1.12.	Teor de polifenóis presentes na solução extrativa de <i>Ilex paraguariensis</i> , obtida por decocção.....	47
Tabela 1.13	Características do extrato seco liofilizado (ESLI) de <i>Ilex paraguariensis</i>	48
Tabela 1.14.	Teor de polifenóis presentes no extrato seco liofilizado (ESLI) de <i>Ilex paraguariensis</i> comparativamente aos teores encontrados na solução extrativa que lhe deu origem (SEI). ...	49
Tabela 1.15.	pH das frações fenólicas obtidas por separação em fase sólida pelo sistema de eluição SV do extrato seco liofilizado de <i>Ilex paraguariensis</i>	52
Tabela 1.16.	Rendimento percentual das frações obtidas no processo de fracionamento do extrato seco liofilizado de <i>Ilex paraguariensis</i>	53
Tabela 1.17.	Teor de polifenóis presentes nas frações obtidas a partir do extrato seco liofilizado de <i>Ilex paraguariensis</i>	54

Tabela 1.18.	Características tecnológicas de produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>Ilex paraguariensis</i> , em escala semi-industrial.....	56
Tabela 1.19.	Comparação entre rendimentos bruto e corrigido dos produtos secos por <i>spray-drying</i> contendo somente dióxido de silício coloidal.....	57
Tabela 1.20.	Comparação dos rendimentos bruto e corrigido dos produtos secos por <i>spray-drying</i> contendo a mistura dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina (1:1).....	58
Tabela 1.21.	Diâmetro médio de partícula e desvio padrão granulométrico dos produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>Ilex paraguariensis</i>	62
Tabela 1.22.	Parâmetros de linearidade da análise de produto seco por <i>spray-drying</i> de <i>Ilex paraguariensis</i> analisada por CLAE.....	64
Tabela 1.23.	Precisão intermediária do produto seco por <i>spray-drying</i> de <i>Ilex paraguariensis</i>	65
Tabela 1.24.	Exatidão do método de doseamento de ácido clorogênico em produtos secos de <i>Ilex paraguariensis</i>	66
Tabela 1.25.	Exatidão do método de doseamento de rutina em produtos secos de <i>Ilex paraguariensis</i>	66
Tabela 1.26.	Teor de polifenóis presentes nos produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>Ilex paraguariensis</i>	67
Tabela 1.27.	Percentual de degradação dos polifenóis, nos produtos secos por <i>spray-drying</i> expostos à luz em 254 nm, ao final de 48 horas.....	71
Tabela 1.28.	Polifenóis, nos produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>Ilex paraguariensis</i> em teste de fotoestabilidade: 352 nm, ao final de 48 horas.....	74
Tabela 1.29.	Parâmetros tecnológicos de produto seco por <i>spray-drying</i> de <i>Ilex paraguariensis</i> empregado nos ensaios <i>in vivo</i>	75
Tabela 1.30.	Comparação do teor de polifenóis presentes nos produtos secos por <i>spray-drying</i> de <i>Ilex paraguariensis</i>	77
Tabela 2.1.	Principais espécies redoxi-ativas.....	96
Tabela 2.2.	Grupos de tratamentos testados.....	110
Tabela 2.3.	Grupos de tratamentos testados no ensaio de lipoperoxidação.....	112
Tabela 2.4.	Grupos de tratamentos testados no ensaio da atividade <i>scavenger</i> de radicais hidroxila.....	114
Tabela 2.5.	Grupos de tratamentos testados no ensaio <i>ex vivo</i>	116

Tabela 2.6.	Teor de polifenóis totais (TPT) e capacidade antioxidante equivalente ao trolox (mM)(CAET) dos extratos secos e frações polifenólicas obtidos pelo TRAP.....	129
Tabela 2.7.	Concentração inibitória da peroxidação lipídica para os produtos secos e frações polifenólicas de <i>Ilex paraguariensis</i>	132
Tabela 2.8.	Efeito do pré-tratamento com PSI-A na atividade das enzimas antioxidantes hepáticas em ratos tratados com CCl ₄	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SEI	solução extrativa aquosa de <i>I. paraguariensis</i> obtida por decocção
ESLI	produto seco por liofilização preparado a partir do decocto
PSI-A	produto seco por <i>spray-drying</i> contendo 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil [®]
PSI-B	produto seco por <i>spray-drying</i> contendo 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil [®] + 15 % Glucidex [®]
PSI-C	produto seco por <i>spray-drying</i> contendo 70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex [®]
PSI-D	produto seco por <i>spray-drying</i> contendo 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil [®] + 15 % Avicel [®]
FAB	fração polifenólica
FF	fração polifenólica
PSI-A L02	produto seco por <i>spray-drying</i> lote 02 contendo 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil [®]
ABAP	2,2'-azobis(2-amidinopropano)
TRAP	potencial antioxidante total
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
t-BHP	<i>ter</i> -butilhidroperóxido
LDH	lactato desidrogenase
CAT	catalase
SOD	superóxido desmutase

RESUMO

Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate)

Ilex paraguariensis A. St. Hil. é uma espécie popularmente conhecida como erva-mate. O presente trabalho refere-se ao desenvolvimento e caracterização tecnológica de produtos secos por *spray-drying*, a partir de solução extrativa aquosa de *I. paraguariensis*, bem como de frações polifenólicas. Adicionalmente foi desenvolvido e validado um método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de polifenóis presentes tanto na matéria-prima vegetal como nos produtos secos. O método mostrou-se adequado para a quantificação de polifenóis em todas as preparações de *I. paraguariensis*. Quatro produtos secos por *spray-drying* foram preparados a partir do decocto. Entre os quatro produtos, o produto contendo 30 % de Aerosil® (PSI-A) apresentou as melhores características tecnológicas e de estabilidade frente à fotodegradação. Na avaliação da atividade antioxidante, no modelo experimental *in vitro*, tanto os produtos secos como as frações polifenólicas demonstraram atividade antioxidante, de maneira dose-dependente, caracterizada pela redução da quimiluminescência no ensaio de TRAP, baixos níveis de TBARS e aumento da atividade *scavenger* de radicais hidroxila. Fatias de fígado de ratos foram utilizadas como modelo *ex vivo*. Entre os produtos por *spray-drying* testados PSI-A e PSI-D e a fração FAB foram eficazes na redução da produção de TBARS quando comparados ao controle pré-incubado com *ter*-butilhidroperóxido (*t*-BHT), corroborando os ensaios *in vitro*. Para o ensaio *in vivo* empregou-se o modelo de dano hepático induzido por tetracloreto de carbono (CCl₄), sendo o produto seco PSI-A selecionado para avaliação com base nos resultados obtidos na caracterização tecnológica. A administração de PSI-A, por via oral, durante 30 dias, na dose de 386 mg/kg, resultou em dano hepático menor, evidenciado por níveis menores de lipoperoxidação e maior atividade das enzimas superóxido desmutase e catalase, quando comparados ao controle.

O conjunto de resultados sugere que o desenvolvimento tecnológico dos produtos secos, bem como de frações purificadas apresentou atividade antioxidante significativa medida em ensaios *in vitro* e *ex-vivo*. Adicionalmente, os resultados também evidenciam efeito hepatoprotetor frente ao estresse oxidativo e dano hepático provocado pelo tetracloreto de carbono, medidos em ensaios *in vivo*. Estudos adicionais visando a investigar o papel destes produtos em patologias em que o estresse oxidativo parece estar envolvido são necessários.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, produtos secos por *spray-drying*, polifenóis, atividade antioxidante, erva-mate.

ABSTRACT

Technological evaluation and antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.- Aquifoliaceae (Maté) spray-dried extracts

Ilex paraguariensis A. St. Hil. is a plant specie traditionally known as maté. The present work was designed in view to develop, in semi-industrial scale, spray-dried extracts of *Ilex paraguariensis* from aqueous extracts as well as polyphenol fractions. Four spray-dried extracts were prepared from the aqueous extract using different excipients. In order to quantify the polyphenols present in raw plant material, spray-dried extracts and polyphenol fractions, a liquid chromatography (LC) method was validated. The spray-dried extract containing 30% of Aerosil® (SPD-A) presented the best technological characteristics and photostability. *In vitro* antioxidant activity evaluation of both spray-dried extracts and polyphenolic fractions showed a dose-dependent antioxidant activity. Quimiluminescence reduction in TRAP assay, low TBARS content and hydroxyl free radicals scavenger activity were observed. Rats liver slices were used for antioxidant test in *ex vivo* model. SPD-A and SPD-D (containing 15% of Aerosil® and 15% of Avicel®) spray-dried extracts and polyphenol fraction FAB were able to reduce TBARS production when compared to the control group preincubated with *ter*-butylhydroperoxide (*t*-BHT). Based on the technological characteristics and photostability, PSI-A spray-dried extract was selected for *in vivo* antioxidant activity evaluation using carbon tetrachloride (CCl₄) induced hepatic damage as a model. Oral administration of 386 mg/kg of SPD-A during 30 days resulted in decreased liver damage as a consequence of lower lipoperoxidation levels and higher activity of superoxide dismutase and catalase enzymes when compared to a control group. In synthesis, the results suggest that both spray-dried extracts and purified fractions presented significant *in vitro* and *ex vivo* antioxidant activity. Additionally, *in vivo* antioxidant activity evaluation demonstrated a hepatic protection effect against oxidative stress and carbon tetrachloride-

induced damage. Further experiments aiming to investigate both spray-dried extracts and polyphenol fractions function in diseases involving oxidative stress represent a very interesting perspective.

Key-words: *Ilex paraguariensis*, spray-dried extracts, polyphenols, antioxidant activity, erva-mate.

INTRODUÇÃO GERAL

Ilex paraguariensis é conhecida popularmente como erva-mate. O mesmo nome é dado ao produto industrializado preparado a partir das folhas e pequenos ramos, por estabilização, secagem rápida e moagem.

No Brasil o setor ervateiro compreende cerca de 450 municípios dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul, englobando 750 indústrias, gerando um total de aproximadamente 700.000 empregos diretos e indiretos, para uma produção anual aproximada de 650.000 toneladas (MOSELE, 2002; VALDUGA, 2002). Dentre a tríade dos países produtores, o Brasil figura como maior produtor e a Argentina como maior exportador. O Paraguai produz basicamente para o consumo interno (RUCKER, 1996).

O conjunto de países que fazem parte do Mercado Comum do Sul (Mercosul) é o principal mercado importador, sendo o Uruguai o maior importador (ANDRADE, 2004).

A partir de 1988, as exportações para outros países aumentaram significativamente. Hoje atingem os mercados da Síria, Alemanha, Japão e Estados Unidos, que passaram a demonstrar interesse pelo produto, principalmente como alimento e nutracêutico.

No entanto, ainda hoje, o maior consumo de erva-mate (92 %) ocorre na forma de produtos tradicionais, como o chimarrão, que apresenta mercado limitado às regiões onde é produzida. Quanto ao mercado externo, nos últimos anos, também apresentou uma demanda estável de cerca de 25 mil toneladas anuais. Como se trata de uma planta de composição química diversificada, esta espécie tem motivado pesquisadores a investir na melhoria da qualidade do produto, visando agregar valor a esta importante matéria-prima regional (VALDUGA, 2002). Paralelamente, iniciou-se a demanda da matéria-prima para indústrias químicas e farmacêuticas, com interesse na produção de produtos de higiene e limpeza (MOSELE, 2002).

A presença de elevados teores de metilxantinas (principalmente cafeína), saponinas e flavonóides fazem desta espécie uma matéria-prima promissora para a

elaboração de diversos produtos tais como fitoterápicos, cosméticos e alimentos funcionais. Para isso, torna-se necessário o estabelecimento de critérios de qualidade para a matéria-prima ou o desenvolvimento de produto padronizado, com características físicas, químicas, físico-químicas e tecnológicas definidas, que possa servir de base para a obtenção de produtos derivados.

No que se refere à atividade biológica, extratos de *Ilex paraguariensis* têm demonstrado atividade antioxidante *in vitro*, com correlação entre esta atividade e a presença de constituintes polifenólicos, sugerindo que os derivados cafeoilquínicos e os flavonóides (como rutina, quercetina e canferol) sejam os responsáveis pelas propriedades antioxidantes e/ou seqüestradoras de radicais livres evidenciadas (SCHINELLA *et al.*, 2000, FILIP *et al.*, 2000, CHANDRA e MEJIA, 2004; RAMIREZ-MARES *et al.*, 2004). A importância desta atividade está relacionada com o potencial da erva-mate, ou de produtos derivados, de proteção frente à lipoperoxidação, radicais livres e glicação envolvidos em várias doenças tais como diabetes e aterosclerose (GUGLIUCCI e STAHL, 1995; FILIP *et al.*, 2000; GUGLIUCCI e MENINI, 2002).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo geral a preparação, em escala semi-industrial, de extratos secos por *spray-drying* e frações polifenólicas de *Ilex paraguariensis* e a avaliação da atividade antioxidante dos produtos obtidos. Para sua apresentação foi dividido em dois capítulos, de acordo com os assuntos abordados:

Capítulo 1: *Ilex paraguariensis*: desenvolvimento e caracterização tecnológica de frações polifenólicas e produtos secos por *spray-drying*, em escala semi-industrial;

Capítulo 2: Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de produtos secos por *spray-drying* e frações polifenólicas de *Ilex paraguariensis*.

A Figura 1 apresenta um esquema geral das etapas experimentais empregadas na preparação e avaliação biológica dos produtos secos por *spray-drying* e frações polifenólicas *Ilex paraguariensis* investigados no presente trabalho.

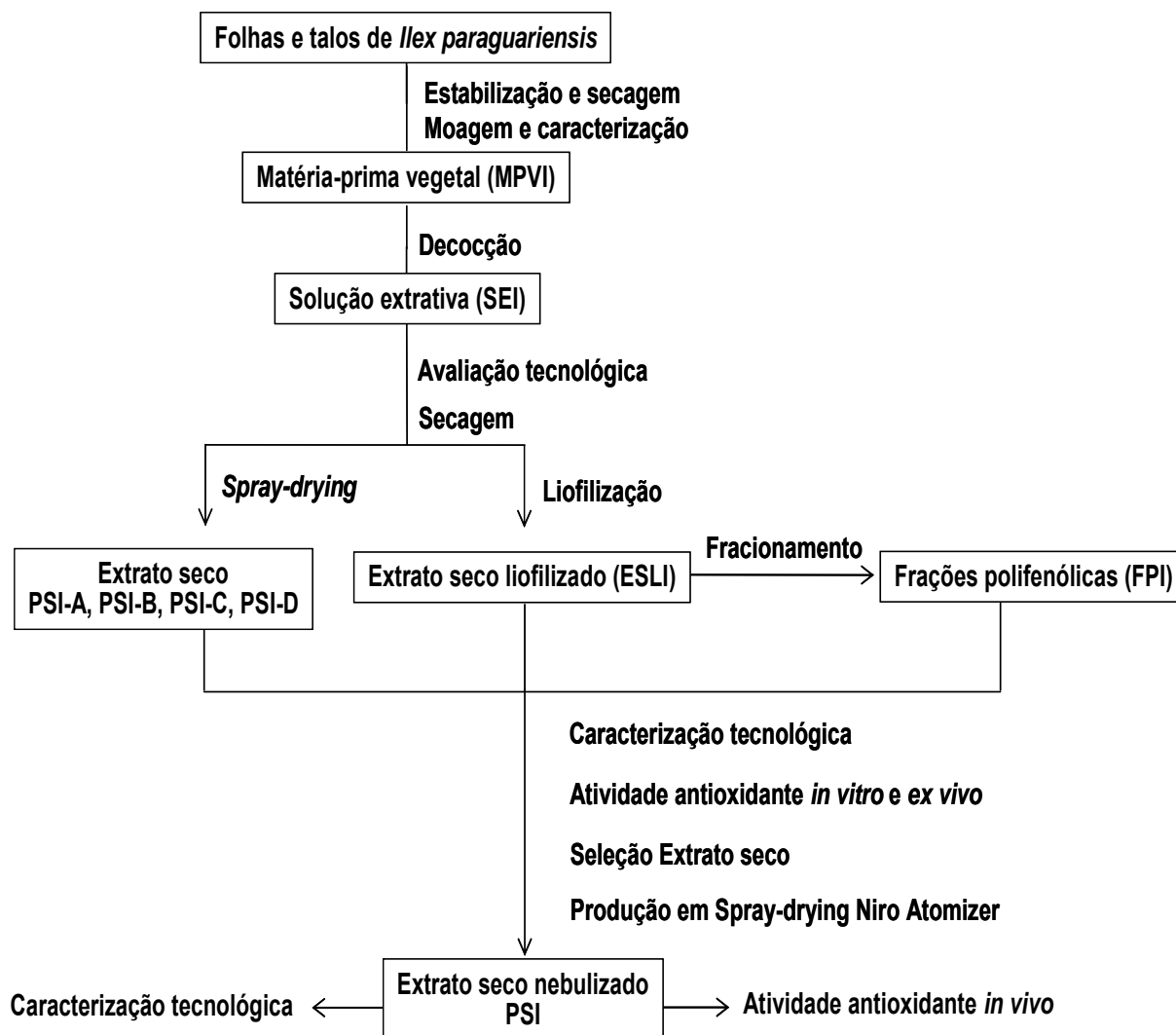


Figura 1. Esquema geral das etapas de produção e avaliação tecnológica e farmacológica de produtos de *Ilex paraguariensis*.

CAPÍTULO 1

***Ilex paraguariensis*: desenvolvimento e caracterização tecnológica de frações polifenólicas e produtos secos por *spray-drying*, em escala semi-industrial.**

1. INTRODUÇÃO

Ilex paraguariensis A. St Hil. é uma espécie do gênero *Ilex*, nativa principalmente de regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, onde é popularmente conhecida como erva-mate. O gênero *Ilex* possui cerca de 705 espécies (GILBERT, 1995), sendo *Ilex paraguariensis* a espécie que apresenta a maior importância do ponto de vista econômico e cultural, devido ao hábito cultural do preparo de bebidas, denominadas chimarrão e tererê.

A literatura relata para *Ilex paraguariensis* a presença de diversos metabólitos como metilxantinas (FILIP *et al.*, 1998), saponinas (GOSMANN *et al.*, 1989; 1995; KRAEMER, *et al.*, 1996) e polifenóis (RICCO *et al.*, 1991; FILIP *et al.*, 2001). Os estudos *in vitro* realizados, até o presente momento, apontam para o importante papel dos polifenóis nas atividades antioxidante e *scavenger* de radicais livres demonstradas para esta espécie (FILIP *et al.*, 2000; RAMIREZ-MARES, 2004). Neste sentido a obtenção de uma fração enriquecida em polifenóis ou de produto seco padronizado em polifenóis, parece ser uma estratégia relevante.

Por outro lado, o grande número de vantagens apresentadas por extratos secos (produtos secos), comparativamente a extratos líquidos, tais como fácil manipulação, maior estabilidade química e microbiológica, homogeneidade de distribuição de constituintes e possibilidade de padronização (LIST e SCHIMIDT, 1989), evidenciam o potencial de utilização de produtos secos derivados de *Ilex paraguariensis* na indústria Agroalimentar, Farmacêutica ou Cosmética. Atualmente, a erva-mate para chimarrão e tererê e o chá mate ou mate solúvel são os alguns produtos comerciais derivados de *Ilex paraguariensis*, atendendo apenas consumidores das regiões Sul e Centro-Oeste.

A carência de produtos padronizados e de métodos que levem à certificação de qualidade dos produtos à base de *Ilex paraguariensis* tem sido um obstáculo para a ampliação do mercado.

Os estudos tecnológicos realizados, até o presente momento, no sentido do desenvolvimento e caracterização de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex*

paraguariensis demonstram sua viabilidade de obtenção (CAMPOS, 1996; GNOATTO, 2002), em escala laboratorial.

A quantificação dos marcadores químicos potencialmente ativos tem como finalidade avaliar a influência da operação de secagem e do uso de adjuvantes sobre os constituintes presentes na solução extrativa inicial. No que se refere à quantificação de polifenóis em *Ilex paraguariensis* a literatura menciona diversos trabalhos (RICCO *et al.*, 1991; CARINI *et al.*, 1998, FILIP *et al.*, 2001, BRAVO *et al.*, 2007) mas ainda é escassa, principalmente no que se refere à validação de método analítico para avaliação e controle de qualidade tanto na matéria-prima vegetal quanto em preparações derivadas.

Sendo assim, o Capítulo 1 do presente trabalho tem por objetivo geral o desenvolvimento e caracterização tecnológica de produtos secos por *spray-drying* em escala semi-industrial e de frações polifenólicas, todos estes obtidos a partir de solução extrativa aquosa de *Ilex paraguariensis*.

2. OBJETIVOS

1. Validar o método de doseamento de polifenóis por CLAE, através da análise da linearidade de resposta, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), e exatidão do método (teste de recuperação), aplicado à análise de solução extrativa, obtida a partir das folhas e talos de *Ilex paraguariensis*;

2. Desenvolver um método de separação de frações polifenólicas mediante emprego de resina adsorvente;

3. Preparar e caracterizar produtos secos por *spray-drying*, a partir da solução extrativa de *Ilex paraguariensis*, em escala semi-industrial;

4. Validar o método para a análise quantitativa de compostos polifenólicos presentes nos produtos secos por *spray-drying*, preparados a partir da solução extrativa de *Ilex paraguariensis*;

5. Avaliar a estabilidade dos produtos secos frente à luz ultravioleta.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Aspectos botânicos

A família Aquifoliaceae compreende os gêneros *Ilex*, *Phelline* e *Nemopanthus* (EDWIN e REITZ, 1967), sendo o primeiro o de maior importância econômica. Este gênero apresenta cerca de 705 espécies relatadas e distribuídas em todo o mundo, principalmente na América do Sul e na Ásia. No Brasil, estima-se a ocorrência de 68 espécies sendo que, para o Rio Grande do Sul são descritas oito espécies nativas (GILBERT, 1995).

A erva-mate é conhecida, também, como mate, chá-mate, chá-do-Paraguai, chá-argentino, chá-do-Brasil, congonha, congonha-das-missões, congoneira, erva, mate-legítimo e mate-verdadeiro (CORREA, 1969).

Apresenta-se como árvore perene dióica, alcançando cerca de 15 metros de altura e 40 centímetros de diâmetro de tronco. Apresenta folhas alternadas, simples, inteiras, do tipo coriáceo ou subcoriáceo, com bordos dentados e pouco profundos (SCHULTZ, 1985). O período de floração ocorre de setembro a dezembro. Suas flores são brancas, pequenas, em inflorescência em pequenos fascículos com até cinco flores, dispostas na axila das folhas superiores.

A frutificação ocorre no período de dezembro a março. O fruto é uma baga-drupa globular, em geral com quatro sementes, medindo de 6 a 8 milímetros, de cor verde, quando novo, passando a vermelho arroxeado e violáceo quando maduro (REITZ *et al.*, 1983).

3.2. Aspectos fitoquímicos e analíticos

Dentre os principais compostos estudados e isolados destacaram-se, inicialmente, as xantinas, devido à facilidade de isolamento por técnicas de cristalização e possibilidade de quantificação gravimétrica (TAKETA, 1997).

Dentre as metilxantinas, a presença de cafeína foi identificada em 1943, por STENHOUSE e LLOYD BULLOCK. A partir daí, muitas análises têm sido

realizadas tanto em produtos comerciais como nas folhas de *Ilex paraguariensis*, verificando a sua presença sob aspectos qualitativos e quantitativos. Segundo MAZZAFERA (1994) e FILIP e colaboradores (1998) os teores de cafeína em folhas de *Ilex paraguariensis* variam de 0,16 em folhas velhas a 1,4 % em folhas jovens. Também tem sido relatada a presença de teobromina em teores de 0,03 a 0,6 % (SIESTO, 1959; GARCIA PAULA, 1962; BALTASSAT *et al.*, 1984). A ocorrência de teofilina é controversa; baixos teores foram relatados por MAZZAFERA (1994), porém, outros pesquisadores não detectaram a presença desta metilxantina (FILIP *et al.*, 1998; REGINATTO *et al.*, 1999; COELHO, 2002). Mais recentemente, GNOATTO e colaboradores (2007) reportaram estudo comparativo entre diversos métodos empregados, verificando que as diferenças anteriormente relatadas entre os teores de cafeína e teobromina podem, também, estar relacionadas com os métodos de extração empregados.

Com relação à pesquisa de saponinas no gênero *Ilex*, diversos trabalhos foram desenvolvidos no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS objetivando caracterizar quimicamente espécies de *Ilex* de ocorrência regional com vistas ao desenvolvimento de métodos de identificação que permitam diferenciar as espécies. Até o momento foram isoladas e identificadas das folhas de *Ilex paraguariensis* saponinas triterpênicas pentacíclicas denominadas matessaponinas 1, 2, 3, 4 e 5 (GOSMANN *et al.*, 1989; KRAEMER *et al.*, 1996) e J1a/b, J2a/b e J3a/b (MONTANHA, 1990; SCHENKEL *et al.*, 1996). Destas, somente as quatro últimas saponinas são monodesmosídicas e ácidas; as demais são bidesmosídicas e neutras. As agliconas destas saponinas são o ácido ursólico ou o ácido oleanólico e os açúcares são a glicose, arabinose e/ou ramnose.

SANTAMOUR JR. (1973) identificou nos frutos as antocianinas cianidina-3-O-xilosilglicosídeo e cinanidina 3-O-glicosídeo. As mesmas antocianinas foram isoladas de folhas adultas de árvores jovens de erva-mate (RICCO *et al.*, 1991).

No que se refere aos polifenóis, GARCIA PAULA e BROOKS (1953) isolaram duas substâncias fenólicas das folhas de *Ilex paraguariensis* por

cromatografia em papel: o ácido clorogênico (ácido 3-cafeoilquínico) e o resinotanol, um produto resultante da oxidação parcial e condensação do ácido clorogênico. Em 1956, ROBERTS separou três substâncias por cromatografia em papel do extrato de *Ilex paraguariensis*: os ácidos clorogênico, neoclorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) e isoclorogênico. Quanto aos flavonóides, foram detectados nas folhas quercetina-3-O-rutinosídeo (rutina) (RICCO *et al.*, 1991), quercetina-3-O-rutinosídeo glicosídeo (isoquercetrina), canferol-3-O-glicosídeo, canferol-3-O-rutinosídeo (OHEM e HOLZL, 1988) e quercetina livre (RICCO *et al.*, 1991).

CARINI e colaboradores (1998) identificaram dez constituintes polifenólicos em *Ilex paraguariensis* por CLAE/MS entre eles os ácidos cafeoilquínico, clorogênico, cripto-clorogênico, rutina e um derivado da luteolina. Os mesmos compostos foram identificados pelo método analítico de quantificação de polifenóis por CLAE MS/MS desenvolvido, recentemente, por BRAVO e colaboradores (2007).

Em estudo realizado FILIP e colaboradores (2001), em oito espécies do gênero *Ilex*, foram identificados e quantificados os teores dos flavonóides canferol, quercetina e rutina, bem como dos derivados cafeoilquínicos (ácidos caféico, clorogênico, 3-4-dicafeoilquinico, 3-5-dicafeoilquinico e 4-5-dicafeoilquinico). Os autores relataram teores de derivados cafeoilquínicos e flavonóides significativamente superiores em *Ilex paraguariensis*.

3.3. Aspectos tecnológicos

A transformação de soluções extrativas em produtos secos vem sendo amplamente realizada no desenvolvimento tecnológico de produtos derivados de plantas. Os objetivos desta operação têm sido especialmente a obtenção de produtos com maior concentração de constituintes químicos e com melhores características tecnológicas. Os produtos secos têm apresentado vantagens relacionadas com a homogeneidade de distribuição dos constituintes da preparação, estabilidade, facilidade de pesagem e manuseio, bem como sua utilização como produto intermediário na obtenção de produtos farmacêuticos derivados, alimentos

funcionais ou cosméticos. Entre as técnicas de secagem empregadas encontra-se a secagem por *spray-drying* (LIST e SCHMIDT, 1989; GAUDY, 1991).

Esta técnica baseia-se na secagem de soluções e suspensões por divisão destes em finas gotículas, no interior de uma torre de secagem provida de ar quente circulante (MASTERS, 1976; BASSANI, 1990; SENNA, 1993). A grande utilização da secagem por *spray-drying* deve-se às vantagens de baixos riscos de degradação química durante a operação, devido ao curto tempo de contato do líquido disperso com a fonte de calor; a versatilidade na obtenção de pós, grânulos ou aglomerados e o elevado rendimento por tempo de produção. Consiste numa técnica de baixo custo, quando comparada a outras técnicas que empregam calor (MASTERS, 1976; LIST e SCHMIDT, 1989).

A necessidade de utilizar adjuvantes de secagem foi colocada em evidência por diversos autores, tanto como fator crítico no rendimento do processo, como na padronização da qualidade e manutenção da estabilidade de produtos secos por *spray-drying*. Entre os adjuvantes já testados estão o dióxido de silício coloidal, a celulose microcristalina, a goma arábica, o fosfato tricálcico e maltodextrina (JACOB *et al.*, 1976; SOERTANO, 1980; CASADEBAIG, 1987; BASSANI, 1990; GAUDY *et al.*, 1991, PUECH, 1991). Estudos realizados sobre o emprego de adjuvantes de secagem têm demonstrado uma melhora nas propriedades físico-químicas, bem como proporciona um aumento no rendimento da operação, além de contribuir, positivamente, para a reconstituição em água do produto e para a estabilidade frente à umidade (GAUDY, 1987; PUECH, 1991; MOURA *et al.*, 1996).

O desenvolvimento de produtos secos por *spray-drying* vem sendo estudado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, destacando-se entre as espécies vegetais estudadas *Achyrocline satureoides* (BASSANI, 1990; SENNA, 1993, TEIXEIRA, 1996, DE PAULA, 1997; DE SOUZA, 2002; DA SILVA, 2003); *Passiflora edulis* (DE SOUZA, 1997); *Maytenus ilicifolia* (CARVALHO, 1997; MARTINS, 1998; DE SOUZA, 1999); *Phyllanthus niruri* (SOARES, 1997; COUTO, 2000), *Cecropia glaziosi* (HEBERLÉ, 2000) e *Ilex paraguariensis* (CAMPOS, 1996; GNOATTO, 2002).

CAMPOS (1996) avaliou a influência dos processos de secagem por sapeco e ao ar livre de *Ilex paraguariensis* sobre as características de produtos secos por *spray-drying* em escala laboratorial. A autora observou que os produtos preparados a partir da erva-mate sapecada (ESA-A) e seca ao ar (ESE-A) apresentaram características físicas e organolépticas semelhantes, diferenciando-se, no entanto, quanto ao teor dos marcadores químicos do vegetal. A erva-mate sapecada apresentou um conteúdo menor de cafeína e teobromina nas folhas secas, soluções extrativas e produto seco final em relação ao material seco ao ar livre. No entanto, os teores de extrativos, flavonóides e polifenóis da erva-mate sapecada foram superiores aos encontrados na erva-mate seca ao ar. Ainda, o mesmo trabalho, avaliou a viabilidade tecnológica de formulações obtidas com e sem adjuvante de secagem (dióxido de silício coloidal), observando que a formulação sem adjuvante originou um produto com características tecnológicas pouco satisfatórias e elevada higroscopia. A adição de dióxido de silício coloidal mostrou-se necessária para a obtenção de produtos secos com teor de umidade residual e estabilidade física frente à atmosfera úmida satisfatórios.

GNOATTO (2002) preparou dois produtos secos por nebulização em escala laboratorial a partir de extrato aquoso: um empregando apenas Aerosil[®]200 (ESN1) e outro utilizando Aerosil[®]200 e Avicel[®]pH101 (ESN2) como adjuvantes. Ambos os extratos foram caracterizados tecnologicamente e quantificados quanto aos rendimentos de metilxantinas e saponinas. A caracterização tecnológica demonstrou que o ESN1 apresentou rendimento bruto superior e teor de umidade inferior ao ESN2, este último, no entanto, apresentou melhores características de fluxo. Não houve diferença significativa nos teores de metilxantinas e saponinas entre os dois extratos.

4. MATERIAIS EMPREGADOS

4.1. Equipamentos e acessórios

Balança analítica PM 200 (Mettler); agitador magnético Fisatom 725 A; balança analítica Sartorius 2402; banho de água Biomatic modelo 869; bomba e sistema de vácuo LiChrolut (Merck); - câmara de fotoestabilidade espelhada (1 x 0,17 x 0,17 m) com lâmpada em 254nm PRS416PH Helfont 127V/40W/60HZ; câmara de fotoestabilidade espelhada (1 x 0,17 x 0,17 m) com lâmpada em 352nm RE130 RCG 127V/33W/60HZ; coluna de aço inoxidável Shimadzu (CLC-ODS (M)) RP-18, 5 μm (250 mm x 4mm d.i.); Cromatógrafo Líquido Shimadzu (LC-10 AD) equipado com controlador de gradiente (FCV-10 AL), injetor automático (SIL-10 A) e detector de UV/VIS (SPD-10 A) controlado por software (CLASS LC-10); espectrofotômetro Hewlett Packard HP; estufa de ar circulante Heraeus RVT 360; evaporador rotatório Büchi R 114; liofilizador Edwards Modulyo 4K; manta aquecedora termostatzada Fisatom 402; membrana para filtração de fluoreto de polivinilideno Millipore–GVHP-0,45 μm ; membrana para filtração de fluoreto de polivinilideno Millipore–HVHP-0,5 μm ; microscópio eletrônico de varredura Jeol modelo JSM 5800; microscópio óptico Jena; moinho de facas Retsch SKI, com abertura de malha de saída de 1 mm; potenciômetro pH-metro B374 Micronal; pré-coluna com fase estacionária Lichrosorb RP-18 ,10 μm ; prensa hidráulica manual Hafico, capacidade 5 L; purificador de água Milli-Q Plus Millipore; tanques e filtro-prensa; torre de secagem por aspersão NIRO – Production Minor.

4.2. Solventes, reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados, a não ser os que constam com especificação contrária, apresentaram grau de pureza pró-análise (p.a).

Acetato de etila; ácido acético glacial; água destilada; água ultrapura; álcool etílico; metanol (HPLC).

4.3. Adjuvantes farmacêuticos

Celulose microcristalina - Avicel[®]

Dióxido de silício coloidal - Aerosil[®] 200

Maltodextrina - Glucidex[®].

4.4. Substâncias de referência

Ácido caféico (Merck); Ácido clorogênico (Sigma); Rutina (Sigma).

5. METODOLOGIA

5.1. Preparação e caracterização da matéria-prima vegetal

5.1.1. Coleta e Identificação botânica.

A matéria-prima vegetal, composta de folhas e talos de *Ilex paraguariensis* estabilizadas por sapeco, foi coletada na empresa ervateira Fino Mate, em Mato Leitão – RS durante o período de safra (julho de 2004). O material vegetal foi identificado botanicamente pela Profa. Dr. Lílian Auler Mentz sendo, posteriormente, depositado um espécime no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UFRGS (ICN 133726).

O material vegetal coletado foi separado manualmente e, após a seleção, determinada a perda por dessecação de uma amostra. O material foi, então, submetido à secagem em estufa com ar circulante em temperatura de 45 ± 2 °C até um teor de perda por dessecação entre 10 a 12 %. Após a secagem, o material foi cominuído em moinho de facas e acondicionado, ao abrigo da luz, em recipiente fechado.

5.1.2. Determinação da perda por dessecação (FARMACOPÉIA, 1988)

Amostras de 300,0 mg de droga vegetal moída foram exatamente pesadas, em pesa-filtros tarados, e colocadas em estufa, por 2 horas, em temperatura de 105 ± 2 °C. Após resfriamento em dessecador os pesa-filtros foram pesados e recolocados em estufa por mais 30 minutos. Este procedimento foi repetido até as amostras alcançarem peso constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, pela média de três determinações.

5.1.3. Determinação do teor de extrativos (DEUTSCHES, 1986)

Uma amostra de cerca de 1,0 g, exatamente pesado, da matéria-prima vegetal, foi submetido à extração com 100,0 ml de água, por decocção, durante 10

min. Após resfriamento, o volume foi reconstituído e a mistura filtrada, desprezando-se os primeiros 20,0 ml do filtrado. Cerca de 20,0 g, exatamente pesados, do filtrado foram colocados em pesa-filtro, previamente tarado, e evaporado à secura em banho de água, com agitação ocasional. Após evaporação, o pesa-filtro contendo a amostra foi levado a estufa por duas horas a 105 °C, resfriado em dessecador e pesado. A amostra foi recolocada em estufa por 30 minutos, repetindo-se o processo até peso constante. O resultado foi expresso pela média de três determinações, segundo a equação 1.

$$TE = \frac{g \times 500}{m} \quad (1)$$

Onde: TE = teor de extrativos (% , m/m); g = massa (g) do resíduo seco; m = massa (g) da amostra inicial, considerando o teor de umidade.

5.1.4 Análise granulométrica por tamisação (VOIGT, 2005)

Cerca de 100 g, exatamente pesados, da matéria-prima vegetal cominuída foram submetidos à passagem através de tamises, previamente tarados, com abertura de malha de 0,800; 0,600; 0,355; 0,250; 0,105 e 0,062 mm. A tamisação foi realizada a 60 vibrações por segundo durante 15 minutos. As frações retidas nos tamises e coletor foram pesadas. Os dados foram analisados por método gráfico, construindo-se curvas de retenção e passagem, e histograma de distribuição, determinando-se o diâmetro médio de partículas e amplitude granulométrica do pó. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

5.2. Preparação e caracterização da solução extrativa (SEI)

5.2.1. Preparação da solução extrativa

A solução extrativa aquosa, denominada SEI, foi obtida por decocção da matéria-prima vegetal seca e moída, por 10 minutos, numa relação droga:solvente de 1,5:10 (m/v). Foram utilizados cerca de 750g de matéria-

prima vegetal. A solução foi filtrada e o marco prensado. Após resfriamento até temperatura ambiente, o volume foi reconstituído até a proporção inicial.

5.2.2. Determinação do resíduo seco (DEUTSCHES, 1986)

Uma amostra de 20,0 g de solução extrativa foi exatamente pesada em pesa-filtro tarado e evaporada, até secura, em banho de água, sob agitação ocasional. O pesa-filtro foi colocado em estufa por 2 horas, em temperatura de aproximadamente 105 ± 2 °C, resfriado em dessecador e pesado. O resultado foi expresso em relação a 100 g da solução extrativa, pela média de seis determinações.

5.2.3. Determinação do pH (FARMACOPÉIA, 1988)

A determinação do pH de uma amostra de 10,0 ml de solução extrativa foi realizada em potenciômetro calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. O resultado foi expresso pela média de cinco determinações.

5.2.4. Determinação da densidade (FARMACOPÉIA, 1988)

A densidade da solução extrativa foi determinada com auxílio de picnômetro, a 25 °C. Os resultados foram expressos em g/ml e corresponderam à média de três determinações.

5.3. Validação de metodologia analítica para doseamento dos constituintes polifenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.3.1. Equipamentos

Cromatógrafo líquido Shimadzu (LC-10 AD) equipado com controlador de gradiente (FCV-10 AL), injetor automático (SIL-10 A) e detector de UV/VIS (SPD-10 A) controlado por software (CLASS LC-10). Para avaliar a pureza e identidade dos picos foi empregado, adicionalmente, um detector de arraste de diodo Waters Millennium (Milford, MA, USA). Depois de analisadas por CLAE, as amostras foram analisadas por ESI-MS e MS/MS em um espectrômetro de massas Varian 1200 (Walnut Creek, CA, USA), equipado com triplo quadrupolo, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Goiás. Cerca de 20 µl de cada amostra foi inserida via injetor em fluxo de 0,5 ml/min, utilizando-se como solvente MeOH/H₂O 50 % (v/v). O gás de nebulização e dessolvatação foi N₂. Os experimentos de MS/MS foram feitos utilizando-se como gás de colisão argônio. A energia ótima de colisão utilizada foi de 10 e 30 eV. Todas as amostras foram injetadas em triplicata.

5.3.2. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas desenvolvidas foram: pré-coluna como fase estacionária Lichrosorb RP-18 10 µm e coluna Shimadzu CLC-ODS (M) RP-18, (5 µm, 250 mm x 4 mm) detecção em ultravioleta ($\lambda = 340$ nm com sensibilidade de 0,05 AUFS) e injeção de 20 µl de amostra.

Como sistema de eluição foi empregado gradiente linear constituído de: (A) ácido acético 2 % (v/v); (B) metanol: água 85 % (m/m). As análises foram realizadas empregando fluxo de eluição de 0,7 ml/min, seguindo o regime de eluição descrito na tabela 1.1.

Tabela 1.1 Descrição do gradiente de eluição em função do tempo.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0,00	69	31
10,0	69	31
25,0	44	56
33,0	44	56
45,0	23	77
50,0	44	56
55,0	69	31

A: ácido acético 2 % (v/v); B: metanol: água 85 % (m/m)

5.3.3. Validação do método analítico

A validação analítica foi realizada considerando como fonte de variação da amostra, a matéria-prima vegetal, o analista e o dia de realização da análise.

A validação analítica consistiu de avaliação de linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), robustez, determinação dos limites de detecção e quantificação (ICH, 2005; SWARTZ e KRULL, 1998).

5.3.3.1. Curva padrão

Para obtenção das curvas padrão de ácido clorogênico e rutina foram preparadas soluções metanólicas 50 % (v/v) nas concentrações de 2,0; 4,0; 6,0 8,0 e 10,0 µg/ml. As soluções foram filtradas em filtro de membrana de polivinilideno de 0,45 µm de diâmetro de poro. Os resultados foram expressos pela área média dos picos obtidos em três injeções. Este procedimento foi repetido em três dias consecutivos.

5.3.3.2. Curva de calibração da solução extrativa de *Ilex paraguariensis* (SEI)

Uma alíquota de 5,0 mL da SEI foi diluída a 50,0 ml com água, constituindo a solução-mãe (SM). Desta SM, uma alíquota de 5,0 ml foi diluída a 25,0 ml com metanol:água (50:50 v/v) . A partir desta solução, alíquotas de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 5,0

ml foram diluídas em balões de 10,0 ml com metanol:água (50:50 v/v). Os resultados foram expressos pela área média dos picos obtidos em três injeções. Este procedimento foi repetido em três dias consecutivos.

As curvas de calibração obtidas foram submetidas à análise por regressão linear e os resultados expressos pelo coeficiente de regressão, limites de confiança no ponto de interseção e pelo coeficiente de inclinação da reta.

5.3.3.3. *Repetibilidade*

Foi realizada para a solução extrativa mediante análise de nove diluições de mesma concentração, correspondente ao ponto central da curva de calibração da solução extrativa. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo percentual.

5.3.3.4. *Precisão intermediária*

Foi verificada através da análise de uma concentração escolhida a partir da curva de calibração da solução extrativa, sendo analisada em três dias deferentes, em triplicata, sendo os resultados expressos como coeficiente de variação percentual.

5.3.3.5. *Limite de detecção*

Foi calculado a partir da curva de calibração das substâncias de referência usando a equação 2.

$$LD = \frac{d_i \times 3,3}{i} \quad (2)$$

Onde d_i = desvio padrão do coeficiente linear (intercepto); i = inclinação da curva de calibração.

