



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE SANTA CATARINA
CAMPUS JARAGUÁ DO SUL

ADAEL IAN MENSLIN
AMANDA MACIEL COSTA
ANDREYNA FERREIRA GAMBA
FELIPE MACIEL BUCHELE
JOÃO VITOR MEZOMO
RÚBIA BATISTA VIANA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE METILXANTINAS
EM ERVAS-MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) DE DIFERENTES REGIÕES DE
SANTA CATARINA**

Projeto de Pesquisa
Conectando Saberes
Curso Técnico em Química (modalidade: Integrado): 3ª Fase

JARAGUÁ DO SUL
2016

ADAEL IAN MENSLIN
AMANDA MACIEL COSTA
ANDREYNA FERREIRA GAMBA
FELIPE MACIEL BUCHELE
JOÃO VITOR MEZOMO
RÚBIA BATISTA VIANA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
METILXANTINAS EM ERVAS-MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) DE
DIFERENTES REGIÕES DE SANTA CATARINA**

Projeto de pesquisa desenvolvido no eixo
formativo diversificado “Conectando Saberes”
do Curso Técnico em Química (Modalidade
Integrado) do Instituto Federal Santa Catarina –
Câmpus Jaraguá do Sul.
Orientador: Prof. Elder Correa Leopoldino.

JARAGUÁ DO SUL
2016

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------|----|
| 1 TEMA | 4 |
| 2 DELIMITAÇÃO DO TEMA | 4 |
| 3 PROBLEMA | 4 |
| 4 HIPÓTESES | 4 |
| 5 OBJETIVOS | 4 |
| 5.1 Objetivo Geral | 4 |
| 5.2 Objetivos Específicos | 4 |
| 6 JUSTIFICATIVA | 5 |
| 7. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 7 |
| 7.1 Breve Histórico da Erva-Mate | 7 |
| 7.2 A Erva-Mate em Santa Catarina | 8 |
| 7.3 A Erva-Mate | 8 |
| 7.4. Propriedades da Erva-Mate | 11 |
| 7.4.1 Aspectos gerais | 11 |
| 7.4.2 Metilxantinas | 12 |
| 7.4.3 Cafeína | 13 |
| 7.4.4 Teobromina | 14 |
| 7.4.5 Teofilina | 14 |
| 7.5 Métodos para Análise | 15 |
| 7.5.1 Cromatografia líquida em coluna | 16 |
| 7.5.2 Cromatografia de camada delgada | 17 |
| 7.5.3 Espectrofotometria de UV-Vis | 17 |
| 7.5.4 Espectroscopia em Infravermelho | 19 |
| 8. METODOLOGIA | 19 |
| 8.1 Tratamento de rejeito | 22 |
| 9 CRONOGRAMA | 22 |
| REFERÊNCIAS | 23 |

1 TEMA

Extração, caracterização e quantificação de metilxantinas em ervas-mate (*Ilex Paraguariensis*) de diferentes localidades.

2 DELIMITAÇÃO DO TEMA

Extração, caracterização e quantificação de metilxantinas (caféina, teobromina e teofilina) em três ervas-mate cultivadas em diferentes regiões de Santa Catarina.

3 PROBLEMA

As metilxantinas são os compostos responsáveis pelas propriedades neuroestimulantes e fisiológicas da erva-mate. Visto isso, é possível que a quantidade de metilxantinas se altere de acordo com a região onde são cultivadas?

4 HIPÓTESES

- Será possível extrair, separar e caracterizar as três metilxantinas presentes nas ervas-mate;
- Os valores de teofilina extraída da erva mate serão inferiores ao de caféina e teobromina;
- Haverá diferença nos valores de metilxantinas entre as ervas das regiões comparadas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Analisar e comparar a quantidade de metilxantinas em ervas-mate de diferentes regiões de Santa Catarina utilizando cromatografia líquida de coluna e espectrofotometria de infravermelho e UV-Vis.

5.2 Objetivos Específicos

- Extrair as metilxantinas (teofilina, teobromina e caféina) das ervas-mate através de extrações com solventes;
- Separar as metilxantinas através de cromatografia líquida de coluna utilizando duas

fases estacionárias diferentes, a sílica e a alumina;

- Caracterizar as metilxantinas obtidas nas ervas-mate através de espectrofotometria de infravermelho;
- Quantificar as metilxantinas nas ervas-mate empregando espectrofotometria UV-Vis;
- Comparar as quantidades de metilxantinas nas ervas-mate de diferentes regiões.

6 JUSTIFICATIVA

A *Ilex paraguariensis* é uma espécie nativa das regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, onde é popularmente conhecida como erva-mate. Na região Sul do Brasil, a erva-mate faz parte dos hábitos culturais, sendo utilizada na preparação de vários tipos de bebidas como o chimarrão, tererê e chás (BASSANI et al., 2007).

Na região Sul concentra-se a maior produção de erva-mate do Brasil, sendo 180 mil propriedades rurais, abastecendo 225 indústrias, gerando 710 mil empregos e movimentando cerca de 180 milhões de recursos, concentrando 98% da produção nacional. Com relação ao consumo dessa espécie, a região Sul também é a que mais consome, entre 3 e 5 kg/hab/ano (Anuário Brasileiro da Erva-Mate, 1999 apud BERGER, 2006).

A erva-mate é constituída por vários componentes químicos como os compostos fenólicos, polifenólicos, alcalóides – onde estão as metilxantinas–, taninos, aminoácidos, vitaminas, minerais, dentre outros. Dentre esses compostos, as metilxantinas, pertencentes ao grupo dos alcalóides, apresentam um elevado potencial estimulante. Entre elas estão a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), a teobromina (3,7-dimetilxantina) e a teofilina (1,3-dimetilxantina).

A cafeína possui benefícios como redução de apatia, fadiga e favorecimento da atividade intelectual do indivíduo. A teobromina possui função antioxidante e pode ser considerada como estimulante cardíaco, diurético e vasodilatador. Por sua vez, a teofilina é muito utilizada para tratamento de doenças respiratórias como bronquite e asma.

Cada vez mais os componentes químicos da erva-mate vêm sendo utilizados na indústria farmacêutica, no Ministério da Saúde estão registradas 14 preparações derivadas da *I. paraguariensis* devido as suas propriedades terapêuticas, no qual é recomendado como estimulante, anti-inflamatório, anti-reumático, tônico e diurético (GIRARDI, 2010). As metilxantinas beneficiam os nervos e músculos, conferindo-lhes maior capacidade de resistência à fadiga, além de proporcionar uma melhora na circulação. (DALA NORA, 2008)

Segundo pesquisas realizadas na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) a erva-mate é eficaz na redução do colesterol ruim, conhecido como Lipoproteína de baixa

densidade (LDL) e aumento do colesterol bom, chamado de Lipoproteína de Alta densidade (HDL). De acordo com os testes, houve uma diminuição de 15% da taxa de colesterol LDL nos pacientes. Além disso, um estudo feito na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) mostrou que a erva-mate é capaz de proteger os pulmões contra a fumaça do cigarro e também é capaz de barrar o envelhecimento celular. A erva-mate é importante para acelerar o metabolismo, o que pode estar associado a perda de peso e prevenção de doenças cardiovasculares, além disso, devido ao seu efeito antioxidante é importante para proteção da pele contra a radiação solar e seu efeito anti-inflamatório alivia queimaduras do sol.

O uso de produtos provenientes da *I. paraguariensis* estão presentes no cotidiano de uma parcela significativa da sociedade. Dessa forma, julga-se importante analisar a concentração de metilxantinas na erva-mate e verificar se existe variação de acordo com a região onde é cultivada.

Na literatura, encontra-se que a composição da erva-mate pode sofrer alterações quantitativas – composição química – e qualitativas – qualidade da erva-mate –, em função de diversas variáveis, como o tipo de cultivo, clima, solo, idade da planta, processamento industrial, metodologia de análise e adubação (CUNHA et al, 2011 apud SILVA, 2015).

À vista disso, foi delimitada a quantificação e extração de metilxantinas das ervas-mate de diferentes locais de Santa Catarina, sendo elas da cidade de Rio das Antas, Canoinhas e Catanduvás. A escolha das cidades foi feita considerando os aspectos naturais de cada cidade e a disponibilidade das ervas-mate nos mercados de Jaraguá do Sul

Alguns aspectos relevantes acerca das cidades são quanto ao clima e fertilidade do solo. As três cidades - Canoinhas, Catanduvás e Rio das Antas - são classificadas, de acordo com Köppen-Geiger, como de clima mesotérmico úmido e sem estação seca. O solo em Canoinhas apresenta média e boa fertilidade em relevos praticamente planos margeando rios ou locais de depressão. O relevo de Rio das Antas é serrano, predominando a presença de morros e possui uma vegetação nativa de Araucárias, assim como em Canoinhas.

O método de análise da erva-mate mais utilizado em pesquisas deste âmbito é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em razão da sua maior sensibilidade. No entanto, este método possui elevado custo e depende de equipamentos mais robustos, sendo assim serão utilizadas técnicas mais simples e de fácil aquisição, como cromatografia líquida de coluna e espectrofotometrias de infravermelho e UV-Vis.

7. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

7.1 Breve Histórico da Erva-Mate

A erva-mate é conhecida desde a época pré-colombiana, no entanto, há poucos vestígios da sua utilização. Alguns estudos indicam que foram os nativos guarani que ensinaram seu uso aos espanhóis durante a ocupação castelhana no Paraguai. O uso da erva-mate como bebida tônica e estimulante já era conhecida pelos aborígenes da América do Sul. Segundo alguns autores, por volta de 1670, os jesuítas deram início ao cultivo da erva-mate (DANIEL, 2009).

Em 1820, houve um enfraquecimento do cultivo da erva-mate nos agrupamentos de nativos cristianizados no Paraguai. Foi nessa época que o Brasil iniciou a exploração da erva-mate, as primeiras áreas de exploração surgiram no Paraná.

No início do século 19, o naturalista francês August de Saint-Hilaire fez várias viagens ao Brasil, esteve no Rio Grande do Sul, Curitiba e litoral. Ao retornar à França, em 1823, apresentou um relatório dos ervais sulinos brasileiros, onde propôs a designação de *Ilex paraguariensis* (DANIEL, 2009).

No final do século 19 boa parte da economia brasileira era movida pela erva-mate, por isso, ela passou a ser chamada de ouro verde. Com o objetivo de aperfeiçoar, divulgar e defender o produto no país e no exterior, o governo brasileiro criou, em 2 de dezembro de 1927, o Instituto do Mate.

Enquanto a produção de erva-mate crescia no Brasil, conseqüentemente, houve o desaparecimento de grandes áreas de florestas naturais, gerando a necessidade da conservação genética da erva-mate na América Latina.

A história econômica da erva-mate caracterizou-se em períodos de escassez dos produtos, alternados por períodos de excessiva demanda, fases em que a erva-mate era adulterada com outras plantas e, por fim, o método de consumo na forma de tererê ou chimarrão, considerado por muito anti-higiênico, contribuiu para restringir sua expansão a outros continentes (DANIEL, 2009)

No Brasil, os estados da Região Sul e o Mato Grosso do Sul são os estados que concentram a maioria dos ervais. A atividade ervateira tem grande importância econômica, principalmente no sul. Presente em 180 mil propriedades rurais, abastecendo aproximadamente 725 indústrias, gerando 710 mil empregos por ano. De acordo com o Anuário Brasileiro da Erva-Mate (1999), as ervateiras do estado de Santa Catarina e do Paraná já tiveram participações de exposições internacionais na Europa, mostrando seu

relevante valor não apenas para o Brasil, mas também para o exterior. A erva-mate também contribuiu para a fixação de imigrantes no século passado e é exportada pelo Brasil para países como Japão e Estados Unidos (Anuário Brasileiro da Erva-Mate, 1999).

7.2 A Erva-Mate em Santa Catarina

Essa bebida é bastante comum em Santa Catarina, devido as baixas temperaturas no inverno, quando a bebida é bastante consumida para também, aquecer o corpo. Há outra versão do Chimarrão, em que a erva é servida com água gelada ou até mesmo sucos, de limão, laranja e até maçã, o chamado Tererê, comumente usado para se refrescar nos dias quentes.

Em todo o território brasileiro há a comercialização do chá de erva-mate, disponibilizados em “saquinhos” contendo a erva concentrada para o consumo humano quando mergulhadas em água quente ou fria. Recentemente, a erva-mate vem sendo utilizada também para a produção de cervejas e de farinhas. Porém, não é somente na indústria alimentícia que se encontra a erva:

Além das tradicionais destinações da erva-mate, começa a crescer a utilização da erva na indústria química podendo ser utilizada como tintas (corantes) e resinas, medicamentos, desinfetantes, material esterilizante, elemento de reciclagem. Perfumes, desodorantes, cosméticos ou sabonetes, ampliam ainda mais as possibilidades de mercado para o produto, apesar de sofrer concorrência de outras matérias-primas. Os resíduos como goma e pó são componentes básicos de joias e bijuterias femininas (DALLA NORA, 2008).

Segundo Da Croce (2001), a erva-mate em Santa Catarina é encontrada em aproximadamente 140 municípios, os quais possuem em torno de 19.700 propriedades rurais e cerca de 118 mil trabalhadores nas 118 empresas processadoras distribuídas pelo estado. A produção estimada ultrapassa 112.000 t/ano de erva-mate cancheada (erva-mate seca) beneficiada.

Essas características dão ao estado o título de primeiro produto brasileiro de erva-mate, cuja produção é sustentada por 80% de ervas nativas e 20% cultivados, distribuindo-se desde a Serra do Mar até a divisa com a Argentina (FRANCO, 1992).