5.3.3.6. *Limite de quantificação*

Foi calculado a partir da curva de calibração das substâncias de referência usando a equação 3.

$$LQ = \frac{d_i \times 10}{i} \quad (3)$$

Onde d_i = desvio padrão do coeficiente linear (intercepto); i = inclinação da curva de calibração.

5.3.3.7. Exatidão

A exatidão foi avaliada através da recuperação do ácido clorogênico e rutina adicionados à solução extrativa com concentração de 6,7 µg/ml. O ensaio foi executado obedecendo à faixa de linearidade da metodologia, por meio de três níveis de concentrações de ácido clorogênico (67, 100 e 133 %) e rutina (50, 100 e 150 %), com três repetições cada. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, de acordo com a equação 4.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 10 \quad (4)$$

Os resultados foram analisados por ANOVA, considerando-se:

- variação de tempo de retenção bruto dos picos (inferior a 5 %);
- variação de área dos picos.

5.3.4. Identificação dos picos

Os picos foram identificados considerando a correspondência dos tempos de retenção e o aumento das áreas dos picos presentes na amostra, mediante adição quantitativa de pequenas quantidades da substância de referência à amostra. Para avaliar a pureza e identidade dos picos foi empregado, adicionalmente, um detector de arranjo de diodo.

5.3.5. Análise quantitativa

A análise quantitativa foi realizada mediante a utilização de um padrão externo, utilizando-se a equação da reta obtida para as substâncias de referência

para determinar a concentração das substâncias a quantificar presentes na amostra, conforme a equação 5.

$$C = \frac{(Am - a)}{b} \quad (5)$$

onde: C = concentração da substância na amostra ($\mu\text{g/ml}$); Am = absorvância da amostra; a = coeficiente linear; b = coeficiente angular.

As análises foram executadas ajustando-se, por diluição, o volume das soluções padrão e amostras, a fim de se obter respostas do detector (áreas) semelhantes. O resultado foi expresso pela média de seis determinações.

5.4 Fracionamento e purificação das frações polifenólicas presentes no extrato seco liofilizado

5.4.1. Preparação do extrato seco liofilizado (ESLI)

A solução extrativa, em volume de 1000 ml, foi transferida para frascos de liofilização, congelada e liofilizada nas condições descritas na tabela 1.2.

Tabela 1.2 Condições operacionais empregadas na liofilização da solução extrativa aquosa de *Ilex paraguariensis*.

Parâmetro	Valor
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	-60
Pressão (mbar)	10^{-1}
Tempo (horas)	96

Os frascos de liofilização contendo as soluções extrativas ficaram ao abrigo da luz durante todo o procedimento de congelamento e secagem. Os liofilizados obtidos foram acondicionados em frascos âmbar, armazenados em dessecador recebendo a denominação ESLI – extrato seco liofilizado obtido a partir da solução extrativa aquosa de *Ilex paraguariensis*.

5.4.2 Caracterização do extrato seco liofilizado (ESLI)

5.4.2.1. Determinação da perda por dessecação (FARMACOPÉIA, 1988)

Conforme descrito no item 5.1.2.

5.4.2.2. Rendimento do processo de liofilização

O rendimento foi calculado pela diferença entre a massa teórica do resíduo seco da solução extrativa e a massa de ESLI obtida, considerando o teor de umidade residual.

5.4.2.3. Determinação do pH (FARMACOPÉIA, 1988)

Conforme descrito no item 5.2.3.

5.4.2.4. Análise quantitativa por CLAE

Foi realizada empregando-se as condições cromatográficas descritas no item 5.3.2.

Uma amostra de 3,80 mg de ESLI foi dissolvida em metanol e o volume completado a 20,0 ml, em balão volumétrico. Uma alíquota de 2,0 ml desta solução foi diluída em metanol:água 50% (v/v) a 10,0 ml, obtendo-se concentração final de 38,0 µg/ml. Uma alíquota desta solução foi filtrada em membrana e injetada no cromatógrafo. As injeções foram realizadas em triplicata. As áreas médias dos picos foram comparadas às áreas dos padrões calculando-se a concentração dos polifenóis presentes utilizando-se a equação da reta obtida para as substâncias.

5.4.3. Preparação do extrato para fracionamento

Para o fracionamento do extrato foi empregada a metodologia descrita por PAVEI (2004), para os frutos da planta, adaptada para o extrato seco por liofilização obtido a partir da solução extrativa de folhas de *Ilex paraguariensis* (ESLI). A metodologia está descrita no relatório descritivo que encontra-se em solicitação de depósito de patente no EITT/UFRGS.

5.4.4. Caracterização das frações

5.4.4.1 *Determinação do pH*

Conforme descrito no item 5.2.3.

5.4.4.2. *Avaliação macroscópica*

Foi realizada por observação de cor e características gerais das frações durante a eluição da coluna e após concentração e liofilização. As frações obtidas foram denominada FA, FB e FF.

5.4.4.3. *Análise qualitativa por CLAE*

Foi realizada empregando a metodologia validada no item 5.3.2.

5.4.4.3.1. *Preparação das amostras*

Cerca de 2,5 mg do extrato liofilizado de cada uma das frações obtidas foram diluídos em balão volumétrico de 10,0 ml com metanol 50% (v/v). As soluções resultantes foram filtradas através de membrana e injetadas em CLAE. As injeções foram realizadas em triplicata.

5.5. Produção e caracterização dos produtos secos por *spray-drying*

5.5.1 Preparo das dispersões a partir da solução extrativa

Os adjuvantes tecnológicos foram incorporados a um volume final de 5 litros de SEI e a mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos.

Foram preparadas quatro formulações equipamento – *Production Minor Spray Dryer Plant*, fabricado pela NIRO A/S, munido de atomizador rotatório, a partir da solução extrativa. A composição percentual das formulações utilizadas na produção dos produtos secos de *Ilex paraguariensis* está descrita na tabela 1.3, sendo os produtos obtidos, codificados como PSI-A, PSI-B, PSI-C e PSI-D.

Tabela 1.3 Composição percentual dos produtos secos de *Ilex paraguariensis* (PSI).

Composição	PSI-A	PSI-B	PSI-C	PSI-D
RS*	70 %	70 %	70 %	70%
Aerosil®	30 %	15 %	-	15 %
Avicel®				15 %
Glucidex®	-	15 %	30 %	

Aerosil®: dióxido de silício coloidal

Avicel®: celulose microcristalina

Glucidex®: maltodextrina

RS* = concentração percentual de resíduo seco (m/m) do vegetal no produto seco final.

As condições de secagem empregadas na produção dos produtos secos por aspersão foram: bomba de alimentação: 143,0 ml/min; velocidade do aspersor: 10900 rpm; temperatura de entrada: 177 ± 1 °C; temperatura de saída: $99,3 \pm 1$ °C; diferença de pressão (Δp): 125.

A SEI foi mantida sob agitação constante durante toda a operação de secagem, a fim de garantir homogeneidade ao produto final. Os PSI foram acondicionados frascos de polietileno opacos e armazenados em dessecador.

5.5.2. Caracterização dos produtos PSI-A, PSI-B, PSI-C e PSI-D

5.5.2.1. Determinação da perda por dessecação (FARMACOPÉIA, 1988)

Determinada por gravimetria de acordo com a metodologia descrita no item 5.1.2.

5.5.2.2. Avaliação do rendimento da operação de secagem

Foi determinado por meio da diferença entre a massa teórica e a massa do PSI obtida, considerando o teor de umidade residual.

5.5.2.3. Análise granulométrica

Realizado pela medida do diâmetro de Feret, no mínimo, 500 partículas, em microscópio óptico com ocular provida de nônio com 10 vezes de aumento e objetiva de 40 vezes. O nônio contém a escala de 1 mm que apresenta 100 divisões, onde cada divisão do nônio corresponde a 3,4 μm . A lâmina foi preparada com uma pequena quantidade de pó disperso a seco. O diâmetro médio e o desvio padrão das partículas foram determinados graficamente (EWLLS, 1988; LIEBERMAN *et al.*, 1989; LANTZ, 1989). Os resultados foram obtidos a partir das curvas de distribuição granulométrica em função da frequência acumulada percentual.

Os valores de diâmetro médio e do desvio padrão granulométrico foram calculados de forma aritmética por meio das equações 6 e 7.

$$\bar{x} = \frac{\sum_i^n x_i}{n} \quad (6)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i^2) - n\bar{x}^2}{(n-1)}} \quad (7)$$

onde: \bar{x} = média; s = desvio padrão; n = número de partículas; x_i = valor do diâmetro da partícula; $\sum_i^n x_i$ = somatório dos valores do diâmetro da partícula; $\sum_i^n (x_i^2)$ = somatório do quadrado do diâmetro das partículas.

5.5.2.4. Avaliação do ângulo de repouso (PARTHIRANA e GUPTA, 1976)

Foi determinado através do escoamento dinâmico utilizando equipamento dotado de módulo de descarga automática modificado por GUTERRES (1990). O aparelho consiste de um cilindro móvel, ajustado a uma base fixa, acoplado a um motor que, quando acionado, separa o cilindro da base pela ascensão do mesmo. Uma superfície vertical dotada de planilha foi utilizada para registro das sombras obtidas após a elevação do cilindro contendo as amostras. As medidas foram feitas diretamente no registro das sombras projetadas nas planilhas e o ângulo de repouso (α) foi calculado através de sua tangente, conforme a equação 8. Os resultados expressam a média de três determinações, utilizando-se 30,0 ml de amostra.

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{h}{r} \quad (8)$$

onde: α = ângulo de repouso ($^{\circ}$) e $\operatorname{tg} \alpha$ = quociente entre os catetos oposto (h) e adjacente (r) do triângulo.

5.5.2.5. Determinação das densidades brutas e de compactação, fator de Hausner, índice de compressibilidade e de densificação (VOIGT, 2005; GUYOT et al., 1995; PECK et al., 1989)

As determinações das densidades brutas e de compactação foram realizadas em volúmetro de compactação, onde o pó, exatamente pesado, foi vertido numa proveta e submetido a 10, 500 e 1250 quedas seqüenciais (DIN 5394). O ensaio foi continuado em seqüências de 1250 quedas até que a diferença entre duas leituras subseqüentes fosse inferior ou igual a 1,0 mL, sendo este considerado como volume de compactação. A partir dos dados obtidos neste ensaio foram calculados o fator de Hausner, índices de compressibilidade e de densificação, segundo as equações 9, 10 e 11, respectivamente.

$$FH = \frac{dc}{db} \quad (9)$$

$$IC = \frac{db - dc}{dc} \times 100 \quad (10)$$

$$ID = V_{10} - V_{500} \quad (11)$$

onde: FH = fator de Hausner; db = densidade bruta (g/ml); dc = densidade de compactação (g/ml); IC = índice de compressibilidade; ID = índice de densificação; V_{10} = volume do pó após 10 quedas; V_{500} = volume do pó, após 500 quedas.

5.5.2.6. Análise das partículas por microscopia eletrônica de varredura

As amostras dos produtos secos foram previamente metalizadas em metalizador Jeol Jee 4B (JVG-IN) utilizando-se um filtro de ouro em suporte de metal. A análise foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM 6060). A morfologia, a superfície e homogeneidade de tamanho e forma das partículas foram observadas.

5.6. Validação de método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para doseamento de constituintes polifenólicos presentes nos produtos secos por *spray-drying*

5.6.1. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas empregadas foram idênticas às descritas na seção 5.3.2.

5.6.2. Validação do método analítico

5.6.2.1. *Curva-padrão*

Para obtenção das curvas padrão de ácido clorogênico e rutina foram preparadas soluções destas substâncias de referência numa mistura metanol:água (1:1 v/v) nas concentrações de 2,0; 4,0; 6,0 8,0 e 10,0 $\mu\text{g/ml}$. As soluções foram filtradas em filtro de membrana de polivinilideno de 0,45 μm de diâmetro de poro. Os resultados foram expressos pela área média dos picos obtidos em três injeções. Este procedimento foi repetido em três dias consecutivos.

5.6.2.2. *Curva de calibração do PSI-A*

Uma amostra de 54,3 mg de PSI-A, exatamente pesada, foi dissolvida em 50,0 ml de água destilada, agitando-se sob proteção da luz por um período de 15 minutos. A partir desta solução, alíquotas de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 5,0 ml foram diluídas em balões de 10,0 ml com uma mistura metanol:água (1:1 v/v). Os resultados foram expressos pela área média dos picos obtidos em três injeções. Este procedimento foi repetido em três dias consecutivos.

As curvas de calibração foram submetidas à análise por regressão linear e os resultados expressos pelo coeficiente de regressão, limites de confiança no ponto de interseção e pelo coeficiente de inclinação da reta.

5.6.2.3. *Repetibilidade*

Foi avaliada por meio da análise de nove diluições de mesma concentração de solução de PSI-A, correspondente ao ponto central da curva de calibração. Os resultados foram expressos como coeficiente de variação percentual.

5.6.2.4. *Precisão intermediária*

Foi verificada por meio da análise de uma concentração escolhida a partir da curva de calibração da solução de PSI-A, sendo analisada em três dias diferentes, em triplicata, sendo os resultados expressos como coeficiente de variação percentual.

5.6.2.5. *Limite de detecção*

Foi calculado a partir da curva de calibração das substâncias de referência de acordo com a equação descrita no item 5.3.3.5.

5.6.2.6. *Limite de quantificação*

Foi calculado a partir da curva de calibração das substâncias de referência de acordo com a equação no item 5.3.3.6.

5.6.2.7. *Exatidão*

A exatidão foi avaliada a partir da recuperação do ácido clorogênico e rutina adicionados à solução com concentração de 6,7 µg/ml. O ensaio foi executado, obedecendo a faixa de linearidade da metodologia, em três níveis de concentrações (50, 100 e 150 %) das substâncias de referência e amostra com três repetições cada. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, de acordo com a equação descrita no item 5.3.3.7.

Os resultados foram analisados por ANOVA, considerando-se:

- variação de tempo de retenção bruto dos picos (inferior a 5 %);
- variação de área dos picos.

5.6.3. Identificação dos picos

Os picos foram identificados considerando-se a correspondência dos tempos de retenção e o aumento das áreas dos picos presentes na amostra, mediante adição quantitativa de pequenas quantidades da substância de referência à amostra.

5.6.4. Análise quantitativa

A análise quantitativa foi realizada mediante a utilização de padrões externos, utilizando-se as equações das retas obtidas para determinar a concentração das substâncias na amostra, de acordo com a equação descrita no item 5.3.5.

As análises foram executadas ajustando-se, por diluição, o volume das soluções padrão e amostras, a fim de se obter respostas do detector (áreas) semelhantes. O resultado foi expresso pela média de seis determinações.

5.6.4.1. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas empregadas idênticas às descritas na seção 5.3.2.

5.6.4.2. Preparação das amostras

Alíquotas de 54,3 mg de cada um dos produtos secos por *spray-drying* (PSI-A, PSI-B, PSI-C e PSI-D) foram pesadas e dissolvidos em 50,0 ml de água destilada e mantidas sob agitação durante 15 minutos sob proteção da luz, constituindo a solução-mãe (SM). Desta SM, 5,0 ml foram diluídos em balões de 50,0 ml com água destilada. A partir desta solução uma alíquota de 5,0 ml foi diluída a 25,0 ml com uma mistura metanol:água (1:1 v/v), constituindo a SA. Para análise cromatográfica, 2,0 ml desta solução foram diluídos a 10,0 ml com o mesmo solvente. As injeções foram realizadas em triplicata, para cada um dos produtos secos por *aspersão* analisados.

5.7. Avaliação da estabilidade frente à luz UV (254 nm e 352 nm)

Para análise da influência da luz sobre a estabilidade dos produtos secos por *spray-drying* estes foram colocados em câmara de fotoestabilidade PRS416PH Helfont (254 nm e 352 nm), por um período de dois dias. Foram preparadas três amostras em vidro relógio aberto para cada dia de avaliação. Foram analisadas amostras nos tempos de 0, 24 e 48 h.

5.7.1. Características sensoriais

As amostras foram avaliadas quanto às características de cor, odor e aparência do pó após exposição à câmara.

5.7.2. Avaliação da perda por dessecação (FARMACOPÉIA, 1988)

Determinada por gravimetria de acordo com a metodologia descrita no item 5.1.2.

5.7.3. Avaliação dos polifenóis por CLAE

5.7.3.1. Condições cromatográficas.

As condições cromatográficas empregadas foram idênticas às descritas na seção 5.3.2.

5.7.3.2. Preparação das amostras

Amostras de 21,7 mg de cada um dos produtos secos por *spray-drying* (PSI-A, PSI-B, PSI-C e PSI-D) foram pesadas e dissolvidas, separadamente, em 20,0 ml de água destilada e a mistura mantida, sob agitação, durante 15 minutos, sob proteção da luz, constituindo a solução-mãe (SM). Para análise cromatográfica 2,0 ml desta solução foram diluídos a 10,0 ml com uma mistura metanol:água (1:1 v/v), constituindo a SA. As injeções no cromatógrafo foram realizadas em triplicata, para cada um dos produtos secos analisados.

5.8 Produção e caracterização de produto seco por *spray-drying* para a realização dos ensaios *in vivo*

Após a caracterização tecnológica e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *ex vivo* dos diferentes produtos secos por *spray-drying*, selecionou-se o produto PSI-A como o mais promissor tanto quanto à atividade antioxidante como quanto à viabilidade tecnológica de produção em escala semi-industrial. Assim, para os testes de atividade antioxidante *in vivo*, foram preparados 30 litros de solução extrativa, a qual, após adição e mistura com Aerosil® 200, foi submetida à secagem obedecendo às condições descritas no item 5.6.1. O produto obtido após secagem foi denominado PSI-A L02 sendo caracterizado tecnologicamente.

5.8.1. Caracterização do produtos PSI-A L02

5.8.1.1. Determinação da perda por dessecação (FARMACOPÉIA, 1988)

Determinada por gravimetria de acordo com a metodologia descrita no item 5.1.2.

5.8.1.2. Avaliação do rendimento da operação de secagem

Foi determinado por meio da diferença entre a massa teórica e a massa do PSI-A L02 obtida de acordo com a metodologia descrita no item 5.5.2.2.

5.8.1.3. Avaliação do ângulo de repouso (PARTHIRANA e GUPTA, 1976)

Foi determinado através do escoamento dinâmico utilizando equipamento dotado de módulo de descarga automática modificado por GUTERRES (1990) de acordo com a metodologia descrita no item 5.5.2.4.

5.8.1.4. Determinação das densidades brutas e de compactação, fator de Hausner, índice de compressibilidade e de densificação (VOIGT, 2005; GUYOT et al., 1995; PECK et al., 1989)

As determinações das densidades brutas e de compactação foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item 5.5.2.5.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Preparação e caracterização da matéria-prima vegetal de *Ilex paraguariensis*

A etapa preliminar de caracterização da matéria-prima vegetal compreendeu a identificação botânica do material fornecido pela Empresa Ervateira Fino Mate (Mato Leitão-RS). A qualidade da matéria-prima vegetal englobou, além da identificação botânica, outros quesitos de análise visando à constância de sua composição química e conseqüentes efeitos biológicos.

A umidade residual de matérias-primas constitui-se num parâmetro importante relacionado com a estabilidade química e microbiológica das mesmas, uma vez que a presença de água favorece a proliferação de microorganismos.

A perda por dessecação de matérias-primas contendo baixo conteúdo de substâncias voláteis tem sido empregada como parâmetro indicativo do teor de umidade residual de drogas, após a etapa de secagem, como é o caso de *Ilex paraguariensis*.

Tabela 1.4. Características da matéria-prima vegetal de *Ilex paraguariensis*, após secagem e moagem.

Perda por dessecação (% m/m)	Teor de extrativos (% m/m)
\bar{X} (DPR %)	\bar{X} (DPR %)
9,72 (2,08)	25,67 (0,46)

\bar{X} : valor médio; DPR (%): desvio padrão relativo percentual.

A matéria-prima vegetal apresentou, após secagem em estufa e moagem, um valor de perda por dessecação superior ao encontrado por CAMPOS (1996) de 6,95. Admitindo-se que estes valores correspondem à umidade residual, encontram-se dentro dos limites farmacopéicos máximos preconizados de 8 a 14 % (ZHI-CHEN, 1980).

Em estudo preliminar sobre a influência de parâmetros de extração sobre as principais características químicas e tecnológicas das soluções extrativas resultantes, CAMPOS (1996) selecionou a decocção por 10 minutos como a

condição de maior eficiência de extração (medida pelo teor de extrativos). O teor de extrativos apresentado pela matéria-prima vegetal empregada de 25,7 % foi inferior ao obtido por CAMPOS (1996), de 42,65. Tal fato pode estar relacionado às variações inerentes à própria matéria-prima por proceder de época de coleta diferente.

A análise granulométrica constitui um parâmetro auxiliar para determinação da eficiência do processo de extração empregado. A moagem visa a aumentar a superfície de contato da matéria-prima com o solvente, permitindo assim, maior interação e maior dissolução de substâncias extratáveis (VOIGT, 2005). Na figura 1.1 visualiza-se o histograma de distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal de *Ilex paraguariensis*, moída em moinho de facas.

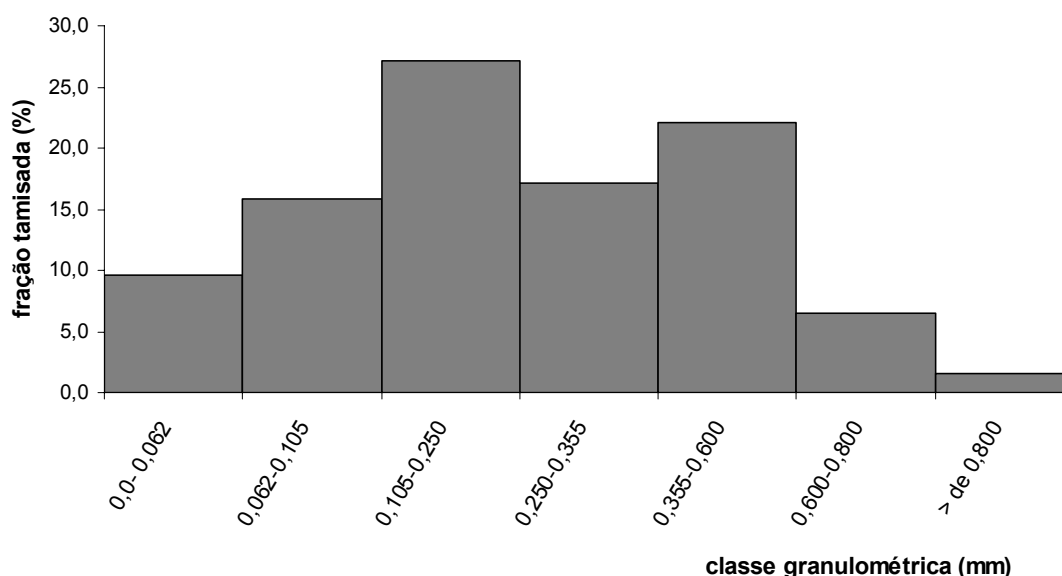


Figura 1.1. Distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal *Ilex paraguariensis*, folhas e talos.

Os dados de distribuição granulométrica da matéria-prima demonstraram que cerca de 27 % de todas as partículas apresentaram diâmetro entre 62 e 105 μm , seguida de 22 % com diâmetro de partícula entre 355 e 600 μm . Os resultados demonstram uma ampla faixa de distribuição granulométrica para a mesma.

6.2. Preparação e caracterização da solução extrativa de *Ilex paraguariensis*

A solução extrativa (SEI) foi preparada de acordo com a metodologia desenvolvida por CAMPOS (1996) sendo, posteriormente, caracterizada e os resultados comparados aos previamente descritos na literatura para soluções extrativas de *Ilex paraguariensis* (CAMPOS, 1992; GNOATTO, 2002).

Tabela 1.5. Características da solução extrativa de *Ilex paraguariensis*.

Ensaio	Resultado; $\bar{X} \pm s$	DPR (%)
Resíduo seco (% m/m) (n=3)	3,78 \pm 0,02	0,46
pH (n=3)	5,67 \pm 0,01	0,10
Densidade relativa (n=3)	1,01 \pm 0,00	0,00

\bar{X} = valor médio; s= desvio padrão; DPR (%)= desvio padrão relativo percentual.

O valor de resíduo seco é um parâmetro que pode ser empregado como medida para avaliação da eficiência de extração do solvente, sem avaliar, geralmente, a extração específica de uma classe de substâncias ou de substâncias isoladas. No caso da preparação de extratos secos, este parâmetro é empregado também para o cálculo das concentrações de adjuvantes empregados na secagem.

O valor de resíduo seco determinado para a SEI, de 3,8 % (m/m), foi menor quando comparado ao encontrado por CAMPOS (1996) de 5,11% (m/m) e semelhante ao descrito por GNOATTO (2002) de 3,66% (m/m). O valor de pH e densidade encontrados para a SEI foram próximos aos obtidos por CAMPOS (1996) de, respectivamente, 5,30 e 1,019.

6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

6.3.1 Identificação dos picos no cromatógrafo

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tornou-se, nas últimas décadas, uma das metodologias analíticas mais amplamente empregadas na análise quantitativa, visto a possibilidade de separar constituintes e simultaneamente quantificá-los com rapidez, simplicidade e confiabilidade. A aplicação desta técnica na quantificação de substâncias de origem natural reveste-se de especial importância na medida em que estas estão inseridas em matrizes de grande complexidade.

Para *Ilex paraguariensis*, foram descritos vários métodos de quantificação por CLAE para compostos fenólicos (FILIP *et al.*, 2001; CARINI *et al.*, 1998; BRAVO *et al.*, 2007). No presente trabalho, foi desenvolvida e validada metodologia analítica por CLAE visando ao doseamento de compostos polifenólicos presentes na solução extrativa e, numa segunda etapa, nos produtos secos derivados.

A figura 1.2 mostra os perfis cromatográficos a 340 nm, com os respectivos espectros de UV com detector de arranjo de diodos (UV-DAD), obtidos para as substâncias de referência (figura 1.2a) e solução extrativa (figura 1.2b) de *I. paraguariensis*. Oito picos foram identificados na solução extrativa, seis destes (picos P1, P2, P3, P4, P5 e P6) apresentam espectros de UV típicos de derivados cafeoilquínicos, com bandas de absorção em que o $\lambda_{\text{máx}}$ é de 328 nm. O pico P1 parece ser o constituinte majoritário na solução extrativa. Devido à complexidade da matriz e ao longo tempo de análise requerido, optou-se pelo emprego de um sistema de eluição em gradiente linear. A fase móvel constituída de uma mistura metanol:água apresentou adequada resolução e separação dos picos, permitindo, assim, a quantificação das substâncias de referência na matéria-prima vegetal em um tempo inferior a 40 min.

A identificação destes compostos foi realizada empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-MS-MS). Foram analisadas as substâncias de referência ácido clorogênico e rutina isoladamente, bem como a solução extrativa diluída em metanol:água (50:50, v/v).

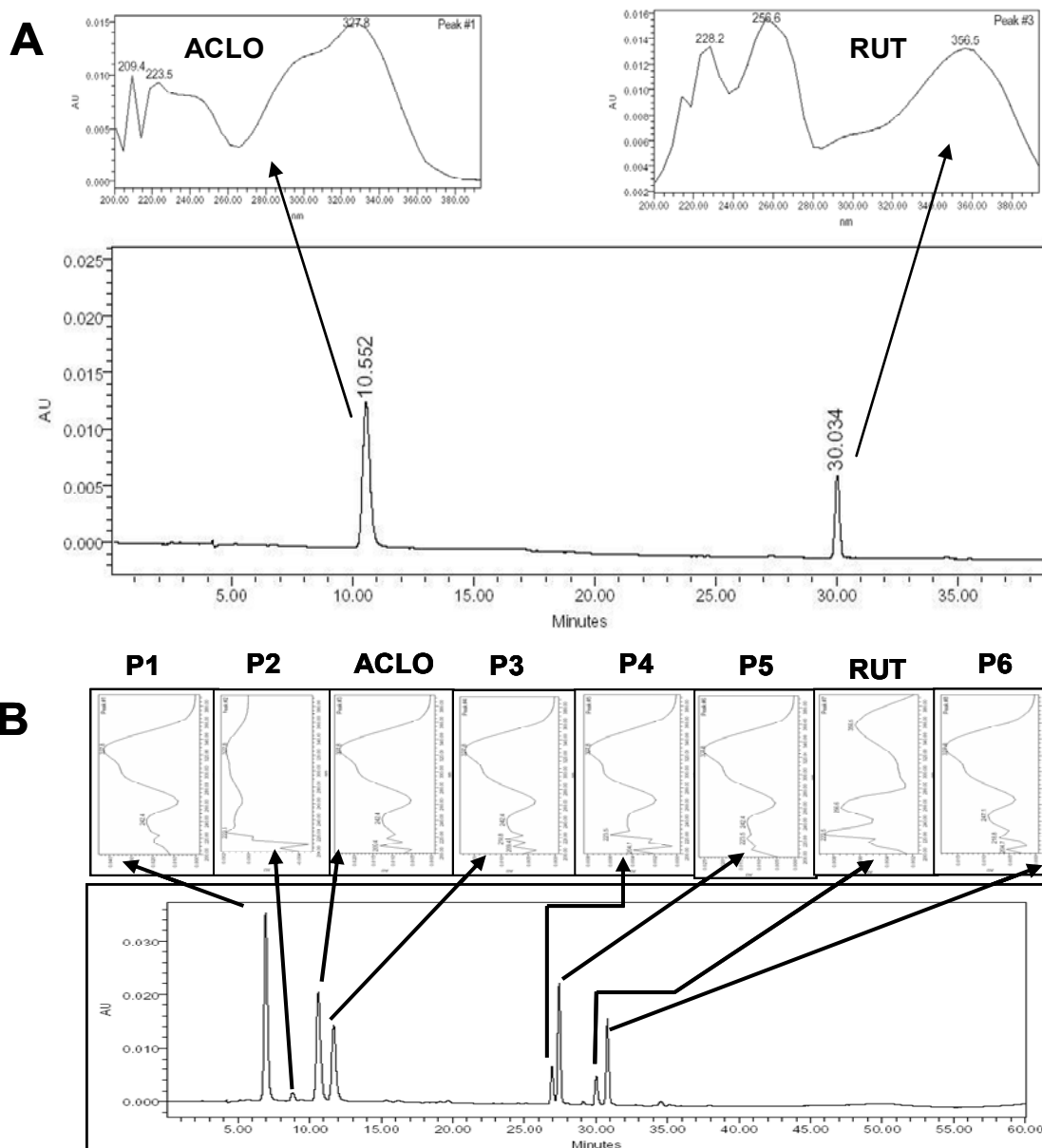


Figura 1.2. (A) Perfil cromatográfico das substâncias de referência, ácido clorogênico (ACLO) e rutina (RUT). (B) Perfil cromatográfico da solução extrativa (SEI) de *Ilex paraguariensis*.

A análise por CLAE-MS-MS revelou que as estruturas dos picos P1 e P3 apresentaram íons idênticos com pico molecular em massa/carga (m/e) 353 e seus fragmentos, quando colididos com gás reagente, resultam nos íons correspondentes ao ácido cafeico (m/e 179) e ácido quínico (m/e 191) (figura 1.3), podendo ser atribuídos a isômeros do ácido clorogênico (ácido 5-O-dicafeoilquinico). A partir destes dados e, considerando o perfil de eluição já previamente descrito na literatura (CARINI *et al.*, 1998; BRAVO *et al.*, 2007), pode-se inferir que os picos P1 e P3, são

os ácidos neo-clorogênico (ácido 3-O-dicafeoilquínico) e cripto-clorogênico (ácido 4-O-dicafeoilquínico). Os picos P4, P5 e P6 apresentaram o mesmo pico do íon molecular (m/e 515) indicativos de isômeros dicafeoilquínicos e fragmentos em m/e 179, 191 e 353 [m -H- cafeoil]⁻, correspondendo, provavelmente aos isômeros ácido 3,4-O-dicafeoilquínico; 4,5-O-dicafeoilquínico; 3,5-O-dicafeoilquínico ou 1,5-O-dicafeoilquínico.

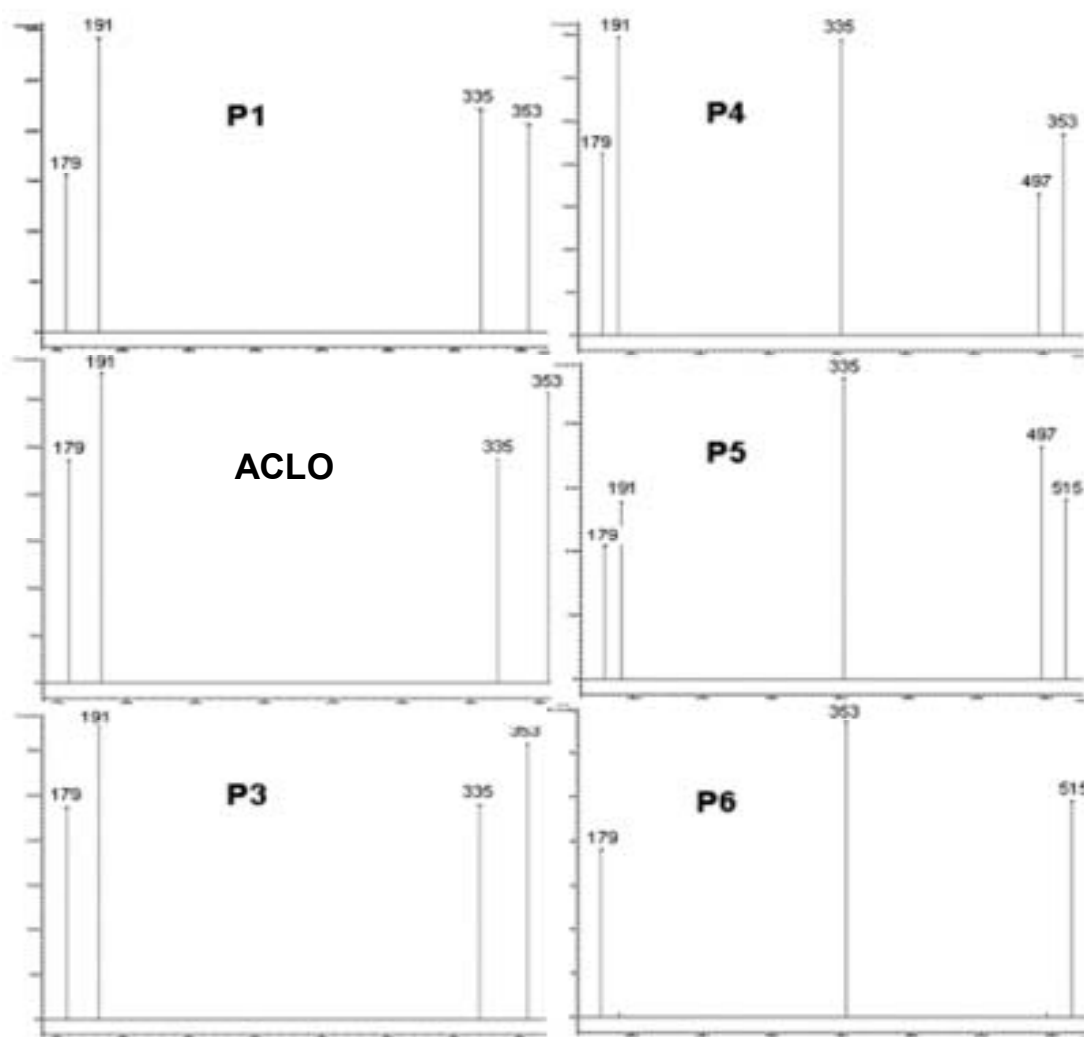


Figura 1.3. Espectro de massas dos picos P1, P3, P4, P5 e P6 presentes solução extrativa (SEI) de *Ilex paraguariensis*.

6.3.2 Validação de metodologia de quantificação dos polifenóis

Os teores dos picos P1, P3, P4, P5 e P6 foram expressos como ácido clorogênico (ACLO), devido à similaridade de seus espectros de ultravioleta (DAD).

A validação do método analítico abrangeu a determinação dos parâmetros linearidade, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão preconizados pelo ICH (2005).

A avaliação da linearidade foi realizada por meio da análise das curvas de calibração para as substâncias de referência e soluções extrativas de *Ilex paraguariensis*, obtidas em três dias diferentes.

Os resultados da avaliação da linearidade para as substâncias de referência são apresentados na tabela 1.6.

Tabela 1.6. Parâmetros de linearidade para as substâncias de referência ácido clorogênico (ACLO) e rutina (RUT), analisadas por CLAE.

Pico	r^2	a	b	DPR (%)
ACLO	0,9980	-5904,98	66.505,77	2,98
RUT	0,9992	-3515,26	36.407,72	1.53

r^2 =coeficiente de regressão linear; a= intersecção; b= inclinação; DPR (%) = desvio padrão relativo percentual da inclinação da reta em três dias consecutivos; ACLO = ácido clorogênico; RUT = rutina.

As curvas de calibração obtidas, tanto para o ácido clorogênico como para a rutina foram lineares na faixa de concentração de 2 a 10 $\mu\text{g/ml}$, com coeficientes de regressão (r^2) superiores a 0,998. A análise dos coeficientes de regressão linear obtidos das curvas analíticas demonstra ausência de desvio de linearidade na faixa de concentração testada. Os limites de confiança incluem o zero, o que demonstra a ausência de erro sistemático constante. Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as equações preconizadas pela ICH (2005). Os limites de detecção medidos para o ácido clorogênico e rutina foram, respectivamente, 0,19 e 0,27 $\mu\text{g/ml}$. Os limites de quantificação obtidos foram, respectivamente, 0,59 e 0,81 $\mu\text{g/ml}$, demonstrando a adequada sensibilidade do método.

Na tabela 1.7 são apresentados os resultados da regressão linear para a solução extrativa, considerando os mesmos parâmetros descritos para a análise de regressão linear das substâncias de referência. A análise dos coeficientes de regressão obtidos evidencia a ausência de desvios de linearidade na faixa de concentração de 2,0 a 10 µg/ml. Os valores de r^2 foram menores aos observados para as curvas das substâncias de referência, fato que pode ser atribuído à complexidade da amostra.

Tabela 1.7. Parâmetros de linearidade na análise de solução extrativa de *Ilex paraguariensis* por CLAE.

Pico	r^2	a	b	DPR (%)
ACLO	0,9978	-1290,63	712.700,52	4,69
RUT	0,9971	-634,10	125.150,42	6,08

r^2 = coeficiente de regressão linear; a= intersecção do eixo y; b= inclinação; DPR (%) = desvio padrão relativo percentual da inclinação da reta em três dias consecutivos; ACLO = ácido clorogênico; RUT = rutina.

A análise dos resultados dos ensaios de precisão intermediária e repetibilidade, tanto para os padrões como para a solução extrativa (tabelas 1.8 e 1.9) mostrou coeficientes de variação inferiores a 15%, limite máximo aceitável para matrizes complexas (FDA, 2001).

Tabela 1.8. Precisão intermediária, na análise por CLAE das substâncias de referência e solução extrativa de *Ilex paraguariensis*.

Pico	Substâncias de referência		Solução extrativa	
	Concentração (mg/ml)	DPR (%)	Concentração (mg/ml)	DPR (%)
ANEO	-	-	2,216 ^a	0,44
ACLO	0,098	2,14	1,669	0,82
ACPT	-	-	1,222 ^a	0,54
P4	-	-	0,359 ^a	0,43
P5	-	-	1,173 ^a	0,91
RUT	0,101	2,24	0,563	0,90
P6	-	-	0,933 ^a	0,80

^a calculado como ácido clorogênico; DPR (%) = desvio padrão relativo percentual. ACLO = ácido clorogênico; ANEO = ácido neo-clorogênico; ACPT = ácido cripto-clorogênico; RUT = rutina.

Tabela 1.9. Repetibilidade na análise por CLAE das substâncias de referência e solução extrativa de *Ilex paraguariensis*.

Pico	Substâncias de referência		Solução extrativa	
	Concentração (mg/ml)	DPR (%)	Concentração (mg/ml)	DPR (%)
ANEO	-	-	2,058 ^a	0,91
ACLO	0,107	0,30	1,628	0,95
ACPT	-	-	1,288 ^a	1,11
P4	-	-	0,388 ^a	1,13
P5	-	-	1,081 ^a	1,33
RUT	0,103	0,25	0,563	1,02
P6	-	-	1,009 ^a	0,75

^a calculado como ácido clorogênico; DPR (%) = desvio padrão relativo percentual. ACLO = ácido clorogênico; ANEO = ácido neo-clorogênico; ACPT = ácido cripto-clorogênico; RUT = rutina.

A exatidão do método foi determinada por meio do teste de recuperação. Para tanto, foram adicionadas à solução extrativa concentrações conhecidas de ácido

clorogênico (67, 100 e 133 %) e rutina (50, 100 e 150 %). Os resultados demonstram uma taxa de recuperação média, respectivamente, de 97 e 104 % para o ácido clorogênico e rutina, com coeficientes de variação inferiores a 1%, em todas as concentrações analisadas.

Tabela 1.10. Resultado do ensaio de exatidão do ácido clorogênico.

Acido Clorogênico			
Concentração teórica (µg/ml)	Concentração experimental (µg/ml)	Recuperação (%) \bar{X} (DPR %)	Recuperação média (%) \bar{X} (DPR %)
10,60	10,41	98,2 (0,89)	
12,60	11,96	94,9 (0,65)	97,4 (2,09)
14,60	14,45	99,0 (0,33)	

\bar{X} = valor médio; DPR (%) = desvio padrão relativo percentual.

Tabela 1.11. Resultado do ensaio de exatidão da rutina.

Rutina			
Concentração teórica (µg/ml)	Concentração experimental (µg/ml)	Recuperação (%) \bar{X} (DPR %)	Recuperação média (%) \bar{X} (DPR %)
3,20	3,43	107,2 (0,87)	
4,20	4,40	104,8 (0,24)	103,9 (3,91)
5,20	5,19	99,8 (0,19)	

\bar{X} = valor médio; DPR (%) = desvio padrão relativo percentual.

Na tabela 1.12 são apresentados os teores de ACLO, RUT e demais picos (P1, P3, P4, P5 e P6) na solução extrativa de *Ilex paraguariensis*, medidos pelo método CLAE anteriormente validado.

Tabela 1.12. Teor de polifenóis presentes na solução extrativa de *Ilex paraguariensis*, obtida por decocção.

Pico	SEI (mg/ml) \bar{x} (s)
ANEO	2,15 ^a (0,014)
ACLO	1,53 (0,008)
ACPT	1,01 ^a (0,007)
P4	0,29 ^a (0,001)
P5	1,13 ^a (0,010)
RUT	0,49 (0,016)
P6	0,75 ^a (0,015)

^a calculado como ácido clorogênico; s = desvio padrão. ACLO = ácido clorogênico; ANEO = ácido neo-clorogênico; ACPT = ácido cripto-clorogênico; RUT = rutina.

Após a validação da metodologia analítica para a quantificação de polifenóis na solução extrativa aquosa, a mesma foi aplicada à quantificação de outras soluções extrativas obtidas por diferentes métodos de extração.