7.3 A Erva-Mate

A *Ilex paraguariensis*, popularmente conhecida como erva-mate, foi primeiramente estudada pelo naturalista francês August de Saint-Hilaire de 1820 a 1824, no Brasil. Ele nomeou a árvore como *Ilex paraguariensis*, pois acreditava que era a mesma árvore que ele havia encontrado no Paraguai dois anos antes. Já mate vem da palavra *quíchua mati*, que

significa cuia (Figura 1), que é o utensílio geralmente usado para a degustação do chimarrão ou do tererê (EDWIN et al, 1967 apud BERGER, 2006).



Figura 1: Cuia utilizada para o consumo da erva-mate na forma de chimarrão ou tererê

A *Ilex paraguariensis* (Figura 2 e 3) é uma árvore da família Aquifoliaceae, podendo atingir 12 metros de altura, nativa das regiões subtropical e temperada da América do Sul, possui tronco curto, com um diâmetro médio de 40 cm. Seu fruto é pequeno e arredondado, com colorações de verde a vermelho-arroxeadado, possui também flores pequenas, de cor esbranquiçada e suavemente perfumada. Sua folha é de formato oval e tem as bordas dentadas, desprovida de pelos, sendo estas aproveitadas na culinária, de várias formas.



Figura 2 e 3: Arvore,folhas, flor e fruto da erva-mate¹

De acordo com o sistema de classificação de Cronquist (BERGER, 2006), a taxonomia da *Ilex paraguariensis* obedece a seguinte hierarquia:

¹ Figura 2-Fonte: <http://www.ufrgs.br/alimentus1/objetos/erva-mate/agri_caracbotanicas.html >

Quadro 1: Taxonomia da erva-mate

| Erva-mate | |
|------------------------|-------------------------------|
| Nome científico | <i>Ilex paraguariensis</i> |
| Reino | Plantae |
| Divisão | Magnoliophyta (Angiospermae) |
| Classe | Magnoliopsida (Dicotyledonae) |
| Ordem | Celastrales |
| Família | Aquifoliaceae |
| Gênero | Ilex |
| Espécie | Paraguariensis |

As plantas do gênero *Ilex* estão presentes em regiões tropicais, subtropicais e temperadas em todo o globo, com mais de 700 espécies. Especificamente na América do Sul existem 218 taxas já registradas, sendo que o Brasil e a Venezuela apresentam maior diversidade com 68 e 64 taxas, respectivamente (GIBERTI, 1995 apud DANIEL, 2009). Segundo o Anuário Brasileiro da erva-mate (1999) “Atualmente existem aproximadamente 550 a 660 espécies do gênero *Ilex* apesar da variedade de espécies, apenas três espécies são úteis para a produção de erva-mate: *Ilex angustifolia*, *Ilex amara* e a *Ilex paraguariensis*, esta última, também conhecida como erva-mate argentina”.

O cultivo da erva-mate se dá pelo processo de silvicultura, em que antes de iniciar a plantação são observados com cuidado pontos como aproveitamento, exploração e manutenção racional das florestas, em função do interesse ecológico, científico, econômico e social do cultivo. O plantio de sementes se inicia a partir do mês de abril, podendo estender-se até setembro, de acordo com as condições climáticas.

A espécie apresenta bons resultados na região sul devido aos aspectos climáticos, pois a planta precisa de temperaturas amenas e chuvas regulares. O solo não pode ser compactado, encharcado ou raso, pois se possuir menos de um metro de profundidade ocasiona queda no

desenvolvimento e rendimento da erva-mate, acentuado em períodos de deficiência hídrica, reduzindo a vida útil das plantas. Os frutos da erva-mate, geralmente amadurecem entre janeiro e fevereiro, quando acontece sua colheita. As árvores passam pela colheita a cada dois anos, que também é a idade necessária para a primeira poda.

As folhas colhidas são usadas de diversos modos para o consumo humano. É uma tradição do sul do Brasil, o chimarrão, onde a erva triturada é colocada em uma cuia, onde se acrescenta água aquecida, entre 70° e 80° C, ocorrendo uma infusão. Podemos visualizar todo esse processo na Figura 4.

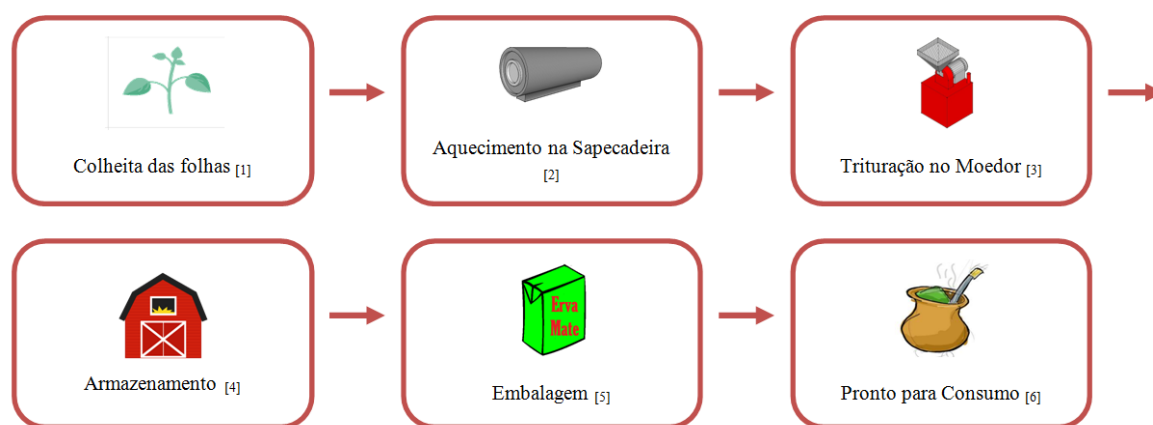


Figura 4: Processo para o consumo da erva mate.²

7.4. Propiedades da Erva-Mate

7.4.1 Aspectos gerais

A erva-mate (*I. paraguariensis*) apresenta algumas classes de compostos fitoquímicos, ou seja, compostos químicos biologicamente ativos que podem ser encontrados em ervas e vegetais e possuem benefícios a saúde. Entre esses compostos, podem ser citados as metilxantinas, fenóis e ácidos fenólicos, aminoácidos, compostos nitrogenados, ácidos graxos, antocianinas, flavonóides, entre outros (NAKAMURA, 2003).

Dentre esses diferentes compostos presentes na erva-mate estão as saponinas (Figura 5). Elas são responsáveis pelo sabor amargo da erva-mate, pela solubilidade da bebida e também pela formação de espuma. A saponina apresenta diferentes funções como por

² Figura 4-Fontes: [1] Imagem Planta. Disponível em: < www.prezi.com > [2] Imagem produzida pelo grupo.

[3] Imagem disponível em: < https://3dwarehouse.sketchup.com/model.html?id=u2ac_c6bba-0c07-470a-9f1a-43d3c234f7e6 > [4] Imagem disponível em: <http://clipartsign.com/image/13245/>

[5] Imagem produzida pelo grupo.

[6] Imagem disponível em:< <http://oleandros.blogspot.com.br/2006/09/os-10-mandamentos-do-chimarro.html> >

exemplo, ação anti- inflamatória, diurética e expectorante (CANTERLE, 2005).