Os resultados desta análise estão descritos no artigo aceito para publicação no *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* (Anexo 1.1).

6.4. Obtenção de frações polifenólicas a partir de extrato seco liofilizado de *Ilex paraguariensis* (ESLI)

Com o objetivo de viabilizar o estudo de isolamento da fração polifenólica presente na SEI optou-se pela liofilização da mesma, considerando que a técnica de liofilização preserva, de um modo geral, os constituintes químicos termolábeis. Além disto o produto resultante (extrato seco liofilizado, ESLI), por tratar-se de extrato seco, apresenta a perspectiva de maior estabilidade, comparativamente à solução extrativa.

O ESLI apresentou aspecto cristalino, com coloração esverdeada. O produto liofilizado foi mantido em dessecador, provido de sílica, até o momento de sua utilização.

Na tabela 1.13 são apresentados os resultados da análise do teor de umidade e pH do ESLI.

Tabela 1.13. Características do extrato seco liofilizado (ESLI) de *Ilex paraguariensis*.

Ensaio	Resultado; $\bar{X} \pm s$	DPR (%)
Teor de umidade (% m/m) (n=3)	6,78 \pm 0,36	5,36
pH (n=3)	5,37 \pm 0,01	0,19

\bar{X} = valor médio; s = desvio padrão; DPR (%) = desvio padrão relativo percentual.

O rendimento percentual da operação de secagem por liofilização a partir de um volume de 1000 ml de solução extrativa foi de 99,70 %. Este valor levou em conta a umidade residual do extrato seco.

A análise do perfil cromatográfico por CLAE do ESLI demonstrou a manutenção dos picos presentes na solução extrativa primária, não sendo observado o aparecimento ou desaparecimento de picos no perfil cromatográfico (figura 1.4).

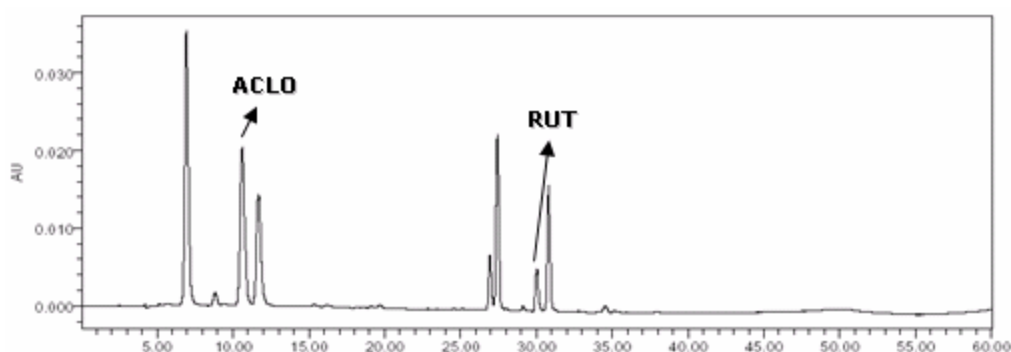


Figura 1.4. Perfil cromatográfico de extrato seco liofilizado (ESLI) de *Ilex paraguariensis*, obtido a partir de solução extrativa preparada por decocção.

No doseamento do ESLI por CLAE observou-se que os teores de polifenóis foram maiores do que aqueles encontrados para a SEI, quando expressos, comparativamente, pelo resíduo seco da SEI original. Esta diferença foi estatisticamente significativa, através ANOVA ($p < 0,001$) (tabela 1.14).

Tabela 1.14. Teor de polifenóis presentes no extrato seco liofilizado (ESLI) de *Ilex paraguariensis* comparativamente aos teores encontrados na solução extrativa que lhe deu origem (SEI).

Pico	SEI (mg/g) * \bar{x} (s)	ESLI (mg/g) ** \bar{x} (s)
ANEO	56,55 ^a (0,366)	62,22 ^a (0,361)
ACLO	40,37 ^a (0,205)	45,41 (0,206)
ACPT	26,45 ^a (0,183)	30,80 ^a (0,147)
P4	7,59 ^a (0,108)	10,19 ^a (0,046)
P5	29,75 ^a (0,258)	36,23 ^a (0,119)
RUT	12,99 ^a (0,420)	14,23 (0,098)
P6	19,73 ^a (0,400)	25,32 ^a (0,075)

^a calculado como ácido clorogênico; s = desvio padrão.

* Concentração expressa em mg de polifenóis/ g de resíduo seco.

** Concentração corrigida considerando o valor de perda por dessecação de 6,78 % (m/m).

ACLO = ácido clorogênico; ANEO = ácido neo-clorogênico; ACPT = ácido cripto-clorogênico; RUT = rutina.

Neste contexto, pode-se inferir que a secagem por liofilização da SEI permitiu a obtenção de extrato seco que, apesar da higroscopia característica, manteve a composição polifenólica original, cumprindo, assim, o seu objetivo.

Para a etapa de obtenção das frações polifenólicas, empregou-se uma resina adsorvente polimérica, de alta porosidade, com matriz de poliestireno. A escolha tanto do processo de purificação como da resina adsorvente fundamentou-se nos resultados obtidos por PAVEI (2004) que, ao desenvolver a metodologia de purificação da fração saponosídica presente no extrato liofilizado de frutos imaturos de *Ilex paraguariensis* detectou, nas porções iniciais do fracionamento, a presença de compostos polifenólicos.

A metodologia descrita por PAVEI (2004) e os respectivos parâmetros como a quantidade de resina utilizada, solvente, massa de ESLI aplicada na coluna, regime

e fluxo de eluição dos solventes foram adaptados ao fracionamento do extrato seco liofilizado obtido a partir de folhas e talos de *Ilex paraguariensis*, e estão sendo submetidos a registro de patente na SEDETEC/UFRGS.

O monitoramento do processo de fracionamento, quanto à separação e pureza das frações obtidas nos diferentes sistemas de eluição testados foi realizada por meio da análise do perfil cromatográfico por CLAE, obtido empregando-se o mesmo sistema descrito para análise da matéria-prima vegetal.

Na figura 1.5 são apresentados os perfis cromatográficos por CLAE das frações obtidas nos cinco sistemas de eluição testados. Pode-se observar que o fracionamento não alterou o perfil cromatográfico do ESLI inicial visto que os picos estão presentes nas frações purificadas, fornecendo indícios de ausência de degradação, durante o processo de purificação.

Na análise qualitativa do perfil cromatográfico dos sistemas testados observa-se que a fração FA foi eficiente em separar os compostos polifenólicos mais polares, caracterizados pelos picos compreendidos entre 0 e 15 minutos, os quais correspondem aos derivados do ácido cafeoilquínico. Não foram evidenciadas, nesta fração, as demais substâncias polifenólicas presentes no ESLI.

As frações eluídas em FE e FF, caracterizaram-se pela presença de compostos menos polares, com tempos de retenção superiores a 25 minutos.

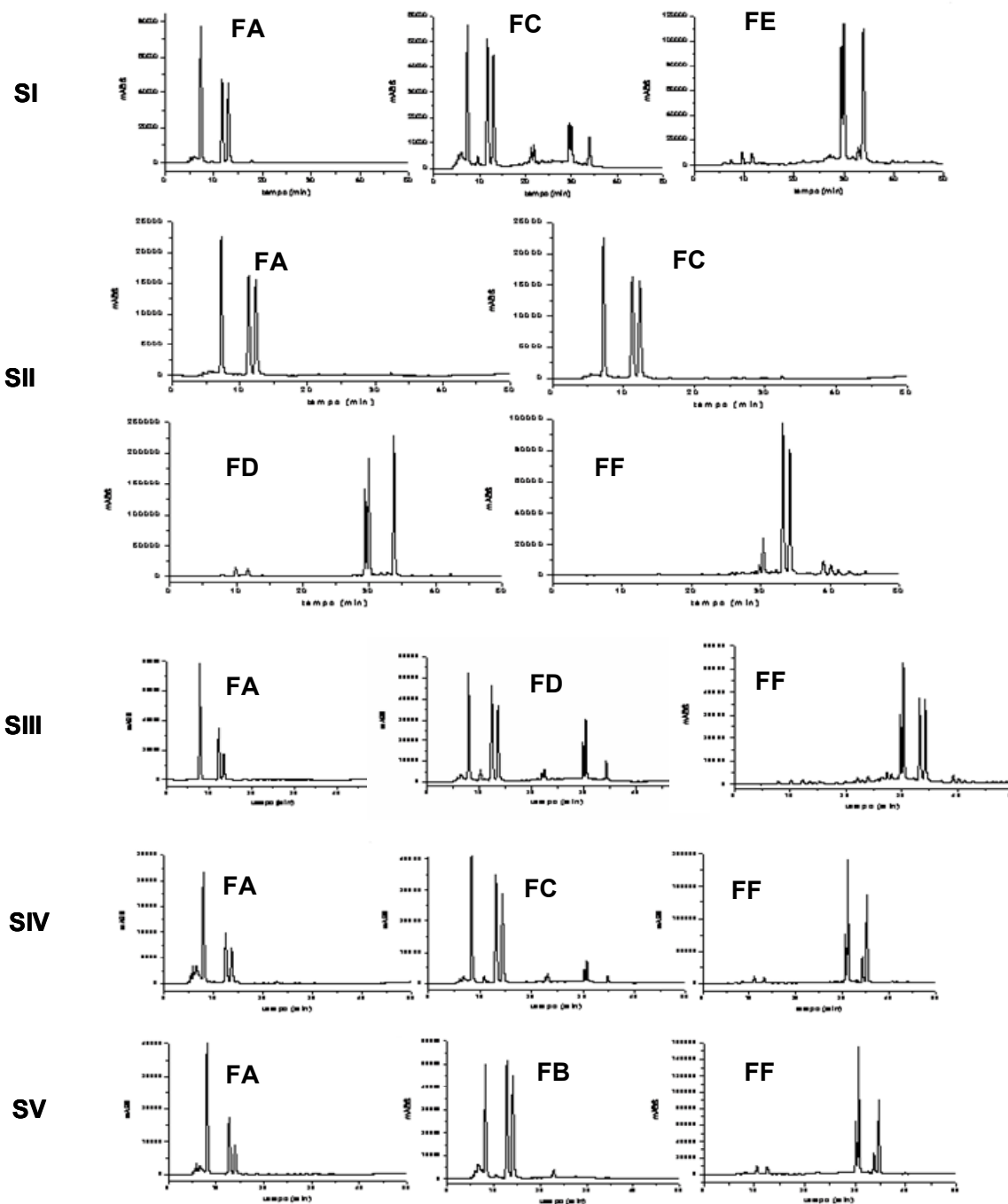


Figura 1.5. Perfis cromatográficos comparativos das frações obtidas pela separação em fase sólida, em diferentes sistemas de eluição, no fracionamento preliminar do extrato seco liofilizado de *Ilex paraguariensis* (ESLI).

No perfil cromatográfico do sistema SV observa-se um acúmulo de picos correspondentes aos derivados cafeoilquínicos nas frações FA e FB e a ausência de compostos de menor polaridade, que são eluídos separadamente na fração FF, correspondendo aos derivados do ácido dicafeoilquínico e rutina. Esta condição

permitiu selecionar o sistema de eluição codificado como SV como sendo o mais seletivo para a purificação de compostos polifenólicos uma vez que permitiu a separação nítida dos constituintes fenólicos por diferença de polaridade. Este sistema compreende um regime de eluição simples, com separação eficiente em curto tempo de fracionamento, além de não requerer grande volume de solvente.

Após separação em fase sólida pelo sistema de eluição SV, as frações coletadas foram caracterizadas quanto aos aspectos macroscópicos e determinação do pH. Os resultados da determinação do pH são apresentados na tabela 1.15.

Tabela 1.15. pH das frações fenólicas obtidas por separação em fase sólida pelo sistema de eluição SV do extrato seco liofilizado de *Ilex paraguariensis*.

Fração	pH ($\bar{x} \pm s$)	DPR (%)
FA	6,83 \pm 0,00	0,08
FB	5,78 \pm 0,01	0,16
FF	6,52 \pm 0,00	0,08

\bar{X} = valor médio; s = desvio padrão; DPR (%) = desvio padrão relativo percentual.

O rendimento do processo de purificação, considerando a massa de liofilizado obtida nas frações FA, FB e FF, representa aproximadamente 80 % da massa de liofilizado submetida ao processo de fracionamento, o que denota que o extrato seco liofilizado que lhe deu origem (ESLI) é um produto rico em polifenóis.

Tabela 1.16. Rendimento percentual das frações obtidas no processo de fracionamento do extrato seco liofilizado de *Ilex paraguariensis*.

Amostras	Massa (g) ($\bar{x} \pm s$)	Rendimento (%)[*]
ESLI	0,4003 \pm 0,000	100,00
FA	0,2074 \pm 0,012	51,81
FB	0,0376 \pm 0,004	9,40
FF	0,0721 \pm 0,002	18,02
Rendimento total		79,23

* rendimento percentual em relação à massa de liofilizado submetido ao processo de fracionamento.

Como as frações FA e FB apresentaram perfis semelhantes no que se refere aos constituintes fenólicos, estas duas frações foram misturadas com a fim de constituir uma única fração denominada fração FAB contendo os compostos polifenólicos de maior polaridade a qual foi, paralelamente com a fração FF, testada em ensaios de determinação de atividade antioxidante (testes *in vitro* e *ex vivo*). Os resultados dos teores de polifenóis presentes nas frações obtidas pelo fracionamento empregando o sistema de eluição SV são apresentados na tabela 1.17.

A análise comparativa do fracionamento enquanto rendimento e pureza demonstra que a fração FAB, apesar de apresentar maior rendimento percentual em termos de massa, apresenta menor teor de polifenóis totais, sendo a fração FF, portanto, mais pura.

Tabela 1.17. Teor de polifenóis presentes nas frações obtidas a partir do extrato seco liofilizado de *Ilex paraguariensis*.

Fração	Pico	Teor de polifenóis (mg/g) \bar{x} (s)	Teor de polifenóis totais na fração (mg/g)
FAB	Pico 1	91,30 ^a (0,142)	192,70
	ACLO	60,98 (0,219)	
	Pico 3	40,42 ^a (0,166)	
FF	Pico 4	57,56 ^a (1,652)	422,04
	Pico 5	184,87 ^a (4,223)	
	RUT	57,76 (1,763)	
	Pico 6	121,85 ^a (1,067)	

FAB: fração FA e FB

^a calculado como ácido clorogênico; s = desvio padrão.

ACLO = ácido clorogênico; RUT = rutina.

6.5. Produção e caracterização dos produtos secos por *spray-drying*

A produção de produtos secos por *spray-drying* a partir de soluções extrativas vegetais resulta na maioria dos casos, em produtos higroscópicos, inadequados para o uso ou processamento. A literatura relata que a utilização de adjuvantes de secagem representa uma alternativa viável para a melhoria das características tecnológicas destes produtos. Dentre os adjuvantes mais comumente mais empregados destacam-se o dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina, dextrina e outros (CASADEBAIG, 1989).

A produção dos produtos secos por *spray-drying* foi efetuada em torre de secagem, em escala semi-industrial, diferentemente das utilizadas por CAMPOS (1996) e GNOATTO (2002).

Com a finalidade de selecionar o melhor adjuvante foram empregados como adjuvantes de secagem o dióxido de silício coloidal isoladamente (CAMPOS, 1996), uma mistura (1:1) deste com celulose microcristalina (GNOATTO, 2002), uma

mistura (1:1) de dióxido de silício coloidal com maltodextrina e maltodextrina isoladamente. A escolha da maltodextrina deu-se ao seu amplo emprego na indústria alimentícia como adjuvante de secagem para sucos de frutas e alimentos (CHRONAKIS, 1998; AL-KHATIB *et al.*, 2001).

Os resultados da caracterização tecnológica observados para os quatro produtos secos por *spray-drying*, contendo diferentes proporções destes adjuvantes, estão apresentados na tabela 1.18.

Observa-se que o extrato produzido somente com Aerosil[®] (PSI-A) apresentou rendimento superior, seguido do extrato contendo a mistura Aerosil[®] + Avicel[®] (PSI-D), fato já relatado anteriormente, e estando provavelmente relacionado com a menor aderência das partículas às paredes da câmara de secagem, durante a nebulização (CAMPOS, 1996; GNOATTO, 2002).

O Fator de Hausner (FH), Índice de Carr (IC) e Índice de densificação (ID) são parâmetros vinculados à capacidade de empacotamento do pó. O Fator de Hausner é um indicador indireto da estabilidade de empacotamento. Quanto mais próximo de 1, mais estável é o sistema de empacotamento (THOMAS e POURCELOT, 1991).

A determinação do Índice de Carr (IC), mede, indiretamente, o fluxo e empacotamento dos pós. Quanto menor o índice de Carr, melhor o fluxo e o empacotamento (THOMAS e POURCELOT, 1991).

O Índice de densificação (ID) ou Índice de compactabilidade fornece informações sobre o comportamento do pó, quando submetido à movimentação. Valores superiores a 20 ml sugerem que o pó apresenta razoável propriedade de fluidez (GUYOT *et al.*, 1995).

Embora os índices acima citados sejam largamente empregados como indicadores de escoamento para materiais particulados, a literatura tem sugerido o emprego de metodologias onde haja a determinação direta da fluidez. Materiais particulares, apresentando valores de ângulo de repouso inferior a 30^o caracterizam-se como materiais de fluxo livre (HERZFELDT e SCHERER, 1987). A determinação

do ângulo de repouso foi possível somente para o produto PSI-A devido à ausência de escoamento livre nos demais produtos secos.

O conjunto de resultados obtidos para os diferentes produtos secos permitiu a caracterização dos mesmos como materiais de empacotamento e fluxo pobres, sendo o produto PSI-A caracterizado como material de fluxo bom.

Tabela 1.18. Características tecnológicas de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis*, em escala semi-industrial.

Característica	PSI-A	PSI-B	PSI-C	PSI-D
Rendimento (%)	60	40	50	52
Características físicas	Pó amarelo, claro, fino	Pó amarelo, claro, pouco aderente	Pó amarelo, aderente, tende a aglutinar	Pó amarelo, claro, pouco aderente
Teor de umidade (%)	5,43	8,26	6,75	6,61
Densidade bruta (g/ml)	0,586	0,456	0,467	0,474
Densidade de compactação (g/ml)	0,816	0,669	0,701	0,729
Fator de Hausner	1,39	1,47	1,51	1,54
Índice de Carr (%)	28,57	31,83	33,51	34,87
Índice de densificação (ml)	3,83	4,00	4,33	5,10
Ângulo de repouso	28,55	nm	nm	nm

PSI-A: 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil®

PSI-B: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil® + 15 % Glucidex®

PSI-C: 70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex®

PSI-D: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil® + 15 % Avicel®

*nm: não mensurável em função de o pó não ter apresentado escoamento livre

A fim de traçar um perfil comparativo apresentamos os resultados de rendimento bruto de PSI-A obtido neste trabalho em escala semi-industrial com os anteriormente encontrados por CAMPOS (1996) e GNOATTO (2002) em escala laboratorial. Os resultados estão apresentados nas tabelas 1.19 e 1.20. Muito embora esses valores não possam ser comparados com precisão, por tratarem-se de processos de secagem empregando equipamentos distintos, uma discussão preliminar revela-se possível. Observa-se que o PSI-A, obtido em escala semi-industrial, apresentou contrariamente ao esperado, rendimento inferior ao relatado por CAMPOS (1996) e GNOATTO (2002), ambos obtidos em escala laboratorial. O mesmo resultado foi observado para o PSI-D. Tal fato pode ser explicado pelo reduzido teor de sólidos presentes na dispersão a ser seca, bem como pelo pequeno volume de solução extrativa empregado (5 litros) na secagem em escala semi-industrial.

Tabela 1.19. Comparação entre rendimentos bruto e corrigido dos produtos secos por *spray-drying* contendo somente dióxido de silício coloidal.

Produto	Resíduo seco (g/100 ml)	Aerosil[®] (g/100 ml)	Rendimento bruto (%)	Rendimento corrigido (%)[*]	Características físicas
ESA-A (Campos, 1996).	5,11	2,19	72,40	68,70	Pó fino amarelo claro
ESN1 (Gnoatto, 2002).	3,66	1,57	68,32	67,04	Pó fino amarelo claro
PSI-A (Silva, 2007).	3,78	1,63	60,00	54,57	Pó fino amarelo claro

^{*}Perda por dessecação: ESA-A=3,67 %; ESN1=1,87 %; PSI-A=5,43 % m/m.

ESA-A = extrato seco nebulizado obtido em escala laboratorial (70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®]).

ESN1 = extrato seco nebulizado obtido em escala laboratorial (70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®]).

PSI-A = extrato seco nebulizado obtido em escala semi-industrial (70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®])

Tabela 1.20. Comparação dos rendimentos bruto e corrigido dos produtos secos por *spray-drying* contendo a mistura dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina (1:1).

Produto	Teor de resíduo seco (g/100 ml)	Rendimento bruto (%)	Rendimento corrigido (%) [*]	Características físicas
ESN2 (GNOATTO, 2002)	3,66	68,32	67,04	Pó fino amarelo claro
PSI-D (SILVA, 2007)	3,78	52	49,06	Pó fino amarelo claro

^{*}Perda por dessecação: ESN2=6,990 %; PSI-D=6,61 % m/m.

ESN1 = extrato seco nebulizado obtido em escala laboratorial (70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®]).

PSI-A = extrato seco nebulizado obtido em escala semi-industrial (70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®])

O aspecto macroscópico dos produtos secos revelou a obtenção de pós finos, de cor amarelo clara. Observa-se que o extrato obtido apenas com Aerosil[®] (PSI-A) apresentou-se mais fino e não aderente. Característica diversa foi observada pelo extratos obtidos com Glucidex[®] (PSI-B e PSI-C), que apresentaram maior aderência e formação de grumos, com grande tendência à compactação (figura 1.6).

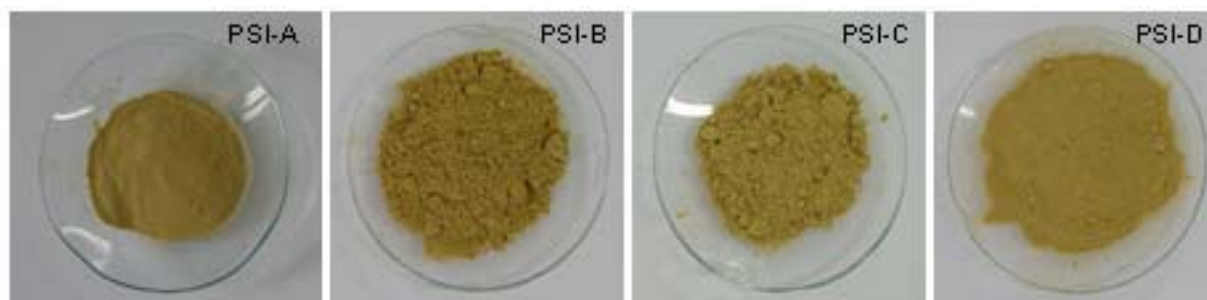


Figura 1.6. Aspecto macroscópico dos produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis*, preparados com diferentes adjuvantes de secagem: PSI-A (70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®]); PSI-B (70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Glucidex[®]); PSI-C (70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex[®]); PSI-D (70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Avicel[®]).

Todos os produtos secos apresentaram teor de umidade residual inferiores ao limite máximo estabelecido de 7 % (LIST e SCHIMIDT, 1989), exceto o PSI-B.

O Índice de Carr e o fator de Hausner são parâmetros vinculados à capacidade de empacotamento do pó. Valores superiores a 20 % no índice de Carr e 1,25 para o Fator de Hausner denotam materiais com características de empacotamento mais estáveis dificultando a capacidade de escoamento. O Índice de densificação informa sobre o comportamento do pó quando em movimento. Valores inferiores a 20 ml sugerem que o pó apresenta razoável propriedade de fluidez. Este parâmetro não diferenciou os produtos analisados. Embora os índices acima citados sejam largamente empregados como indicadores de escoamento para materiais particulados, a literatura tem sugerido o emprego de metodologias em que a determinação da fluidez seja direta.

A análise por microscopia eletrônica de varredura demonstra que o PSI-A apresenta-se como partículas esféricas com superfície rugosa, característica do adjuvante de secagem, Aerosil[®], no entanto, as demais formulações (PSI-B, PSI-C e PSI-D) apresentaram-se com forma irregular, devido à influência física dos adjuvantes Glucidex[®] e Avicel[®] (figuras 1.7 e 1.8).

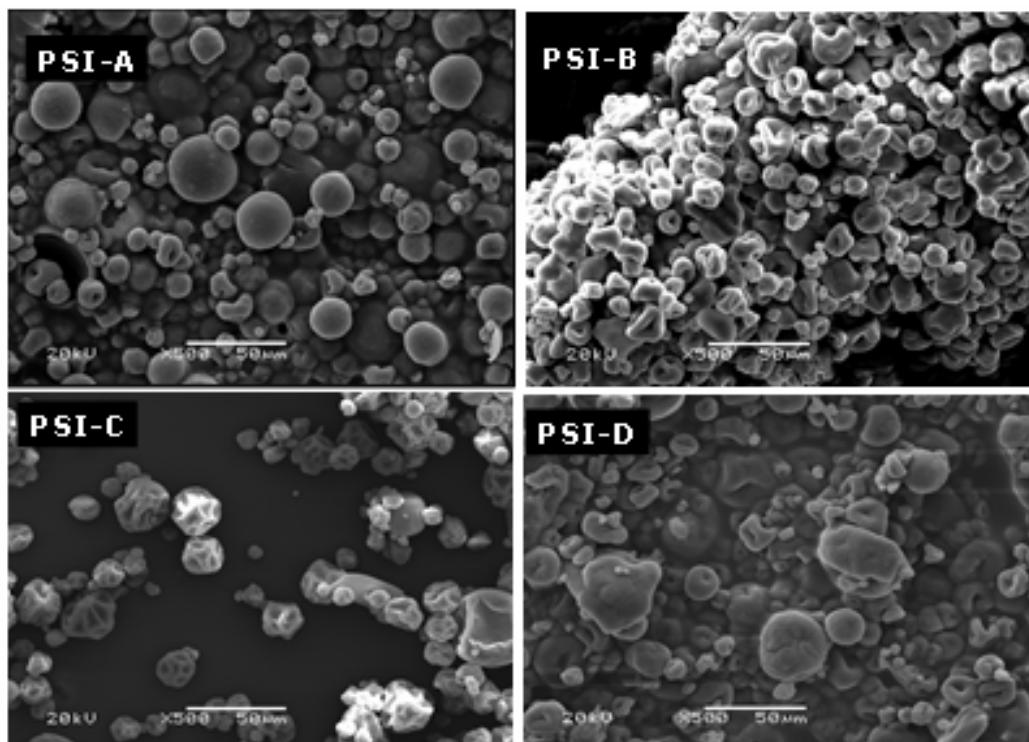


Figura 1.7. Fotomicrografia eletrônica de varredura de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* (PSI) (aumento 500 x), preparados com diferentes adjuvantes de secagem: PSI-A (70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®]); PSI-B (70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®]+ 15 % Glucidex[®]); PSI-C (70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex[®]); PSI-D (70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®]+ 15 % Avicel[®]).

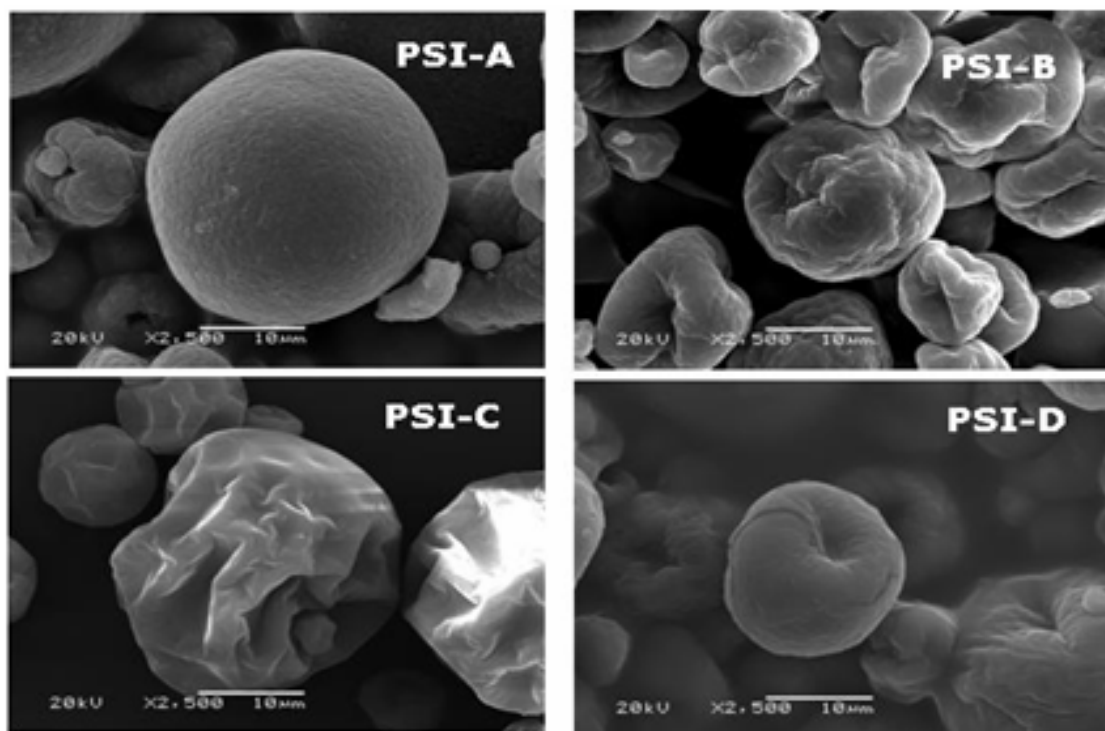


Figura 1.8. Fotomicrografia eletrônica de varredura de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* (PSI) (aumento 2500 x), preparados com diferentes adjuvantes de secagem: PSI-A (70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®]); PSI-B (70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®]+ 15 % Glucidex[®]); PSI-C (70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex[®]); PSI-D (70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®]+ 15 % Avicel[®]).

As distribuições granulométricas dos produtos secos por *spray-drying* podem ser visualizadas na figura 1.9.

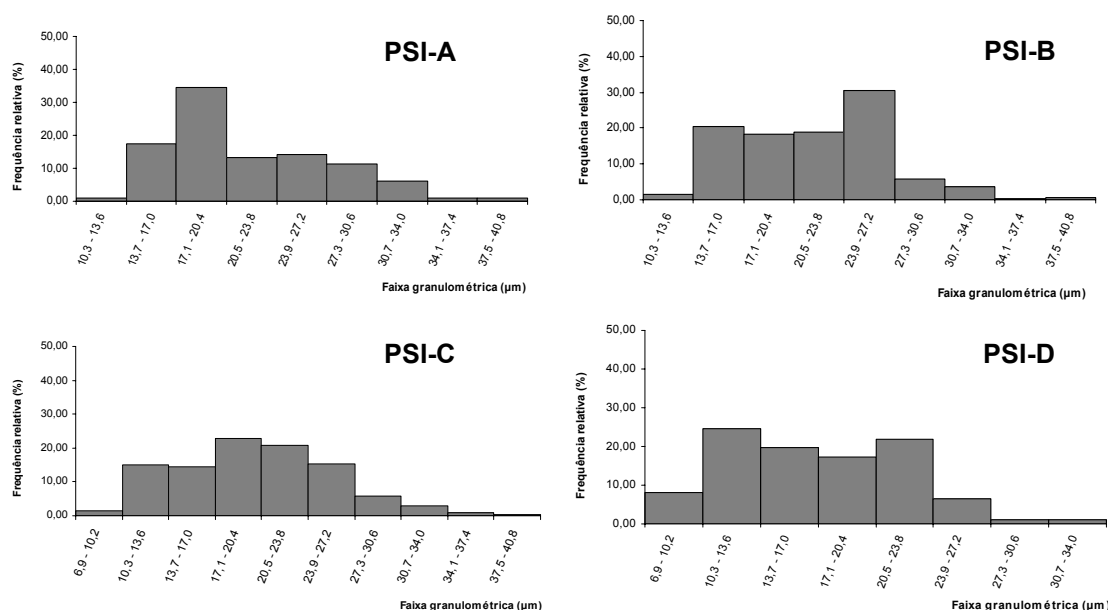


Figura 1.9. Distribuição granulométrica dos produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis*, preparados com diferentes adjuvantes de secagem: PSI-A (70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil®); PSI-B (70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil® + 15 % Glucidex®); PSI-C (70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex®); PSI-D (70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil® + 15 % Avicel®).

A análise dos histogramas dos produtos secos por *spray-drying* revela pequenas diferenças nos perfis de distribuição granulométrica entre os produtos. Tratam-se de partículas de pequeno diâmetro e de perfil de distribuição granulométrica não gaussiana. Os dados demonstram que as partículas do PSI-A e PSI-B encontram-se distribuídas, respectivamente, entre 11,95 e 39,15 µm. No caso dos produtos PSI-C e PSI-D, as partículas encontram-se distribuídas, respectivamente, na faixa de 8,55 a 39,15 e 8,55 a 32,35 µm (anexos 1.2-1.5).

A tabela 1.21 apresenta os valores de diâmetro-médio de partícula e desvios padrão obtidos pelo método aritmético. Pode-se observar que todos os produtos secos por *spray-drying* apresentaram tamanho de partícula em torno de 20 µm com exceção do PSI-D cujo valor foi de 17 µm, evidenciando que a natureza dos adjuvantes de secagem não foi um fator determinante neste parâmetro. O produto seco somente com Aerosil® (PSI-A) apresentou diâmetro médio inferior ao obtido por

CAMPOS (1966), 53,6 μm , aspecto provavelmente relacionado ao menor teor de resíduo seco da solução de origem (SEI) encontrado no presente trabalho.

Tabela 1.21. Diâmetro médio de partícula e desvio padrão granulométrico dos produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis*.

Ensaio	PSI-A	PSI-B	PSI-C	PSI-D
Diâmetro médio (μm)	21,86	21,93	20,02	17,00
Desvio padrão (μm)	$\pm 5,57$	$\pm 5,00$	$\pm 5,79$	$\pm 5,25$

6.5.1. Validação de método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para doseamento de constituintes polifenólicos presentes nos produtos secos por *spray-drying*

A fim de avaliar a influência da operação de secagem, bem como o uso de adjuvantes sobre os constituintes presentes na solução extrativa inicial, foi realizada a quantificação de polifenóis nos produtos secos, empregando ACLO e RUT como marcadores químicos. Para tanto, empregou-se a mesma metodologia analítica empregada para caracterização da solução extrativa, conforme descrito no item 5.3.1. No entanto, considerando que a SEI foi submetida à secagem por *spray-drying*, na presença de diferentes adjuvantes, fez-se necessária a adequação e validação do método analítico para a quantificação dos constituintes fenólicos nos produtos secos.

A figura 1.10 mostra o perfil cromatográfico em 340 nm da SEI (figura 1.10a) e dos quatro PSI (figura 1.10b), nos quais não foi evidenciada nenhuma alteração no perfil qualitativo dos polifenóis presentes.

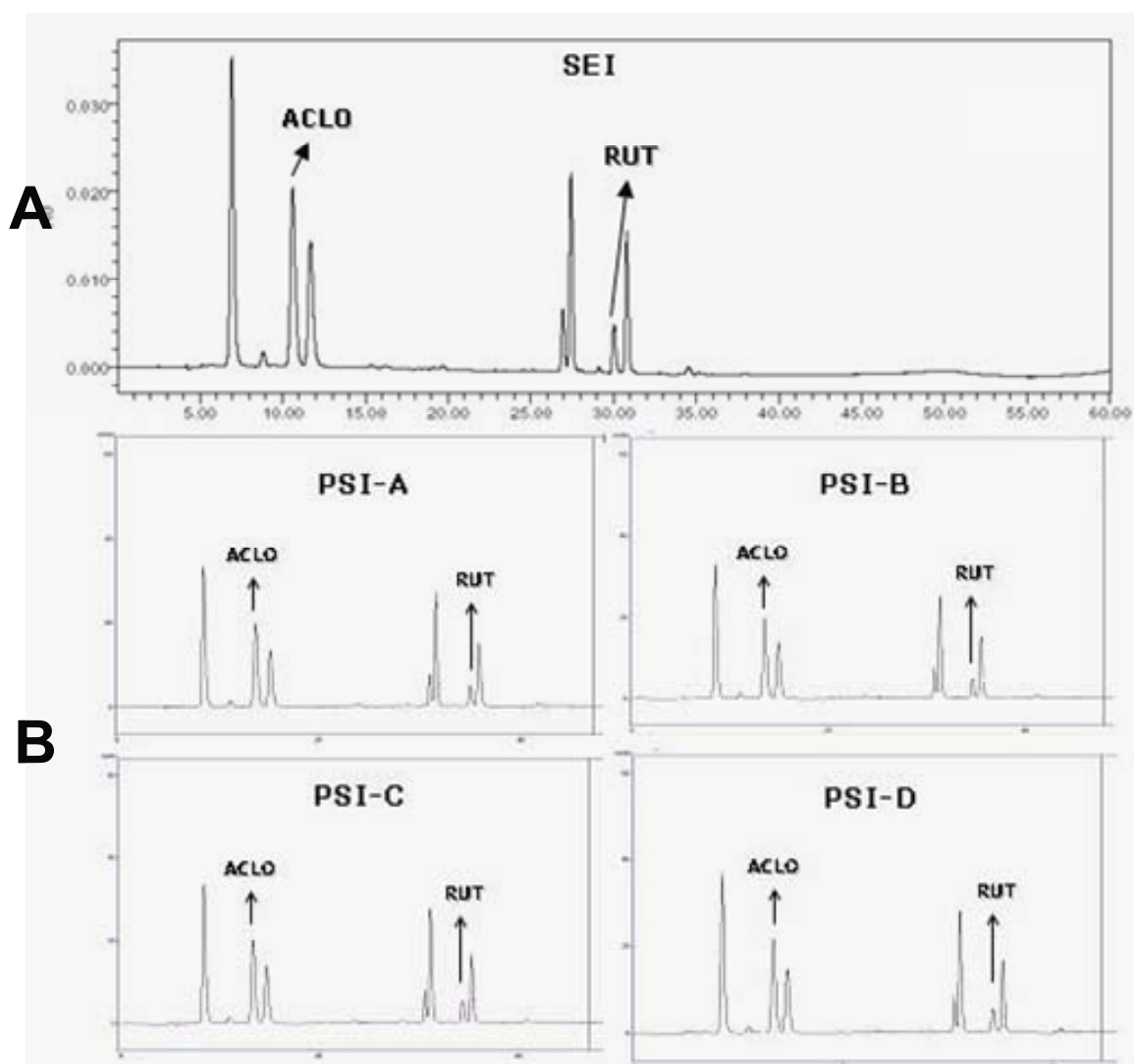


Figura 1.10. Perfil cromatográfico da solução extrativa aquosa (SEI) (A) e dos produtos secos por *spray-drying* (PSI) de *Ilex paraguariensis* (B) obtidos com diferentes adjuvantes de secagem: PSI-A (70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®]); PSI-B (70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Glucidex[®]); PSI-C (70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex[®]); PSI-D (70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Avicel[®]). Ácido clorogênico (ACLO), rutina (RUT).

Apesar do método analítico ter sido validado para a SEI, nova validação foi requerida para os produtos secos, devido à adição de novos adjuvantes farmacêuticos de secagem e a etapa de secagem por *spray-drying*. As melhores características tecnológicas do PSI-A determinaram a sua seleção e a validação da metodologia analítica para este extrato seco.

Os resultados da avaliação da linearidade da curva de calibração do PSI-A estão apresentados na tabela 1.22. A curva de calibração foi construída de modo

que cada ponto analisado estivesse na mesma concentração, em termos de resíduo seco, que a solução extrativa. Considerando os coeficientes de regressão obtidos, evidencia-se ausência de desvios de linearidade na faixa de concentração de 2,0 a 10 $\mu\text{g/ml}$. Os valores de r^2 foram ligeiramente superiores aos encontrados para SEI, resultado que pode ser considerado excelente, considerando a complexidade da amostra e as etapas envolvidas na análise.

Tabela 1.22. Parâmetros de linearidade da análise de produto seco por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* analisada por CLAE.

Pico	r^2	a	b	DPR (%)
ACLO	0,9990	-16535,79	2287347,45	3,26
RUT	0,9980	853,41	387731,40	3,91

r^2 =coeficiente de regressão linear; a= intersecção; b= inclinação; DPR (%) desvio padrão relativo da inclinação da reta em três dias consecutivos; ACLO = ácido clorogênico; RUT = rutina.

A análise dos resultados dos ensaios de precisão intermediária e repetibilidade do PSI-A de *Ilex paraguariensis* (tabela 1.23) demonstrou coeficientes de variação inferiores a 2 % para ambos os ensaios, o que demonstra a boa reprodutibilidade do método para análise dos polifenóis no PSI-A.

Tabela 1.23. Precisão intermediária do produto seco por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis*.

Pico	Precisão intermediária		Repetibilidade	
	Concentração \bar{Y} (mg/ml)	DPR (%)	Concentração \bar{X} (mg/ml)	DPR (%)
ANEO	44,84 ^a	0,57	44,81 ^a	0,58
ACLO	32,92	0,60	32,89	0,58
ACPT	22,38 ^a	0,73	22,37 ^a	0,58
P4	7,09 ^a	1,03	7,00 ^a	0,84
P5	24,65 ^a	1,23	24,33 ^a	0,97
RUT	11,33	0,86	11,54	0,60
P6	18,42 ^a	0,92	18,34 ^a	1,18

^a calculado como ácido clorogênico; DPR (%): desvio padrão relativo percentual.

\bar{Y} = média de três determinações

\bar{X} = média de três determinações

ACLO = ácido clorogênico; ACNEO = ácido neo-clorogênico; ACPT = ácido cripto-clorogênico; RUT = rutina.

A tabelas 1.24 e 1.25 apresentam os resultados da recuperação do ácido clorogênico e rutina no PSI-A de *Ilex paraguariensis*, demonstrando uma recuperação média de 98,88 % e 99,91 %, respectivamente para ACLO e RUT, e valores de CV% inferiores a 1 %, em todas as concentrações analisadas. Esses resultados permitem inferir que o adjuvante de secagem presente no PSI-A de *Ilex paraguariensis* não interferiu no doseamento dos marcadores em questão.

Tabela 1.24. Exatidão do método de doseamento de ácido clorogênico em produtos secos de *Ilex paraguariensis*.

Acido clorogênico			
Concentração teórica (µg/ml)	Concentração experimental (µg/ml)	Recuperação (%) \bar{X} (DPR %)	Recuperação média (%) \bar{X} (DPR %)
11,31	11,21	99,12 (0,29)	
13,31	12,91	97,02 (0,07)	98,88 (1,73)
15,31	15,39	100,49 (0,32)	

\bar{X} : valor médio; DPR (%): desvio padrão relativo percentual.
ACLO = ácido clorogênico; RUT = rutina.

Tabela 1.25. Exatidão do método de doseamento de rutina em produtos secos de *Ilex paraguariensis*.