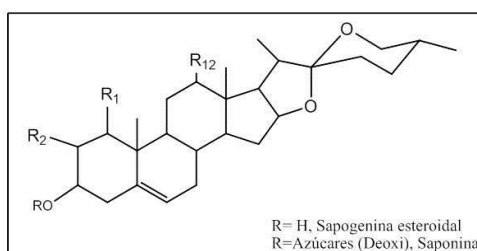


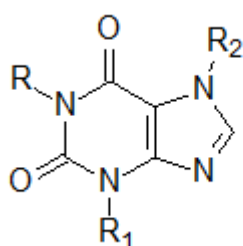
Figura 5: Saponinas.³

A erva-mate apresenta variações em sua qualidade, no conjunto de suas características e benefícios devido à influência de alguns fatores como a idade das árvores e das folhas, a época de colheita, o sistema de cultivo, região produtora e as formas de beneficiamento e armazenamento, época de poda, luminosidade, tipo de solo e teor de minerais, adubação, variabilidade genética, além dos métodos de extração, isolamento e quantificação (VIEIRA, 2009).

Segundo Pedrolo (2005 apud Filipi et al, 2000) a erva é utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças como artrite, lenta digestão, obesidade, dor de cabeça e reumatismo e também é conhecida por conter compostos com propriedades antioxidantes. Ela apresenta propriedades estimulantes ao sistema nervoso central atribuído ao teor das metilxantinas, que serão abordadas a seguir.

7.4.2 Metilxantinas

As metilxantinas (Figura 6) são derivadas de bases púricas que são compostos nitrogenados. Suas sínteses têm como precursora a xantina, por isso, essas substâncias são compostos metilados dessa xantina



- 1 Cafeína: R = R₁ = R₂ = CH₃
- 2 Xantina: R = R₁ = R₂ = H
- 3 Teofilina: R = R₁ = CH₃; R₂ = H
- 4 Teobromina: R = H; R₁ = R₂ = CH₃

Figura 6: Representação genérica de alguns compostos xantínicos⁴

³ Figura 5-Fonte: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Saponinas&lang=3

Essas substâncias são de origem vegetal e responsáveis pela obtenção de bebidas estimulantes. As metilxantinas mais importantes são a cafeína, teofilina e a teobromina, sendo as duas primeiras as mais importantes para a indústria farmacêutica por suas características estimulantes do sistema nervoso e respiratório, respectivamente.

7.4.3 Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um alcalóide pertencente ao grupo das metilxantinas com a fórmula molecular $C_8H_{10}N_4O_2$. Se caracteriza por ser uma substância branca, sólida e inodora, pouco solúvel em água e com o ponto de fusão entre 234 e 239° C. A cafeína (Figura 7) é relativamente tóxica ($DL_{50} = 75 \text{ mg/kg}$), mas para se obter uma dose letal de cafeína, o indivíduo deveria ingerir cerca de uma centena de xícaras de café em um curto período de tempo. (Apostila do Departamento de química – UFSC).

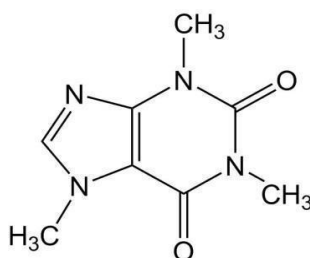


Figura 7: Estrutura química da cafeína

A cafeína atua bloqueando a adenosina, neurotransmissor do sono. Ao ser ingerida em quantidade adequada, a cafeína reduz a sonolência, a apatia e a fadiga, além de favorecer a atividade intelectual do indivíduo, aumentando a capacidade de atenção, concentração e memória (Segatto, 1999; Lima, 1995 apud Encarnação; Lima, 2003. p. 26).

Aproximadamente 250 mg de cafeína, para pessoas que não estejam habituadas ao seu consumo regular, pode levar a um aumento da frequência cardíaca (taquicardia). Em certos casos, pode chegar a sentir-se a sensação de palpitações. (SOARES; FONSECA, 2004)

Pode ser encontrada em diversas plantas como no guaraná, erva-mate e em outros vegetais, e é responsável pelo efeito estimulante de bebidas como chá e café e de refrigerantes. É também um dos princípios ativos de bebidas ditas “energéticas” (Apostila do Departamento de química - UFSC).

⁴ Figura 6- Fonte: Apostila do departamento de química-UFSC

7.4.4 Teobromina

A Teobromina conhecida como 3,7-dimetilxantina (Figura 8) é um alcalóide que faz parte do grupo de compostos químicos referidos como metilxantinas. Possui fórmula molecular $C_7H_8N_4O_2$ e a dose letal (DL_{50}) para o organismo humano é de 1000 mg/kg. É um pó branco pouco solúvel em água.

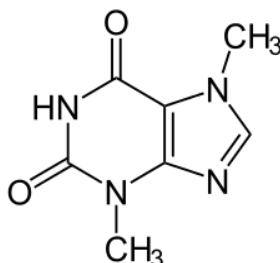


Figura 8: Estrutura química da Teobromina

Na medicina moderna, a teobromina é usada como vasodilatador (alargador de vaso sanguíneo). Não é considerada uma substância viciante, mas já foi apontada como causadora do vício do chocolate. Além disso, esta metilxantina possui algumas características antioxidantes (BEAUDOIN et al., 2011).

Diferentemente da cafeína, a teobromina tem menos impacto no sistema nervoso central (SNC), mas ainda sim estimula o coração em um alto grau. Apesar dos efeitos leves ao SNC, a teobromina ainda pode causar insônia, ansiedade e tremores.

A teobromina presente na erva-mate atua no relaxamento dos músculos lisos, além de serem considerados estimulantes cardíaco, diurético e vasodilatador. (CAMPOS et al, 1986 apud MACCARI JUNIOR et al, 2000). Além disso, vem sendo muito utilizada como doses terapêuticas para quimioterapia de alguns cânceres, angina peitoral e edema cardíaco (GIL et al., 1993).

Além de encontrada na erva-mate, a teobromina é a metilxantina predominante do cacau e proporciona efeitos psicostimulantes. Contudo, a concentração de teobromina no cacau varia dependendo da espécie do fruto.

7.4.5 Teofilina

A teofilina conhecida como 1,3-dimetilxantina (Figura 9) é um alcalóide de forma molecular $C_7H_8N_4O_2$ integrante do grupo das metilxantinas. É pouco solúvel em água e sua DL_{50} para o organismo humano é 332 mg/kg.

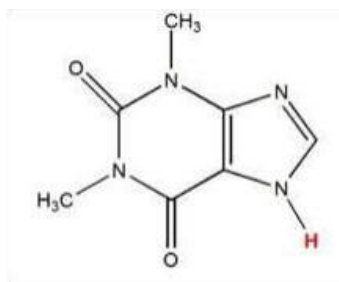


Figura 9: Estrutura química da Teofilina.

A teofilina está relacionada a mecanismos de responsividade brônquica à histamina e aeroalérgenos, por exemplo. Outras ações da teofilina também incluem a inibição de mediadores inflamatórios, ou seja, a teofilina é bem utilizada para tratamento de doenças respiratórias como bronquite e também asma (FILHO, 2016).

Essa metilxantina é absorvida pelo gastro intestinal e é metabolizada pelo fígado devido ao sistema enzimático. Ingestões excessivas de teofilina podem causar náuseas, vômitos e dores abdominais, por exemplo (FILHO, 2016)

A teofilina pode ser encontrada em diferentes bebidas e alimentos como chá, café, guaraná e noz-de-cola, sendo muito apontada como importante para construção do organismo, por ser uma substância diurética e também em alguns casos por aumentar a frequência cardíaca (SCHWEIKART, s/d).

Em quantidades, a teofilina é menos significativa quando comparada com a cafeína e a teobromina na *I. paraguariensis*. Segundo Ito (1997 apud Pedroso 2008)

Isso se deve a participação da teofilina no metabolismo da cafeína e teobromina. Essa participação foi demonstrada quando se encontrou teofilina radioativa nas moléculas de cafeína e de teobromina. A possível explicação para isso seria o envolvimento da teofilina na ressíntese da cafeína (ITO, 1997 apud Pedroso, 2008).

A teofilina, em usos clínicos, é utilizada para tratamento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), pode ser estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC) preparada contra possíveis resfriados. Os efeitos da teofilina, como já comentado anteriormente, podem ser benéficos ou adversos de acordo com a quantidade e objetivo terapêutico.

7.5 Métodos para Análise

Dentre os possíveis métodos de análise das metilxantinas na erva-mate, foi optado por utilizar uma variedade de técnicas para que o processo ocorra.

Para separar os compostos, é necessário recorrer a métodos que abordem as diferenças

nas propriedades das substâncias a serem separadas, diferentes métodos exploram diferentes propriedades. A Gravimetria mede a massa da substância que foi separada através de uma precipitação ou volatilização, já que necessita dela em seu estado puro, apenas substâncias que podem formar precipitados pouco solúveis ou que se volatilizam facilmente podem ser submetidas a esse método(BASSETT et al, 1992)

A Eletroforese separa as substâncias baseadas em suas cargas, já que consiste da aplicação de correntes elétricas nelas, geralmente as substâncias que apresentam disparidade de cargas são suscetíveis a esse método já que interagirão melhor com a corrente (WILSON & WALKER. s/d).

As Cromatografias Gasosa e Líquida, se baseiam em como a substância interage com o eluente (gasoso ou líquido) que flui no sistema, separando as mais interativas das menos interativas, tais interações podem se dar por características como polaridade, acidez e basicidade, afinidade química e solubilidade (PAVIA et al, 2006); (MALVIYA, 2010).

A espectroscopia detecta as substâncias de acordo com a forma que interagem com certos comprimentos de ondas eletromagnéticas, já que os componentes apresentam características que variam a forma com que absorvem, emitem, refletem as ondas incididas, tais como diferentes elementos, tamanhos, forças de ligações e conformações (MENDHAN,2002).

7.5.1 Cromatografia líquida em coluna

A cromatografia líquida em coluna é uma técnica que se fundamenta basicamente na polaridade das moléculas envolvidas no processo. Adiciona-se à coluna o adsorvente que também é conhecido como fase estacionária, geralmente utilizando a sílica e alumina e também é composto por uma fase móvel, o solvente (VERLY, 2011).

A velocidade do processo varia, dependendo da polaridade do composto, da fase estacionária e também do solvente. Se o composto é mais atraído pela fase estacionária do que pela fase móvel, o processo ocorrerá de forma mais lenta, bem como, se possuir maior afinidade com o solvente ele migrará mais rapidamente da coluna, o que faz o processo gerar menos tempo e também solvente (VERLY, 2011).

Com relação as metilxantinas, elas apresentam variações em sua polaridade devido à presença dos grupos metila (-CH₃). Assim, as metilxantinas não sairão todas simultaneamente da coluna devido à polaridade envolvida, portanto, a escolha correta do diâmetro da coluna, fase estacionária e fase móvel farão com que haja uma melhor separação

dessas metilxantinas não havendo coeluição entre as amostras, conseqüentemente saindo uma por vez.

7.5.2 Cromatografia de camada delgada

A cromatografia em camada delgada (TLC) se destaca por ser um método simples, rápido, visual e econômico, a (TLC) é a técnica predominantemente escolhida para o acompanhamento de reações orgânicas, sendo também muito utilizada para a purificação de substâncias e para a identificação de frações coletadas de cromatografia líquida em coluna (DEGANI et al, 1998).

O método se constitui em uma espécie “reversa” da cromatografia líquida em coluna (pois também irá ter uma separação pela afinidade do composto pelo solvente), onde, após aplicar uma pequena parte da amostra em uma placa com adsorvente, ela será colocada em um recipiente com solvente que, por capilaridade, subirá pela placa. Se o composto for colorido será possível acompanhar o deslocamento visualmente, se não for possível essa visualização é necessário revelar a placa para acompanhar este deslocamento (DEGANI et al, 1998).

Para as metilxantinas, será retirada a amostra da coluna de cromatografia líquida, e aplicada na placa, onde se pode acompanhar a saída das metilxantinas, identificando em quais amostras contem cada uma das metilxantinas, pois haverá um deslocamento diferente para cada xantina, já que cada uma apresentará uma interação diferente com o solvente. No entanto, é possível que as metilxantinas saiam juntas em uma mesma amostra retirada da coluna (DEGANI et al, 1998).

Como as metilxantinas não são visíveis, essas placas deverão ser reveladas, onde revelaremos em uma câmara de UV-Vis, no qual, será possível identificar o deslocamento da metilxantina na placa por interação com o solvente, e conseqüentemente distinguir as metilxantinas presentes na amostra.

7.5.3 Espectrofotometria de UV-Vis

A espectrofotometria de UV-Vis é uma técnica utilizada para identificar a presença de um composto em uma amostra e/ou quantificar um composto de acordo com sua absorvância de luz. Essa técnica se baseia na capacidade de um elétron sair de um orbital menos energético para um orbital mais energético, se receber uma quantidade de energia específica, e quando volta a seu estado fundamental, libera um fóton (energia luminosa) que pode estar dentro ou fora do espectro visível, dependendo do comprimento de onda (MARTINHO, 1994).