Rutina			
Concentração teórica (µg/ml)	Concentração experimental (µg/ml)	Recuperação (%) \bar{X} (DPR %)	Recuperação média (%) \bar{X} (DPR %)
3,37	3,40	100,83 (0,32)	
4,37	4,42	101,19 (0,43)	99,91 (0,25)
5,37	5,25	97,71 (0,93)	

\bar{X} : valor médio; DPR (%): desvio padrão relativo percentual.
ACLO = ácido clorogênico; RUT = rutina.

Os resultados dos teores de polifenóis presentes nos diferentes PSI são apresentados na tabela 1.26. Comparando-se os resultados, observa-se que entre as diferentes formulações de PSI, não houve diferenças significantes nos teores dos polifenóis analisados, sugerindo que os adjuvantes de secagem empregados não interferiram neste parâmetro. Observa-se, também, que a secagem determinou a

concentração destes constituintes, apresentando-se estes em concentrações cerca de 20 vezes superiores nos produtos secos, comparativamente à solução extrativa que lhes deu origem (tabela 1.12).

Tabela 1.26. Teor de polifenóis presentes nos produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis*.

Pico	PSI-A	PSI-B	PSI-C	PSI-D
	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração
	(mg/g) \bar{x} (s)	(mg/g) \bar{x} (s)	(mg/g) \bar{x} (s)	(mg/g) \bar{x} (s)
ANEO	44,71 (0,416)	47,04 (0,200)	48,04 (0,045)	52,82 (0,204)
ACLO	32,83 (0,287)	35,30 (0,226)	35,57 (0,217)	39,03 (0,174)
ACPT	22,33 (0,191)	24,96 (0,164)	24,05 (0,614)	26,84 (0,131)
P4	7,07 (0,077)	8,22 (0,235)	8,45 (0,070)	9,07 (0,026)
P5	24,58 (0,295)	26,33 (0,187)	29,17 (0,106)	30,95 (0,133)
RUT	11,50 (0,104)	10,76 (0,045)	11,23 (0,060)	12,13 (0,045)
P6	18,57 (0,268)	19,83 (0,094)	21,20 (0,067)	22,58 (0,099)

\bar{x} : valor médio; s: desvio padrão.

ACLO = ácido clorogênico; ANEO = ácido neo-clorogênico; ACPT = ácido cripto-clorogênico; RUT = rutina.

6.5.2. Avaliação preliminar da estabilidade frente à luz

A luz é um fator ambiental que pode desencadear reações de degradação, tais como oxidação e redução, rearranjo de anéis, polimerização, rupturas de ligações, isomerizações, racemizações e promover instabilidade em produtos farmacêuticos, alimentícios ou cosméticos (LEITE, 2005).

Como os produtos secos por *spray-drying* apresentam em sua composição constituintes fenólicos, derivados do ácido clorogênico, que possuem hidroxilas ligadas ao anel aromático e duplas ligações conjugadas, são passíveis de sofrer fácil degradação, por oxidação. Sua labilidade os torna passíveis de serem eleitos, também, como os constituintes indicadores de estabilidade dos produtos secos.

A análise dos cromatogramas obtidos por CLAE revelou que não houve aparecimento de novos picos, bem como alteração nos tempos de retenção DOS picos quantificados. É importante salientar que o método analítico desenvolvido mostrou-se promissor como ferramenta para avaliação destes acontecimentos. A figura 1.11 apresenta o comportamento dos constituintes fenólicos presentes nos produtos secos por *spray-drying*, após exposição de luz em 254 nm, durante 48 horas. Observa-se uma queda de concentração nas primeiras 24 horas seguida de pequena estabilização em 48 horas para todos os produtos secos. Dentre os produtos secos, PSI-B apresentou pior desempenho quanto à fotoproteção e, comparativamente, o maior teor de umidade residual (8,26 %). Observa-se, ainda, que nos extratos PSI-B, PSI-C e PSI-D o percentual de degradação dos constituintes fenólicos, após 48 horas de exposição, variou de 12 a 31 %, em média. O perfil de degradação tanto dos ácidos cafeoilquínicos, quanto dicafeoilquínicos foi bastante semelhante. A degradação foi significativamente menor para o PSI-A, cujo percentual situou-se entre 2 a 13 % (figura 1.12 e tabela 1.27), sendo este o produto que apresentou menor teor de umidade residual (5,43 %). Entre os ácidos cafeoilquínicos presentes no PSI-A, o ácido cripto-clorogênico (ACPT) parece sofrer menor interferência desta fonte energética, seguido do ácido neo-clorogênico (ANEQ) e ácido clorogênico (ACLO). Para os ácidos dicafeoilquínicos, o pico P5 parece ser o menos sensível, seguido de P4 e P6.

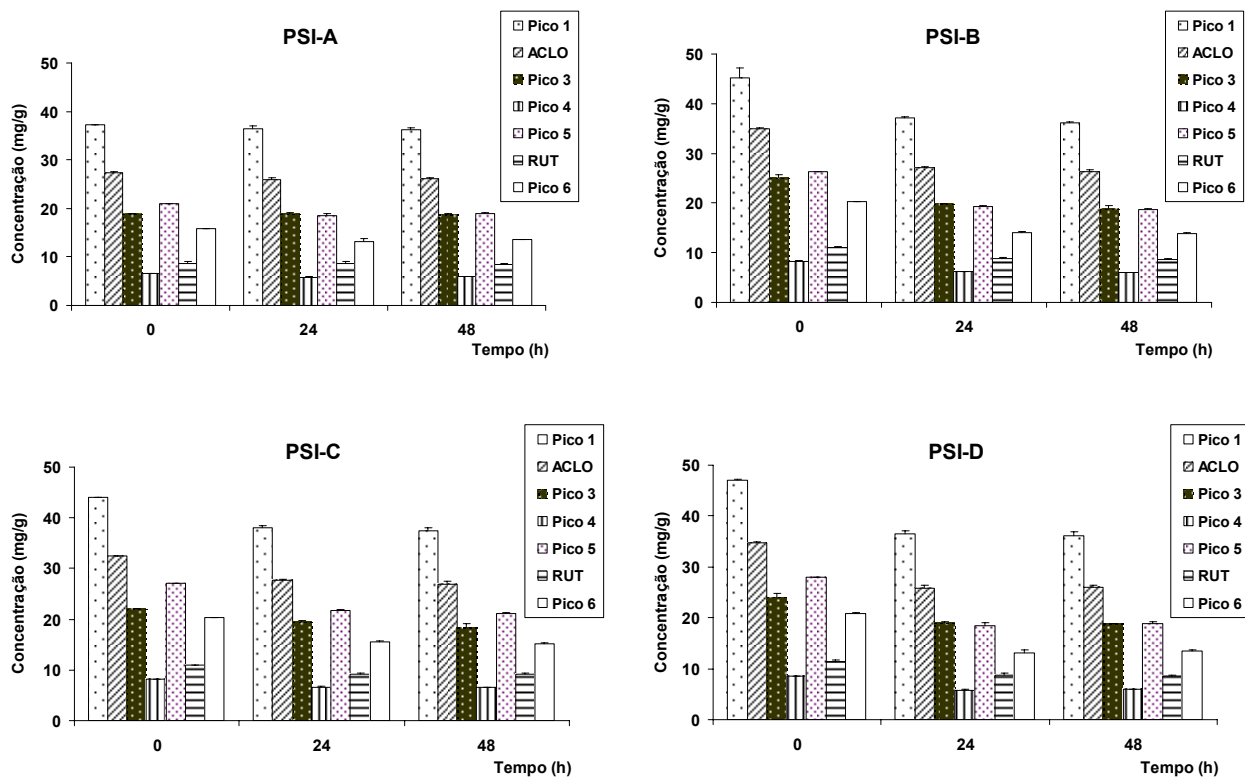


Figura 1.11. Polifenóis em produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* em teste de fotoestabilidade: exposição à luz, 254 nm. Pico1: ácido neo-clorogênico; ACLO: ácido clorogênico; Pico 3: ácido cripto-clorogênico; Picos 4, 5 e 6: ácidos dicafeoilquínicos; RUT: rutina.

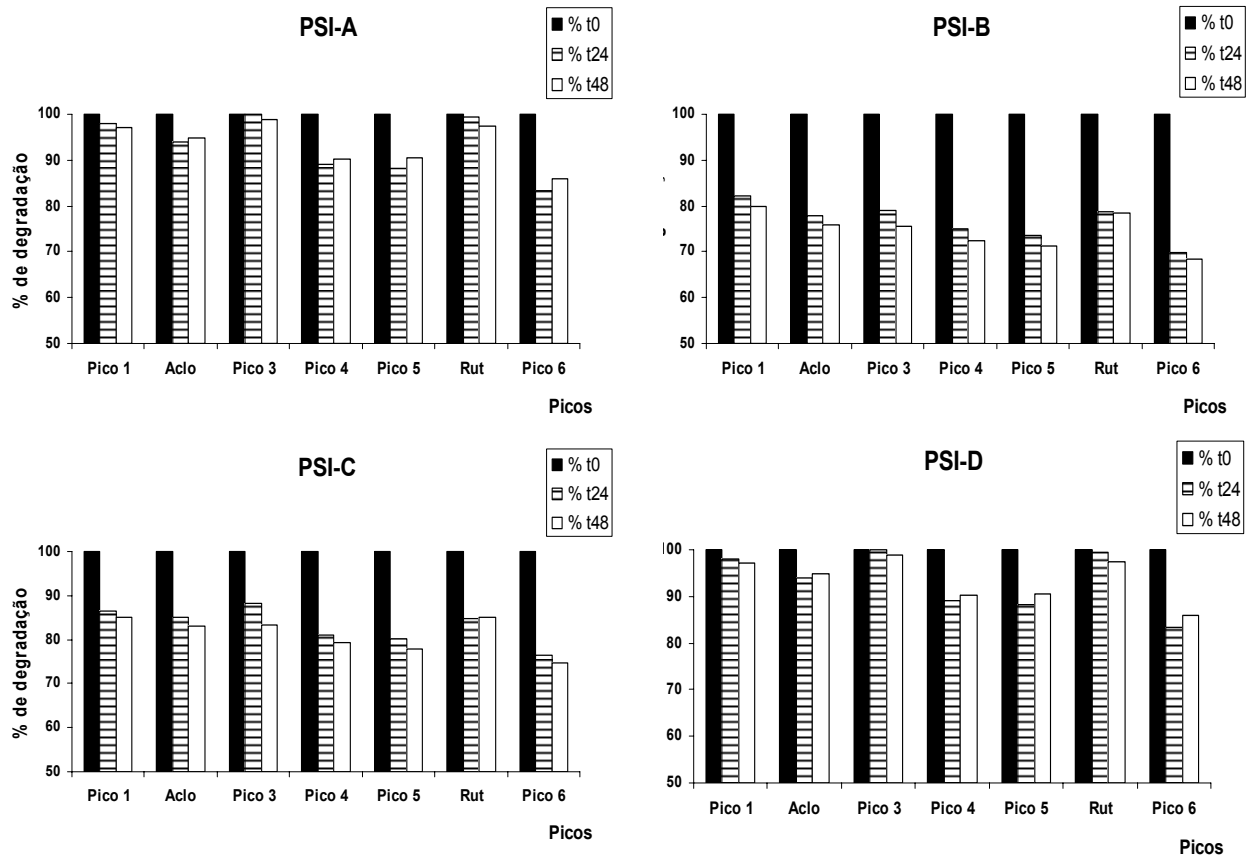


Figura 1.12. Polifenóis em produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis*, em teste de fotoestabilidade: exposição à luz, 254 nm. Pico1: ácido neo-clorogênico; Aclo: ácido clorogênico; Pico 3: ácido cripto-clorogênico; Picos 4, 5 e 6: ácidos dicafeoilquínicos; Rut: rutina.

Tabela 1.27. Percentual de degradação dos polifenóis, nos produtos secos por *spray-drying* expostos à luz em 254 nm, ao final de 48 horas.

Degradação após de 48 h (%) \bar{X} *				
Pico	PSI-A	PSI-B	PSI-C	PSI-D
ANEO	2,74	19,99	14,92	12,08
ACLO	5,21	24,27	17,04	14,55
ACPT	1,21	24,48	16,79	15,97
P4	9,91	27,61	20,56	17,72
P5	9,60	28,63	22,14	19,41
RUT	2,52	21,67	15,05	16,33
P6	13,95	31,50	25,37	22,96

* Valores corrigidos com base na umidade residual dos extratos, admitida como perda por dessecação.

ACLO = ácido clorogênico; ANEO = ácido neo-clorogênico; ACPT = ácido cripto-clorogênico; RUT = rutina.

PSI-A: 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil®

PSI-B: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil® + 15 % Glucidex®

PSI-C: 70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex®

PSI-D: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil® + 15 % Avicel®

A figura 1.13 apresenta o comportamento dos compostos polifenólicos presentes nos produtos secos por *spray-drying*, após exposição de luz em 352 nm, durante 48 horas. Observa-se uma queda de concentração nas primeiras 24 horas seguida de pequena estabilização em 48 horas para todos os produtos secos, sendo ligeiramente mais acentuada para os produtos PSI-B e PSI-C. Observa-se, ainda, que nos produto PSI-B houve degradação mais acentuada tanto dos ácidos cafeoilquínicos e dicafeoilquínicos, como da rutina.

A degradação foi significativamente menor para o PSI-A, cujo percentual situou-se entre 1 a 24 % (figura 1.14 e tabela 1.28). Entre os ácidos cafeoilquínicos presentes no PSI-A, ácido neo-clorogênico (ANEO) parece sofrer menor interferência desta fonte energética, seguido do ácido cripto-clorogênico (ACPT) e ácido clorogênico (ACLO).

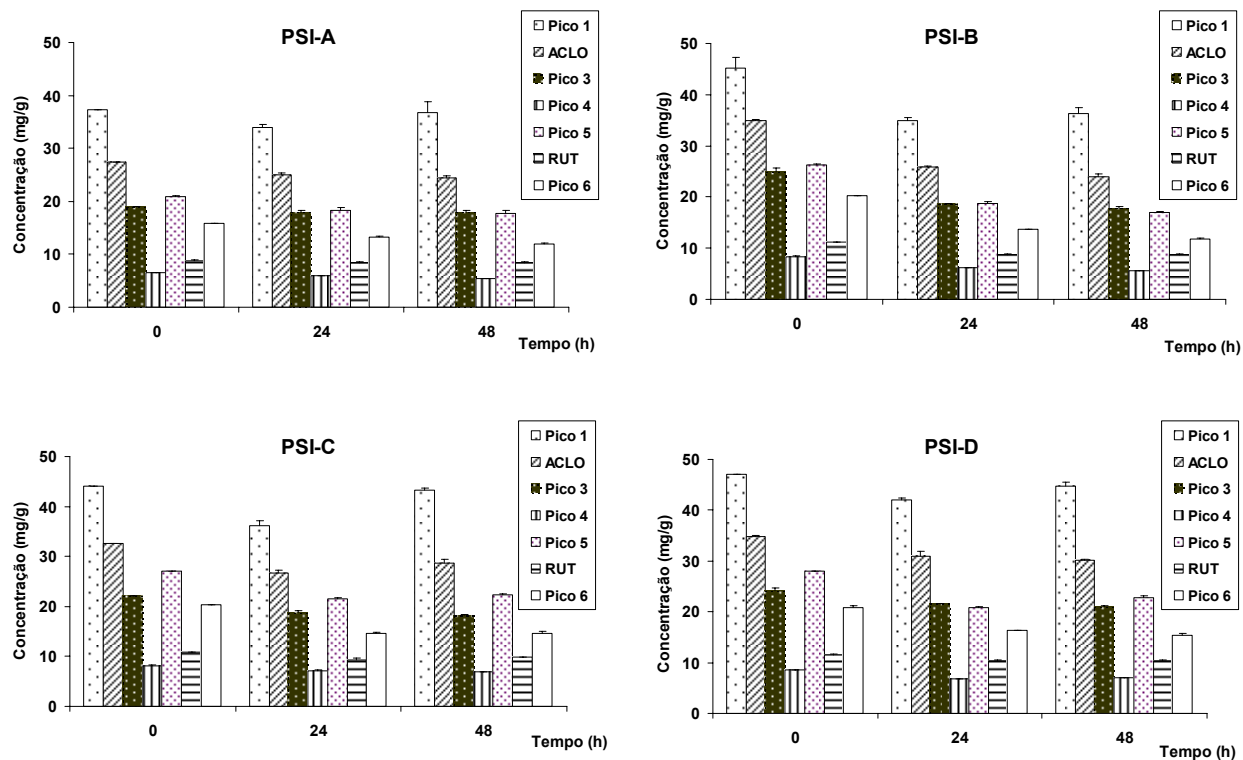


Figura 1.13. Polifenóis em produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis*, em teste de fotoestabilidade: exposição à luz, 352 nm. Pico1: ácido neo-clorogênico; ACLO: ácido clorogênico; Pico 3: ácido cripto-clorogênico; Picos 4, 5 e 6: ácidos dicafeoilquínicos; RUT: rutina.

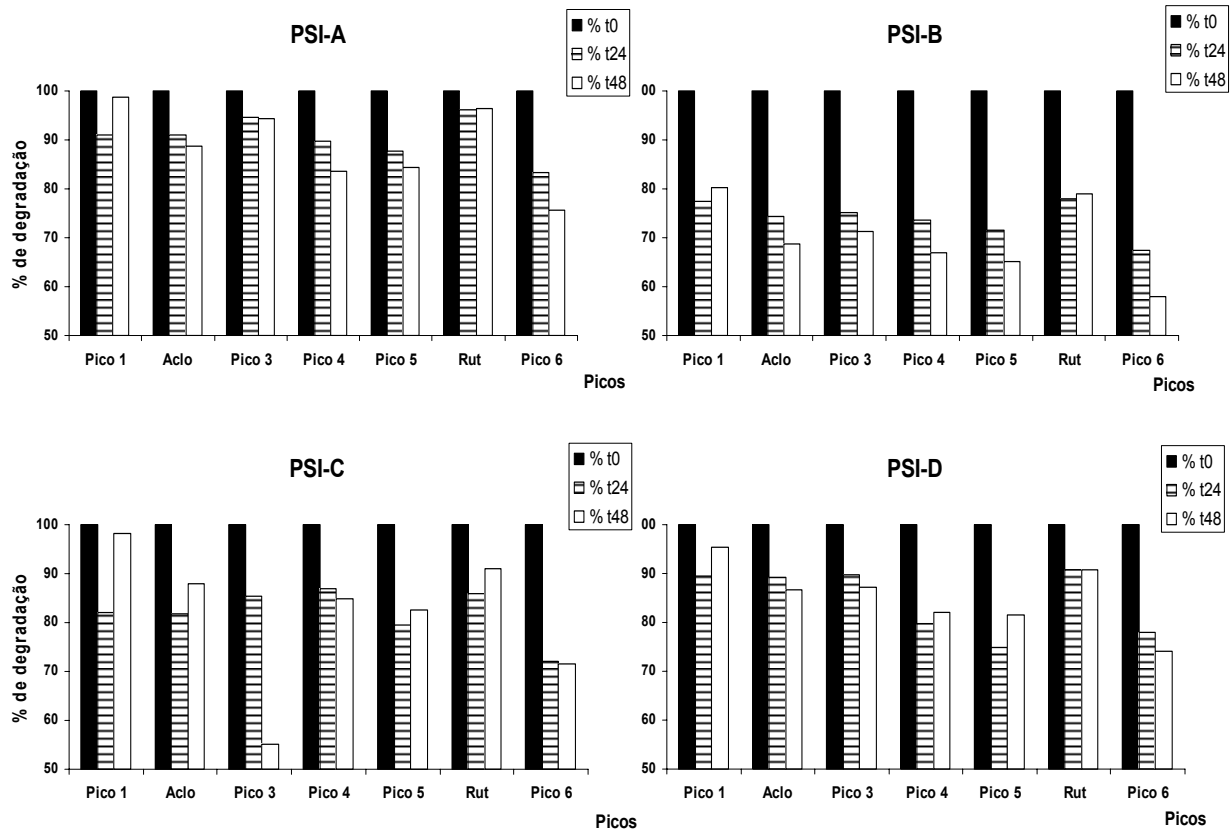


Figura 1.14. Polifenóis em produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis*, em teste de fotoestabilidade: exposição à luz, 352 nm. Pico1: ácido neo-clorogênico; Aclo: ácido clorogênico; Pico 3: ácido cripto-clorogênico; Picos 4, 5 e 6: ácidos dicafeoilquínicos; Rut: rutina.

Tabela 1.28. Polifenóis, nos produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* em teste de fotoestabilidade: 352 nm, ao final de 48 horas.

Degradação após de 48 h (%) \bar{X}				
Pico	PSI-A	PSI-B	PSI-C	PSI-D
ANEO	1,21	19,66	1,79	4,72
ACLO	11,18	31,18	12,05	13,25
ACPT	5,53	28,80	44,75	12,89
P4	16,46	33,13	15,18	17,84
P5	15,57	34,98	17,45	18,55
RUT	3,66	21,04	8,99	9,31
P6	24,35	42,04	28,37	25,89

* Valores corrigidos com base na umidade residual dos extratos, admitida como perda por dessecação.

ACLO = ácido clorogênico; ANEO = ácido neo-clorogênico; ACPT = ácido cripto-clorogênico; RUT = rutina.

PSI-A: 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil®

PSI-B: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil® + 15 % Glucidex®

PSI-C: 70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex®

PSI-D: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil® + 15 % Avicel®

Em suma, pode-se concluir que o produto seco contendo somente Aerosil® em sua composição (PSI-A) mostrou-se o mais estável frente ao teste de estabilidade a que os PSI foram submetidos, no que se refere à fração polifenólica presente, sugerindo um efeito protetor do dióxido de silício coloidal, utilizado como adjuvante. Ainda não é possível inferir sobre o mecanismo pelo qual ocorre esta proteção, no entanto, a hipótese de forte interação das hidroxilas fenólicas com as hidroxilas presentes no dióxido de silício coloidal não pode ser descartada.

6.5.3 Produção e caracterização de produto seco por *spray-drying* para a realização dos ensaios *in vivo*

O rendimento da operação de secagem apresentado para o produto PSI-A L02 (tabela 1.29) foi consideravelmente superior quando comparado ao produto PSI-A (tabela 1.18). Este rendimento pode ser justificado pelo volume maior de solução extrativa que foi atomizada.

Tabela 1.29. Parâmetros tecnológicos de produto seco por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* empregado nos ensaios *in vivo*.

Característica	PSI-A L02
Rendimento (%)	78,98
Características físicas	Pó amarelo, claro, fino
Teor de umidade (%)	3,36 ± 0,002
Densidade bruta (g/ml)	0,642 ± 0,022
Densidade de compactação (g/ml)	0,860 ± 0,007
Fator de Hausner	1,34 ± 0,037
Índice de Carr (%)	25,36 ± 2,020
Índice de densificação (ml)	3,33 ± 0,629
Ângulo de repouso	33,50 ± 2,446

PSI-A L02: produto seco lote 02 (70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil®)

Através da análise do histograma do produto seco por *spray-drying* produzido no lote 02 podemos constatar que as partículas do PSI-A encontram-se distribuídas entre 10,50 e 17,50 µm (Anexo 1.6).

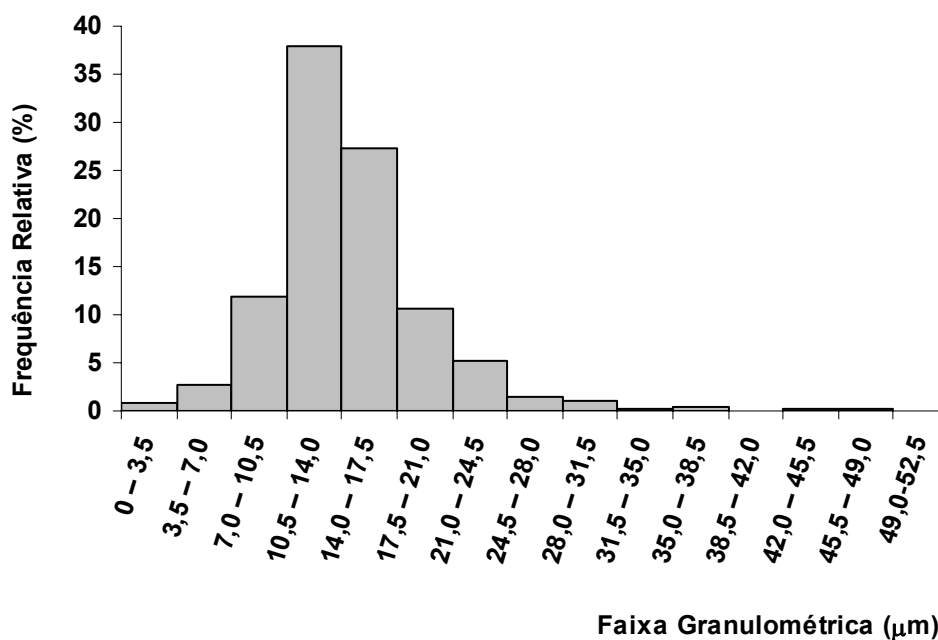


Figura 1.15. Distribuição granulométrica do produto seco por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* PSI-A (70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil®) lote 02, produzido em escala semi-industrial.

O diâmetro médio, calculado pelo método matemático foi de 14,42 e o desvio-padrão (σ_g) de $\pm 1,25$, caracterizando a distribuição granulométrica para o PSI-A L02 como estreita (WELLS, 1988).

Na tabela 1.30 são apresentados os resultados dos teores de polifenóis apresentados pelo PSI-A L02 em comparação ao PSI-A. Observa-se que apesar das diferenças apresentadas na composição dos derivados cafeoilquínicos e dicafeoilquínicos, no somatório dos picos não foram evidenciadas diferenças entre os dois produtos.

Tabela 1.30. Comparação do teor de polifenóis presentes nos produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis*.

Pico	PSI-A Concentração (mg/g) \bar{x} (s)	Polifenóis totais (mg/g)	PSI-A L02 Concentração (mg/g) \bar{x} (s)	Polifenóis totais (mg/g)
ANEO	44,71 (0,416)		37,29 (0,277)	
ACLO	32,83 (0,287)		33,17 (0,616)	
ACPT	22,33 (0,191)		30,95 (0,300)	
P4	7,07 (0,077)	161,59	11,69 (0,046)	166,33
P5	24,58 (0,295)		17,61 (0,107)	
RUT	11,50 (0,104)		10,04 (0,196)	
P6	18,57 (0,268)		25,58 (0,079)	

\bar{X} : valor médio; s: desvio padrão.

ACLO = ácido clorogênico; ANEO = ácido neo-clorogênico; ACPT = ácido cripto-clorogênico; RUT = rutina.

PSI-A: 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®] obtido por secagem de 5 L de solução extrativa.

PSI-A L02: 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®] obtido por secagem de 30 L de solução extrativa.

7. CONCLUSÕES

- O método por cromatografia líquida de alta eficiência, desenvolvido e validado, permitiu a detecção de ácido clorogênico (ACLO) e rutina (RUT) tanto na matéria-prima vegetal, como nos intermediários de processamento (solução extrativa, produtos secos por *spray-drying* e frações polifenólicas) obtidos de *Ilex paraguariensis*.
- O processo de fracionamento levou à obtenção de duas frações distintas, denominadas FAB e FF, as quais apresentaram maior teor de polifenóis quando comparadas ao extrato seco liofilizado que as originou.
- A secagem da solução extrativa aquosa de *Ilex paraguariensis*, em escala semi-industrial, permitiu a obtenção de produtos secos cujos rendimentos de processo variaram de 40 a 60 %. A adição de adjuvantes de secagem mostrou-se necessária para a melhoria das características tecnológicas dos produtos obtidos, no entanto não foi suficiente para evitar a higroscopia dos mesmos.
- Não houve diferença significativa nos teores de polifenóis entre os quatro extratos, denotando que a natureza dos adjuvantes empregados, bem como a técnica de secagem não exercem influência sobre este parâmetro.
- O produto seco por *spray-drying* PSI-A, contendo 30 % de Aerosil® como adjuvante de secagem, apresentou melhores características tecnológicas que os demais produtos. Entre os parâmetros destaca-se menor teor de umidade residual, maior rendimento operacional e proteção frente à fotodegradação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

AL-KHATIB, G.R.; DUGGAL, M.S.; TOUMBA, K.J. An evaluation of the acidogenic potential of maltodextrins in vivo. **Journal of Dentistry**, v. 29, p. 409-414, 2001.

ANDRADE, F.M. **Avaliação de biomassa, clorofila, cafeína e tanino em *Ilex paraguariensis* Saint-Hilaire, crescendo sob sombreamento e pleno sol.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Florestal, UFPR, Curitiba, 2004.

BALTASSAT, F.; DARBOUR, N.; FERRY, S. Étude du contenu purique de drogues a caféine: I. Le maté: *Ilex paraguariensis* Lamb. **Plantes médicinales et phytothérapie**, v. 23, n. 4, p. 195-203, 1984.

BASSANI, V.L. **Valorization de formes galêniques végétales desalcoolisation et concentration de solutions extratives sur membrane d'osmose inverse.** Tese (Tese de Doutorado) - Faculté de Pharmacie, Montpellier, 1990.

BOLETIM CACEX. Rio de Janeiro: CACEX, 1995.

BRAVO, L., GOYA, L., LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, 2007, 40, 193-405.

CAMPOS, A.M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Erva-mate).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1996.

CARINI, M.; MAFFEI FACINO, R.; ALDINI, G.; CALLONI, M.; COLOMBO, L. Characterization of Phenolic Antioxidants from mate (*Ilex paraguariensis*) by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and liquid Chromatography/Tandem mass Spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, p. 1813-1819, 1998.

CARVALHO, E. L. S. **Desenvolvimento de produto seco nebulizado de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss – Celastraceae (espinheira-santa).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1997.

CASADEBAIG, J.L. **Realization d'extraits secs nebulisés. Optimization de formes galêniques de origine végétale a activité diuretique.** Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculté de Pharmacie, Montpellier, 1987.

CHANDRA, S e MEJIA, E. G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant capacity, and Quinone Reductase Activity of na Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHRONAKIS, I.S. On the molecular Characteristics, Compositional Properties, and Structural-Funtional Mechanisms of Maltodextrins : A Review. **Critical Reviews on Food Science**, v. 38, n. 7, p. 599-637, 1998.

COELHO, G.C. **Teores de metilxantinas, saponinas e morfologia foliar de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) sob a influência de diferentes fatores ambientais e em diferentes variedades de populações.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2002.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: IBDF, 1969. v. 4.

COUTO, A.G. **Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado contendo produto seco nebulizado de *Phyllanthus niruri* L. *Eufhorbiaceae* (quebra-pedra).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2000.

DA SILVA, D.M. **Desenvolvimento de forma farmacêutica semi-sólida contendo extrato padronizado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Asteraceae*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2003.

DE PAULA, I.C. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC. *Compositae* – marcela.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1997.

DE SOUZA, K.C.B. **Avaliação biológica de preparações obtidas a partir das**

inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Marcela). Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2002.

DE SOUZA, K.C.B. **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1997.

DE SOUZA, T.P. **Influência de adjuvantes farmacêuticos sobre as características tecnológicas de compactos contendo alto teor de produto seco nebulizado de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss (*Celastraceae*).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1999.

DEUTSCHES Arzneibuch. 9. Ausgabe. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1986.

EDWIN, G.; REITZ, R. Aquifoliáceas. In: REITZ, R. (Ed.). **Flora Ilustrada Catarinense. I parte.** Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1967.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. Ed., São Paulo: Andrei, 1988.

FDA: Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001.

FILIP, R.; LOPEZ, P.; CAUSSIO, J.; FERRARO, G. Mate substitutes or adulterants: study of xantine content. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 129-131, 1998.

FILIP, R.; LOPEZ, P.; GIBERT, G.; CAUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 774-778, 2001.

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

GARCIA PAULA, R.D de. Contribuição ao estudo dos alcalóides do mate. **Revista Brasileira de Química**, v. 54, p. 492-494, 1962.

GARCIA PAULA, R.D de; BROOKS, G. Bioquímica do mate: o tanóide do mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Isolamento e identificação. **Revista de Química Industrial**, p. 72-74, 1953.

GAUDY, D. **Contribution à l'optimisation des préparations galéniques à base de Noix vomique: mises au point technologique et analytique.** Montpellier: Unité de Formation et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 1987. Tese (Doutorado em Farmácia).

GAUDY, D.; PUECH, A.; JACOB, M. Rôle de l'adjuvant dans l'optimisation de la production d'un extrait de Noix vomique. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 66, n. 1, p. 5-10, 1991.

GILBERT, G. C. Ilex en sudamerica: florística sistemática y potencialidades com relación a un banco de germoplasma para la yerba mate. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E.A. **Erva-mate; biologia e cultura no Cone Sul.** Porto Alegre: UFRGS, 1995. p.303-312.

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

GNOATTO, S. C. B.; BASSANI, V. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Influência do Método de Extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.-HIL., Aquifoliaceae). **Química Nova** (Online), v. 30, p. 304-307, 2007.

GNOATTO, S.C.B. **Metodologias Analíticas para Quantificação de Marcadores Químicos em Preparações de *Ilex paraguariensis* (A. St. Hil.) e Desenvolvimento de Extrato Seco por Nebulização.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2002.

GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.; SELIGMANN, O. A new saponin from mate, *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1367-1370, 1989.

GUYOT, J.C.; ARNAUD, P.; BECOURT, P.; CASSIERE, J.P.; CHULIA, D.; DUCHÊNE, D.; FARRAND, D.; GOUAIHARDOU, J.; LANGLOIS, C.; LEQUIEN, C.; MALFROID, F.; POURCELOT, Y.; RENOUX, R.; SERGOT, S.; TORE, P. Commentaires relatifs aux methods générales d'analyse des formes orales solides récemment introduites dans les pharmacopées française et européenne. Report d'une Commission SFSTP. **S.T.P. Pharma Pratiques**, v.5, n.6, p.482-495, 1995.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antitrombin II. **Life Sciences**, v. 72, p. 279-292, 2002.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A.J.C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 35, n. 1, p. 47-56, 1995.

GUTERRES, S. S. **Influência de adjuvantes sobre as características farmacêuticas de cápsulas de gelatina dura contendo hidroclorotiazida**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1990.

GUYOT, J.C.; ARNAUD, P.; BECOURT, P.; CASSIERE, J.P.; CHULIA, D.; DUCHÊNE, D.; FERRAND, D.; GOUAIHARDOU, J.; LANGLOIS, C.; LEQUIEN, C.; MANFROI, F.; POURCELOT, Y.; RENOUX, R.; SEGOT, S.; TOURE, P. Commentaires relatifs aux methods générales d'analyse des formes orales solides récemment introduites dans les pharmacopées française et européenne. Rapport d'une commission SFSTP. **S.T.P. Pharma Pratiques**, v. 5, n. 6, p. 482-494, 1995.

HEBERLÉ, G. **Desenvolvimento de produto seco por aspersão de *Cecropia glazoui* Sneth. (Cecropiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2000.

HERZFELDT, C.D e SCHERER, D. Herstellung von Harthgelatin Kapseln in der Apotheke. **Acta Pharmaceutica Technologica**, v.33, n.3, Suppl. 4, p.1-3, 1987.

ICH. International Conference on Harmonization. Validation of analytical procedures: methodology. Step 4. **Closing Report**. Brussels, 2005.

JACOB, M.; PUECH, A.; DURU, C.; FRESQUET, J. Elaboration d'extraits végétales adsorbés. Obtention d'un extrait de Belladone sur support Aerosil. **Revue Science Technologie Pharmacie**, v. 5, n. 2, p. 79-80, 1976.

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

LEITE, E.G. **Estabilidade: Importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2005.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. *Phytopharmaceutical technology*. Boca Raton: CRC, 1989.

MARTINS, A.G. **Influência de fatores tecnológicos na avaliação analítica e farmacológica de extratos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1998.

MASTERS, K. **Spray-drying**. 2 ed., New York: John Wiley, 1976.

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

MONTANHA, J.A. **Estudo químico e biológico das saponinas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. – Aquifoliaceae.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1990.

MONTGOMERY, D.C. **Diseño y análisis de experimentos.** México: Iberoamérica, 1992.

MOSELE, S.H. **A governança na cadeia agroindustrial da erva-mate na região do Alto Uruguay.** Dissertação (Mestrado) - Centro de Estudos e Pesquisa em Agronegócios, UFRGS, Porto Alegre, 2002.

MOURA, T.F.; GAUDY, D.; JACOB, M.; TEROL, A.; PAUVERT, B.; CHAUVET, A. vitamin C spray-drying: Study of the thermal constraint. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 22, n. 5, p. 393-400. 1996.

OHEM, N. e HÖLZL, J. Some investigations on *Ilex paraguariensis* flavonoids and triterpenes. **Planta Medica**, v. 54, n. 6, p. 576, 1988.

PATHIRANA, M.G.M. e GUPTA, B.K. Determination of angle of repose by shadow tracing method. **Canadian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 30-32, 1976.

PAVEI, C. **Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2004.

PAVEI, C.; GUZZATTO, P.; PETROVICK, .P.R.; GOSMANN, G.; ORTEGA, G. G. Development and Validation of an HPLC method for the characterization and assay of the saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Mate) fruits. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 87-95, 2007.

PECK, C.E.; BAILEY, G.J. McCURDY, V.E.; BANKER, G.S. Tablets Formulation and Design IN: LIBERMEN, H.A.; LACHMAN, I.; SCHWARTS, J.B. (ed) **Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets**. 2ed., v.1, New York: Marcel Dekker, 1989.

PELOZO, M.I.G. **Desenvolvimento e caracterização tecnológica de extrato e do grabulado de *Paullinia cupana* H.B.K var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Guaraná).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UEM, Maringá, 2005.

PUECH, M. **Elaboration d'un extrait sec nebulisé de *Vigne Rouge*. Place des substances auxiliaires.** Montpellier: Faculté de Pharmacie, 1991. Tese (Doutorado em Farmácia).

RAMIREZ-MARES, M. V.; CHANDRA, S.; MEJIA, E.G. In vitro Chemopreventive activity of *Camellia sisensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research**, v. 554, n. 1-2, p. 53-65, 2004.

REGINATTO, F.; ATHAYDE, M.L.; GOSMANN, G., SCHENKEL, E.P. Methylxanthines Accumulation in *Ilex* species – Caffeine and Theobromine in Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 443-446, 1999.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. (Org.) **Projeto madeira do Rio Grande do Sul.** Itajaí: Sudesul; Herbário Barbosa Rodrigues, p. 284-292, 1983.

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

ROBERTS, E.A.H. The chlorogenic acids of tea and maté. **Chemistry and Industry**, v. 37, p. 985-986, 1956.

RUCKER, N.G. de A. **Mercomate: cooperação na competitividade**. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. Departamento de Economia Rural, 1996.

SANTAMOUR JR., F.S. Anthocyanins of holly fruits. **Phytochemistry**, v. 12, p. 611-615, 1973.

SCHENKEL, E.P.; MONTANHA, J.A.; GOSMANN, G. Triterpene saponins from maté, *Ilex paraguariensis*. In: WALLER, G.; YAMASAKI, K. (Ed.). **Saponins used in food and agriculture**. New York: Plenum, p. 47-56, 1996.

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 357-360, 2000.

SCHULTZ, A. **Introdução à Botânica Sistemática**. 5. Ed. Ver. Porto Alegre. Editora da UFRGS, 1985.

SENNA, E.M.L. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureoides* (Lam) DC. COMPOSITAE (marcela)**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia, UFRGS, 1993. Dissertação de Mestrado.

SIESTO, A.J. Separazione mediante procedimento controcorrente della frazione purinica del maté. **Archivio Italiano di Scienze Farmacologiche**, v. 9, p. 194-196, 1959.

SOARES, L. A. L. **Padronização de extrato aquoso e desenvolvimento de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. – Euphorbiaceae (Quebra-Pedra)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1997.

SOERTANO, S. **Comparaison entre divers extraits secs de *Strychnos ligustrina* BL. Aspect Technologique, Analytique et Disponibilité**. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculté de Pharmacie, Montpellier, 1980.

SWARTZ, M.E. e KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, (ed. Port.), p. 12-20, 1998.

TAKETA, A.T.C. **Saponinas de *Ilex brevicuspis* Reissek**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1997.

TEIXEIRA, H.F. **Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. *Compositae* (marcela)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1996.

THOMAS, C e POURCELOT, Y. Perfromulation of five commercial celluloses in drug development: reological and mechanical behaviour. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 19, n.15, p.1947-1964, 1991.

TORMEN, M.J. Economia ervateira brasileira. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E. A.; TARASCONI, L.C. (Org.). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: UFRGS, p. 27-40, 1995.

TRUEBA, G.P.e SÁNCHEZ, G. M. Los flavonoides como antioxidantes naturales. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 20, n. 4, p. 397-306, 2001.

VALDUGA, A.T. **Uso Sustentado e Processamento de *Ilex paraguariensis* St. Hil (Erva-mate)**. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, UFRGS, Porto Alegre, 2002.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. 9. Überarb. Aufl., Stuttgart: Deutsch Apotheker, 2005.

WORLD Helth Organization. **Mate. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 51, p. 273-287, 1990.

ZHI-CHEN, L. **General control methods for vegetable drugs**. Geneva: WHO, 1980.

CAPÍTULO 2

Avaliação da atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* e frações polifenólicas de *Ilex paraguariensis*

1. INTRODUÇÃO

A presença de espécies redoxi-ativas tem sido correlacionada com um grande número de doenças, indicando que estas espécies não têm um papel etiológico na grande maioria dos estados patológicos, mas que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nesses processos (MELLO e MANEGHINI, 1984; HALLIWEL, 2007).

Radical livre é qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados. O elétron desemparelhado que caracteriza esta molécula pode estar centrado num átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou em átomos de metais de transição. Na natureza existem duas importantes substâncias que podem gerar espécies radiculares, o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (NO_2) (REBELO, 1996; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Todos os componentes celulares estão expostos às espécies redoxi-ativas sendo a membrana a estrutura mais atingida, devido à ocorrência de peroxidação lipídica (lipoperoxidação) que leva a alterações na sua estrutura e permeabilidade. Como consequência, há perda de seletividade na troca iônica e liberação de conteúdo das organelas (como enzimas hidrolíticas dos lisossomas), formação de produtos citotóxicos (como malonaldeído), culminando com a morte celular (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007).

Em condições normais, as reações de formação de espécies redoxi-ativas são mantidas sob controle por meio de um sistema de defesa antioxidante do organismo, composto de substâncias que atuam em diferentes níveis. O sistema de defesa primário é constituído de substâncias que impedem a geração ou seqüestram espécies reativas de oxigênio, ou seja, bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar. Neste sistema, encontram-se as enzimas antioxidantes, quelantes, proteínas e substâncias não enzimáticas. O sistema de defesa secundário é formado por compostos fenólicos ou aminas aromáticas, como os tocoferóis, flavonóides, principalmente flavonas e flavonóis (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007).