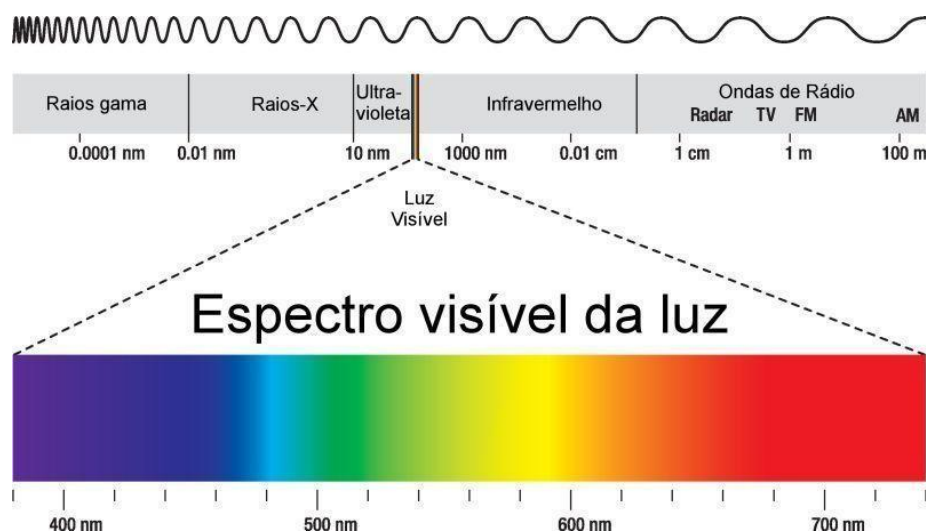


Figura 10: Espectro eletromagnético⁵

O espectrofotômetro de UV-Vis analisa a absorção de energia pela amostra ao incidir sobre ela, ondas eletromagnéticas em um comprimento específico (dentro da faixa do ultravioleta e do visível). O comprimento de onda em que há maior absorção de energia é algo intrínseco da substância (relaciona-se diretamente com os tipos de ligação intramolecular que a substância apresenta), e também proporcional a concentração da amostra, ou seja, se o equipamento estiver regulado corretamente para analisar a absorção da energia absorvida por composto, quanto maior for a concentração deste composto na amostra, maior será o resultado que o equipamento apresentará (QUÍMICA-RJ, 2016).

A quantificação das amostras é possível seguindo a lei de Beer, onde se constrói um gráfico de absorbância por concentração com amostras conhecidas. Com uma curva de calibração pode-se determinar valores de concentração desconhecidos para amostras de absorbância conhecida, com esta curva de calibração encontra-se uma equação de primeiro grau, $y=ax+b$, conhecendo os valores de a e b na equação será possível quantificar a concentração das metilxantinas em diferentes amostras a partir de sua absorbância lida no espectrofotômetro,

As metilxantinas apresentam as maiores absorções de energia ao serem expostas a ondas entre 275 e 280 nm (valores citados por diversos autores), isso se deve ao fato de suas ligações intramoleculares serem muito parecidas nas três moléculas, distinguindo uma da outra pela somente pela variação dos grupos metila, e por isso há a proximidade da absorção energética.

⁵ Figura 10- Fonte: InfoEscola

7.5.4 Espectroscopia em Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica utilizada para quantificar e identificar compostos ou investigar a composição de uma substância, baseada nos grupos funcionais que ela apresenta. Ela está associada com as vibrações específicas das ligações químicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula, tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrônico. Assim o aparelho incide radiação eletromagnética na região do infravermelho em um mesmo nível de energia das vibrações da ligação que acarreta na absorção da luz pelas moléculas, e pela diferença entre luz absorvida e emitida é possível saber quais ligações vibraram e como vibraram.

As metilxantinas possuem grupos funcionais bem característicos e de fácil identificação como, por exemplo, os grupos carbonilas associados a lactamas (amidas cíclicas), anel imidazol, ligações contendo nitrogênios, entre outras, o que facilita a caracterização das mesmas. Ainda, é relevante ressaltar que as metilxantinas são estruturas que se diferenciam apenas por grupos metilas em posições diferentes da molécula, assim, com essa técnica é possível identificar essas pequenas mudanças e caracterizar cada uma delas, se estiverem devidamente puras. A figura n apresenta o espectro no infravermelho de duas metilxantinas: cafeína e teobromina.

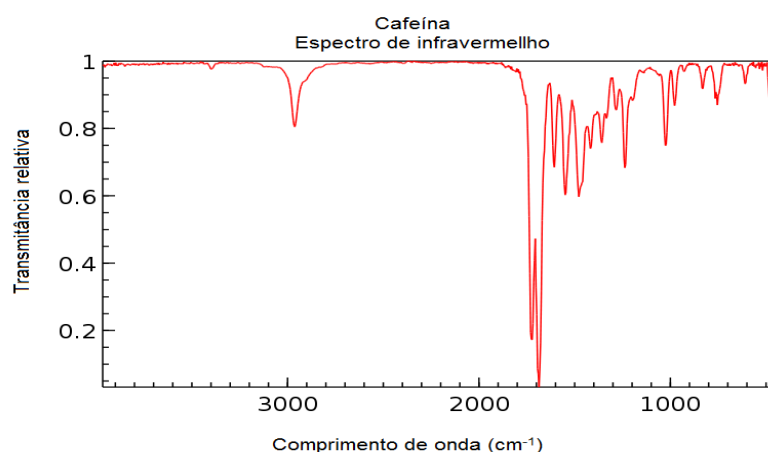


Figura 11: Espectro no infravermelho da cafeína⁶

8. METODOLOGIA

Dentre as metodologias descritas no processo de análise das metilxantinas, há uma quase generalização quanto ao processo, no qual é utilizado o método HPLC, que não depende de uma previa separação das metilxantinas, pois o próprio sistema realiza a análise conjunta de vários compostos. Pelo alto custo do método, foi optado em utilizar diferentes

procedimentos para as análises.

As amostras a serem analisadas serão provenientes da erva-mate comercial, que após prévia pesquisa em supermercados da cidade se optou por utilizar ervas mate das cidades de Rio das Antas, Canoinhas e Catanduvas. A seleção destas amostras foi feita considerando os aspectos naturais de cada cidade e também da disponibilidade destas amostras à venda em Jaraguá do Sul. Todas as análises serão feitas em triplicata visando a confiabilidade dos resultados.

Para a extração das metilxantinas utilizaremos o método descrito por Bassan et al. (2007) que consiste em manter a matéria prima (erva-mate) em ebulição com H_2SO_4 onde o extrato obtido será filtrado e neutralizado com uma solução aquosa de NH_4OH .

Este método de extração consiste em extrair, mutualmente, as três metilxantinas a serem analisadas, e para a análise em espectrofotometria de UV-Vis é necessário que estejam separadas em amostras diferentes.

Para a separação destas metilxantinas utilizar-se-á o método de cromatografia em coluna para separar cada metilxantina. O acompanhamento dessa separação pode ser feito de duas maneiras: Com o UV-Vis e com a cromatografia de camada delgada (CCD ou TLC). Em literatura são encontradas duas formas de preparação de coluna para esta separação.

A coluna descrita por Shingler e Carlton (1959) para a separação das metilxantinas tem como fase estacionária o ácido silícico (H_2SiO_4) misturado com água destilada, a fim de formar uma pasta, que será colocada dentro da coluna. Após essa colocação da pasta de ácido silícico e a remoção das bolhas de ar presentes na pasta, a coluna deve ser preenchida com clorofórmio lavado, sendo esse solvente a fase móvel da coluna. Após o processo de preparação da coluna, é colocado um papel-filtro no topo da coluna, onde posteriormente irá se colocar a amostra obtida no processo de extração das metilxantinas, onde, lentamente se adicionará o clorofórmio lavado⁶, cuidando para que não se ultrapasse o topo da coluna, mas que também não seque.