Os polifenóis estão usualmente presentes em plantas como produtos do metabolismo secundário, exercendo papel importante na sua morfologia e fisiologia, na medida em que estão relacionados a diversos aspectos do crescimento e reprodução das mesmas (BRAVO, 1998). A estes compostos são atribuídas diversas propriedades biológicas tais como antiinflamatórias, antibióticas, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorais, antiasmáticas e antioxidantes (TRUEBA e SÁNCHEZ, 2001).

Os flavonóides têm sido investigados extensivamente desde 1966, em trabalhos que abordam aspectos clínicos e nutricionais destas substâncias, demonstrando que estes constituintes fenólicos reduzem a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e protegem os tecidos da ação de radicais livres sugerindo seu emprego como estratégia na redução do risco de doenças cardiovasculares e risco de câncer (MOURE *et al.*, 2001).

A atividade antioxidante dos flavonóides resulta da combinação de suas propriedades quelantes de metais e seqüestradoras de radicais livres, assim como de inibir oxigenases tais como a lipoxigenase, a cicloxigenase, a mieloperoxidase, a NADPH oxidase e a xantina oxidase. Outros mecanismos podem incluir a inibição de enzimas envolvidas indiretamente nos processos oxidativos e a estimulação de outras com propriedades antioxidantes como a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (TRUEBA e SÁNCHEZ, 2001).

Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças (SOARES, 2002). Isômeros do ácido clorogênico e do ácido caféico são descritos como antioxidantes (BELITZ e GROSCH, 1988; DURÁN e PADILLA, 1993; HARBORNE, 1973). Embora outras características também contribuam para a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres, esta é, geralmente, determinada pelo número de hidroxilas presentes na molécula (RAJALAKSMI e NARASIMHAN, 1995).

A literatura relata para *Ilex paraguariensis* a presença de flavonóides derivados do núcleo canferol, quercetina, rutina, proantocianidina e de diferentes ácidos fenólicos, como clorogênico, caféico, 3,4- e 3,5-dicafeoilquínico, substâncias para as quais tem sido atribuído potencial antioxidante *in vitro* (YOUNES e SIEGERS, 1981; LARSON, 1998; FILIP *et al.*, 2000; KESSLER *et al.*, 2003; CHANDRA e MEJIA, 2004).

Considerando o potencial antioxidante de *Ilex paraguariensis*, bem como dos compostos polifenólicos descritos para a espécie, o Capítulo 2 do presente trabalho tem por objetivo investigar, por meio de ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* o potencial antioxidante de produtos secos por liofilização, *spray-drying* e de frações polifenólicas, obtidos a partir de decocto de *Ilex paraguariensis*, descritos no Capítulo 1.

2. OBJETIVOS

1. Investigar a atividade antioxidante *in vitro* de produtos secos por *spray-drying* e fração polifenólica de *Ilex paraguariensis*;

2. Investigar a atividade antioxidante *ex vivo* de produtos secos por *spray-drying* e fração polifenólica de *Ilex paraguariensis* em homogeneizado de fatias de fígado;

3. Investigar a atividade antioxidante *in vivo* de produto seco por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* em modelo de dano oxidativo hepático induzido por tetracloreto de carbono.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes e espécies redoxi-ativas

Os efeitos dos radicais livres sobre os sistemas biológicos têm estado em evidência nos últimos anos, especialmente nas doenças relacionadas com o aumento destas espécies reativas no organismo e ao envelhecimento precoce. Varias pesquisas têm demonstrado a participação dos radicais livres nos mecanismos fisiopatológicos de algumas patologias de elevada incidência na população ocidental. Assim, qualquer substância que demonstre ter capacidade de neutralização destes radicais, torna-se um alvo importante, já que pode prevenir ou amenizar os problemas causados pelo excesso de espécies redoxi-ativas no organismo (CARBONARI, 2005).

Os radicais livres ou espécies redoxi-ativas são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados na sua órbita externa, geralmente formados pela perda ou ganho de elétrons (oxirredução). Em meio biológico, a maioria das moléculas não se encontra na forma de radicais, permanecendo com elétrons pareados. Entretanto, em determinadas situações, as espécies redoxi-ativas são formadas e podem causar efeitos fisiológicos e patológicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Espécie redoxi-ativa é um termo coletivo que inclui as espécies reativas de oxigênio (ERO), bem como as espécies reativas de nitrogênio (ERN), como pode ser observado na tabela 2.1. “Reativo” não é sempre o termo mais apropriado, uma vez que H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ e óxido nítrico (NO^{\cdot}) reagem, diretamente, com poucas moléculas no corpo humano, enquanto o $^{\cdot}OH$ pode reagir com qualquer molécula (HALLIWELL, 2007).

Tabela 2.1. Principais espécies redoxi-ativas.

Espécies redoxi-ativas de oxigênio	
Radicais	Não radicais
Superóxido ($O_2^{\bullet -}$)	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
Hidroxila ($^{\bullet}OH$)	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
Peroxila (RO_2^{\bullet})	Ácido hipobromoso ($HOBr$)
Alcoxila (RO^{\bullet})	Ozônio (O_3)
Hidroperoxila (HO_2^{\bullet})	Oxigênio singleto (1O_2)

Espécies redoxi-ativas de nitrogênio	
Radicais	Não radicais
Óxido nítrico (NO^{\bullet})	Peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$)
Dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet})	Alquil peroxinitrito ($ROONO$)

Fonte: adaptado de HALLIWELL, 2001.

As espécies redoxi-ativas são formadas pela redução parcial do oxigênio, por meio de sucessivas reações. A transferência de um elétron para o O_2 produz o primeiro intermediário reativo, o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o qual sofre dismutação espontânea a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que não é uma espécie redoxi-ativa. O H_2O_2 sofre uma reação de quebra das ligações entre os átomos de O_2 formando o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), catalisada por metais de transição (reação de Fenton), ou pela combinação do $O_2^{\bullet -}$ com o H_2O_2 (reação de Haber-Weiss) (figura 2.1), (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

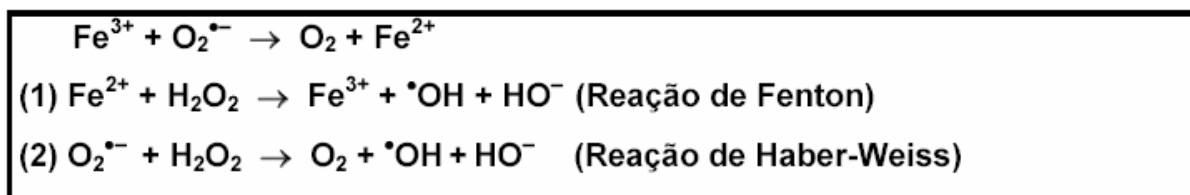


Figura 2.1. Reações de formação do radical hidroxila ($^{\bullet}OH$). Adaptada de HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007.

A formação de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) originado pela adição de um elétron ao oxigênio molecular (O_2), pode ser mediado por enzimas como as NAD(P)H oxidase e xantina oxidase (XO), e não enzimaticamente, por compostos redox-ativos tais como as semi-ubiquinonas da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons.

A enzima superóxido dismutase (SOD) converte enzimaticamente o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 . Nos tecidos, o $O_2^{\cdot-}$ também pode ser convertido não enzimaticamente em H_2O_2 e 1O_2 , (DROGE, 2002). Na presença de metais de transição livres (particularmente ferro ou cobre), $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 podem gerar o radical $\cdot OH$, que é extremamente reativo via reações de Fenton e Haber-Weiss (Figura 2.1). Alternativamente, o H_2O_2 pode ser convertido em H_2O , pelas enzimas catalase (CAT) ou glutaciona peroxidase (GPx). Na reação da GPx, a glutaciona (GSH) é oxidada a glutaciona dissulfeto (GSSG), que pode ser novamente convertida a GSH pela glutaciona redutase (GR) num processo que consome NADPH (figura 2.2), (DROGE, 2002; HADDAD, 2002).

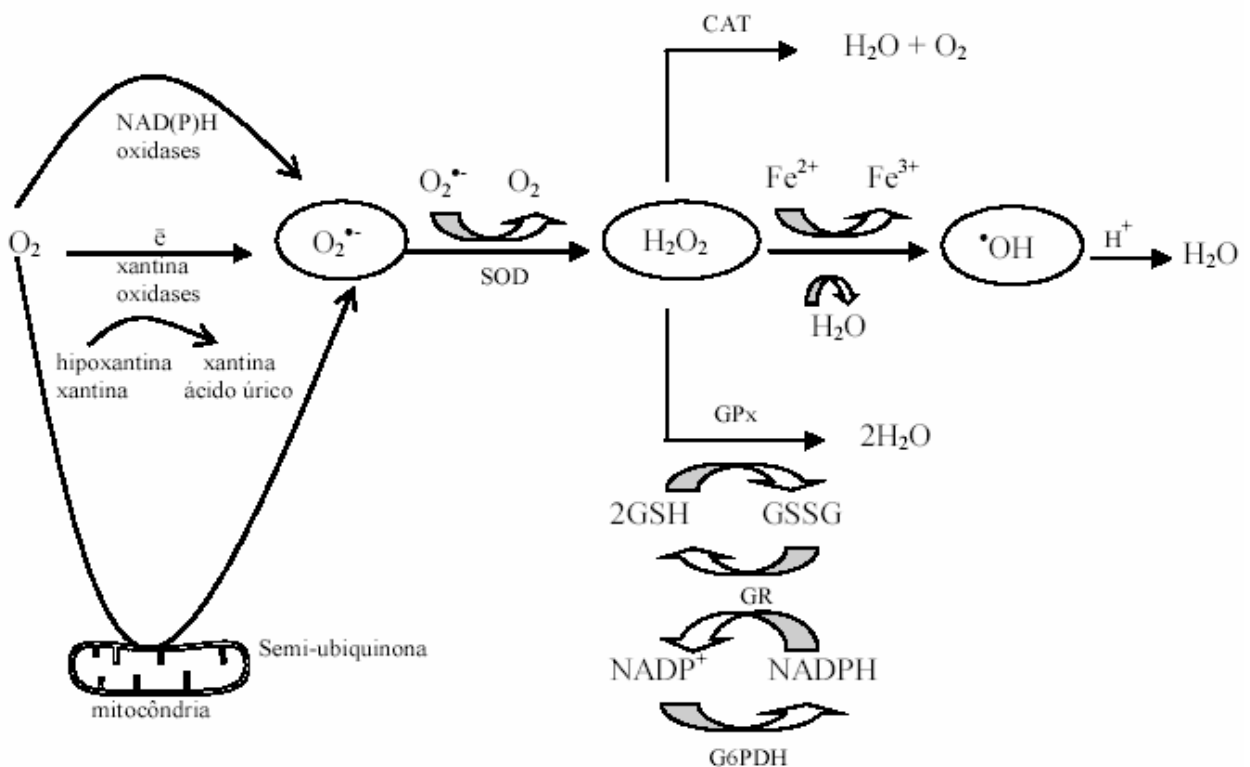


Figura 2.2. Vias de geração de espécies redoxi-ativas e mecanismo de defesa enzimática. Adaptada de DROGE, 2002; HADDAD, 2002 e BECKER, 2004.

O mecanismo de geração de espécies redox-ativas em sistemas biológicos pode ocorrer por inúmeras reações bioquímicas, sendo que quatro destes têm recebido maior atenção: o sistema de β -oxidação peroxisomal, as reações do citocromo P450, a geração de NO^{\bullet} e HOCl no processo fagocítico, e a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, onde acredita-se ocorrer o mecanismo responsável pela produção da maior parte das espécies redoxi-ativas no organismo (BECKMAN e AMES, 1998; PRESTON *et al.*, 2001).

Para minimizar os efeitos deletérios associados à constante formação das espécies redox-ativas, os organismos aeróbicos foram dotados, ao longo do tempo evolutivo, de distintas defesas antioxidantes. Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo este ser enzimáticos, como notadamente a SOD, CAT e GPx, ou não enzimáticos, tais como α -tocoferol (principal componente da vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C), polifenóis e GSH (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Os principais sistemas de defesa antioxidantes enzimáticas celulares são compostos pela SOD, CAT e GPx (figura 2.2), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização dos radicais livres. Secundariamente, a glutathione redutase (GR) e a glutathione S-transferase (GST) auxiliam na regeneração da GSH e na conjugação de metabólitos reativos. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do $\text{O}_2^{\bullet-}$ e de H_2O_2 , evitando assim, a formação do OH^{\bullet} , que embora de vida curta, de fração de segundos, e em reduzida concentração, é extremamente reativo e danoso às células (BOVERIS e CADENAS, 1997).

A SOD, uma metaloenzima, é considerada uma das mais importantes defesas antioxidantes na neutralização das espécies redoxi-ativas e está presente praticamente em todos os organismos eucarióticos, sendo responsável pela conversão do $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). As células humanas apresentam, pelo menos, duas isoformas da SOD, uma mitocondrial que contém manganês no seu sítio ativo (MnSOD), e outra citosólica com cobre e zinco no seu sítio ativo (CuZnSOD) (HALLIWELL, 2001; STEHBENS, 2003).

O H_2O_2 da célula pode ser convertido a H_2O e O_2 por dois tipos de enzimas: CAT e GPx. A CAT está presente na maioria das células aeróbicas, especialmente

concentradas nos hepatócitos e eritrócitos localizando-se, principalmente, em organelas sub-celulares denominadas peroxissomos. Esta enzima é composta de quatro subunidades proteicas, cada uma contendo um grupo heme (FellI-protoporfirina) ligado ao sítio ativo. Já a GPx, uma das poucas classes de enzimas humanas que requer selênio para sua ação, remove H_2O_2 oxidando a GSH à GSSG (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007) (figura 2.2).

A GR auxilia na manutenção do poder redutor intracelular, pois catalisa a redução da GSSG por meio da oxidação de NADPH, permitindo a contínua regeneração da GSH produzida pela ação da GPx (HALLIWELL, 2001).

As GSTs, também desempenham um papel fisiológico importante, iniciando a detoxificação de agentes alquilantes potenciais, incluindo compostos farmacologicamente ativos, entretanto não atuam diretamente contra as espécies redoxi-ativas. Estas enzimas catalisam a conjugação de metabólitos reativos com os grupamentos SH da GSH, neutralizando os sítios eletrofílicos destes compostos e gerando produtos mais solúveis em água (HABIG *et al.*, 1974).

As células também exibem antioxidantes não-enzimáticos que incluem compostos endógenos como a GSH, e outros exógenos como a vitamina E, C e A (além de outros carotenóides como o licopeno e o β -caroteno), polifenóis e outras pequenas moléculas derivadas de fonte vegetais (SCANDALIOS, 1997). Antioxidantes não-enzimáticos podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente, mesmo em baixas concentrações comparadas com o substrato oxidável, são capazes de retardar ou inibir a oxidação deste substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A GSH, um tripeptídeo composto de glutamato, cisteína e glicina, é o principal tiol celular não protéico, mais abundante em células eucariotas, e desempenha um importante papel em muitos tipos de reações de bio-redução e conjugação, tais como: integridade do citoesqueleto, síntese de proteínas (tradução) e de DNA (replicação), transporte de aminoácidos, *scavenger* de radicais livres, transdução de sinais, cofator de enzimas essenciais e defesa contra moléculas oxidantes e xenobióticos potencialmente tóxicos (PEÑA *et al.*, 2000; STEHBENS, 2003). Este tripeptídeo pode conferir proteção contra todas as formas de estresse oxidativo

através de, pelo menos, dois mecanismos: i) nos primeiros momentos do dano oxidativo, a GSH pode agir bloqueando o potencial tóxico das EROs; ii) pode também ajudar a ativar muitos genes que têm a função de extinguir o dano oxidativo (NEBERT, 2000; STEHBENS, 2003).

Em organismos aeróbios saudáveis, a relação entre a produção de espécies redoxi-ativas com os sistemas de defesas antioxidantes estão aproximadamente em equilíbrio. Entretanto, esse equilíbrio nem sempre é perfeito. O estresse oxidativo ocorre como um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante / antioxidante, em favor da situação pró-oxidante, promovendo um dano potencial (SIES, 1993; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O efeito do estresse oxidativo pode resultar em três diferentes processos: i) adaptação por regulação do sistema de defesa antioxidante; ii) lesão tecidual, podendo causar dano a qualquer molécula alvo (DNA, proteínas e lipídios); iii) morte celular por apoptose (HALLIWELL, 2001).

As espécies redox-ativas podem reagir com biomoléculas tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Tanto a ligação peptídica quanto as cadeias laterais podem ser o alvo do ataque de espécies redoxi-ativas (LEVINE, 2002).

O processo de peroxidação lipídica da membrana celular leva a alterações na estrutura e na permeabilidade, levando a perda da seletividade na troca iônica e liberação de conteúdo das organelas (como enzimas hidrolíticas dos lisossomas), podendo tornar o ambiente favorável ao ataque ao DNA da cromatina por outros tipos de espécies radicalares, culminando com a morte celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A lipoperoxidação é utilizada como um sinal do estresse oxidativo celular e auxiliar no reconhecimento de danos oxidativos em organismos com algumas patologias, ocorrendo numa seqüência de reações já conhecida. Inicialmente, um átomo de hidrogênio é seqüestrado do ácido graxo contendo, ao menos, duas duplas ligações separadas por metilenos intercalados (LH), originando um radical livre centrado no carbono (radical lipídico) (L[•]) com um rearranjo das duplas ligações (conjugação de dienos). Esta fase é seguida pela interação do L[•] com o oxigênio

molecular (O_2), para formar um radical peroxila (LOO^\bullet), que pode então retirar um átomo de hidrogênio tanto do LH adjacente (induzindo uma reação de propagação), como de outro doador de hidrogênio como, por exemplo, um antioxidante (figura 2.3). Em ambas as circunstâncias, um hidroperóxido de ácido graxo (LOOL) é formado (ERNSTER e HOCHSTEIN, 1994; HERMES-LIMA *et al.*, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

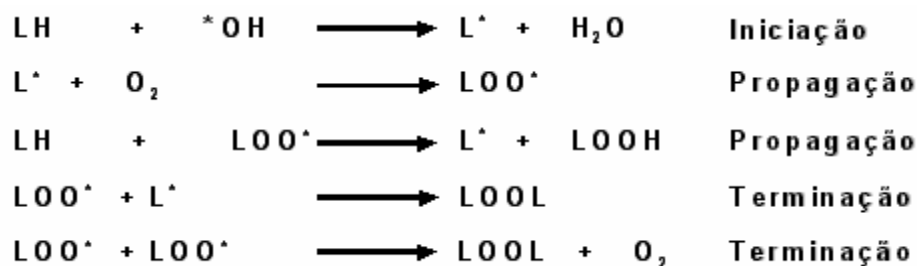


Figura 2.3. Representação esquemática das reações de iniciação e propagação da LPO. Adaptada de HERMES-LIMA *et al.*, 1995.

As conseqüências mais comuns da lipoperoxidação correspondem à perturbação das funções essenciais das membranas celulares e organelas, incluindo o processo de transporte transmembrana, a transdução de sinais mediada por receptores, e a preservação do gradiente de íons e metabólitos (ERNSTER e HOCHSTEIN, 1994).

Os níveis elevados de espécies redoxi-ativas no organismo parecem ser um dos maiores contribuintes para o envelhecimento (HARMAN, 1992), e para muitos processos degenerativos como o câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, cataratas dentre outros (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

3.2. Atividade antioxidante de polifenóis

Em condições normais, as reações de formação de espécies reativas de oxigênio são mantidas sob controle por meio de um sistema de defesa antioxidante do organismo composto de substâncias que atuam em diferentes níveis. O sistema de defesa primário é constituído de substâncias que impedem a geração ou

seqüestram espécies reativas de oxigênio, ou seja, bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar. Neste sistema encontram-se as enzimas antioxidantes, quelantes e proteínas e substâncias não enzimáticas. O sistema de defesa secundário é formado por compostos fenólicos ou aminas aromáticas, como os tocoferóis, flavonóides, principalmente flavonas e flavonóis (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007).

Os polifenóis são constituintes amplamente distribuídos em plantas, aos quais são atribuídas diversas propriedades biológicas tais como antiinflamatórias, antibióticas, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorais, antiasmáticas e antioxidantes. Os flavonóides, por exemplo, dividem-se em 13 subclasses, que apresentam em comum um esqueleto hidrocarbonado do tipo C₆-C₃-C₆ (difenílpropano), cada porção de seis carbonos compreende um anel aromático e a de três carbonos um heterociclo, conforme mostrado na figura 2.4 (TRUEBA e SÁNCHEZ, 2001).

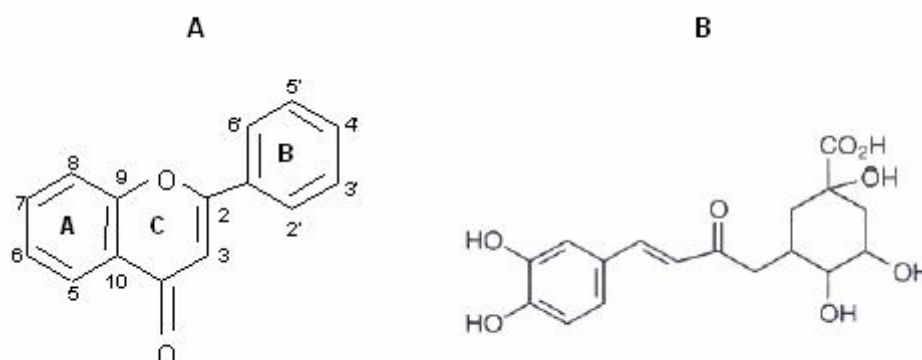


Figura 2.4. Núcleo fundamental dos flavonóides (A) e ácidos cafeoilquínicos (B).

Exatamente por se constituírem em fundamentais contribuintes da dieta, os primeiros estudos dos polifenóis estavam em sua maioria relacionados aos efeitos nutricionais destes como, por exemplo, à diminuição na absorção e digestibilidade de alimentos devido à capacidade destes constituintes químicos de se ligar e precipitar minerais e macromoléculas tais como proteínas e carboidratos (YANG *et al.*, 2001).

O interesse principal recente tem recaído sobre o fato de que diversos constituintes deste grupo revelaram atividades antioxidantes, antiinflamatória e anticarcinogênicas. Diversos estudos epidemiológicos têm sugerido associações entre uma dieta com alimentos ricos em polifenóis e à prevenção de doenças. Muitos destes efeitos benéficos relacionados à prevenção de diversas enfermidades estão associados à própria natureza química deste grupo de substâncias (MOURE *et al.*, 2001).

Deste modo, a habilidade destas substâncias em prevenir doenças conhecidamente associadas ao estresse oxidativo, tais como cardiopatias, alguns tipos de câncer e processos inflamatórios podem estar vinculadas às propriedades antioxidantes dos polifenóis reportadas. A prevenção da peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade pode estar relacionada com a proteção de doenças cardíacas, enquanto que a proteção contra danos oxidativos ao DNA pode ser relacionada à prevenção de cânceres ou disfunções genômicas (MAURICIO, 2006).

A atividade antioxidante dos polifenóis resulta da combinação de suas propriedades *scavenger* de espécies redox-ativas e *quencher* de metais, assim como de inibir oxigenases tais como a lipoxigenase, a cicloxigenase, a mieloperoxidase, a NADPH oxidase e a xantina oxidase. Outros mecanismos podem incluir a inibição de enzimas envolvidas indiretamente nos processos oxidativos e a estimulação de outras com propriedades antioxidantes com a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (TRUEBA e SÁNCHEZ, 2001).

Os polifenóis são reconhecidos por apresentar atividade antioxidante devido a sua habilidade *scavenger* de espécies redox-ativas, interrompendo, por exemplo, a reação radicalar em cadeia da peroxidação lipídica (RICE-EVANS, 1996). Estes constituintes químicos interferem nas reações de oxidação de lipídios e outras moléculas por meio de uma rápida transferência de átomos de hidrogênio aos radicais como, por exemplo, hidroxila e peroxila.

Em termos estruturais, os principais responsáveis por esta atividade são os dois grupos hidroxila na posição 3',4' do anel B, a dupla ligação em

conjugação com um grupo cetônico no carbono 4 do anel C e os grupos hidroxila dos carbonos 5 e 7 do anel A, no caso dos flavonóis (figura 2.4A).

Considerando o caso dos derivados do ácido cafeoilquínico, a estrutura hidroxifenólica conjugada com a dupla ligação da cadeia de ramificação lateral, tem sido reportada como o principal componente responsável pela atividade antioxidante (RICE-EVANS, 1996) (figura 2.4B).

Nos casos em que polifenóis têm sua capacidade antioxidante devida a sua ação como *scavenger* de radicais, pode-se dizer que, em geral, a eficiência dos mesmos em prevenir danos oxidativos depende, diretamente, da sua habilidade em formar intermediários estáveis após reação com os radicais.

Outro mecanismo de ação antioxidante dos compostos polifenólicos de especial relevância é a sua capacidade de se ligar a metais tais como íons ferro e cobre, impedindo ou minimizando a participação destes em reações de Fenton (TRUEBA e SÁNCHEZ, 2001). No entanto, em alguns casos, a interação dos polifenóis com metais pode conferir aos mesmos uma característica pró-oxidante. Compostos dos grupos dos flavonóides e ácidos fenólicos demonstraram ser antioxidantes inibindo a formação de radicais peroxila e hidroxila em diferentes sistemas oxidantes, porém na presença de Cu^{2+} os mesmos se revelaram pró-oxidantes (CAO *et al.*, 1997; YAMANAKA, 1997), provavelmente devido a reações de redução de Cu^{2+} a Cu^+ induzidas por estes compostos, abrindo caminho para reações do tipo Fenton. ANDRADE JR (2004) em estudos sobre a capacidade do ácido tânico em prevenir danos oxidativos ao DNA induzidos por íons cobre, verificou um efeito pró-oxidante deste polifenol e, também, do complexo ácido tânico-Cu em presença de DNA.

É importante ressaltar que uma proteção contra a ação de algumas espécies redox-ativas *in vitro*, não necessariamente implica em proteção contra danos oxidativos em células. POOL-ZOBEL (1999) observou que, tanto substâncias isoladas quanto amostras complexas de plantas contendo várias antocianinas e antocianidinas mostraram-se potentes antioxidantes *in vitro*. Porém, pelo menos em células tumorais do colon humano, este grupo de substâncias não foi capaz de minimizar o dano oxidativo endógeno ao DNA.

Da mesma forma, pequena atividade antioxidante *in vitro* também não necessariamente significa que uma substância não seja responsável por ação antioxidante *in vivo*. Flavonóides tais como quercetina e catequina, com espécies antioxidantes intracelulares do tipo glutathione peroxidase (GPx) pode aumentar significativamente a atividade antioxidante destas (FERGUSON, 2001; NAGATA, 1999).

3.3. Atividade antioxidante de *Ilex paraguariensis*

A erva-mate também é utilizada com fins terapêuticos, constando nas Farmacopéias Portuguesa (1876), Francesa (1884), Brasileira, (1929), Venezuelana (1939), Paraguaia (1949) e Mexicana (1952) (IMBESI, 1964), sendo atribuídas ao produto ações sobre os sistemas cardiovascular e respiratório (COSTA e BADINI, 1939), tecido muscular (SIQUEIRA *et al.*, 1953) e trato gastrintestinal (EDWIN e REITZ, 1967). Também lhe são atribuídas as propriedades estimulante do sistema nervoso central, anti-reumática e diurética (BRITISH HERBAL PHARMACOPOEA, 1983).

Os estudos referentes à atividade antioxidante de *Ilex paraguariensis* iniciaram com GUGLIUCCI e STAHL (1995) ao demonstrarem que extratos aquosos e etanólicos das folhas de *Ilex paraguariensis* inibiram a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade– LDL, em ensaios *in vitro*. Os extratos aquosos apresentaram atividade antioxidante superior ao ácido ascórbico e ao butil-hidroxitolueno *in vitro*. Posteriormente, examinando a oxidação de LDL no plasma de indivíduos sadios, antes e após a ingestão de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis*, foi constatada a mesma atividade, observando que as substâncias antioxidantes são absorvidas e alcançam níveis suficientemente altos no plasma humano para inibir a auto-oxidação das LDL (GUGLIUCCI, 1996). Os extratos também inibiram a peroxidação enzimática e não-enzimática de lipídios microsossomais empregando diferentes modelos experimentais *in vitro* (SCHINELLA *et al.*, 2000).

FILIP e colaboradores (2000) avaliaram a atividade antioxidante de *Ilex paraguariensis* e de espécies relacionadas como adulterantes, por meio da medida da lipoperoxidação *in vitro*. Ainda neste estudo, foram quantificados os conteúdos de

derivados cafeoilquínicos visando ao estabelecimento de uma possível correlação entre a atividade farmacológica e a composição química. Os autores observaram que todas as espécies inibiram a oxidação lipídica, porém os extratos de *Ilex paraguariensis* obtiveram uma correlação altamente significativa entre a atividade antioxidante e o teor de derivados cafeoilquínicos.

BRACESCO e colaboradores (2003) analisaram a atividade antioxidante da infusão de *Ilex paraguariensis* utilizando dois modelos experimentais: indução de ruptura da cadeia de DNA por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e indução da oxidação de LDL. Os autores observaram que a infusão reduziu significativamente, de maneira dose-dependente, tanto o número de quebras na cadeia de DNA e letalidade induzida por H₂O₂, como a oxidação de LDL humano. Os autores concluíram que a infusão apresentou atividade antimutagênica e antígenotóxica *in vitro*.

GORZALCZANY e colaboradores (2001) investigaram o efeito de quatro espécies de *Ilex* sobre o fluxo da bile e o trânsito intestinal de ratos Wistar. Os autores observaram um aumento significativo, do tipo dose-dependente, no fluxo da bile sem alterações no trânsito intestinal em ratos tratados com decocto de *Ilex paraguariensis*, dando suporte ao uso desta espécie, na medicina popular, como digestivo e hepatoprotetor.

GUGLIUCCI e MENINI (2002), estudando o possível efeito antiglicante de extratos aquosos de *Achyrocline satureoides* e *Ilex paraguariensis*, observaram um efeito significativo e dose-dependente destes na indução da perda da atividade *in vitro* de metilgloxal, utilizando como modelos o plasminogênio e antitrombina III. Os autores observaram que o efeito antiglicante foi significativo em concentrações que corresponderam a uma diluição de 1:100 das preparações usualmente ingeridas, indicando que os extratos são candidatos promissores para estudos de suplementação natural no tratamento de diabetes. Efeito similar foi observado para os extratos de *Ilex paraguariensis* quando comparados à amostra comercial de chá verde (LUNCEFORD, 2005).

A inibição da nitração de proteínas é descrita por BIXBY e colaboradores (2005). Ao avaliar a citotoxicidade induzida por peroxinitrito utilizando como modelo

células mamárias, os autores observaram uma acentuada inibição do estresse nitrosativo para extratos de *Ilex paraguariensis*.

A composição polifenólica descrita para a espécie, associada às atividades biológicas descritas para estes constituintes, tem levado à realização de estudos *in vitro* e *in vivo* a fim de entender o papel desta espécie na formação ou prevenção de câncer. RAMIREZ-MARES e colaboradores (2004) avaliaram a atividade quimiopreventiva *in vitro* de infusos de *Ilex paraguariensis*, *Camellia sinensis* e *Ardisia compressa* comparando com padrões de polifenóis em modelo de citotoxicidade em células HepG2 e atividade antitopoisomerase. O infuso de *Ilex paraguariensis* apresentou elevada citotoxicidade e inibiu significativamente a topoisomerase II, um bio-marcador da proliferação de células cancerígenas. Segundo os autores, este resultado faz desta espécie um candidato promissor para estudos de atividade quimiopreventiva. Pesquisadores do mesmo grupo, ao avaliar os extratos de *Ilex paraguariensis*, em modelo de carcinoma oral, *in vitro*, observaram a inibição da proliferação celular (MEJIA, 2005).

4. MATERIAL

4.1. Equipamentos e acessórios

Balança analítica Sartorius 2402; centrífuga Eppendorf 5403; espectrofotômetro Hewlett Packard HP; espectrofotômetro Shimadzu UV 190; evaporador rotatório Büchi R 114; guilhotina para animais de porte pequeno Ugo Basile; homogeneizador – Sonicator ultrasonic processor Heat Systems; liofilizador Edwards Modulyo 4K; manta aquecedora termostaticada Fisatom 402; pipetas reguláveis Gilson Pipetman, P10,P20, P100, P200 e P 1000. agitador Vortex Phoenix AT 56; potenciômetro pH-metro B374 Micronal.

4.2. Solventes, reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados, a não ser nos casos de especificação contrária devem apresentaram grau de pureza pró-análise (p.a).

Ácido acético glacial; ácido ascórbico; ácido clorídrico; ácido fórmico; ácido tricloroacético; adrenalina; água destilada; álcool etílico; álcool n-butílico, carbonato de potássio; catalase; ciclo-hexano; cloreto de sódio; clorofórmio; dinitrofenilhidrazina – DNPH; éter de octilpolietilenoglicol - Triton® X-100; fosfato dibásico de potássio; fosfato dibásico de sódio hepta-hidratado; fosfato monobásico de potássio; hidróxido de sódio; luminol; malondialdeído – MDA; metanol; metanol (CLAE); nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida – NADPH; peróxido de hidrogênio; sal de sódio do ácido etilnodiamina tetra-acético – EDTA; solução aquosa de metanamina 0,5 % (m/v); solução de ácido fosfórico 0,16M; solução etanólica de polietilenoglicol 400 30 %; solução tampão glicina; solução tampão pH 4,0; solução tampão pH 7,0; sulfato ferroso hepta-hidratado; 1,1,3,3-tetrametoxipropano; tetracloreto de carbono.

4.3. Adjuvantes

celulose microcristalina (Avicel®)

dióxido de silício coloidal (Aerosil 200®)

maltodextrina (Glucidex®)

4.4. Substâncias de referência

2,2'-azo-bis(2-amidinopropano)(ABAP); ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromo-2-carboxílico (Trolox); ácido ascórbico; ácido caféico (Merck); ácido clorogênico (Sigma).

4.5. Material biológico

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com dois meses de idade, pesando de 250 a 350 g, provenientes do biotério do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com livre acesso à ração e água.

5. METODOLOGIA

5.1. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do PSI-A, PSI-B, PSI-C, PSI-D, ESLI e FPI

Os estudos *in vitro* foram realizados com a finalidade de auxiliar na seleção do extrato a ser desenvolvido em escala semi-industrial, comparado às frações polifenólicas obtidas.

5.1.1. Potencial Antioxidante Total (TRAP) (WAYNER *et al.*, 1985)

Para a contagem de quimioluminescência basal adicionou-se 4,0 ml de solução de ABAP 10 mM em tampão glicina 0,1 M (pH 8,6). A seguir, adicionou-se 10 µl de solução de luminol 4 mM à mistura anterior como padrão externo para monitorar a produção de radicais livres. Este meio foi previamente incubado a 25 °C durante 2 horas para estabilização da leitura de quimioluminescência.

Após a incubação foram adicionados ao meio reacional 10 µl dos diferentes extratos, as frações polifenólicas e o padrão antioxidante, constituindo os diferentes grupos de tratamentos, conforme descrito na tabela 2.2.

Tabela 2.2. Grupos de tratamentos testados.

Grupo	Concentrações testadas
ESLI	0,125; 0,25; 0,625 µg/ml
PSI-A	0,125; 0,25; 0,625 µg/ml
PSI-B	0,125; 0,25; 0,625 µg/ml
PSI-C	0,125; 0,25; 0,625 µg/ml
PSI-D	0,125; 0,25; 0,625 µg/ml
FAB	0,025; 0,0625; 0,125 µg/ml
FF	0,025; 0,0625; 0,125 µg/ml
Trolox	200 nM

ESLI: extrato seco liofilizado; PSI-A: 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®]; PSI-B: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Glucidex[®]; PSI-C: 70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex[®]; PSI-D: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Avicel[®]; FAB e FF: frações polifenólicas – processo submetido a registro de patente.

Todos os adjuvantes empregados no preparo dos produtos secos por *spray-drying* foram ensaiados na concentração equivalente a maior dose testada de produto seco para cada grupo.

A quimioluminescência produzida foi quantificada e registrada em cintilador, após 60 minutos da adição dos tratamentos. Após os diferentes tratamentos, a intensidade de quimioluminescência foi medida. O tempo necessário para que a contagem retornasse ao valor inicial foi comparado ao tempo de indução do trolox no mesmo sistema. A capacidade antioxidante foi expressa como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (CAET, mM).

5.1.2. Medida da lipoperoxidação (TBARS) *in vitro*

Para o ensaio, foi empregada como fonte de lipídios homogeneizados de gema de ovo (RUBERTO *et al.*, 2000).

Procedimento

Em tubos Pirex[®] com tampa de rosca foram adicionados 1000 µl de homogeneizado de gema de ovo 1% (v/v) em solução salina. A este meio foram pipetados 100 µl dos diferentes extratos e frações polifenólicas, constituindo os diferentes grupos de tratamentos (tabela 2.3).

Tabela 2.3. Grupos de tratamentos testados no ensaio de lipoperoxidação.

Grupo	Concentrações testadas
ESLI	0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 µg/ml
PSI-A	0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 µg/ml
PSI-B	0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 µg/ml
PSI-C	0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 µg/ml
PSI-D	0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 µg/ml
FAB	0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 µg/ml
FF	0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 µg/ml

ESLI: extrato seco liofilizado; PSI-A: 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®]; PSI-B: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Glucidex[®]; PSI-C: 70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex[®]; PSI-D: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Avicel[®]; FAB e FF: frações polifenólicas – processo submetido a registro de patente.

Todos os adjuvantes empregados no preparo dos produtos secos por *spray-drying* foram ensaiados na concentração equivalente a maior dose testada de produto seco para cada grupo.

Após a adição das amostras foram pipetados 100 µl de AAPH (120 mM) em tampão TBA. Ao final foi adicionado tampão TBA até volume de 1,2 ml. Esta mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Passado este período retirou-se 300 µl de cada tubo e transferiu-se para tubos tipo *ependorf*. 600 µl de TCA 15% foram adicionados aos tubos *ependorfs* e centrifugados a 10000 g a 4 °C. 500 µl do sobrenadante de cada *ependorf* foram transferidos para tubos de reação e acrescidos de 500 µl de TBA 0,67 % em água Milli-Q. A mistura final foi aquecida em banho-maria durante 30 minutos. Após este período a absorvância foi medida a 532 nm.

A atividade antioxidante foi calculada como porcentagem de inibição da peroxidação de lipídeos, segundo a equação 1.

$$\text{Inibição da peroxidação lipídica (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{CONT}} - \text{Abs}_{\text{AMOS}}}{\text{Abs}_{\text{CONT}}} \times 100 \quad (1)$$

Onde Abs_{cont} é a absorvância do controle que não recebeu tratamento e Abs_{amos} a absorvância das amostras incubadas com diferentes concentrações dos tratamentos.

A concentração do extrato (mg/mL) necessária para inibir 50% da peroxidação lipídica (IC_{50}) foi calculada.

Preparação da curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP)

A curva padrão de TMP foi preparada a partir de uma solução aquosa na concentração de 2,0 nmol/ml. Alíquotas de 30; 60; 120 e 180 μl da solução TMP foram transferidas para tubos de vidro e o volume completado para 500 μl com água destilada. As soluções foram preparadas em triplicata.

5.1.3. Ensaio da atividade scavenger de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$)

Em tubos Pirex[®] com tampa de rosca foram adicionados 100 μl de 2-deoxirribose (50 mM) em água Milli-Q (substrato), 100 μl de FeSO_4 (60 mM), 100 μl H_2O_2 (1 mM) em água Milli-Q (sistema gerador). A este meio foram adicionados 100 μl dos diferentes extratos, frações polifenólicas e o padrão antioxidante, constituindo os diferentes grupos de tratamentos, conforme descrito na tabela 2.4.

Tabela 2.4. Grupos de tratamentos testados no ensaio da atividade *scavenger* de radicais hidroxila.

Grupo	Concentrações testadas
ESLI	0,1; 0,5; 1,0 ; 5,0 µg/ml
PSI-A	0,5; 1,0; 5,0; 50 µg/ml
PSI-B	0,5; 1,0; 5,0; 50 µg/ml
PSI-C	0,5; 1,0; 5,0; 50 µg/ml
PSI-D	0,5; 1,0; 5,0; 50 µg/ml
FAB	0,5; 1,0; 5,0; 50 µg/ml
FF	0,5; 1,0; 5,0; 50 µg/ml
Trolox	200 nM

ESLI: extrato seco liofilizado; PSI-A: 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®]; PSI-B: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Glucidex[®]; PSI-C: 70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex[®]; PSI-D: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Avicel[®]; FAB e FF: frações polifenólicas – processo submetido a registro de patente.

Todos os adjuvantes empregados no preparo dos produtos secos por *spray-drying* foram ensaiados na concentração equivalente a maior dose testada de produto seco para cada grupo.

Após a adição das amostras foi adicionada solução tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,2) até volume de 900 µl. Ao final foi adicionado 100 µl de H₂O₂ (10 mM) em água Milli-Q. Esta mistura foi incubada a 27 °C por 15 minutos. Passado este período a reação foi interrompida mediante a adição de 500 µl de ácido fosfórico 4 % (v/v). Após a incubação 500 µl de TBA (1,0 %) em NaOH 50 mM, foi adicionados. A mistura final foi aquecida em banho-maria durante quinze minutos. Após este período a absorvância foi medida a 532 nm.

O percentual de inibição de radicais hidroxila (atividade *scavenger* de radicais hidroxila) será expresso pela equação 2.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{CONT}} - \text{Abs}_{\text{AMOS}}}{\text{Abs}_{\text{CONT}}} \times 100 \quad (2)$$

5.2. Avaliação da atividade antioxidante *ex vivo* dos PSI e FPI

A partir dos resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos produtos secos PSI-A, PSI-B, PSI-C e PSI-D, foram previamente selecionados os produtos PSI-A e PSI-D, os quais demonstraram-se promissores tanto quanto a atividade antioxidante como quanto a viabilidade tecnológica de produção em escala semi-industrial. Estes extratos foram avaliados quanto à atividade antioxidante *ex vivo*, juntamente com as frações polifenólicas FAB e FF.

5.2.1 Material biológico

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com 2 a 3 meses de idade, pesando de 250 a 350 g.

5.2.2 Obtenção de fatias de fígado e preparação do homogeneizado (RUDNICKI, 2005)

Procedimento

Os fígados dos animais foram retirados, cirurgicamente, sendo transferidos para placas de Petry contendo tampão Krebs-Ringer 10 mM de glicose (pH 7,4) em gelo, onde foram cortados e selecionados pedaços próximos às bordas. Os fígados foram fatiados em *chopper*, em fatias de 400 μm de espessura. As fatias foram separadas e colocadas em copo de becker contendo 2,0 ml de tampão Krebs-Ringer 10 mM de glicose (pH 7,4). Cada grupo foi constituído por 5 fatias. A seguir os grupos foram pré-incubados por 10 minutos em 37 °C, em atmosfera de carbogênio (95% O₂/5% CO₂), equilibrado com tampão fosfato Krebs-Ringer 10 mM de glicose (pH 7,4), em banho de água sob agitação (60 oscilações/min). Após este período o tampão foi trocado por um volume de 1,0 ml e incubado novamente por um período de 30 minutos para lavagem das fatias. Ao final de 30 minutos o tampão foi substituído por 1,0 ml dos tratamentos constituindo os diferentes grupos (tabela 2.5).