Já o segundo método de preparação de coluna descrito por Teixeira e Spoladore (1980) consiste em utilizar uma fase estacionária composta de alumina básica (Al_2O_3) misturada com água destilada e homogeneizada mecanicamente. Após homogeneização, serão adicionados 5% butanol em clorofórmio (v/v) juntamente com alumina, e introduzida dentro da coluna, onde, com a ajuda de um bastão de vidro serão removidas possíveis bolhas de ar presentes na mistura. Com o término da colocação da alumina, deverão ser adicionados 5% butanol em clorofórmio dentro da coluna, até que fique acima do nível da alumina.

⁶ A lavagem do clorofórmio consiste em purificar o clorofórmio, para que outros possíveis compostos que ali estão presentes não reajam com a amostra.

Para a separação da amostra, deverá ser feita uma mistura homogênea com agitação mecânica utilizando alumina básica e a solução com as amostras, e colocada no topo da coluna sempre adicionando 5% butanol em clorofórmio a fim de não variar o fluxo da saída do solvente da coluna.

Em ambos os métodos de preparação de coluna, será retirada as amostras da coluna em frações de 5 mL, para assim fazermos as análises de acompanhamento, quantificação e identificação das metilxantinas.

O acompanhamento da saída das metilxantinas pela coluna será pelo método de cromatografia de camada delgada⁷, onde será visualizado em quais frações contém cada uma das metilxantinas e se houve a separação das mesmas.

Outro método para o acompanhamento da separação das metilxantinas pela coluna cromatográfica é o espectrofotômetro de UV-Vis⁸, onde, regulado para emitir ondas de 276,5 nm, apresentará variações de absorbância de acordo com a progressão das frações testadas. Cada metilxantina terá um pico de absorbância em diferentes frações, onde há, primeiramente, um aumento do nível de absorbância até apresentar um pico desta absorbância, e em seguida uma diminuição deste nível. Essa variação da absorbância representa que há a presença de alguma metilxantina naquela faixa de frações. Ao ser observado três vezes o aumento e diminuição da absorbância no decorrer das amostras, o processo de passagem do solvente pela coluna poderá ser interrompido, pois isso representa que as três metilxantinas já foram separadas e saíram da coluna.

Ao utilizar o método de preparação de coluna descrito por Shingler e Carlton, ao observar que houve a saída e separação da primeira metilxantina da coluna, será necessário uma troca do solvente utilizado, de clorofórmio para 5% butanol em clorofórmio, onde foi descrito que, há uma melhor separação da segunda e da terceira metilxantina que ainda estão na coluna com esta substituição de solvente.

Já para quantificar, método escolhido é o de pesagem, onde, as frações que contém o solvente com a mesma metilxantina serão reunidas a fim de se extrair o solvente. Com a extração do solvente, além de recuperar o mesmo, tem como resultado a determinada metilxantina em forma de pó, forma essa que será pesada, assim conseguindo quantificar.

Após pesado, o pó será colocado no Infravermelho⁹, equipamento esse, com a função de identificar cada metilxantina, ou seja, saber qual metilxantina corresponde a cada massa e a cada fração de amostra retirada da coluna.

A quantificação das metilxantinas também é possível a partir de uma curva de

⁷ Método descrito no item 7.5.2 da fundamentação teórica.

⁸ Método descrito no item 7.5.3 da fundamentação teórica.

⁹ Método descrito no item 7.5.4 da fundamentação teórica.

calibração no UV-Vis, obtida com amostras de concentrações conhecidas relacionando uma série de valores de concentração, com seus respectivos valores de absorvância. Esse método quantitativo é aplicável para as duas formas descritas de elaboração da coluna, pois, a construção da curva de calibração é necessária para qualquer análise espectrofotométrica de concentração desconhecida.

A identificação da metilxantina pelo Infravermelho também se fará necessária quando utilizarmos o UV-Vis a fim de quantificar, pois este aparelho tem como função somente demonstrar qual a absorvância de cada amostra, sendo necessário sabermos qual metilxantina é aquela tratada na amostra, para assim utilizarmos a curva de calibração correta para cada uma.

Após obtermos os valores quantificados das metilxantinas, compararemos com os valores já dispostos em literatura, além de compararmos os valores entre as diferentes amostras analisadas.

8.1 Tratamento de Rejeito

Ao final das análises laboratoriais, algumas medidas serão tomadas em relação aos rejeitos das análises. Os solventes utilizados serão recuperados, tornando-os próprios para serem reutilizados. As substâncias adsorventes e fases estacionárias utilizadas serão tratadas com purificação, já que podem ser reutilizadas após esse procedimento. Os resíduos sólidos como a cafeína, teobromina e teofilina obtidas após extração do solvente, assim como amostras orgânicas obtidas no processo de extração serão condicionadas a tratamento e descarte de acordo com as normas dispostas no laboratório, tendo em vista que essas substâncias são potenciais causadoras de danos ao meio ambiente.

9. CRONOGRAMA

| | Agosto | Setembro | Outubro | Novembro | Dezembro |
|----------------------------------|--------|----------|---------|----------|----------|
| Extração das metilxantinas | X | | | | |
| Análise das metilxantinas | X | X | | | |
| Caracterização das metilxantinas | | X | X | | |
| Quantificação das metilxantinas | | X | X | | |

| | | | | | |
|-----------------------------|--|---|---|---|---|
| Análise dos resultados | | X | X | X | |
| Escrita do relatório | | | X | X | |
| Elaboração do <i>Banner</i> | | | | X | |
| Entrega do relatório | | | | | X |
| Apresentação final | | | | | X |

REFERÊNCIAS

ACOFARMA DISTRIBUCIÓN S.A.. **Ficha de Dados de Segurança: Cafeína anidra.** Disponível em: <http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/2363-f36da2aa0d75b1b312e3c3f5843b7de1662d72ef/main/files/Cafeina Anhidra_pt.pdf>. Acesso em: 30 maio 2016.

Apostila de química orgânica experimental A; Disponível em: <<http://www.qmc.ufsc.br/organica/>>

BASSANI, Valquiria L. et al. **Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. St.-Hil., aquifoliaceae).** 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200012>. Acesso em: 15 jun. 2016.

BASSETT, J.; DENNEY, R. C.; JEFFERY, G. H. & MENDHAN, J., VOGEL Análise inorgânica quantitativa. Editora Guanabara S.A., Rio de Janeiro, 1992.

Beaudoin, M.S., Graham, T.E. (2011). **Methylxanthines anh human health:** epidemiological and experimental evidence. Handbook of Experimental Pharmacology 200: 509-548.

BERGER, Gabriel. **Biomassa e nutrientes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St-Hil), no município de Nova Prata, RS.** Santa Maria: UFSM, 2006. 93 f. Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em engenharia florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2006.

DA CROCE, D.M. A pesquisa em erva-mate. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.5, n.4, p.28, 1992 (Reportagem de FRANCO, H.M. Erva-mate: o Mercosul dispõe dessa exclusividade, 1992. p.24-30).