Tabela 2.5. Grupos de tratamentos testados no ensaio *ex vivo*.

Grupo	Tratamentos
Controle	incubação com tampão fosfato Krebs-Ringer
Controle induzido	incubação com <i>t</i> -BHP 0,5 mM
Antioxidante	pré-incubação com Trolox 10 mM
Antioxidante induzido	pré-incubação com Trolox 10 mM seguida de indução com <i>t</i> -BHP 0,5 mM
PSI-A	pré-incubação com 0,25 µg/ml
PSI-A induzido	pré-incubação 0,25 µg/ml seguida de indução com <i>t</i> -BHP 0,5 mM
Adjuvante PSI-A	pré-incubação com dióxido de silício coloidal
Adjuvante PSI-A induzido	pré-incubação com dióxido de silício coloidal seguida de indução com <i>t</i> -BHP 0,5 mM
PSI-D	pré-incubação com 0,25 µg/ml
PSI-D induzido	pré-incubação 0,25 µg/ml seguida de indução com <i>t</i> -BHP 0,5 mM
Adjuvante PSI-D	pré-incubação com com dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina
Adjuvante PSI-D induzido	pré-incubação com dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina seguida de indução com <i>t</i> -BHP 0,5 mM
FAB	pré-incubação com F100+10 0,125 µg/ml
FAB induzido	pré-incubação com F100+10 0,125 µg/ml seguida de indução com <i>t</i> -BHP 0,5 mM
FF	pré-incubação com F50 0,125 µg/ml
FF induzido	pré-incubação com F50 0,125 µg/ml seguida de indução com <i>t</i> -BHP 0,5 mM

PSI-A: 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®]; PSI-D: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Avicel[®]; FA e FF: frações polifenólicas – processo submetido a registro de patente.

Os diferentes grupos de tratamentos foram mantidos sob incubação por mais 30 minutos, quando foi adicionado 20 µl do indutor de dano *ter*-butilhidroperóxido (*t*-BHP) 0,5 mM aos grupos correspondentes e mantidos sob incubação por 30 minutos.

Após a incubação final, as fatias de fígado foram removidas e o meio foi centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos. A porção superior foi retirada com auxílio de pipeta automática e conservada em temperatura ambiente até utilização nos ensaios de quantificação da lactato desidrogenase (LDH).

Para o ensaio de lipoperoxidação e ensaio de dano protéico, as fatias de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato, pH 7,0 e congeladas a -75°C até análise.

Determinação da concentração de proteínas (LOWRY et al., 1951)

A concentração de proteínas totais no homogeneizado do fígado foi determinada pelo método de LOWRY e colaboradores (1951), adaptado para leitor de placas, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

Preparação dos reativos

Para a preparação do reagente CTC (cobre-tartarato-carbonato) foram preparadas três soluções. Para a solução A, 20,0 g de Na_2CO_3 foram transferidos para um béquer de plástico e dissolvidos em 100 ml de água. A solução B foi obtida pela dissolução de 0,2 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ em 40 ml de água. A solução C foi preparada adicionou-se 0,4 g de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 40 ml de água. O reagente CTC foi obtido pela mistura das soluções 2, 3 e 1, respectivamente.

O reativo de Lowry foi obtido pela mistura de 10 ml de CTC, 10 ml de SDS 10 %, 8 ml de NaOH 1N e 12 ml de água.

Preparação da curva padrão

A curva padrão de BSA foi preparada a partir de uma solução aquosa na concentração de 0,5 mg/ml. Em placas de poliestireno de 96 poços foram pipetadas alíquotas de 10, 20, 30, 40 e 60, 70, 80, 90 e 100 μl da solução de BSA e o volume completado para 100 μl com água. As soluções foram preparadas em triplicata.

A cada poço contendo as diferentes concentrações de BSA foram adicionados 100 μl do reativo Lowry. Após 10 minutos, foram adicionados 100 μl do reativo de Folin-Cicalteau 0,4N, seguido de agitação em placa. Trinta minutos após

adição do reativo de Folin-Cicalteau, placa foi transferida para leitor de placas e a leitura realizada em 750 nm.

Procedimento para o homogeneizado

Em placas de poliestireno cristalino de 96 poços e fundo plano (Alfesa -São Paulo/Brasil) foram pipetados 5,0 μ l de homogeneizado, em seguida foram acrescentados 95 μ l de água e 100 μ l do reativo de Lowry. Após 10 minutos, foram adicionados 50 μ l do reativo de Folin-Cicalteau 0,4 N seguido de agitação. Trinta minutos após adição do reativo de Folin-Cicalteau, placa foi transferida para leitor de placas e a leitura realizada em 750 nm. Cada homogeneizado foi preparado em triplicata.

5.2.3. Ensaio de citotoxicidade via estresse oxidativo - quantificação da lactato-desidrogenase (LDH)

O potencial citotóxico dos extratos foi avaliado por meio da determinação da lactato-desidrogenase, uma enzima citosólica indicadora de dano celular. Sua determinação é feita empregando o método espectrofotométrico, o qual se baseia na oxidação do lactato a piruvato na presença do NAD que é reduzido a NADH, frente a um agente que cause dano oxidativo (FeSO_4). Foi realizada empregando um kit comercial (LDH Labtest[®] Diagnóstiva S.A).

A porção superior do homogeneizado de fígado de rato foi centrifugada a 5000 rpm durante 2 minutos. Após este período o sobrenadante foi transferido para tubos tipo *ependorf* em duplicata correspondendo ao branco (B) e teste (T) para cada grupo de tratamento analisado. O teste foi realizado conforme protocolo do fornecedor seguindo esquema abaixo ilustrado:

	Branco	Teste	Padrão
Tampão	320 µl	-	320 µl
Substrato	-	320 µl	-
Amostra	25 µl	25 µl	16 µl
Incubação por 2 minutos a 37 °C			
Reagente de cor *	64 µl	64 µl	-
Incubação por 5 minutos a 37 °C			
Estabilizador **	640 µl	640 µl	640 µl
Incubação por 5 minutos a temperatura ambiente			

* Reagente de cor: contém INT (cloreto de iodofenil-nitrofenil tetrazolio) 4 nmol/l; NAD 7,5 nmol/l; fenazida 4,6 nmol/l e azina sódica 7,7 nmol/l.

** Estabilizador: contém ácido clorídrico 200 nmol/l.

Após este período a absorvância foi medida em 500 nm utilizando água destilada como branco. O cálculo foi expresso pela equação 3.

$$\text{Desidrogenase Láctica (U/L)} = \frac{\text{Abs}_{\text{teste}} - \text{Abs}_{\text{controle}}}{\text{Abs}_{\text{padrão}}} \times 150 \quad (3)$$

Onde: Abs= absorvância (teste, controle e padrão)

5.2.4. Medida da lipoperoxidação (TBARS) (DRAPER E HADLEY,1990)

Alíquotas do homogeneizado do fígado contendo 1,0 mg de proteínas foram pipetadas em tubos de ensaio e o volume completado a 300 µL com tampão PBS. A seguir foram adicionados 600 µl de ácido tricloroacético 15% (TCA) e a mistura centrifugada a 11000 rpm, durante 10 minutos. Após centrifugação, 500 µl do sobrenadante foram transferidos para tubos de reação acrescidos de 500 µl de TBA 0,67% em água purificada Milli-Q. A mistura final foi aquecida em banho-maria durante 20 minutos. Após este período a absorvância foi medida em 532 nm,

utilizando-se o malonaldeído (MDA) como padrão ($\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos como nmol MDA/mg proteína em cada amostra.

As concentrações de MDA foram determinadas pela comparação à curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP).

Preparação da curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP)

A curva padrão de TMP foi preparada a partir de uma solução aquosa na concentração de 2,0 nmol/ml. Alíquotas de 30; 60; 120; 220; 300; 500 μl da solução de TMP foram transferidas para tubos de vidro e o volume completado para 500 μl com água destilada. As soluções foram preparadas em triplicata.

5.2.5. Dano protéico (LEVINE *et al.*, 1990)

Em tubos de ensaio foram adicionados 500 μL do homogeneizado de fatias de fígado de rato e centrifugados a 6000 rpm durante 3 minutos. Após centrifugação, 300 μL da fase superior foram submetidos à precipitação com igual volume de TCA 20 %. A mistura foi novamente centrifugada a 7000 rpm durante 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado ao final. As proteínas precipitadas foram ressuspensas em 500 μl de tampão KCl (120 mM), KH_2PO_4 (30 mM, pH 7,4) para determinação da concentração de proteínas (conforme descrito no item 5.2.2).

Uma alíquota de 200 μL da proteína ressuspensa foi pipetada para o preparo do branco e da amostra, sendo o volume final completado a 500 μl de tampão KCl (120 mM), KH_2PO_4 (30 mM, pH 7,4). A esta mistura foram adicionados 500 μl de HCl 2 M ao tubo contendo o branco e, 500 μl de DNPH 10 mM (diluído em HCl 2N) ao tubo contendo a amostra. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, foram adicionados 250 μL de TCA 20 %, a mistura foi novamente centrifugada a 22000 rpm durante 3 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e as proteínas precipitadas foram lavadas três vezes com 1000 μL de uma mistura de etanol:acetato de etila (1:1, v/v) sendo, novamente,

centrifugadas a 22000 rpm durante 3 minutos. O resíduo sólido resultante foi dissolvido em 1000 μ l de uréia 8,0 M, pH 2,3 e mantido em banho-maria a 37 °C por 15 minutos, sendo posteriormente centrifugado. A absorvância da solução obtida após centrifugação, foi lida em 370 nm para quantificar o conteúdo de carbonila protéica.

O conteúdo total de carbonila é estimado pela diferença entre os valores de absorvância das amostras tratadas com DNPH e amostras tratadas somente com HCL sem DNPH. Os dados foram expressos como nM de carbonila/mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção de 22000 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

5.3. Avaliação da atividade antioxidante *in vivo* do PSI

Todos os experimentos abaixo discriminados estão em concordância com o estabelecido no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* promulgado pelo NIH (1985) e de acordo com princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em reunião nº 12, ata nº 78, de 09/11/2006, sob número de registro: 2004321.

5.3.1 Material biológico

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com dois meses de idade, pesando de 250 a 350 g, provenientes do biotério do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com livre acesso à ração e água.

5.3.2. Preparação das amostras e tratamento dos animais

Para a escolha do tamanho da população em estudo, protocolos pré-estabelecidos e previamente descritos na literatura para avaliação da atividade

antioxidante *in vivo* (SAMUEL *et al.* 2005; TIEPPO *et al.*, 2006) foram considerados.

Grupos de animais (n=10) foram tratados com PSI-A, disperso em solução salina a 0,9 %. A dose de 386 mg de produto seco por *spray-drying* por kg de animal foi administrada por via oral, empregando sonda gástrica.

Um segundo grupo de animais (n=10) foi tratado, por via oral, com dióxido de silício coloidal, disperso em solução salina a 0,9 %, na dose de 166 mg por kg de animal, por via oral empregando sonda gástrica.

O grupo controle (n=10) recebeu o veículo empregado para dissolução das amostras testadas, por via oral.

Todos os grupos foram tratados por um período de 30 dias em horário fixo, pré-estabelecido, entre 15 e 16 horas, no período da tarde.

A atividade antioxidante *in vivo* do PSI-A e dióxido de silício coloidal foi avaliada empregando o modelo de dano oxidativo hepático induzido por tetracloreto de carbono (CCl₄), um potente agente hepatóxico que é biotransformado a radical triclorometila (CCl₃⁻ e/ou CCl₃OO⁻) pelo sistema P450, o qual desencadeia o processo de peroxidação lipídica das membranas (McCAY *et al.*, 1984; RECKNAGEL *et al.*, 1989; ALEYNIK *et al.*, 1997). Ao final do tratamento de 30 dias, os animais receberam, por via intra peritoneal, CCl₄ em dose única de 1,0 ml/kg de animal, previamente dissolvido em óleo vegetal. Após o período de seis horas da administração de CCl₄, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. Após o sacrifício o fígado dos animais foi removido, cirurgicamente, para obtenção do homogeneizado.

Após sacrifício, os animais foram congelados e encaminhados para o Centro de Controle de Zoonoses da PMPA-SMS para descarte.

5.3.3. Preparação do homogeneizado

Após a remoção do fígado dos animais, o órgão foi homogeneizado em tampão fosfato pH 7,0 e congelado a -75 °C até análise.

5.3.4. Medida da lipoperoxidação (TBARS)

Realizada conforme descrito na seção 5.2.4.

5.3.5. Dano protéico

Realizada conforme descrito na seção 5.2.5.

5.3.6. Medida da atividade enzimática

Preparação do homogeneizado de fígado.

Realizada conforme descrito na seção 5.3.3.

Medida da atividade da enzima catalase (CAT).

A atividade da catalase (CAT) foi determinada em homogeneizado de fatias de fígado de rato pelo método de AEBI (1984).

Procedimento

Uma alíquota de 100 μl da porção superior do homogeneizado de fígado de rato foram suspensos em 1,0 ml de tampão PBS. Retirou-se uma alíquota de 100 μl da suspensão que foi diluída em 1,0 ml de tampão catalase (D1). Desta solução, uma alíquota de 100 μl foi diluída a 1,0 ml com tampão catalase(D2). A solução resultante foi sonicada e centrifugada a 6000 rpm, durante 10 minutos.

O meio reacional foi preparado adicionando-se 40 μl de H_2O_2 a 8,8 M a 25,0 ml de tampão catalase. Foram pipetados 1,0 ml deste meio em cubeta de quartzo, e o espectrofotômetro calibrado com um branco de mesma composição, porém sem a adição de H_2O_2 . Após a adição de 100 μl de amostra, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 240 nm, em temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 0; 30, 60 e 90 segundos.

A atividade da catalase foi expressa em U/mg de proteína, considerando que cada unidade (1 U) equivale à quantidade de catalase necessária para decompor 1,0 μmol de H_2O_2 num minuto, nas condições indicadas no ensaio, de acordo com a equação 4.

$$\text{UCat} = \frac{2,361(\text{Abs}_i - \text{ABS}_F)}{\text{ABS}_i \times [\text{proteína}]} = \text{U /mg de proteína (4)}$$

Onde: Abs_i = absorvância inicial (nm); Abs_F = absorvância final (nm); $[\text{proteína}]$ = mg.

Medida da atividade da enzima superóxido desmutase (SOD).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em homogeneizado de fígado de rato pelo método de BANISTER E CALABRESE (1987), o qual consiste na medida da formação do adrenocromo proveniente da oxidação da adrenalina em presença de ácido clorídrico (HCl), adaptado para leitor de placas.

Preparação da amostra.

Uma alíquota de 100 μl da porção superior do homogeneizado foi diluída em 200 μl de tampão glicina 50 mM (pH 10,2).

Procedimento

Primeiramente, foram realizadas leituras da auto-oxidação da adrenalina. Em placas de poliestireno de 96 poços foram pipetadas alíquotas de 5 μl de catalase 10 mM e 195 μl de tampão glicina 50 mM (pH 10,2). Realizou-se a leitura do branco, adicionando-se, em seguida 5,0 ml de adrenalina 60 mM. Para a leitura das amostras foram colocados nos poços 5 μl de catalase 10 mM, alíquotas de 5, 10, 15 e 20 μl de amostra a ser analisada, completando-se o volume para 195 μl com tampão glicina 50 mM (pH 10,2). Realizou-se a leitura do branco, adicionando-se, em seguida 5,0 ml de adrenalina 60 mM. A leitura da absorvância foi realizada a 480 nm, durante 10 minutos, com intervalos de 10 segundos de leitura, em temperatura

ambiente ($37 \pm 2^{\circ}\text{C}$), sendo a atividade da enzima expressa em U/mg de proteína.

5.4. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e analisados estatisticamente pelo Teste “t” de Student e Análise da Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para as variáveis distribuídas normalmente. Os dados com distribuição não-normal foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

Vários métodos têm sido desenvolvidos para medir a capacidade seqüestradora de espécies redoxi-ativas, como um indicador da atividade antioxidante *in vitro*. Tais métodos são, geralmente, baseados na inibição da acumulação de produtos oxidados, visto que a geração de espécies redoxi-ativas é bloqueada pela adição de antioxidantes (CHOI *et al.*, 2002).

Um dos procedimentos mais empregados para avaliar a capacidade antioxidante de uma substância é a análise de seu potencial de captura de radicais (*Total Radical Potential-TRAP*) (WAYNER *et al.*, 1985).

Este método se baseia na medida dos tempos de indução da oxidação de uma dispersão de lipídios expostos a uma fonte de radicais livres com velocidade, constante e conhecida, de produção de radicais livres em condições anaeróbias. O ABAP (2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) é empregado como fonte de radicais livres e a diminuição na concentração de oxigênio é usada para medir a velocidade de oxidação. A quimiluminescência do luminol é utilizada para avaliar os níveis de TRAP, sendo estendida à determinação da capacidade de uma substância em provocar a diminuição da concentração estacionária de radicais livres, formados a partir do ABAP (LISSI *et al.*, 1995).

No presente trabalho o potencial antioxidante total (TRAP) de produtos secos e frações polifenólicas de *Ilex paraguariensis* foi avaliado empregando-se o método de quimiluminescência emitida por luminol. A adição de concentrações crescentes dos diferentes produtos secos por *spray-drying* ao meio reacional ocasionou significativa redução na quimiluminescência emitida por luminol, em todas as concentrações testadas. Esta redução foi mais acentuada e duradoura para a maior concentração testada (0,625 µg/ml), a qual ocasionou uma diminuição de cerca de 20 % na intensidade da luminescência, superando o efeito observado pelo trolox (Figura 2.5), sendo um pouco mais acentuada para o produto PSI-D. Os diferentes adjuvantes empregados na secagem não demonstraram efeito redutor de

quimiluminescência descartando, assim, um possível efeito antioxidante dos mesmos.

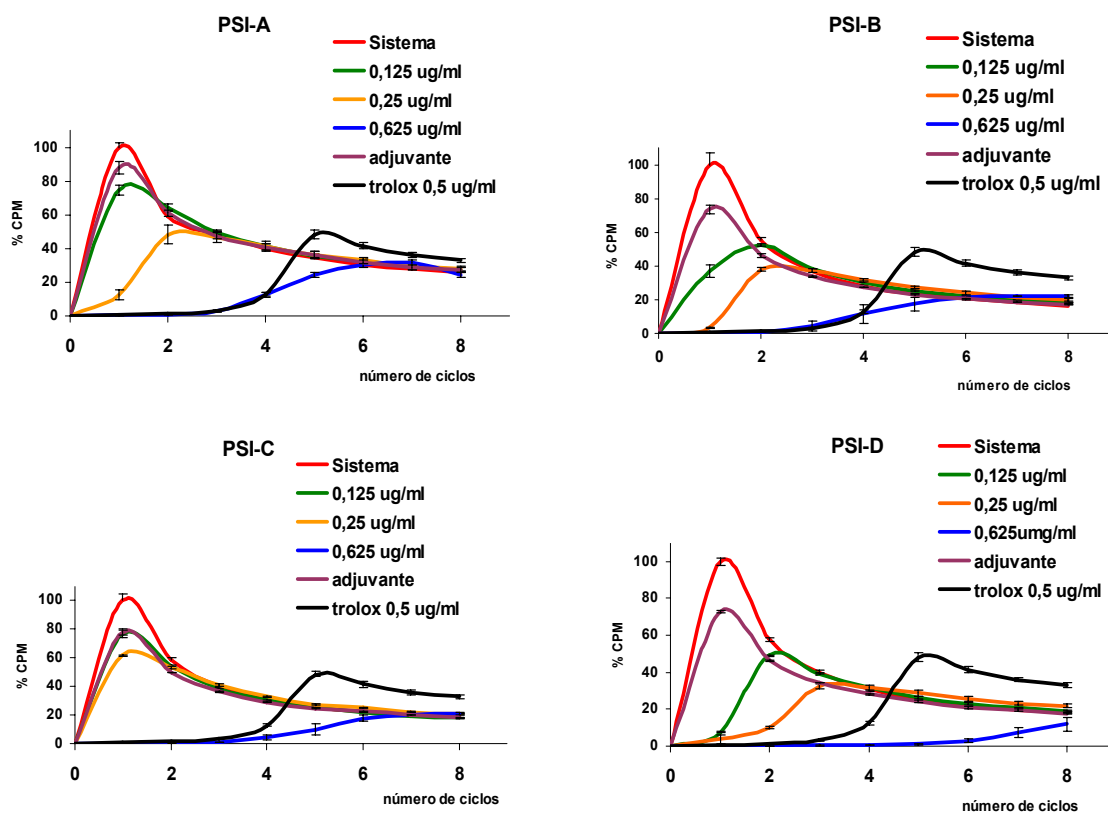


Figura 2.5. Cinética antioxidante, *in vitro*, dos produtos secos de *Ilex paraguariensis*, medida por quimiluminescência. PSI-A: 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil®; PSI-B: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil®+ 15 % Glucidex®; PSI-C: 70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex®; PSI-D: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil®+ 15 % Avicel.

Na figura 2.6 observa-se o perfil de quimiluminescência emitida por luminol após a adição de concentrações crescentes de frações polifenólicas e do produto seco liofilizado que as originou. Semelhante ao observado para os produtos secos por *spray-drying* houve significativa redução na quimiluminescência emitida por luminol, sendo esta redução proporcional ao aumento nas concentrações testadas. No entanto, cabe salientar que a semelhança no perfil cinético das frações em relação aos produtos secos foi obtida empregando concentrações cerca de 10 vezes menores tanto para a fração FAB como FF, o que sugere um potencial antioxidante superior para as frações.

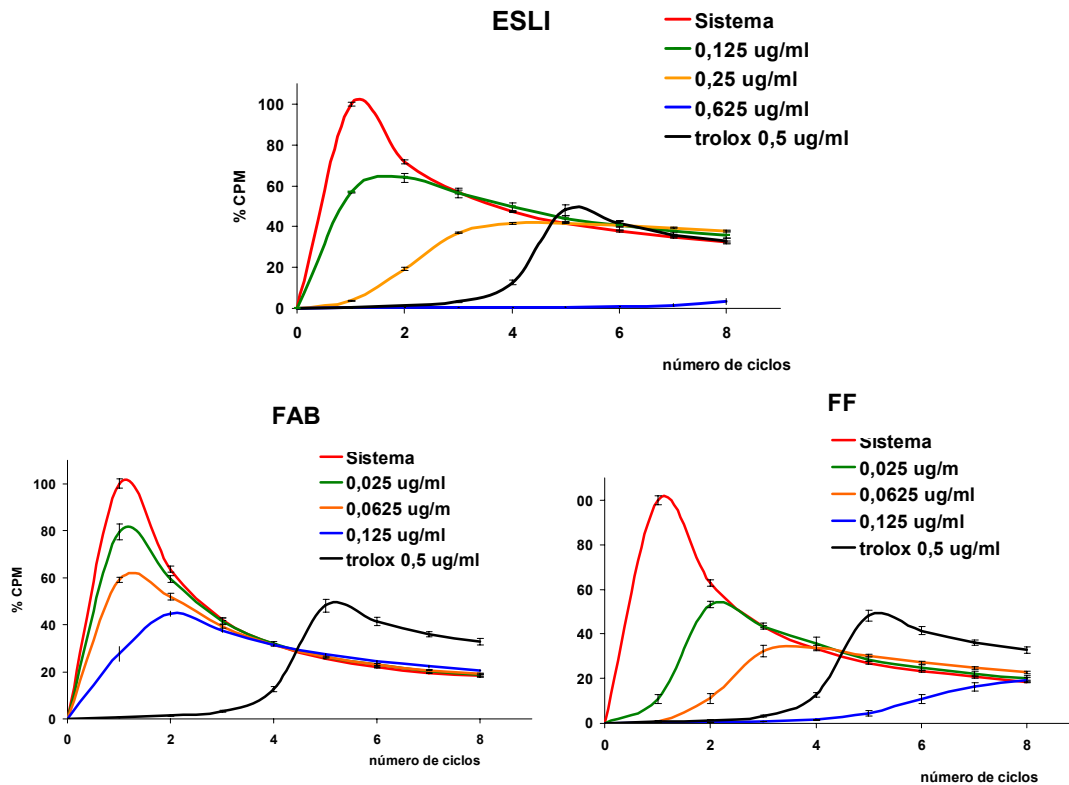


Figura 2.6. Cinética antioxidante, *in vitro*, do produto seco liofilizado e frações polifenólicas, medida por quimioluminescência. ESLI: extrato seco liofilizado; FAB: fração polifenólica I - processo submetido a registro; FF: fração polifenólica II - processo submetido a registro.

A tabela 2.6 apresenta os valores de capacidade antioxidante total calculada para os diferentes extratos testados. Observa-se que o efeito antioxidante apresentado foi proporcional ao teor de polifenóis dos produtos testados. Entre os produtos secos por *spray-drying* PSI-C e PSI-D apresentaram atividade antioxidante mais pronunciada. As frações foram mais ativas, na ordem FF>FAB, comparativamente ao extrato liofilizado que lhes deu origem.

Tabela 2.6. Teor de polifenóis totais (TPT) e capacidade antioxidante equivalente ao trolox (mM)(CAET) dos extratos secos e frações polifenólicas obtidos pelo TRAP.

	Extratos						
	ESLI	PSI-A	PSI-B	PSI-C	PSI-D	FAB	FF
TPT (mg/g)	240,71	161,59	172,44	177,71	193,42	192,70	422,04
CAET (mM)	0,24	0,13	0,14	0,21	0,22	0,37	0,41

TPT: determinado por CLAE. ESLI: extrato seco liofilizado; PSI-A: 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®]; PSI-B: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Glucidex[®]; PSI-C: 70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex[®]; PSI-D: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Avicel[®]; FAB e FF: frações polifenólicas – processo submetido a registro de patente.

Embora os resultados obtidos neste ensaio tenham sido promissores, em que as amostras mostraram-se potencialmente antioxidantes ensaios adicionais foram realizados com o intuito de aprofundar a investigação.

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada. A proteção contra a peroxidação lipídica *in vitro* foi avaliada por meio da detecção de derivados lipoperóxidos formados, empregando como substrato alvo homogeneizado de gema de ovo (RUBERTO *et al.*, 2000). Dentre outros produtos formados destaca-se o malondialdeído (MDA), o qual reage em meio ácido com o ácido tiobarbitúrico (TBA) na proporção de 2:1 formando um éster com absorção característica a 532 nm (OHKOWA *et al.*, 1979).

Todos os produtos secos diminuíram a peroxidação lipídica, de maneira dose-dependente (figura 2.7). Entre os produtos secos por *spray-drying* PSI-A e PSI-D mostraram-se mais efetivos em todas as concentrações testadas, sendo o potencial em reduzir a peroxidação lipídica mais expressivo na concentração de 5,0 µg/ml.

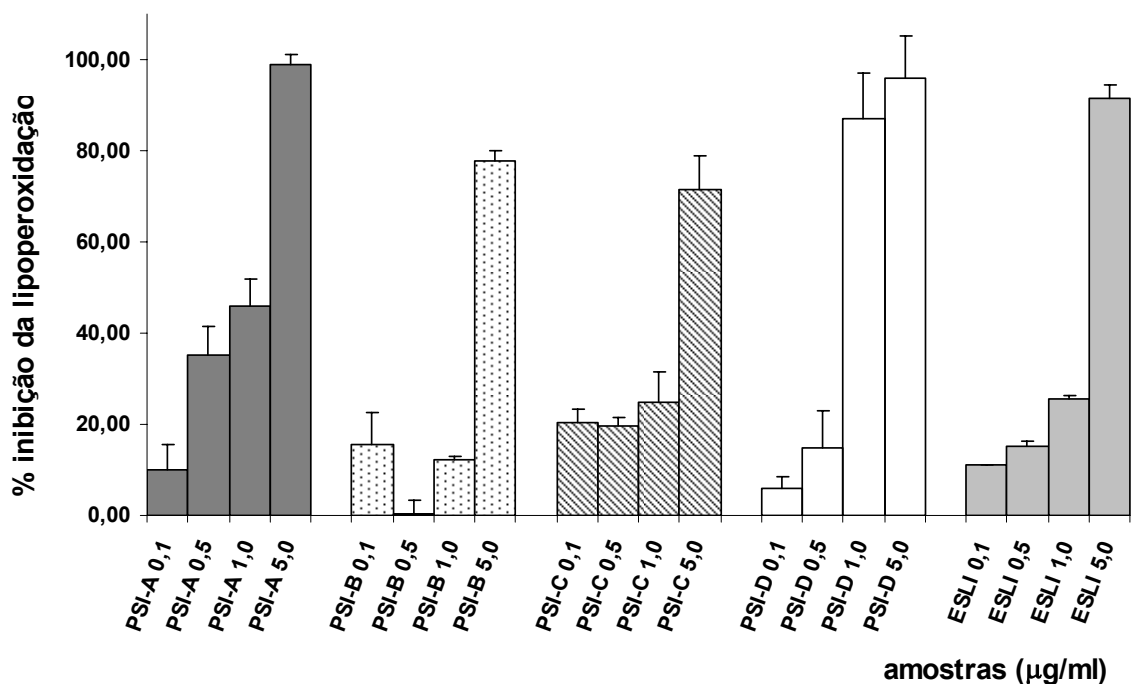


Figura 2.7. Inibição da peroxidação lipídica em homogeneizado de gema de ovo. Os resultados representam a média \pm o desvio-padrão. (n=3). ESLI: extrato seco liofilizado; PSI-A: 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil®; PSI-B: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil®+ 15 % Glucidex®; PSI-C: 70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex®; PSI-D: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil®+ 15 % Avicel.

O mesmo comportamento foi observado para as frações polifenólicas (figura 2.8). As frações polifenólicas testadas apresentaram importante efeito protetor da lipoperoxidação, sendo que a fração FF mostrou-se ligeiramente mais eficiente quando comparada à fração FAB. No entanto, considerando que a concentração de polifenóis é mais que o dobro em FF do que FAB, o efeito sobre a lipoperoxidação *in vitro* não se revelou proporcional.

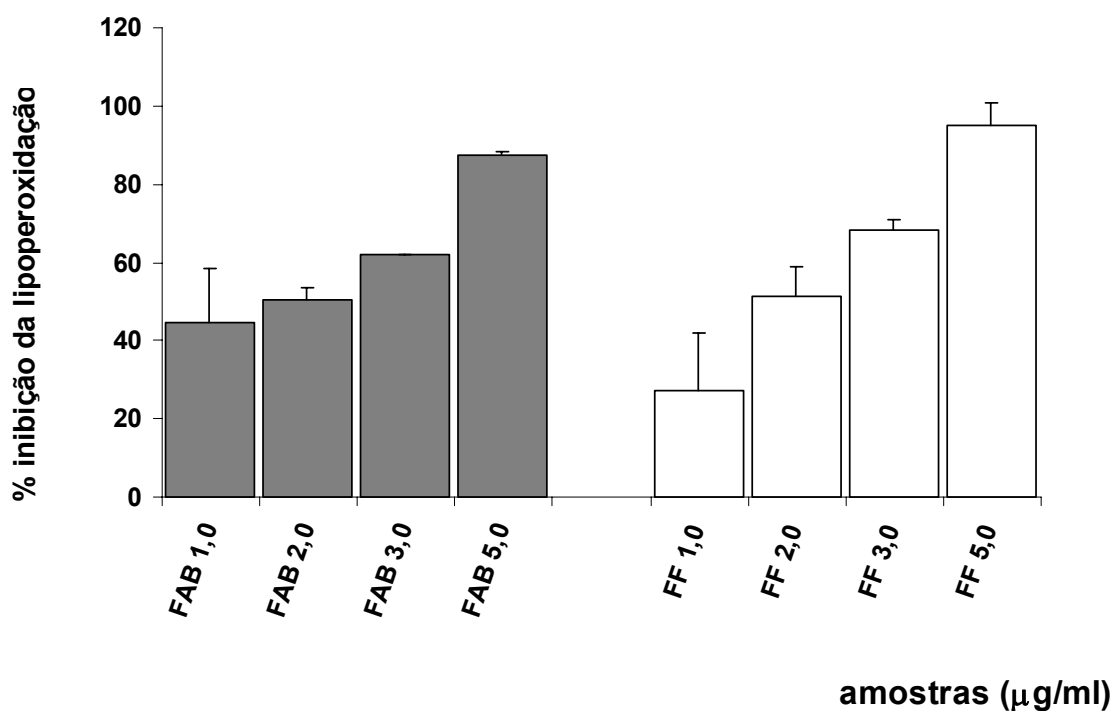


Figura 2.8. Porcentagem de inibição da peroxidação lipídica em homogeneizado de gema de ovo. Os resultados representam a média \pm o desvio-padrão. (n=3); FAB e FF: frações polifenólicas – processo submetido a registro de patente.

Na tabela 2.7 são apresentados as concentrações dos produtos testados ($\mu\text{g/ml}$) necessárias para inibir 50 % da peroxidação lipídica (IC 50%). Tais valores corroboram que, entre os produtos secos por *spray-drying*, PSI-A e PSI-D mostram-se mais promissores, uma vez que apresentam menores valores de IC 50%, seguidos das frações polifenólicas.

Tabela 2.7. Concentração inibitória da peroxidação lipídica para os produtos secos e frações polifenólicas de *Ilex paraguariensis*.

Extratos	IC 50%
ESLI	3,52
PSI-A	1,26
PSI-B	2,77
PSI-C	3,09
PSI-D	0,92
FAB	2,27
FF	1,94

ESLI: extrato seco liofilizado; PSI-A: 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil[®]; PSI-B: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Glucidex[®]; PSI-C: 70 % de resíduo seco + 30 % Glucidex[®]; PSI-D: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil[®] + 15 % Avicel[®]; FAB e FF: frações polifenólicas – processo submetido a registro de patente.

A lipoperoxidação é, caracteristicamente, uma reação em cadeia iniciada pela abstração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado por um radical livre. Esta etapa leva à formação de outros radicais que propagam a reação peroxidativa e carbonilas tóxicas, como o malondialdeído, a diversas estruturas celulares. Pode-se, então, afirmar que *in vitro*, tantos os produtos secos quanto as frações polifenólicas demonstraram atividade antioxidante promissora, podendo auxiliar na prevenção e combate aos danos celulares causados pela lipoperoxidação.

O radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) é a espécie mais reativa encontrada em meios biológicos, reagindo no próprio sítio onde foi gerado, sendo responsável por grande parte dos danos celulares provenientes das espécies redoxi-ativas, causando quebras na estrutura do DNA, lipoperoxidação de membranas e também, oxidação protéica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Para determinar se os produtos secos e frações polifenólicas poderiam, de alguma forma, afetar a formação ou os efeitos deste radical, utilizou-se um método de geração de $\bullet\text{OH}$ que se baseia na oxidação da 2-deoxirribose provocada por $\bullet\text{OH}$,

produzido pela reação de H_2O_2 com o ferro, descrito por CHUNG e colaboradores (1997). Esta técnica espectrofotométrica determina a degradação oxidativa da 2-deoxirribose (2-DR) mediada por radicais hidroxila. Os radicais hidroxila são gerados pela reação de Fenton na presença de Fe^{2+} . O princípio do ensaio é a quantificação do produto de degradação da 2-DR, o malondialdeído (MDA), através de sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (figura 2.9).

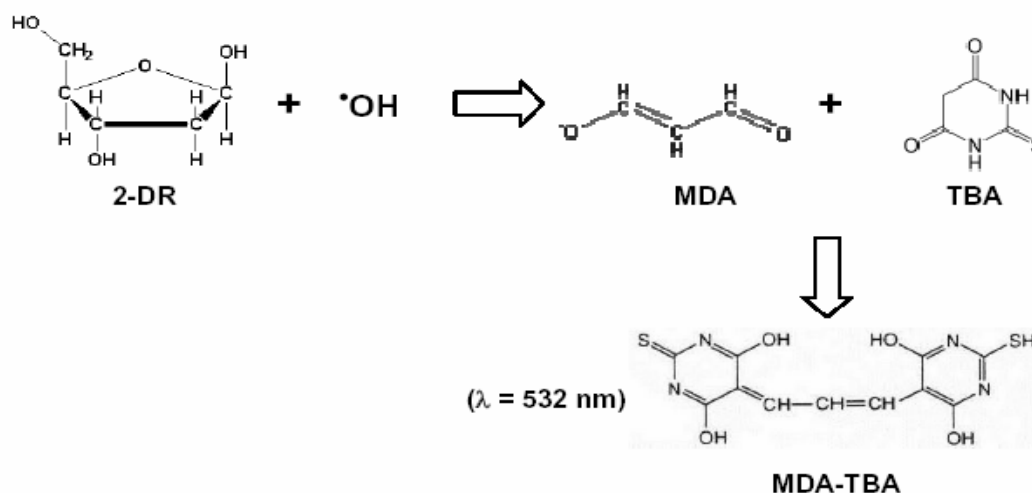


Figura 2.9. Substâncias geradas pela reação de Fenton na presença de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Todos os extratos testados apresentaram atividade antioxidante neste ensaio, pois foram capazes de inibir a degradação da 2-deoxirribose de maneira dependente da concentração. Todos os produtos secos por *spray-drying* apresentaram forte potencial *scavenger* de radicais $\cdot\text{OH}$, de maneira dose-dependente, em relação ao controle, entretanto apresentaram atividade menor que o Trolox. Na concentração mais elevada PSI-C e PSI-D apresentaram uma atividade *scavenger* significativamente maior quando comparados ao PSI-A e PSI-B (figura 2.10). Esta diferença pode ser associada e correlacionada ao maior teor de polifenóis totais encontrados para estes produtos secos (PSI-A: 161,59; PSI-B: 172,44; PSI-C: 177,71; PSI-D: 193,42 mg/g).

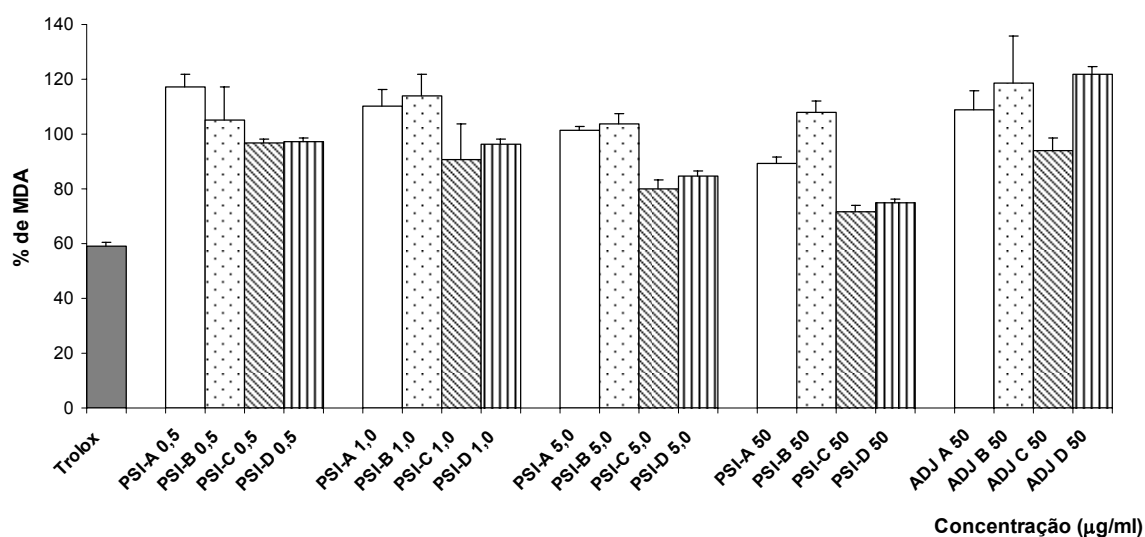


Figura 2.10. Capacidade *scavenger* de radical hidroxila pelos produtos secos. Resultados expressos como média \pm desvio padrão do percentual de produção de malondialdeído. $P < 0,05$.

Entre todos os produtos testados, as frações polifenólicas exibiram atividade *scavenger* de radicais $\bullet\text{OH}$ mais intensa, quando comparadas aos produtos secos por *spray-drying*, bem como ao produto seco liofilizado que as originou (figura 2.11). Diferente do observado para os produtos secos por *spray-drying* a atividade *scavenger* foi maior que aquela apresentada pelo trolox, para ambas as frações, na concentração de 5,0 $\mu\text{g/ml}$ para FAB e a partir da concentração de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para FF. Esta redução, no entanto, foi estatisticamente significativa apenas para a concentração de 5,0 $\mu\text{g/ml}$. A diferença observada entre as duas frações polifenólicas testadas, demonstrou que, neste caso, o maior teor de polifenóis totais apresentados para a fração FF parece ser o fator determinante na atividade (FAB: 192,7; FF: 422,04 mg/g).

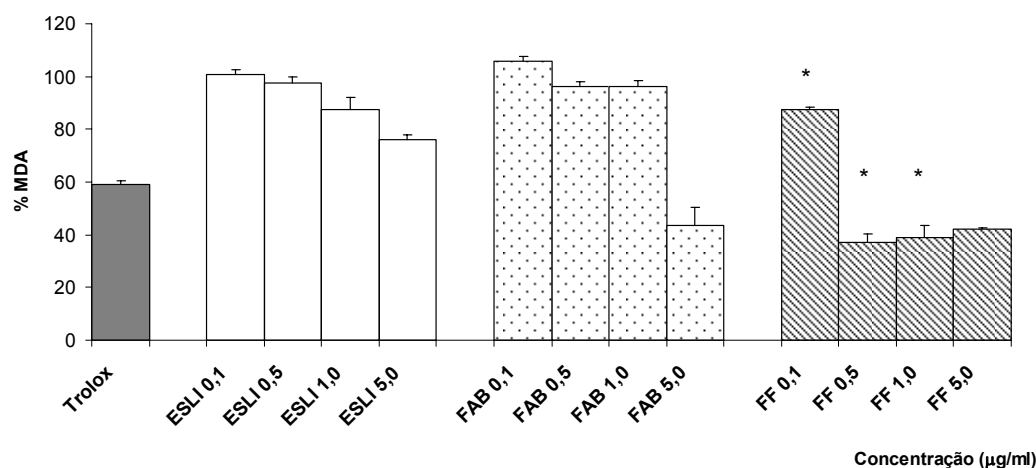


Figura 2.11. Capacidade *scavenger* de radical hidroxila pelo produto seco liofilizado e frações polifenólicas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão do percentual de produção de malondialdeído. $P < 0,05$. FAB e FF: frações polifenólicas – processo submetido a registro de patente.

A partir dos resultados exibidos pelos ensaios *in vitro* com relação à atividade antioxidante dos diferentes extratos analisados, foram selecionados os produtos secos por *spray-drying* que revelaram melhor potencial antioxidante, associado às melhores características tecnológicas e de estabilidade demonstradas no Capítulo 1. Como todos os produtos secos por *spray-drying* testados apresentaram potencial antioxidante *in vitro* selecionaram-se, então, os que demonstraram viabilidade tecnológica de produção em escala semi-industrial, no caso, PSI-A e PSI-D, juntamente com as frações polifenólicas FAB e FF para avaliação subsequente da atividade antioxidante *ex vivo*.

6.2 Avaliação da capacidade antioxidante *ex vivo*

A atividade antioxidante *ex vivo* dos produtos secos PSI-A e PSI-D, bem como das frações FAB e FF foi avaliada por meio do modelo de estresse oxidativo induzido por *ter*-butilhidroperóxido (*t*-BHT) em homogeneizado de fatias de fígado de ratos (FRAGA e TAPPEL, 1988). As concentrações testadas foram previamente determinadas no ensaio de TRAP *in vitro*.

O emprego de modelos de homogeneizado de tecidos tem sido empregado por diversos autores para avaliação do dano oxidativo, pois permite mimetizar as condições fisiológicas. A adição de um indutor de dano oxidativo em homogeneizados de tecido leva ao aumento substancial de morte celular (FRAGA e TAPPEL, 1988, RUDNICK, 2005). A quantificação da lactato desidrogenase (LDH) nos homogeneizados vem sendo empregada por diversos autores como indicador de morte celular (PEÑA *et al.*, 2004; CAMPO *et al.*, 2005). A co-incubação tanto com os produtos secos PSI-A e PSI-D, como as frações polifenólicas FAB e FF demonstraram a diminuição da liberação de LDH, quando comparadas ao controle.

A fim de avaliar se a pré-incubação com PSI-A, PSI-D, FAB e FF era capaz de inibir o dano oxidativo hepático induzido por *t*-BHT, determinou-se, nos homogeneizados, os níveis de TBARS. No presente trabalho, os produtos PSI-A; PSI-D e FAB foram capazes de reduzir a produção de TBARS quando comparados ao controle pré-incubado com *t*-BHT, conforme previamente encontrados nos ensaios de lipoperoxidação *in vitro*. Esta redução, no entanto, não diferiu significativamente do controle antioxidante (figura 2.12A e 2.12B). Curiosamente, a fração FF não comprovou os resultados obtidos *in vitro* (figura 23 C). A ausência de trabalhos na literatura referentes à avaliação da atividade antioxidante *ex vivo* para produtos derivados de *Ilex paraguariensis*, tais como produtos secos e frações enriquecidas em compostos polifenólicos, não nos permite ainda encontrar explicação para a divergência observada nos resultados *in vitro* e *ex vivo*, revelando a necessidade de aprofundamento da investigação.

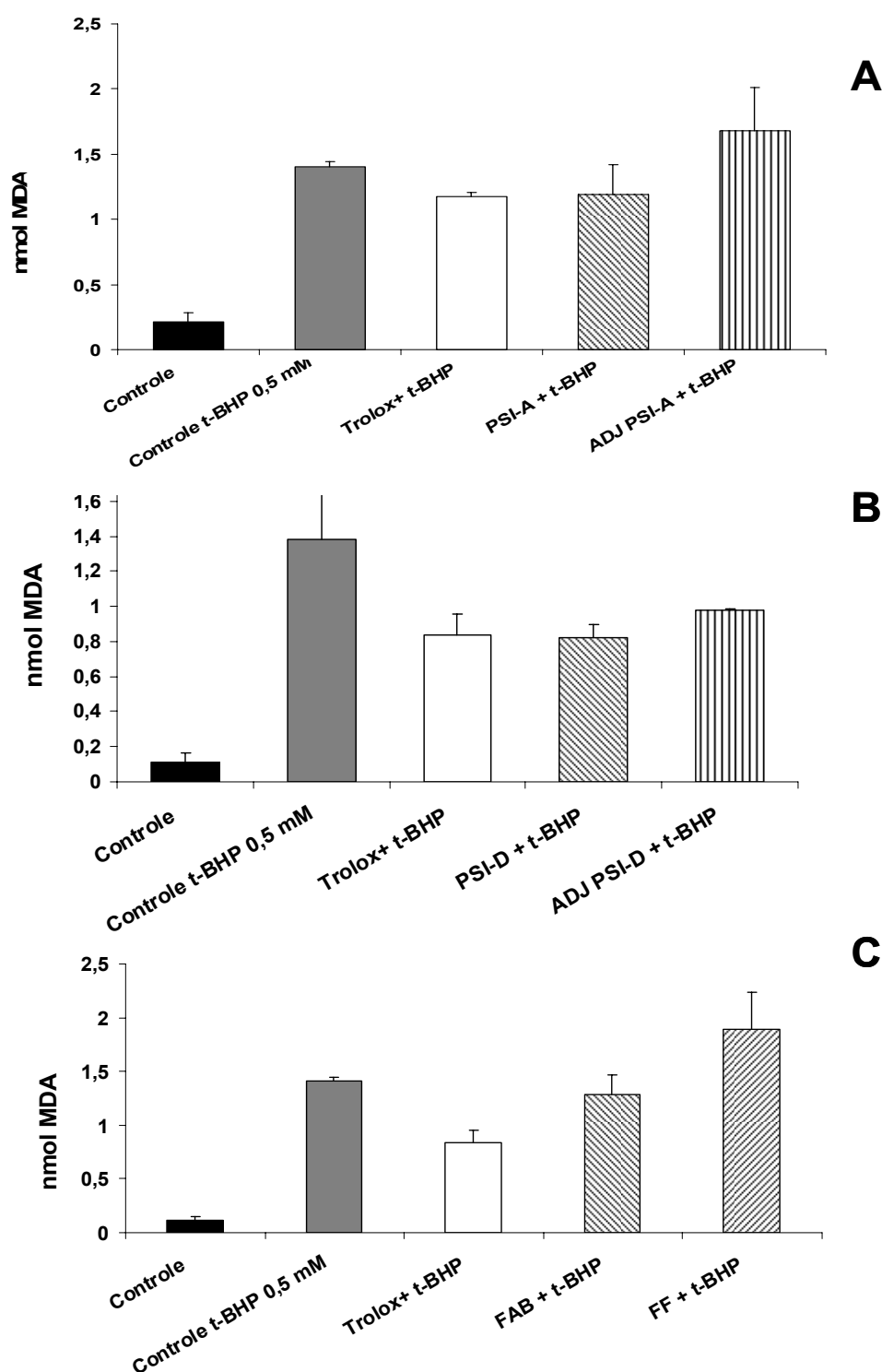


Figura 2.12. Níveis de TBARS em homogeneizado de fatias de fígado. Os resultados representam a média \pm o desvio-padrão (n=3). PSI-A: 70 % de resíduo seco + 30 % Aerosil®; PSI-D: 70 % de resíduo seco + 15 % Aerosil® + 15 % Avicel; FAB e FF: frações polifenólicas – processo submetido a registro de patente.

A dosagem protéica nos homogeneizados demonstrou valores de proteínas abaixo dos limites mínimos necessários para a determinação do dano protéico, desta forma, os níveis de carbonilação protéica nos homogeneizados não puderam ser quantificados.

6.3 Avaliação da capacidade antioxidante *in vivo*

Como não foi evidenciada diferença significativa em relação à atividade antioxidante *in vitro* para os produtos secos analisados, selecionaram-se, para avaliação da atividade antioxidante *in vivo*, o produtos PSI-A, por este ter demonstrado melhor viabilidade tecnológica de produção em escala semi-industrial, além de melhor proteção frente a fotoestabilidade.

No presente trabalho utilizamos um modelo clássico de indução de dano hepático por tetracloreto de carbono (CCl_4). Os efeitos tóxicos do CCl_4 no fígado já foram extensivamente documentados na literatura. Este agente hepatotóxico sofre metabolização no fígado pelo complexo de enzimas oxidativas denominado complexo enzimático citocromo P-450. Este processo gera o radical triclorometila (CCl_3^\cdot). Parte do radical triclorometila gera o radical triclorometil-peroxila ($\text{CCl}_3\text{OO}^\cdot$) o qual desencadeia o processo de peroxidação lipídica das membranas (McCAY et al., 1984; RECKNAGEL et al., 1989; ALEYNIK et al., 1997).

A dose de PSI-A a ser administrada aos ratos foi determinada pelo cálculo da quantidade de produto seco equivalente a uma ingestão de 500 ml de decocto, em uma proporção droga:solvente de 15 % (m/v), por um homem de 70 kg.

Entre os métodos de avaliação da degradação peroxidativa por CCl_4 está o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, através da quantificação do malondialdeído (MDA). Os níveis de MDA são utilizados como indicador de dano oxidativo. O CCl_4 foi eficiente na geração de dano hepático, induzindo lipoperoxidação, uma vez que houve um aumento significativo da concentração de MDA neste grupo. Observou-se que o pré-tratamento com PSI-

A foi capaz de reverter este índice de lipoperoxidação hepática causada pelo CCl_4 , sugerindo que este produto conferiu proteção às membranas celulares contra o ataque oxidativo de espécies reativas, corroborando os ensaios *in vitro* e *ex vivo* realizados, os quais evidenciam para o PSI-A atividade. A avaliação dos valores encontrados pelo método de TBARS (Figura 2.13) demonstra que o pré-tratamento com PSI-A foi efetivo na prevenção ao dano lipídico em fígado de rato. Observa-se, também, que o pré-tratamento com o adjuvante de secagem não exerceu atividade protetora, demonstrado pelos altos índices de MDA encontrados em relação ao controle.

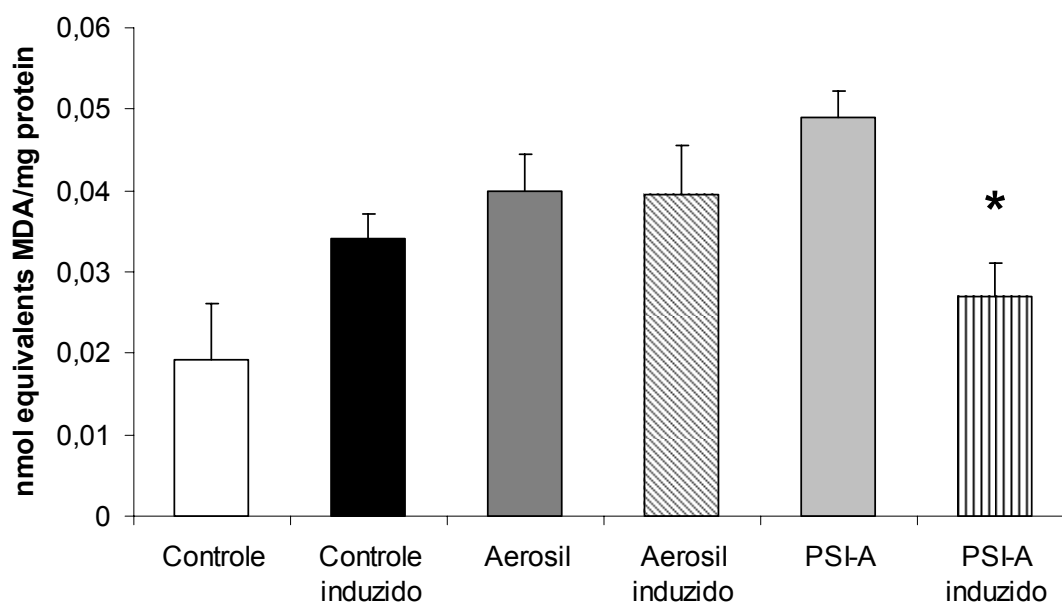


Figura 2.13. Efeito do produto seco por *spray-drying* PSI-A na peroxidação lipídica hepática induzida por CCl_4 . Resultados expressos como média \pm desvio padrão da produção de malondialdeído. $p < 0,05$. PSI-A: grupo tratado sem administração de CCl_4 ; PSI-A induzido: grupo tratado submetido ao dano com administração de CCl_4 .

Dados existentes na literatura sugerem que o CCl_4 induz a carbonilação das proteínas dos hepatócitos de camundongos. Os resultados obtidos mostraram que a administração de CCl_4 causou um aumento na carbonilação de proteínas, quando comparado ao controle que não recebeu o indutor de dano hepático. No entanto,

nenhum efeito protetor significativo frente à carbonilação protéica hepática foi constatado com o pré-tratamento com PSI-A (Figura 2.14). Resultados semelhantes foram encontrados por RUDNICKI (2005) ao avaliar o efeito protetor de extrato de *Passiflora alata* em modelo semelhante de dano hepático, em que a administração do extrato foi eficaz somente na redução da lipoperoxidação, falhando na proteção frente à carbonilação protéica.

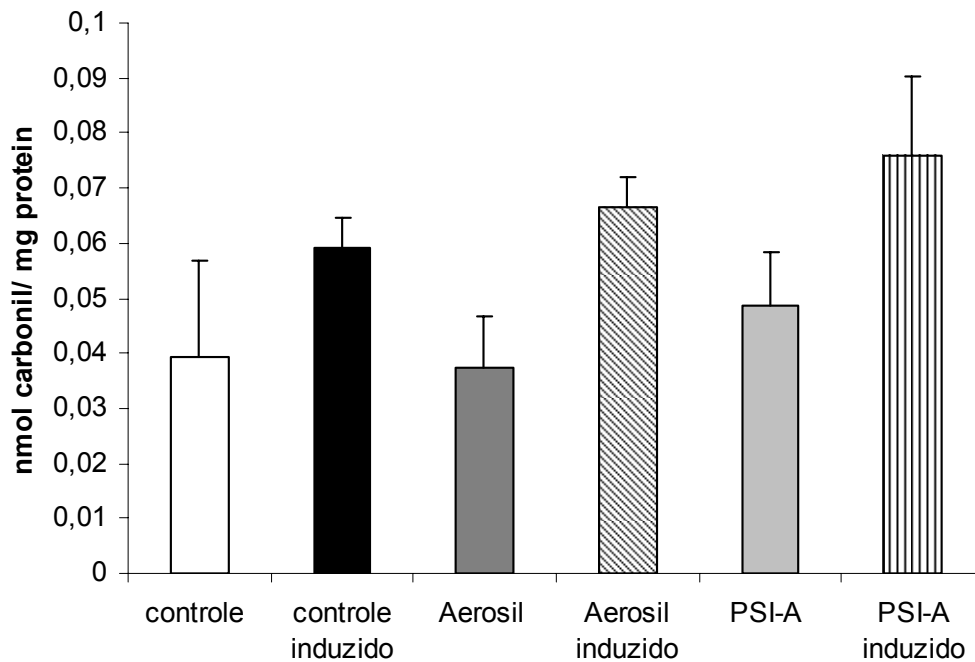


Figura 2.14. Efeito do produto seco por *spray-drying* nos níveis de carbonilação protéica hepática induzida por CCl_4 . Resultados expressos como média \pm desvio padrão da produção de malondialdeído. * $p < 0,05$. PSI-A: grupo tratado sem administração de CCl_4 ; PSI-A induzido: grupo tratado submetido ao dano com administração de CCl_4 .

Outra característica do dano oxidativo induzido por CCl_4 é a deficiência do sistema de defesa enzimático, resultante da inativação das mesmas pelos peróxidos de lipídios e/ou pela produção elevada de espécies reativas (SZYMONIK-LESIUK *et al.*, 2003). Assim sendo, avaliou-se a atividade enzimática hepática das enzimas superóxido desmutase (SOD) e catalase (CAT). A atividade da SOD foi determinada segundo metodologia descrita por BANNISTER e CALABRESE (1987), em que a atividade enzimática é mensurada por meio da formação do adenocrono resultante da oxidação da adrenalina pelo radical superóxido. A atividade da CAT foi

determinada segundo método de AEBI (1984), o qual se baseia na decomposição de H_2O_2 nas amostras. A taxa de decomposição de H_2O_2 é determinada em espectrofotômetro, sendo diretamente proporcional à atividade da CAT.

Os resultados demonstram que o CCl_4 causou uma pequena elevação nos níveis de CAT e SOD, porém não significativa estatisticamente, em relação ao controle negativo (dado não apresentado). No entanto, o tratamento prévio com PSI-A elevou, significativamente, a atividade da SOD quando comparada ao grupo controle ($p < 0,05$) (tabela 2.8).

Resultados semelhantes já foram descritos na literatura utilizando o mesmo modelo *in vivo*, demonstrando que o pré-tratamento com extratos ricos em polifenóis pode impedir a inativação das enzimas antioxidantes, possivelmente por um mecanismo de seqüestro de espécies reativas ou indução da expressão destas enzimas (CHIADAMBARA *et al.*, 2002).

Tabela 2.8. Efeito do pré-tratamento com PSI-A na atividade das enzimas antioxidantes hepáticas em ratos tratados com CCl_4 .

Enzima	Controle (n=05)	PSI-A (n=05)	Aerosil® (n=05)
SOD (U/mg proteína)	19,24 ± 3,41	31,47 ± 7,12*	18,47 ± 5,54
CAT (U/mg proteína)	28,46 ± 6,34	34,88 ± 22,93	27,38 ± 11,00

Os resultados representam a média ± erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

7. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos na determinação do potencial antioxidante total (TRAP) dos produtos secos ESLI, PSI-A, PSI-B, PSI-C, PSI-D, permitiram verificar que todos foram eficientes na redução da quimiluminescência, de maneira dose-dependente. O mesmo foi constatado para as frações FAB e FF, revelando uma correlação direta entre potencial antioxidante e teor de polifenóis.
- Tanto os produtos secos por *spray-drying*, como as frações polifenólicas apresentaram atividade antioxidante, de maneira dose-dependente, através da medida da proteção frente à lipoperoxidação (TBARS) *in vitro*;
- De maneira semelhante, tanto os produtos secos por *spray-drying*, como as frações polifenólicas apresentaram atividade *scavenger* de radicais hidroxila *in vitro*.
- Na investigação da atividade antioxidante *ex vivo* os produtos PSI-A e PSI-D apresentaram atividade antioxidante, expressa pela redução da produção de TBARS em homogeneizado de fatias de fígado de rato, resultados corroborando os obtidos nos ensaios *in vitro*.
- Os animais pré-tratados, por via oral, na dose de 386 mg/kg com PSI-A em modelo de dano oxidativo hepático induzido por CCl₄, apresentaram níveis de TBARS significativamente menores em relação aos animais do grupo controle.
- A atividade enzimática das enzimas catalase e superóxido desmutase foi significativamente maior nos animais pré-tratados com PSI-A, em relação aos animais do grupo controle.
- Não foi evidenciada atividade antioxidante *in vivo* para o grupo de animais tratados com o adjuvante empregado na obtenção do PSI-A, sugerindo que sua adição ao processo de secagem não interferiu na atividade biológica dos produtos derivados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALEYNIK, I. S.; LEO, A. M.; MA, Y.; ALEYNIK, K. M.; LIEBER, S. C. Polyenylophosphatidil choline prevents carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation while it attenuates liver fibrosis. **Hepatology**, v. 27, p. 554- 561, 1997.

BANISTER, J.V.; CALABRESE I. Assays for SOD. **Methods and Biochemistry Analysis**, v. 32, p. 279-312, 1987.

BECKER, L. B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular Research*. v. 61, p. 461-470, 2004.

BECKMAN, K. B. e AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 2, p. 547-581, 1998.

BELITZ, H.D. e GROSCH, W. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, p. 645-656, 1988.

BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**, v. 77, p. 345-358, 2005.

BOVERIS, A. e CADENAS, E. **Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species**. In: CLERCH, L; MASSARO, D. Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function. Marcel Decker: New York, v. 105, p 1-25, 1997.

BRACESCO. N.; DELL, M.; ROCHA, A.; BEHTASH, S.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A.; NUNES, E. 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. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, n. 3, p. 379-387, 2003.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, New York, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

BRITISH HERBAL PHARMACOPOEA. London: British Herbal Medicine Association, 1983. p. 117-118.

CAMPO, G.M.; AVENOSO, A.; D'ASCOLA, A.; CAMPO, S.; FERLAZZO, A.M.; SAMÃ, D.; COLATRONI, A. Purified human plasma glycosamino glycans limit oxidative injury induced by iron plus ascorbate in skin fibroblast cultures. **Toxicology in Vitro**. v, 19, p. 561-572, 2005.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant as prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749-760, 1997.

CARBONARI, K.A. **Avaliação do potencial antioxidante (*in vitro* e *in vivo*) e antiinflamatório de *Ourotea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura***. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFSC, Santa Catarina, 2005.

CHANDRA, S e MEJIA, E. G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant capacity, and Quinone Reductase Activity of na Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHIDAMBARA, M.; SING, R.P.; JAYAPRAKASHA.G.K. Antioxidante activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 5909-5914, 2002.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168. 2002.

CHUNG, S.K.; OSAWA T.; KAWAKISKI, S. Hydroxy radical scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 118-123, 1997.

COSTA, P.L. e BADINI, J. Estudo Botânico e Químico de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Da variedade *Eunera loes*. **Tribuna Farmacêutica**, v. 7, n. 9, p. 177-184, 1939.

DRAPER, H.H. e HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-31, 1990.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. In: **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47

DURÁN, R.M. e PADILLA, R.B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**. Sevilla: v. 44, n.2, p. 101-106, 1993.

EDWIN, G. e REITZ, R. Aquifoliáceas. In: REITZ, R. (Ed.). **Flora Ilustrada Catarinense. I parte**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1967.

ERNSTER, L. e HOCHSTEIN, P. Membrane lipid peroxidation: cellular mechanisms and toxicological implications. In: C. A. Tyson e J. M. Frazier. **Methods in Toxicology**. Academic Press, 1994. p. 33-45.

FERGUSON, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 89-111, 2001.

FERREIRA, A. L. A. e MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

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

FRAGA, C.G. e TAPPEL, A.L. Damage to DNA concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices. **Biochemistry Journal** , v. 252, p. 893-896, 1988.

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

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: introduction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research**

Communications, v. 224, p. 338-344, 1996.

GUGLIUCCI, A. e MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antitrombin II. **Life Sciences**, v. 72, p. 279-292, 2002.

GUGLIUCCI, A. e STAHL, A.J.C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 35, n. 1, p. 47-56, 1995.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HADDAD, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. **Cellular Signalling**, v. 14, p. 879-897, 2002.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs and Aging**, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3 ed. Oxford: Oxford University, 2007.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods**. London: Chapman and Hall, p. 33-88, 1973.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts. Based on FE(III)Xylenol orange complex formation, **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, n. 3, p. 271-280, 1995.

IMBESI, A. **Indici delle piante = index plantarum**. Messina: Istituto di Farmacognosia dell'Università di Messina, 1964.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 969-978, 1988.

LEVINE, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 790-796, 2002.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENS, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADMAN, E.R. Determination of carbonil content in oxidativly modified proteins. **Methods in Enzimology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 153-158, 1995.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, M. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with folin reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUNCEFORD, N. e GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, p. 419-427, 2005.

MAURICIO, A. Q. **Estudo da atividade antioxidante do ácido caféico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético**. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, UNB, Brasília, 2006.

McCAY, P. B.; LAI, E. K.; POYER, J. L.; DuBOSE, C.M.; JANZEN, E. G. Oxygen- and carbon-centered free radical formation during CCl₄ metabolism: observation of lipid radicals in vivo and in vitro. **Journal Biological Chemistry**, v. 259, p. 2135-2143, 1984.

MEDJIA, E.G.; SONG, Y.S.; RAMIREZ-MAREZ, M.V.; KOBAYASHI, H. Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) tea on Topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1966-1973, 2005.

MELLO, A. C. e MANEGHINI, R. *In vivo* formation of single-strand breaks in DNA

by hydrogen peroxide is mediated by Haber-Weiss Reaction. **Biochemical Biophysic Acta**, v. 781, p. 56-73, 1984.

MOURE, A.; CRUS, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

NAGATA, H. et al. antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase, **Jour Exp Clin Med**, v. 24, p. 1-11, 1999.

NEBERT, D. W. et al. Role of the Aromatic Hydrocarbon Receptor and [Ah] Gene Battery in the Oxidative Stress Response, Cell Cycle Control, and Apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 65-85, 2000.

OHKOWA, M.; OHISI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

PEÑA S. et al. Role of glutathione in thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, p. 51-56, 2000.

PEÑA, V.A.; DIOS, P.D.; ROCAMONDE,S.L.; SIERRA, R.T.; SEGADE, S.R. A standardised protocol for quantification of lactate dehydrogenase activity in saliva. **Archives of Oral Biology**. v. 49, p. 23-27, 2004.

PRESTON, T. J., ABADI, A., WILSON, L. et. al. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potencial for drug development. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 49, p. 45-61. 2001.

RAJALAKSMI, D. e NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. **Food Antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. New York: Marcel Dekker, p. 65-157, 1995.

RAMIREZ-MARES, M. V.; CHANDRA, S.; MEJIA, E.G. In vitro Chemopreventive activity of *Camellia sisensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research**, v. 554, n. 1-2, p. 53-65 2004.

REBELO M. I. O stress oxidativo, **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. XLVI, n. 4, p. 161-168, 1996.

RECKNAGEL, R. O.; GLENDE Jr. E. A.; DOLAK, J. .; WALLER, E. L. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. **Pharmacology Therapeutic**, v. 43, p. 139-154.

RUBERTO G.; BARATTA M.T.; DEANS S.G.; DORMAN H.J. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. **Planta Medica**, v. 66(8), p. 687-93, 2000.

RUDNICKI, M. **Propriedade Antioxidante de Extratos de *Passiflora alata* Dryander de *Passiflora edulis* Sims**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, UFRGS, Porto Alegre, 2005.

SAMUEL, S.; KATHIRVEL, R.; JAYAVELU, T.; CHINNAKKANNU, P. Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of DL- α -lipoic acid. **Toxicology letters**, v. 155, p. 27-34, 2005.

SCANDALIOS, J. G. Introduction. *Free Radicals in Biology and Medicine*. v. 23, p. 471- 472, 1997.

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 357-360, 2000.

SIQUEIRA, R de. PECHNIK. E.; CRUZ, A. Contribuição à química e à farmacologia do mate. *Tribuna Farmacêutica*, v. 21, n. 1, p. 1-5, 1953.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

STEBBENS, W. E. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 75, p. 265-276, 2003.

SZYMONIK-LESKISIUK, S.; CZECHOWSKA, G.; STRYJECJA-ZIMMER, M.; SLOMKA, M.; MADRO, A.; CELINSKI, K.; WIELOSZ, M. Catalase, superoxide

desmutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. **Journal Hepatobiliary Pancreat Surg**, v., 10, p. 309-315, 2003.

TIEPPO, M.; PORAWSKI, M.; SALVADOR M.; MOREIRA, A.J.; COLLADO, P.S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; MARRONI N.P. Croton cajucara BENTH. Leaf Extract Scavenges the Stable Free Radical DPPH and Protects Against Oxidative Stress Induced by Paraquat. **Biol. Pharm. Bull.** v.29, n. 1, p. 161—165, 2006.

TRUEBA, G.P. e SÁNCHEZ, G. M. Los flavonoides como antioxidantes naturales. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 20, n. 4, p. 397-306, 2001.

WAYNER, D.D.M.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; LOCKE, S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. **FEBS Letters**, v. 187, p. 33-37, 1985.

YAMANAKA, N.; ODA, O.; NAGAO. S. Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu²⁺ induced lipoprotein oxidation, **FEBS Letters**, v. 405 p. 186-190, 1997.

YOUNES, M. e SIEGERS, C. P. Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion. **Planta Medica**, v. 43, p. 240-244, 1981.

DISCUSSÃO GERAL

No que tange ao desenvolvimento de novos produtos de *Ilex paraguariensis*, a evolução é lenta. Desde que a erva-mate passou a ser processada industrialmente, o seu principal consumo se dá na forma de produtos tradicionais, como o chimarrão, tererê ou chá. A possibilidade de ampliação de mercado depende da priorização do aprimoramento tecnológico no processamento da erva-mate, por meio de planejamento estratégico de sua produção e transformação, que atenda as atuais exigências de qualidade e amplie seu uso em novos produtos tais como fitoterápicos, cosméticos ou alimentos funcionais.

As recentes descobertas sobre os mecanismos de oxidação celular têm estimulado a realização de uma pesquisa sobre a ação antioxidante de constituintes polifenólicos, presentes em algumas plantas e alimentos. A atividade antioxidante, *in vitro* e *ex vivo*, de infusões de erva-mate tem sido objeto de estudos publicados, sugerindo que os derivados cafeoilquínicos e os flavonóides (como rutina, quercetina e canferol) sejam os responsáveis pelas propriedades antioxidantes e/ou seqüestradoras de radicais livres demonstradas (FILIP *et al.*, 2000; SCHINELLA *et al.*, 2000; CHANDRA e MEJIA, 2004; RAMIREZ-MARES *et al.*, 2004).

Neste contexto, o potencial terapêutico de preparações extrativas de erva-mate, o desenvolvimento de produto padronizado, com parâmetros conhecidos, tais como composição química, atividades biológica e toxicológica, apresenta especial importância, na medida em que constitui produto intermediário para a preparação de novos produtos de aplicação farmacêutica, cosmética ou alimentar, além de propiciar o estabelecimento de metodologias de controle de qualidade da matéria-prima e produtos derivados.

O capítulo 1 do presente trabalho abordou o desenvolvimento e caracterização tecnológica de produtos secos por *spray-drying* e fração polifenólica obtidos a partir de solução extrativa aquosa de *Ilex paraguariensis*. Para isto, realizou-se a caracterização tecnológica tanto da matéria-prima vegetal, como da solução extrativa, por meio de ensaios físicos e físico-químicos e químicos.

A matéria-prima vegetal, constituída de folhas e talos de *Ilex paraguariensis*, apresentou, características semelhantes às relatadas por outros autores (CAMPOS, 1996; GNOATTO, 2002), que empregaram matéria-prima de mesma origem. O

método de decocção, para extração da matéria-prima vegetal, foi selecionado com base nos resultados obtidos por Campos (1996).

Sendo assim, realizou-se o desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de polifenóis, aplicada à matéria-prima vegetal e produtos derivados, empregando como substâncias de referência ácido clorogênico e rutina. A validação do método foi realizada tanto para o decocto (SEI) como para os produtos secos por *spray-drying* (PSI). O método apresentou linearidade e elevada precisão intermediária, caracterizada pelos baixos coeficientes de variação obtidos nos testes. O ensaio de exatidão evidenciou que o método em estudo permitiu a recuperação de mais de 99% das substâncias de referência. A validação do método para o PSI-A demonstrou que o adjuvante de secagem empregado não interferiu na análise dos polifenóis, viabilizando, assim, a sua aplicação nas demais etapas do processo de elaboração de produtos derivados.

O emprego da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas para a identificação e quantificação de polifenóis em *Ilex paraguariensis* foi previamente descrito por CARINI e colaboradores (1998) e FILIP e colaboradores (2001). No presente trabalho esta técnica foi empregada com o objetivo de identificar os polifenóis presentes nos produtos desenvolvidos. Foram identificados os picos correspondentes ao ácido neo-clorogênico e ao ácido cripto-clorogênico. Estas substâncias, bem como as demais que apresentaram espectros de UV característicos de derivados cafeoilquínicos foram quantificados expressando-se sua concentração em ácido clorogênico.

A SEI e o PSI-A apresentaram, respectivamente, concentrações de polifenóis totais de 7,33 mg/ml e 161,59 mg/g denotando a obtenção de um produto seco concentrado em polifenóis. Em ambos, predominou a presença de derivados cafeoilquínicos.

O fracionamento do extrato liofilizado de *Ilex paraguariensis* demonstrou-se eficaz quanto à separação dos compostos polifenólicos. Na análise do perfil cromatográfico das frações obtidas, observou-se a presença dos ácidos cafeoilquínicos (ácido clorogênico, cripto-clorogênico e iso-clorogênico) nas frações codificada FAB, já os derivados dicafeoilquínicos e rutina concentraram-se na fração FF.

Quatro produtos secos por *spray-drying* foram produzidos, em escala semi-industrial, e caracterizados quanto aos parâmetros de viabilidade tecnológica, como fluxo, densidades bruta e de compactação, além da realização de um estudo preliminar de estabilidade frente à luz UV em 254 nm e 352 nm. O produto PSI-A, contendo dióxido de silício coloidal em sua composição, apresentou as melhores características de rendimento e fluxo, além de exibir melhor fotoestabilidade, uma vez que apresentou menor percentual de degradação dos compostos polifenólicos, após 48 horas de exposição (2 a 13 %), comparativamente aos demais produtos secos.

No capítulo 2, foi abordada a avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* dos produtos secos por *spray-drying* e da fração polifenólica de *Ilex paraguariensis*. Cabe ressaltar que a literatura relata a realização de estudos com ensaios *in vitro* e *ex vivo* de infusões, por se constituir na forma tradicionalmente consumida. Verifica-se que os resultados encontrados são bastante heterogêneos, o que pode ser explicado tanto pela utilização de diferentes maneiras para o preparo das infusões, bem como pela variação que pode ocorrer na composição da matéria-prima em função da variedade, região, clima e fatores de manejo da planta (BASTOS e TORRES, 2003). Até o presente não foram encontrados relatos de investigação de atividade antioxidante para produtos secos derivados de *Ilex paraguariensis*, ou de frações enriquecidas em constituintes polifenólicos, o que revela o ineditismo do estudo.

Os estudos de avaliação da atividade antioxidante *in vitro* foram realizados com os produtos secos por *spray-drying*, por liofilização, bem como com as frações polifenólicas FAB e FF. Tanto os produtos secos, como as frações analisadas, apresentaram um alto potencial antioxidante *in vitro*, de maneira dose-dependente, em todas as concentrações analisadas.

Os resultados obtidos revelam que há uma correlação direta entre o teor de polifenóis e sua atividade antioxidante *in vitro*; os produtos que apresentaram maior potencial antioxidante apresentaram maior teor de polifenóis. Resultados semelhantes foram obtidos para as frações polifenólicas (FAB e FF), as quais apresentaram atividade antioxidante equivalente à apresentada pelo liofilizado que lhes deu origem, porém em concentrações cerca de dez vezes menores, sugerindo que o processo de fracionamento foi efetivo na concentração desta classe de

substâncias. Não foi evidenciada atividade antioxidante para os adjuvantes de secagem testados separadamente, o que sugere que sua adição ao processo de secagem não interferiu na atividade biológica dos produtos derivados.

Como não foi evidenciada diferença significativa em relação à atividade antioxidante *in vitro* para os produtos secos analisados, selecionaram-se, para avaliação da atividade antioxidante *ex vivo*, os produtos PSI-A e PSI-D, por apresentarem melhor viabilidade tecnológica de produção em escala semi-industrial, além de melhor fotoestabilidade. Também as frações polifenólicas FAB e FF foram testadas. Como modelo experimental empregou-se o homogeneizado de fatias de fígado de rato, sendo o dano oxidativo induzido por *ter*-butilhidroperóxido (*t*-BHT). Apesar dos níveis de TBARS serem reduzidos nos grupos pré-incubados com produtos secos PSI-A e PSI-D e fração polifenólica FAB, esta redução não diferiu significativamente do grupo controle, demonstrando que o pré-tratamento nas concentrações testadas não foi suficiente para reverter o dano oxidativo causado por *t*-BHT.

A literatura relata que o efeito antioxidante *in vivo* de polifenóis é dependente de diversos fatores tais como via de administração e biodisponibilidade (KAPLAN *et al.*, 2001; VILSON *et al.*, 2004). A biodisponibilidade de constituintes polifenólicos pode ser influenciada pela estrutura química, absorção intestinal, interação com outros alimentos e metabolismo intestinal e hepático (MANACH *et al.*, 2004). O efeito antioxidante *in vivo* do produto seco por *spray-drying* PSI-A foi investigado empregando um modelo clássico de dano oxidativo hepático induzido por CCl₄ (McCAY *et al.*, 1984; RECKNAGEL *et al.*, 1989; ALEJNIK *et al.*, 1997). Os resultados encontrados demonstraram que o pré-tratamento dos animais com PSI-A foi capaz de inibir o dano induzido por CCl₄, demonstrado através da redução nos níveis de TBARS hepático e aumento da atividade enzimática de catalase e superóxido desmutase, quando comparados ao grupo controle. Testes *in vivo* das frações FAB e FF constituem perspectiva para a continuidade da investigação. Os resultados sugerem que o efeito hepatoprotetor frente ao dano oxidativo demonstrado no ensaio *in vivo*, pode ser atribuído à capacidade antioxidante do PSI-A, já anteriormente demonstrada nos ensaios *in vitro* e *ex vivo*.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados apresentados nos Capítulo 1 e Capítulo 2 do presente trabalho permitem concluir que:

- A metodologia analítica empregada na quantificação de polifenóis mostrou-se eficiente para a detecção e quantificação destes constituintes em preparações obtidas a partir de *Ilex paraguariensis*;
- A secagem da solução extrativa aquosa de *Ilex paraguariensis*, em escala semi-industrial, permitiu a obtenção quatro de produtos secos, com características tecnológicas diferenciadas;
- Dentre os produtos desenvolvidos o produto PSI-A apresentou melhores características tecnológicas e de fotoestabilidade;
- Todos os produtos secos e frações polifenólicas testadas apresentaram capacidade antioxidante *in vitro*, de maneira dose-dependente, sugerindo que os polifenóis sejam os responsáveis pela atividade antioxidante demonstrada;
- O pré-tratamento com PSI-A determinou proteção de fígado de rato frente ao estresse oxidativo e dano celular induzido por tetracloreto de carbono (CCl₄), medido por ensaios TBARS *in vivo* e pela atividade das enzimas catalase e superóxido desmutase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEYNIK, I. S.; LEO, A. M.; MA, Y.; ALEYNIK, K. M.; LIEBER, S. C. Polyenylophosphatidil choline prevents carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation while it attenuates liver fibrosis. **Hepatology**, v. 27, p. 554- 561, 1997.

BASTOS, D.H.M. e TORRES, E.A.F.S. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Journal Of The Brazilian Society Of Food And Nutrition**, v.26, p. 77-89, 2003.

CAMPOS, A.M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Erva-mate)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1996.

CARINI, M.; MAFFEI FACINO, R.; ALDINI, G. ; CALLONI, M.; COLOMBO, L. Characterization of Phenolic Antioxidants from mate (*Ilex paraguariensis*) by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and liquid Chromatography/Tandem mass Spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, p. 1813-1819, 1998.

CHANDRA, S e MEJIA, E. G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant capacity, and Quinone Reductase Activity of na Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis:UFSC, 2001. Cap. 12, p. 197-220.

FILIP, R.; LOPEZ, P.; GIBERT, G.; CAUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 774-778, 2001.

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

GNOATTO, S.C.B. **Metodologias Analíticas para Quantificação de Marcadores Químicos em Preparações de *Ilex paraguariensis* (A. St. Hil.) e Desenvolvimento de Extrato Seco por Nebulização.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2002.

KAPLAN, M.; HAYEK, T.; RAZ, A.; COLEMAN R.; DORNFELD, L.; VAYA, J.; AVIRAM, M. Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2082-2089, 2001.

MACCARI, A.J. e SANTOS, A.P.R. **Produtos Alternativos e Desenvolvimento da Tecnologia Industrial na Cadeia Produtiva da Erva-Mate.** MCT/CNPq/PADCT. Curitiba, PR, 2000.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food, sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**. v, 79, p. 727-747, 2004

McCAY, P. B.; LAI, E. K.; POYER, J. L.; DuBOSE, C.M.; JANZEN, E. G. Oxygen- and carbon-centered free radical formation during CCl₄ metabolism: observation of lipid radicals in vivo and in vitro. **Journal Biological Chemistry**, v. 259, p. 2135-2143, 1984.

RAMIREZ-MARES, M. V.; CHANDRA, S.; MEJIA, E.G. In vitro Chemopreventive activity of *Camellia sisensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research**, v. 554, n. 1-2, p. 53-65, 2004.

RECKNAGEL, R. O.; GLENDE Jr. E. A.; DOLAK, J. .; WALLER, E. L. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. **Pharmacology Therapeutic**, v. 43, p. 139-154.

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 357-360, 2000.

VALDUGA, A.T. **Uso Sustentado e Processamento de *Ilex paraguariensis* St. Hil (Erva-mate).** Dissertação (Mestrado em Ciências : Ecologia e Recursos Naturais) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, UFRGS, Porto Alegre, 2002.

VINSON, J.A.; TEUFEL, K.; WU,N. Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant and fibrinolytic mechanisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v, 52, p. 3661-3665.

ANEXO 1

Author Queries

JOURNAL: LJLC

MANUSCRIPT: 263230

AQ Please check if the short title on the right hand side page is ok.

Citation Preview

Dear Author,

Below is a preview of the citation record for your article as it will appear on the journal Contents Page. Please review this record for author order and author name spelling. The author list will be made available to indexing services in the format on this page.

Many thanks for your assistance.

Validation of an LC Method for Polyphenol Assay in Extractive Solutions from *Ilex paraguariensis* (Mate)

F. A. da Silva, C. Pavei, G. G. Ortega, V. L. Bassani, E. M. Lima, D. G. A. Diniz, and J. C. F. Moreira

Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies[®], 30: 1–13, 2007

Copyright © Taylor & Francis Group, LLC

ISSN 1082-6076 print/1520-572X online

DOI: 10.1080/10826070701633848

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

Validation of an LC Method for Polyphenol Assay in Extractive Solutions from *Ilex paraguariensis* (Mate)

Francilene Amaral da Silva, Cabral Pavei,

George González Ortega, and Valquiria Linck Bassani

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
RS, Brazil

Eliana Martins Lima and Danielle Guimarães Almeida Diniz

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal de Goiás,
Goiânia, Go, Brazil

José Cláudio Fonseca Moreira

Centro de Estudo em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica,
Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract: A liquid chromatography (LC) method was developed and validated for identification and quantification of polyphenols in aqueous extractive solution from *Ilex paraguariensis* (erva-mate), in agreement with the ICH requirements for analytical methods. The analysis was performed using a RP 18 column, in gradient solvent. Chlorogenic acid (CLOA) and rutin (RU) were used as external standards. The standard curves for CLOA and RU were linear with correlation coefficients higher than 0.9980. The LC method showed excellent performance in separating seven peaks. The method showed excellent repeatability (R.S.D. < 2.0%) and accuracy (CLOA = 97.4 and RU = 104.0%). Besides CLOA and RU, six other constituents were detected, which were identified by LC-MS/MS based on their mass spectra in full scan mode and retention times compared with those available in the literature data. The analytical method was successfully applied for quantifying polyphenols in four different extractive solutions from erva-mate, a decoction (ES), an infusion

Address correspondence to Valquiria Linck Bassani, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Avenida Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: proreitorpg@ufrgs.br

46 (ESI), and an extractive solution obtained by turbo extraction with water (TE₁) or
47 ethanol 40% (v/v) (TE₂). The last one presented the highest polyphenol concentration.

48
49 **Keywords:** LC, Polyphenols, ICH validation, *Ilex paraguariensis*, Chlorogenic acid,
50 Rutin

51

52

53 INTRODUCTION

54

55 *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. is a popular species known as “Mate”. The
56 product available in the market, which is prepared by stabilization, drying,
57 and grinding of leaves and stems is also called “Mate” or “erva-mate”.

58 The species is economically and socially of great interest in South
59 America where it is consumed as the traditional beverage called
60 “chimarrão” or “Mate”, which is prepared by infusion of “erva-mate”.