DA CROCE, D.M.; FLOSS, P.A. **Cultura da erva-mate no Estado de Santa Catarina.** Florianópolis: EPAGRI-SC, 1999. 81p. (EPAGRI-SC, Boletim Técnico, 100).

DANIEL, Omar. Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial. Dourados, MS:

UFGD; UEMS, 2009. 288p.

DALLA NORA, Cleice. **Erva-mate**. 2008. Trabalho acadêmico. Bacharelado de Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas.

DA ROCHA, Weimar Freire. **Análise Do Agronegócio Da Erva-Mate Com O Enfoque Da Nova Economia Institucional E O Uso Da Matriz Estrutural Prospectiva**. Disponível em: <http://novosite.fepese.org.br/portaldeeconomia-sc/arquivos/links/alimentos_agronegocio/2001%20Erva%20mate%20tese%20ufsc.pdf> Acesso em 27/05/2016

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. Cromatografia um breve ensaio. Química nova na escola, v. 7, p. 21-25, 1998.

ENCARNAÇÃO, Ronaldo de Oliveira; LIMA, Darcy Roberto. **Café & Saúde Humana**. Brasília, DF: Embrapa, 2003. 66 p.

FILHO, Alcides Goularti. DE MORAES, Fábio Farias. **A construção dos caminhos da erva-mate em santa catarina: combinação e sobreposição de transportes**. Disponível em: http://www.apec.unesc.net/IV_EEC/sesoes_tematicas/Hist%F3ria%20econ%F4mica/A%20onstru%E7%E3o%20dos%20caminhos%20da%20erva-mate%20em%20Santa%20Catarina%20combina%E7%E3o%20e%20sobreposi%E7%E3o%20de%20transportes.pdf. Acesso em 20/05/2016.

FILHO, Pierre d'Almeida. **Asma Brônquica: Teofilina**. 2016

GIBERTI, G. C. Aspectos oscuros de la corologia de Ilex paraguariensis St. Hil.. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. de A.; TARASCONI, L. C. org. **Erva-mate**. Biologia e cultura no Cone Sul. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, p. 289-300. 1995.

GIRARDI, Jonathan dos Santos. **Avaliação da influência das condições de cultivo sobre os teores de compostos de interesse presentes nos extratos de erva-mate (Ilex paraguariensis) obtidos por CO2 a altas pressões**. Florianópolis: SC, 2010. 125p

INFOESCOLA. **Espectro Eletromagnético**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/fisica/espectro-eletromagnetico/>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

MACCARI JUNIOR, A.; SANTOS, A. P. R. Parâmetros tecnológicos para a utilização industrial da erva-mate. In: MACCARI JUNIOR, A.; MAZUCOWSKI, J. Z. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: Paraná. p. 43-68, 2000.

MALVIYA, R.; BANSAL, V.; PAL, O. P.; SHARMA, P. K. **High performance liquid chromatography: a short review**. Journal of Global Pharma Technology, v. 2, p. 2226, 2010.

MARTINHO, J. M. G. **Espectroscopia de Absorção no Ultra-Violeta e Visível**. 1994.

MAZUCHOWSKI, J.Z. **Manual da erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hill.)**. Curitiba: EMATER, 1989. 104 p.

MENDHAM, J. **Vogel: análise química quantitativa, Livros Tecnicos e Científicos**, 2002.

MILLAN, Pollianna. SANTOS, Leandro. **O início de uma tradição.** Disponível em: <<http://www.gazetadopovo.com.br/vida-e-cidadania/especiais/erva-mate/origens.jpp>>. Acesso em 28/05/2016.

PAVIA, Donald L., Gary M. LAMPMAN, George S. KRITZ, Randall G. Engel (2006). **Introduction to Organic Laboratory Techniques** (4th Ed.) Thomson Brooks/Cole [S.l.] pp. 797–817.

PEDROSO, Gabriela Lima. **Avaliação da ingestão alimentar e peso corporal em ratos wistar machos tratados com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*.** 2008.

PREFEITURA DE CANOINHAS. **Localização.** Disponível em: <<http://www.pmc.sc.gov.br/cms/pagina/ver/codMapaItem/25981>>. Acesso em: 15/08/16.

PREFEITURA DE CATANDUVAS. **Capital catarinense do chimarrão.** Disponível em: <<http://catandugas.sc.gov.br/municipio/index/codMapaItem/17255>> Acesso em: 15/08/2016.

QUÍMICA-RJ, Cefet. **Análise instrumental:** Apostila de espectrofotometria molecular. Disponível em: <http://www.ifrj.edu.br/webfm_send/547>. Acesso em: 04 jul. 2016.

REVISTA RURAL. **Erva-Mate - Lucro Na Chaleira.** Disponível em: <http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2006/Artigos/rev103_erva_mate.htm> Acesso em 28/05/2016.

SAINT-HILAIRE, Auguste de. **Viagem ao Rio Grande do Sul (1820-1821).** 2ª São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1939. 167 v. (Biblioteca Pedagógica Brasileira. Sér. 5.a: Brasileira). Tradução de Leonam de Azeredo Pena.

SALDANHA, Luciane Arias. **Efeitos da ingestão de cafeína, café (*Coffea arabica*) e chá mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a atividade lipolítica do tecido adiposo e parâmetros metabólicos em ratos submetidos ao exercício físico.** 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SCHWEIKART, Jörg. Alcalóides no chá verde e no chá preto- Cafeína, Teofilina, Teobromina. **Chá verde e Saúde.** s/d. Disponível em: <<http://www.cha-verde.net/alcaloides/>>.

SHINGLER, A. J.; CARLTON, J. K.. Method for Separation and Determination of Theophyllin, Theobromine, and Caffeine. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 31, n. 10, p.1679-1680, out. 1959. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60154a040>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

SILVA, Renata Moreira de. **Avaliação do efeito da erva mate (*Ilex paraguariensis*) no processo de neovascularização em camundongos.** UCDB, Campo Grande: MS, 2015.

SISTEMAS DE PRODUÇÃO DA EMBRAPA. **Cultivo da erva-mate.** Disponível em: <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao16_1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=3601&p_r_p_-996514994_topicoId=2901>. Acesso em 28/05/2016.

SOARES, Ana Isabel Sousa Montenegro; FONSECA, Bruno Miguel Reis. **Cafeína**. 2004. Disponível em: <<http://cafeina.com.sapo.pt/cafeina/cafeina.pdf>>. Acesso em: 30 maio 2016.

STUMPF, Míriam. **Erva mate (Ilex paraguaiensis)**. Disponível em: <<http://www.fazfacil.com.br/jardim/erva-mate/>>. Acesso em 28/05/2016.

TEIXEIRA, João Paulo F.; SPOLADORE, Dayse Soave. MÉTODO DE SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS BASES PURINAS CAFEÍNA E TEOBROMINA. **Bragantia: Revista científica do instituto agrônomo**, Campinas, v. 39, n. 8, p.199-204, abr. 1980. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v39n1/23.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2016.

WILSON; WALKER. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**, 7ed. Página 399.