61 Concerning the chemical composition, the main constituents reported for
62 *I. paraguariensis* are methylxanthines,^[1] saponins,^[2–4] and polyphenols,^[5,6]
63 all of them presenting potential therapeutic interest. In the polyphenols
64 class, the presence of flavonoids such as quercetin, rutin, and caffeoyl deriva-
65 tives such as chlorogenic acid have already been reported,^[6] being that its
66 presence is related to the antioxidant activity of this species.^[7–9]

67 Regarding the analysis of these compounds, Filip et al.^[6] have previously
68 reported a LC quantitative method to separate and to identify the phenolic
69 compounds in South America *Ilex* species. Carini et al.^[10] have developed
70 an analytical method for the caffeoyl derivatives in *I. paraguariensis*
71 extracts using liquid chromatography associated with mass spectroscopy
72 detection to identify ten compounds. Recently, Bravo et al.^[11] reported a
73 LC/MS method for determining the polyphenol composition of the mate
74 extracts. However, as far as we know, no method regarding polyphenol quanti-
75 fication has been described taking into account the ICH requirements in order
76 to validate it.

77 In this context, the present work was designed to develop an easy, repro-
78 ducible, and accurate LC method for quantifying the polyphenols in *I. para-*
79 *guariensis* extractive solutions, determining the main ICH validation
80 parameters for this complex matrix. Further, the method was applied to four
81 extractives solutions from erva-mate, in view to compare its polyphenol
82 contents.

83

84

85 EXPERIMENTAL

86

87 Plant Material

88

89 *I. paraguariensis* leaves and stems were supplied by “Fino Mate” (Mato
90 Leitão – RS, Brazil). The specimen was identified and deposited at the

Validation of an LC Method for Polyphenol Assay**3**

91 Herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN
92 133726). The traditional method of “erva-mate” production was
93 employed, briefly, the raw material was stabilized by roasting, then dried
94 and ground.

95

96

97

Chemicals and Reagents

98

99

100

101

102

103

104

105

106

Apparatus and Chromatographic Conditions

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

LC analysis was performed using a Shimadzu liquid chromatograph (LC-10 AD) equipped with a gradient controller (FCV-10 AL), an autosampler (SIL-10 A), a UV/VIS detector (SPD-10 A), and a CLASS LC-10 software (Shimadzu, Kyoto, Japan) and photodiode array detector, PDA, (Waters Millenium, Milford, MA, USA). A Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18 (5 μ m, 250 mm \times 4 mm i.d) column coupled to a pre-column with Lichrosorb RP-18 (Waters Millenium, Milford, MA, USA) was employed. The UV spectra of the non identified peaks, obtained by PDA detection, were additionally analyzed. Mass spectrometric analysis was performed on a Varian 1200 mass spectrometer (Walnut Creek, CA, USA) fitted with an electrospray ionization source (ESI). The negative ion mode [m/z M-H] was used for all compounds. Preliminary analysis was carried out using full scan, data dependent MS/MS scanning from m/z 150–800. Identities of the compounds were obtained by matching their molecular ions (m/z) obtained by LC-MS/MS with the literature data.¹¹⁰¹

The analytical method employed a linear gradient system, which consisted of (A) acetic acid 2.0% (v/v); (B) methanol:water 85.0% (w/w). The gradient elution for the first 10 min was 31% B, 31–56% B during 10 min, then in 8 min 56% B, 12 min of 56–77% B, 77–56% B during 5 min, and 56–31% B for the last 5 min. The flow rate was adjusted to 0.70 mL/min, the detection wavelength to 340 nm, and 20 μ L were injected. The sensitivity was 0.05 AUFS. The LC analysis was carried out at $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

The polyphenols were identified, comparing its retention time and the corresponding diode array spectra to that obtained from the standards.

Calibration curves of standard compounds were used for quantification purposes, as usual.

Standard Curve

136

137

138 CLOA and RU standards were dissolved in methanol-water (50:50, v/v)
139 yielding concentrations of 2.0; 4.5; 6.0; 8.0, and 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The solutions
140 were filtered through a 0.45 μm membrane filter (Millipore, HVHP). The
141 results were expressed by the mean of peak areas obtained from three
142 injections.

143

144

Extractive Solution (ES)

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

Preparation of Extractive Solution

For validation of the method, an aqueous extractive solution (ES) was prepared by decoction (ES) of the erva-mate, for 15 min, in a plant:solvent ratio of 1.5:10. The ES was filtered and the volume was made up to 100.0 mL with distilled water. The loss on drying assay of ES, following the procedure described in the USP 27,^[12] yielded 3.8% (w/v).

In order to compare their polyphenol content, three other extractive solutions were prepared by infusion or turbo-extraction method. The infusion (ESI) was prepared by pouring boiling water on the aerial parts. The mixture was left to stand for 15 min and then filtered. For preparing the two extractive solutions by turbo-extraction, water (TE₁) or ethanol 40% (v/v) (TE₂) were employed as solvent; the extraction was carried out at 10,000 rpm for 15 min. The drug:solvent ratio employed for all extractive solutions was 1.5:10 (w/w). All the extractive solutions were filtered through filter paper and the volume was made up to 100.0 mL with the solvent.

Extractive Solution Curve

Samples of 0.5; 1.0; 2.0; 4.0, and 5.0 mL of the ES were diluted in methanol-water (50:50 v/v) to 10 mL, yielding concentrations of 50.0, 100.0, 200.0, 400.0, and 500.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$. The samples were filtered through a 0.45 μm membrane filter (Millipore, HVHP) prior to injection. Evaluation of each point was repeated three times.

Validation

The validation of the analytical method included the determination of linearity, repeatability, intermediary precision, and accuracy according to the International Conference on the Harmonization (ICH) guideline.^[13]

The linearity of the method was determined by the calibration curves obtained by LC analysis of the standards CLOA and RU. The linearity of the method was also evaluated by the calibration curves of the corresponding

Validation of an LC Method for Polyphenol Assay

5

181 peaks when different volumes of ES samples were employed. The calibration
182 curves were fitted by linear regression and the results expressed by regression
183 coefficient and other statistical parameters, as follows.

184 The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were
185 calculated based on the standard deviation (S.D.) and the slope (S) of the
186 standard calibration curves.^[13]

187 The precision of the method was evaluated through the determination of
188 the repeatability and intermediary precision. The repeatability experiment was
189 performed analyzing the R.S.D. values, obtained from nine samples evaluated
190 in the same day. The intermediary precision was evaluated in triplicate for
191 three consecutive days and the results were expressed as the R.S.D.

192 The accuracy was evaluated through recovery studies by adding known
193 amounts of CLOA and RU to ES. The ES without standard addition was
194 analyzed as control. The assay was performed at three concentration levels
195 (50, 100, and 150%) of the standard CLOA and RU, three times each. The
196 recovery was determined by subtracting the values obtained for the control
197 samples from those samples that were prepared with the added standards,
198 divided by the amount added and multiplied by 100%.^[13]

199

200

201 Analysis of the Extractive Solutions

202

203 Samples of 5.0 mL of ES, ESI, TE₁, and TE₂ were diluted in methanol-water
204 (50:50 v/v) to 10 mL, yielding concentrations of 200.0 µL/mL. The samples
205 were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore, HVHP) prior to
206 injection. Evaluation of each point was repeated three times.

207

208

209 RESULTS AND DISCUSSION

210

211 The recognized antioxidant potential of *I. paraguariensis* has motivated the
212 development of methods for identifying and quantifying polyphenols in the
213 plant or in the corresponding extracts. The method, reported by Carini
214 et al.^[10] using LC associated to MS detection was developed with the aim
215 of identifying the phenolic constituents from the species. The method
216 reported by Filip et al.^[6] involves a LC method with UV detection in order
217 to compare the profile of the phenolic compounds from several American
218 species. Recently, Bravo et al.^[11] reported a LC/MS method for characteriz-
219 ation of phenolic constituents, identifying more than twenty quinic acid or
220 hydroxycinnamates derivatives. Caffeoylquinic acid and dicaffeoylquinic
221 acid isomers were referred to as the major components of the phenolic
222 fraction of erva-mate.

223 Validation of analytical methods has the aim of demonstrating that the
224 employed analytical procedures are suitable for their intended use. The guide-
225 lines, as ICH, describe the procedure for carrying out the validation of the

analytical procedures included as part of an application for approval and registration of a pharmaceutical product, including those used in storage stability. In the case of *Ilex paraguariensis*, since this raw material is abundant in South America and considering its therapeutic potential properties, the development of new products from the plant seems to be natural and economically feasible. In this way, the first step is the development of extractive solutions as an intermediary product for the pharmaceutical or food industry for producing solid or semi-solid products. Consequently, besides the development, the validation of a simple method to determine the main polyphenol concentration in extractive solutions is necessary.

In the choice of the LC conditions, the complex composition of the *I. paraguariensis* ES required the use of a gradient elution system. This system also allowed shortening the analysis time. The mobile phase consisting of methanol:water showed suitable resolution and peaks separation, allowing the quantification of the standards in the ES. The analysis time was also appropriate, since all the compounds were eluted in less than 40 min.

Figure 1 shows the chromatographic separation of the standards CLOA and RU at 340 nm (Fig. 1a) and also the corresponding peaks in the ES (Figure 1b), with the respective diode array spectra. Among the eight peaks, CLOA and RU are observed at the retention time of 10.6 and 30.0 min, respectively. Among the others peaks, P1, P3, P4, P5, and P6 exhibited UV spectra pattern of caffeoylquinic acid derivatives with UV-max absorption bands at 328 nm, indicating that this class of polyphenols are the major constituents in the ES polyphenol fraction.

The analysis by LC MS/MS reveals that the structures of peaks P1 and P3 show identical $[M-H]^+$ ions at m/z 353 and also the ions corresponding to the caffeic acid (m/z 179) and quinic acid (m/z 191) (Fig. 2), which can be attributed to the chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid) isomers. Hence, the proposed structures for P1 and P3 on the basis of elution order,^[10] are as neochlorogenic (3-*O*-caffeoylquinic acid) (NEO) and crypto-chlorogenic (4-*O*-caffeoylquinic acid) (CPC) acids. The peaks P4, P5, and P6 show the same molecular ion m/z 515 and fragments ions at m/z 179, 191, and 353 $[M-H-Caffeoyl]^-$, corresponding, probably to isomeric dicaffeoyl esters of quinic acid (i.e., 3,4-*O*-dicaffeoyl, 4,5-*O*-dicaffeoyl, 3,5-*O*-dicaffeoyl or 1,5-*O*-dicaffeoyl esters). Although, with the lack of reference standards, no definitive structure assignment can be done; these results are in agreement with those reported by Carini et al.^[10] and Bravo et al.^[11]

In this first report on validation of a LC-UV method for *I. paraguariensis* polyphenol assay, the concentration of the substances corresponding to the major peaks (P1, P3, P4, P5, and P6) were determined by the CLOA calibration curve due to their similar UV spectra.

The validation of the analytical method included the determination of linearity, repeatability, intermediary precision and accuracy, according to the ICH requirements.^[13]

Validation of an LC Method for Polyphenol Assay

7

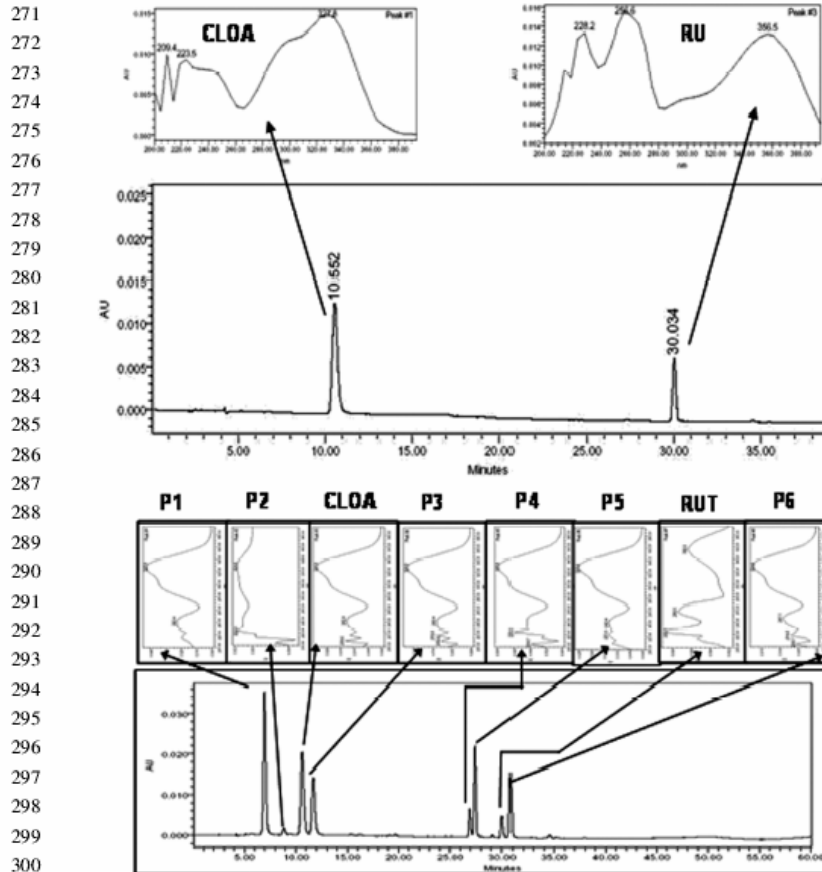


Figure 1. LC profile at 340 nm and diode array spectra 200–400 nm of (A) chlorogenic acid (CLOA) and rutin (RU); (B) extractive solution from *Ilex paraguariensis* (Mate).

The linearity evaluation was performed in three different days by calibration curves analysis for the two standards, CLOA and RU and also for the ES curve. The results are presented in the Tables 1 and 2.

The CLOA and RU calibration curves were linear in the concentration range from 2.0 to 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with regression coefficients (r^2) higher than 0.9980. Therefore, these results show the absence of deviation from linearity for the tested concentration range. The confidence limit, calculated for the intercept, included zero, demonstrating the absence of constant

8

F. A. da Silva et al.

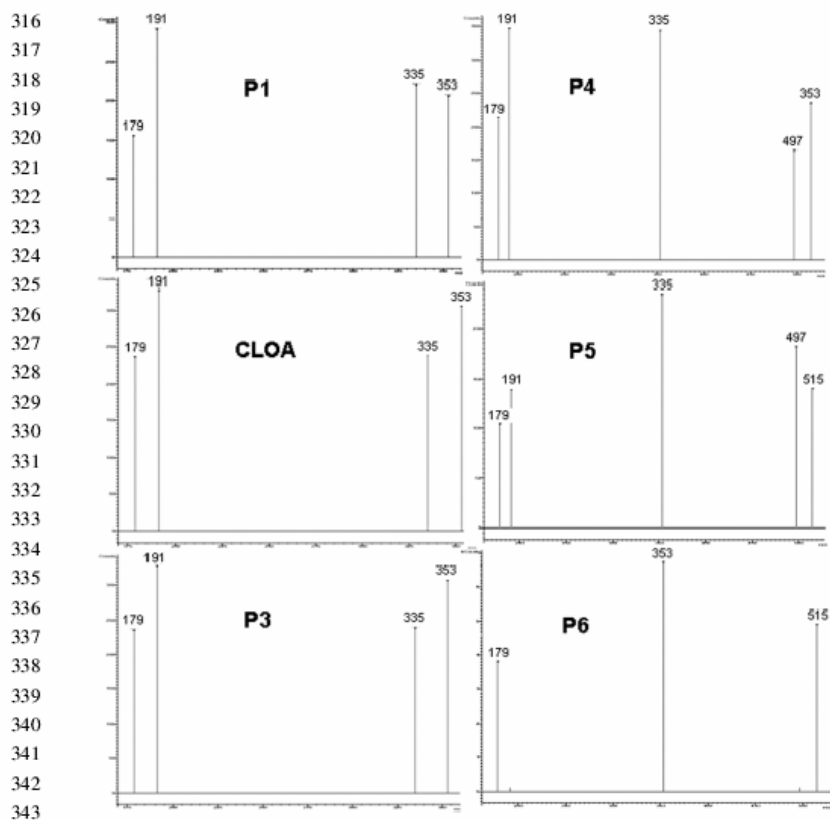


Figure 2. LC MS/MS spectra of the peaks P1, ACLO, P3, P4, P5, RUT, and P6 in extractive solution obtained by decoction of *Ilex paraguariensis* (Mate).

systematic errors. The LOD for CLOA and RU were, respectively, 0.29 and 0.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the LOQ found were, respectively, 0.89 and 0.97 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Therefore, the results show that the method presents good sensitivity for the standards analyzed.

Table 1. Linear regression data for chlorogenic acid and rutin standard curves

Peak	r^2	a	b	R.S.D. (%)
Chlorogenic acid	0.9980	-5904.98	66505.77	2.98
Rutin	0.9992	-3515.26	36407.72	1.53

r^2 = regression coefficient; a = slope; b = intercept; R.S.D. = relative standard deviation.

Validation of an LC Method for Polyphenol Assay

9

361 **Table 2.** Linear regression data for both chlorogenic acid and rutin in extractive
362 solution curve

363 Peak	r^2	a	b	R.S.D. (%)
364 Chlorogenic acid	0.9978	-1290.63	712700.52	4.69
365 Rutin	0.9971	-634.10	125150.42	6.08

367 r^2 : regression coefficient; a: slope; b: intercept; R.S.D. = relative standard deviation.
368

369
370 Table 2 shows the linear regression data obtained for CLOA and RU in
371 the ES curve. The absence of linearity deviation in the range from 50.0 to
372 500.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ is demonstrated. The r^2 values of 0.9978 for CLOA and
373 0.9971 for RU can be considered suitable, considering the complex compo-
374 sition of this herbal sample.

375 Precision of the LC method was evaluated through the intermediary
376 precision and repeatability tests (Tables 3 and 4). The assay of intermediary
377 precision was performed during three consecutive days, in order to
378 determine the accumulation of the random errors between different ES
379 samples and days. The R.S.D. lower than 2.5% demonstrate the reproduc-
380 ibility and, thus, the low interference of the sample preparation step. All
381 R.S.D. values observed in the repeatability test were lower than 1.5%
382 (Table 4). These values can be considered excellent for complex
383 matrices.^[14]

384 The accuracy of the method was evaluated by the recovery test. Con-
385 centrations of CLOA and RU (50, 100, and 150%) were added to ES.
386

387
388 **Table 3.** Intermediary precision for the standards chlorogenic acid and rutin and for
389 the corresponding polyphenols in the *Ilex paraguariensis* extractive solution

391 Substâncias	Standard 392 concentration 393 (mg/mL)	R.S.D. (%)	Extractive solution concentration (mg/mL)	R.S.D. (%)
394 Neo-chlorogenic 395 acid	—	—	2.216 ^a	0.44
396 Chlorogenic acid	0.098	2.14	1.669	0.82
397 Crypto-chlorogenic 398 acid	—	—	1.222 ^a	0.54
399 P4	—	—	0.359 ^a	0.43
400 P5	—	—	1.173 ^a	0.91
401 Rutin	0.101	2.24	0.563	0.90
402 P6	—	—	0.933 ^a	0.80

404 ^aCalculated as chlorogenic acid.

405 R.S.D. = relative standard deviation.

10

F. A. da Silva et al.

406 **Table 4.** Repeatability test for the reference substances and for the corresponding
 407 polyphenols in the *Ilex paraguariensis* extractive solution

408					
409		Standard		Extractive	
410		concentration		solution	
411	Peaks	(mg/mL)	R.S.D. (%)	concentration	
412				(mg/mL)	
413				R.S.D. (%)	
413	Neo-chlorogenic	—	—	2.058 ^a	0.91
414	acid				
415	Chlorogenic acid	0.107	0.30	1.628	0.95
416	Crypto-chlorogenic	—	—	1.288 ^a	1.11
417	acid				
418	P4	—	—	0.388 ^a	1.13
419	P5	—	—	1.081 ^a	1.33
420	Rutin	0.103	0.25	0.563	1.02
421	P6	—	—	1.009 ^a	0.75

422 ^aCalculated as chlorogenic acid.

423
 424
 425 The results (Table 5) indicate recovery rates for CLOA and RU of 97.4 and
 426 103.9%, respectively, with R.S.D. lower than 1.0% in all concentrations
 427 analyzed.

428 Finally, the LC method was applied to compare the polyphenol content
 429 in four extractive solutions. For this purpose, besides ES, which was prepared
 430 by decoction, three other extractive solutions were analyzed. The first one
 431 was prepared by infusion (ESI) and the other ones were prepared by turbo
 432 extraction (TE₁) using water as solvent. The last one was also prepared by
 433 turbo extraction, but using ethanol 40% (v/v) as solvent. The LC analysis
 434 showed similar polyphenol chromatographic profiles for all extractive
 435 solutions. Table 6 shows the content of CLOA, RU, NEO, CPC, P4, P5,
 436 and P6) in these extractive solutions (mg/mL). CLOA and its derivatives
 437 are present in higher concentration than RU in all extractive solutions. The
 438 aqueous extracts prepared using hot water as solvent, decoction, or
 439 infusion (ES and ESI) compared to that obtained by turbo extraction in
 440 water (TE₁), showed higher amounts of the total polyphenol examined
 441 (ES: 7.47 mg/mL; ESI: 8.45 mg/mL; TE₁: 5.71 mg/mL). However, the
 442 highest total polyphenol content was found in the extractive solution
 443 prepared by turbo extraction using ethanol 40% (v/v) as solvent (TE₂:
 444 11.83 mg/mL).

445 Regarding the main peaks, the results also demonstrate that the most
 446 polar constituents NEO, CLOA, and CPC are present in higher concen-
 447 tration when water is used as solvent (ES: 4.69; ESI: 5.31; TE₁:
 448 3.59 mg/mL) than that of less polar P5, RU and P6 (ES: 2.78; ESI:
 449 3.14; TE₁: 2.12 mg/mL). However, when ethanol 40% was employed as
 450 solvent, the difference is significantly lower assuming almost similar

Validation of an LC Method for Polyphenol Assay

11

451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495**Table 5.** Recovery test for both chlorogenic acid and rutin in *Ilex paraguariensis* extractive solution

Chlorogenic acid			Rutin				
Theoretical concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Experimental concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%) \bar{X} ; R.S.D)	Average of the recovery (%) \bar{X} ; R.S.D)	Theoretical concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Experimental concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%) \bar{X} ; R.S.D)	Total recovery (%) \bar{X} ; R.S.D)
10.60	10.41	98.19; 0.89	97.36; 2.09	3.20	3.43	107.19; 0.87	103.95; 3.91
12.60	11.96	94.92; 0.65		4.20	4.40	104.84; 0.24	
14.60	14.45	98.96; 0.33		5.20	5.19	99.83; 0.19	

R.S.D. = relative standard deviation.

496 **Table 6.** Polyphenol content in *Ilex paraguariensis* extractive solutions

497					
498		ES (mg/mL)	ESI (mg/mL)	TE ₁ (mg/	TE ₂ (mg/
499	Peaks	(\bar{X} ; S.D.)	(\bar{X} ; S.D.)	mL) (\bar{X} ;	mL) (\bar{X} ;
500				S.D.)	S.D.)
501	Neo-chlorogenic	2.15 ^a ; 0.014	2.43 ^a ; 0.007	1.72 ^a ; 0.005	2.90 ^a ; 0.008
502	acid				
503	Chlorogenic acid	1.53 ^a ; 0.008	1.75 ^a ; 0.005	1.18 ^a ; 0.001	2.06 ^a ; 0.006
504	Crypto-chlorogenic	1.01 ^a ; 0.007	1.13 ^a ; 0.004	0.69 ^a ; 0.000	1.17 ^a ; 0.004
505	acid				
506	Peak 4	0.41 ^a ; 0.001	0.41 ^a ; 0.002	0.38 ^a ; 0.001	0.58 ^a ; 0.003
507	Peak 5	1.13 ^a ; 0.010	1.29 ^a ; 0.003	0.87 ^a ; 0.001	2.75 ^a ; 0.004
508	Rutin	0.49; 0.016	0.55 ^a ; 0.002	0.36 ^a ; 0.003	0.74 ^a ; 0.002
509	Peak 6	0.75 ^a ; 0.015	0.89 ^a ; 0.002	0.51 ^a ; 0.004	1.63 ^a ; 0.005
510	Total	7.47	8.45	5.71	11.8

511 ES. Aqueous extractive solution obtained by decoction; ESI. Aqueous extractive
 512 solution obtained by infusion; TE₁. Extractive solution obtained by turbo-extraction
 513 with water. TE₂. Extractive solution obtained by turbo-extraction with ethanol 40%
 514 (v/v).

515 ^acalculated by chlorogenic acid standard curve; S.D. = standard deviation.

516 All the extractive solution were prepared using a plant:solvent ratio of 1.5:10 and 10
 517 minutes of extraction time.

518
 519 concentration. The interest of separating these two groups of polyphenols
 520 is being verified in our laboratory.

521 522 523 CONCLUSIONS

524
 525 This is the first report on validation of a LC analytical method for quan-
 526 tifying polyphenols in *Ilex paraguariensis* extractive solution demon-
 527 strated to be simple, specific, precise, rapid, and reproducible, therefore,
 528 appropriate for the separation and quantification of this relevant
 529 compound class. Applied to the polyphenol assay in four extractive
 530 solutions, the results revealed that ethanol 40% (v/v) was more suitable
 531 than hot water in the extraction of the polyphenols from the mate.
 532 Finally, the proposed LC method can be useful for the quality control
 533 of *I. paraguariensis* extractive solutions in phytopharmaceutical or food
 534 industries.

535 536 537 ACKNOWLEDGMENTS

538
 539 The authors would like to thank Dr. Amélia Henriques and Dr. José Angelo
 540 Zuanazzi for supplying the LC diode array equipment and to the Brazilian

Validation of an LC Method for Polyphenol Assay

13

541 Government, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico,
542 CNPq, for the financial support of this research.

543

544

545

REFERENCES

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

1. Filip, R.; Lopez, P.; Coussio, J.; Ferraro, G. Mate substitutes or adulterants: Study of xantine content. *Phytother. Res.* **1998**, *12*, 129–131.
2. Gosmann, G.; Schenkel, E.P. A new saponin from Mate, *Ilex paraguariensis*. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52* (6), 1367–70.
3. Gosmann, G.; Guillaume, D.; Taketa, A.T.C.; Schenkel, E.P. Triterpenoids Saponins from *I. paraguariensis*. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58* (3), 438–441.
4. Kraemer, K.H.; Taketa, A.T.C.; Schenkel, E.P.; Guillaume, D. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *I. paraguariensis*. *Phytochemistry* **1996**, *42* (4), 1119–1122.
5. Ricco, R.A.; Wagner, M.L.; Gurni, A. Estudio comparativo de flavonóides em seis especies austrosudamericanas del género *Ilex*. *Acta Farmacéutica Bonaerense* **1991**, *10* (1), 29–35.
6. Filip, R.; Lopez, P.; Gibert, G.; Coussio, J.; Ferraro, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Pitoterapia* **2001**, *72*, 774–778.
7. Filip, R.; Lotito, S.B.; Ferraro, G.; Fraga, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutr. Res.* **2000**, *20* (10), 1437–1446.
8. Ramirez-Mares, M.V.; Chandra, S.; Mejia, E.G. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sisensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mut. Res.* **2004**, *554* (1–2), 53–65.
9. Nardini, M.; Ghiselli, A. Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chem.* **2004**, *84*, 137–143.
10. Carini, M.; Maffei Facino, R.; Aldin, I.G.; Calloni, M.; Colombo, L.C. Characterization of phenolic antioxidants from mate (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 1813–1819.
11. Bravo, L.; GOYA, L.; Lecumberri, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Res. Intl.* **2007**, *40*, 193–405.
12. *The United States Pharmacopoeia*, 27th edn.; Unites States Pharmacopoeial Convention: Rockville, 2004; 2320.
13. International Conference on the Hamonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q2B: Validation of analytical procedures: Methodology, 1996.
14. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, FDA, 2001.

Received April 14, 2007

Accepted May 22, 2007

Manuscript 6135

ANEXO 2

Tabela A2.1. Distribuição granulométrica do PSI-A por microscopia óptica.

Faixa Granulométrica (μm)	Diâmetro médio (μm)	Freqüência absoluta (n)	Freqüência relativa (%)	Freqüência acumulada (%)
10,3 - 13,6	11,95	6	1,01	1,01
13,7 - 17,0	15,35	104	17,54	18,55
17,1 - 20,4	18,75	205	34,57	53,12
20,5 - 23,8	22,15	78	13,15	66,27
23,9 - 27,2	25,55	85	14,33	80,61
27,3 - 30,6	28,95	67	11,30	91,91
30,7 - 34,0	32,35	37	6,24	98,15
34,1 - 37,4	35,75	5	0,84	98,99
37,5 - 40,8	39,15	6	1,01	100,00
TOTAL	-	593	100	-

Tabela A2.2. Distribuição granulométrica do PSI-B por microscopia óptica.

Faixa Granulométrica (μm)	Diâmetro médio (μm)	Freqüência absoluta (n)	Freqüência relativa (%)	Freqüência acumulada (%)
10,3 - 13,6	11,95	8	1,38	1,38
13,7 - 17,0	15,35	118	20,42	21,80
17,1 - 20,4	18,75	106	18,34	40,14
20,5 - 23,8	22,15	110	19,03	59,17
23,9 - 27,2	25,55	176	30,45	89,62
27,3 - 30,6	28,95	34	5,88	95,50
30,7 - 34,0	32,35	22	3,81	99,31
34,1 - 37,4	35,75	1	0,17	99,48
37,5 - 40,8	39,15	3	0,52	100,00
TOTAL	-	578	100	-

Tabela A2.3. Distribuição granulométrica do PSI-C por microscopia óptica.

Faixa Granulométrica (μm)	Diâmetro médio (μm)	Freqüência absoluta (n)	Freqüência relativa (%)	Freqüência acumulada (%)
6,9 - 10,2	8,55	10	1,57	1,57
10,3 - 13,6	11,95	96	15,05	16,61
13,7 - 17,0	15,35	93	14,58	31,19
17,1 - 20,4	18,75	146	22,88	54,08
20,5 - 23,8	22,15	133	20,85	74,92
23,9 - 27,2	25,55	97	15,20	90,13
27,3 - 30,6	28,95	36	5,64	95,77
30,7 - 34,0	32,35	19	2,98	98,75
34,1 - 37,4	35,75	6	0,94	99,69
37,5 - 40,8	39,15	2	0,31	100,00
TOTAL	-	638	100	-

Tabela A2.4. Distribuição granulométrica do PSI-D por microscopia óptica.

Faixa Granulométrica (μm)	Diâmetro médio (μm)	Freqüência absoluta (n)	Freqüência relativa (%)	Freqüência acumulada (%)
6,9 - 10,2	8,55	70	8,12	8,12
10,3 - 13,6	11,95	212	24,59	32,71
13,7 - 17,0	15,35	170	19,72	52,44
17,1 - 20,4	18,75	149	17,29	69,72
20,5 - 23,8	22,15	188	21,81	91,53
23,9 - 27,2	25,55	55	6,38	97,91
27,3 - 30,6	28,95	9	1,04	98,96
30,7 - 34,0	32,35	9	1,04	100,00
TOTAL	-	862	100	-

Tabela A2.5. Distribuição granulométrica do PSI-A lote 02 por microscopia óptica.

Faixa Granulométrica (μm)	Diâmetro médio (μm)	Freqüência absoluta (n)	Freqüência relativa (%)	Freqüência acumulada (%)
0 – 3,5	1,75	14	0,80	0,80
3,5 – 7,0	5,25	47	2,70	3,51
7,0 – 10,5	8,75	208	11,95	15,46
10,5 – 14,0	12,25	658	37,82	53,28
14,0 – 17,5	15,75	475	27,30	80,57
17,5 – 21,0	19,25	184	10,57	91,15
21,0 – 24,5	22,75	91	5,23	96,38
24,5 – 28,0	26,25	27	1,55	97,93
28,0 – 31,5	29,75	18	1,03	98,97
31,5 – 35,0	33,25	4	0,23	99,20
35,0 – 38,5	36,75	8	0,46	99,66
38,5 – 42,0	40,25	1	0,06	99,71
42,0 – 45,5	43,75	2	0,11	99,83
45,5 – 49,0	47,25	2	0,11	99,94
49,0 - 52,5	50,75	1	0,06	100
TOTAL	-	1740	100	-

ANEXO 3

PARECER COMISSÃO DE ÉTICA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO

pro.pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2004321

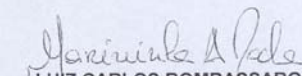
Título : Desenvolvimento de metodologias analíticas para quantificação de marcadores químicos em extratos de *Ilex paraguariensis* e avaliação de atividade biológica dos extratos

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
VALQUIRIA LINCK BASSANI	PESQ RESPONSÁVEL	valqui@farmacia.ufrgs.br	33163602
JOSE CLAUDIO FONSECA MOREIRA	PESQUISADOR	jcfm@vortex.ufrgs.br	33165534

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 12 , ata nº 78 , de 09/11/2006 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, sexta-feira, 2 de março de 2007


LUIZ CARLOS BOMBASSARO
Coordenador do CEP-UFRGS

ANEXO 4

PARECERES

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Título: **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate)**

Doutoranda: FRANCILENE AMARAL DA SILVA

P A R E C E R

A tese defendida pela doutoranda Francilene Amaral da Silva teve por objetivos, em uma primeira etapa, desenvolver e caracterizar tecnologicamente produtos secos nebulizados em escala semi-industrial e frações enriquecidas em polifenóis obtidos a partir de solução extrativa aquosa de *Ilex paraguariensis* (erva-mate). Nesta parte do trabalho destaca-se a validação de metodologia para análise de polifenóis, em diferentes matrizes, sendo que a desenvolvida para soluções extrativas já se encontra em fase de publicação. Ainda, o estudo de fotoestabilidade é inédito e ressalta a importância do método de secagem e seleção dos adjuvantes na obtenção de um produto estável concentrado em polifenóis. A correlação entre o teor de polifenóis e atividade antioxidante é demonstrada na segunda parte da tese, também inédita no que se refere a produtos secos derivados de *Ilex paraguariensis*. O trabalho está bem fundamentado e o conjunto de resultados traz uma importante contribuição ao desenvolvimento de novos produtos contendo erva-mate. Pelo exposto, sou de parecer favorável à concessão do título de Doutor à Francilene Amaral da Silva.



Prof. Dr. Leticia Scherer Koester
Porto Alegre, 11 de outubro de 2007.

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

Nível: Doutorado

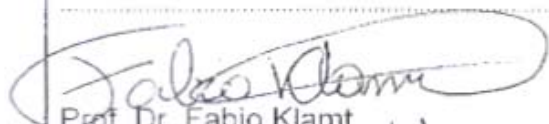
Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Título: Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate)

Doutoranda: FRANCILENE AMARAL DA SILVA

PARECER

A aluna desenvolveu ao longo de sua tese desde processos tecnológicos para a obtenção de extratos de erva-mate e buscou em diferentes modelos biológicos (*in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*) a validação de parâmetros antioxidantes destes diferentes extratos. A abordagem é original, relevante cientificamente, economicamente e socialmente, o que valoriza ainda mais os resultados obtidos. A aluna também demonstrou maestria na apresentação e defesa de seus resultados. Portanto, como membro da banca julgadora, considero "Aprovada" a aluna Francilene Amaral da Silva.



Prof. Dr. Fabio Klamt
Porto Alegre, 11 de outubro 2007.

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

Nível: Doutorado

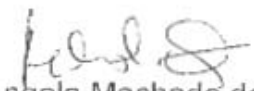
Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Título: Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate)

Doutoranda: FRANCILENE AMARAL DA SILVA

PARECER

O trabalho apresentado pela doutoranda teve por objetivo principal o desenvolvimento e a caracterização tecnológica de extratos secos por *spray-drying* a partir de uma solução extrativa aquosa de *I. paraguariensis* e de frações polifenólicas isoladas a partir do extrato liofilizado bem como a avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* das preparações obtidas. O tema abordado é relevante e inovador, tanto do ponto de vista do aproveitamento do potencial terapêutico da erva-mate como do desenvolvimento de um produto seco em escala piloto. Trata-se de um trabalho científico relevante, bem estruturado, com objetivos bem definidos, metodologias adequadas e válidas. Os resultados obtidos foram apresentados e discutidos, com base em literatura especializada. Pelo exposto, considero a tese aprovada e recomendo a concessão do título de doutora à candidata Francilene Amaral da Silva.


 Profa. Dr. Ângela Machado de Campos
 Porto Alegre, 11 de outubro 2007.

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Título: Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate)

Doutoranda: FRANCILENE AMARAL DA SILVA

PARECER

Inicialmente, quero parabenizar a Doutoranda e seus Professores Orientadores e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pela excelente tese, apresentada de forma clara e organizada, o que tornou o exame e avaliação da mesma, fácil - mesmo para quem, como é meu caso, não é da área específica.

Contribuiu muito para a clareza e compreensão, além do texto claro e objetivo, a organização geral do tema - que abordaram aspectos múltiplos - em capítulos específicos - cada um com a discussão específica e respectivas conclusões (parciais), facilitando a discussão e as conclusões gerais das pesquisas.

Sem dúvidas, os resultados obtidos pela Doutoranda, constituem uma contribuição valiosa para o avanço do conhecimento sobre a erva-mate e suas aplicações farmacológicas, visando a saúde humana, em particular, merecendo o conceito A, aprovado.

Profa. Dr. Helga Winge
 Porto Alegre, 11 de outubro, 2007.

Helga Winge

BIOGRAFIA

Francilene Amaral da Silva

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 1992-1995 Graduação em Farmácia
Universidade Federal do Pará (UFPA)
Belém, PA
- 1997 -1999 Bolsista da Cnpq nível mestrado
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, RS
- 1999 Obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas com a
dissertação: Obtenção, caracterização e avaliação do extrato seco
liofilizado de *Portulaca pilosa* L. (Portulacaceae) sobre a fertilidade e
reatividade uterina de ratas Wistar.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, RS
- 1996-2001 Aperfeiçoamento em Habilitação Em Farmácia Industrial.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, RS
- 2003-2007 Bolsista da Cnpq nível doutorado
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, RS

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Trabalhos apresentados em Congressos

SILVA, Francilene Amaral da; KAPPEL, Virginia De Marchi; MOREIRA, Jose Cláudio Fonseca; BASSANI, Valquiria Linck. Antioxidant and free radical scavenging potential of Mate (*Ilex paraguariensis*) powders. In: Free Radicals in Montevideo 2007, Montevideo, 2007.

SILVA, Francilene Amaral da; KAPPEL, Virginia De Marchi; MOREIRA, Jose Cláudio Fonseca; BASSANI, Valquiria Linck. Avaliação do potencial antioxidante de *Ilex paraguariensis* (erva-mate): extratos secos por spray-drying e frações polifenólicas. In: XIX Simpósio de Plantas medicinais do Brasil, Salvador, 2006.

SILVA, Francilene Amaral da; PAVEI, Cabral; ORTEGA, Geoge González; MOREIRA, José Cláudio Fonseca; BASSANI, Valquiria Linck . Desenvolvimento de extratos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* (A. St. Hil.): caracterização tecnológica e determinação do teor de polifenóis por CLAE. In: 4o Congreso Sudamerica de la Yerba Mate, Posadas, 2006.

SILVA, Francilene Amaral da; BASSANI, Valquíria Linck. Análise de constituintes fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência em preparações de *Ilex paraguariensis*. In: XVIII Simpósio de Plantas medicinais do Brasil, Manaus, 2004.

SILVA, Francilene Amaral da; AMARAL, Karine Medeiros Do; MANTESE, Fabiane; LANGELOH, Augusto . Efeito do extrato seco liofilizado de *Portulaca pilosa* L. sobre o desenvolvimento ponderal e parâmetros reprodutivos de ratas Wistar. In: IV Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, Ribeirão Preto, 1999.

SILVA, Francilene Amaral da; AMARAL, Karine Medeiros Do; MANTESE, Fabiane; LANGELOH, Augusto . Estudo de toxicidade reprodutiva de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* em ratas Wistar.. In: IV Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, Ribeirão Preto, 1999.

SILVA, Francilene Amaral da; DALSENTER, Paulo Roberto; LANGELOH, Augusto . Exposição pré e perinatal ao endossulfano: avaliação dos efeitos sobre o trato reprodutivo masculino. In: XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de

Biologia Experimental, 1998, Caxambu, 1998.

SILVA, Francilene Amaral da; ORTEGA, George Gonzáles; PETROVICK, Pedro Ros; LANGELOH, Augusto. Obtenção e caracterização de extratos de *Portulaca pilosa* L. In: XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Águas de Lindóia, 1998.

SILVA, Francilene Amaral da; DALSENTER, Paulo Roberto; LANGELOH, Augusto . Efeitos do pesticida endossulfano sobre o trato reprodutivo masculino de ratos Wistar expostos durante a prenhez e lactação. In: XIII Jornada Nacional Y VIII Latinoamericana de Farmacología Veterinaria, Santa Fé, 1998.

SILVA, Francilene Amaral da; DALSENTER, Paulo Roberto; LANGELOH, Augusto; DALLEGRAVE, Eliane. Toxicidade reprodutiva do endossulfano em ratos expostos durante a prenhez e lactação. In: II Congresso de Medicina Veterinária do Cone Sul, XIII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado, 1997.

Artigos completos publicados em periódicos

SILVA, Francilene Amaral da; PAVEI, Cabral; ORTEGA, George González; LIMA, Eliana Martins; DINIZ, Danielle Guimarães Almeida; MOREIRA, José Cláudio Fonseca; BASSANI, Valquiria Linck. Validation of a LC method for polyphenol assay in extractive solution from *Ilex paraguariensis* (Mate). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.30, p.1-13, 2007.

SILVA, Evandro Gomes da; BEHR, Guilherme Antonio; ZANOTTO-FILHO, Alfeu; LORENZI, Rodrigo; PASQUALI, Matheus Augusto de Bittencourt; RAVAZOLO, Luis Gustavo; BORDIGNON Jr., Celso Luis; SILVA, Francilene Amaral da; ABOY, Ana Lucia; BASSANI, Valquiria Linck; HENRIQUES, Amelia Teresinha; REGINATTO, Flavio Henrique; DAL-PIZZOL, Felipe; MOREIRA, Jose Claudio Fonseca. Antioxidant Activities and Free Radical Scavenging Potential of *Bauhinia microstachya* (RADDI) MACBR. (Caesalpinaceae) Extracts Linked to Their Polyphenol Content(Pharmacognosy). **Biological & pharmaceutical bulletin**, v, 30; (8), p.1488-1496, 2007.

SILVA, Francilene Amaral da; PETROVICK, Pedro Ros; LANGELOH, Augusto. Efeito do extrato seco liofilizado de *Portulaca pilosa* L. (Portulacaceae) sobre a reatividade uterina à oxitocina de ratas Wistar. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 20, n. 1, p. 47-52, 2001.

PETRY, Raquel Denise; SOUZA, Tatiane Pereira de; SILVA, Francilene Amaral da; HEBERLÉ, Graziela; SILVA, Welington Barros da; FLECK, Juliane D; BASSANI, Valquiria Linck; ORTEGA, George Gonzáles; PETROVICK, Pedro Ros. Influência de adjuvantes e técnica de enchimento sobre as características farmacêuticas de cápsulas de gelatina dura contendo teofilina. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 14, n. 1/2, p. 13-20, 1998.

