



FURG

Dissertação de Mestrado

**FRACIONAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
AMOSTRAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)
ORGÂNICA E CONVENCIONAL**

Juliana Martins Dias

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2022

**FRACIONAMENTO DE COMPOSTOS FENÓOLICOS EM
AMOSTRAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)
ORGÂNICA E CONVENCIONAL**

por

JULIANA MARTINS DIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2022

Ficha Catalográfica

D541f Dias, Juliana Martins.
Fracionamento de compostos fenólicos em amostras de erva-
mate (*Ilex paraguariensis*) orgânica e convencional / Juliana Martins
Dias. – 2022.
86 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e
Ambiental, Rio Grande/RS, 2022.

Orientador: Dr. Rodolfo Carapelli.

Coorientadora: Dra. Michele Moraes de Souza.

1. Erva-mate 2. Compostos fenólicos 3. Compostos fenólicos
livres 4. Compostos fenólicos conjugados 5. Sistemas de cultivo
6. Partes da planta I. II. Título.

CDU 633.77

Catologação na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

Universidade Federal do Rio Grande
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**FRACIONAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
AMOSTRAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)
ORGÂNICA E CONVENCIONAL**

elaborada por
JULIANA MARTINS DIAS

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Rodolfo Carapelli (FURG – RS)



Prof. Dr. Marcos Alexandre Gelesky (FURG- RS)



Prof. Dr. Cláudio Martin Pereira De Pereira (UFPEL - RS)
Rio Grande, 01 de novembro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Muitos desafios são encontrados ao se iniciar um novo projeto, e ter apoio é fundamental. Por isso, expresso aqui minha gratidão:

À Universidade Federal do Rio Grande (FURG), da qual sou aluna desde minha graduação, agradeço o ensino de qualidade e um ambiente agradável.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental pelas oportunidades de conexões e aprendizados que me permitiram desenvolver este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de apoio financeiro.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodolfo Carapelli e minha coorientadora Dra. Michele Moraes de Souza, por terem me aceito junto ao grupo e por esses anos de dedicação, respeito e parceria. Vocês são os exemplos de profissionais que eu quero seguir, muito obrigada.

A todos professores, amigos e colegas que tive o prazer de conhecer, aprender e estreitar laços. Em especial O Dr. João Batista dos Santos Espinelli Junior e a aluna Ana Claudia Oliveira.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado e foram meu alicerce para que eu pudesse ter chegado até aqui, em especial a minha mãe, Jaqueline, e minha avó, Liane.

Por último, mas não menos importante, ao meu filho, Lucian, por me ensinar todos os dias a ser perseverante e paciente, a sua presença me engrandece e me concede forças para conquistar meus sonhos e poder proporcionar os seus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
3. REVISÃO DA LITERATURA	05
3.1 <i>ERVA-MATE (Ilex paraguariensis)</i>	05
3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	10
3.3 SISTEMA DE CULTIVO.....	18
3.4 FRACIONAMENTO.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	30
4.2 REAGENTES.....	30
4.3 OBTENÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS.....	31
4.4 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO (FRACIONAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS).....	31
4.4.1 EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO (FRAÇÃO LIVRE).....	32
4.4.2 EXTRAÇÃO POR HIDRÓLISE ÁCIDA (FRAÇÃO CONJUGADA).....	33
4.5 CLARIFICAÇÃO (“ <i>clean-up</i> ”).....	33
4.6 PROCEDIMENTO DE DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU.....	34
4.7 EXATIDÃO.....	34

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	35
5.1 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL.....	35
5.2 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E EXATIDÃO.....	37
5.3 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	40
5.4 COMPOSTOS FENÓLICOS NAS PARTES DA PLANTA (FOLHAS E TALOS).....	49
5.5 COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO (ORGÂNICO E CONVENCIONAL).....	52
5.6 FRAÇÕES DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE ERVA- MATE.....	64
6. CONCLUSÕES	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Árvore da erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>).....	06
Figura 02. Fluxograma das etapas para geração de produtos à base de erva-mate...	08
Figura 03. Possíveis vias de biossíntese dos compostos fenólicos em vegetais.....	11
Figura 04. Grupamento fenol.....	12
Figura 05. Classes de compostos fenólicos... ..	13
Figura 06. Ácidos fenólicos.....	14
Figura 07. Estrutura básica de flavonoides e polifenóis baseados em flavonoides (proantocianidinas).....	15
Figura 08. Selos de certificação orgânica no Brasil.....	20
Figura 09. Comparação entre o cultivo orgânico e convencional	22
Figura 10. Estrutura de tanino hidrolisável	25
Figura 11. Estrutura das paredes celulares.....	26
Figura 12. Fluxograma de procedimento de fracionamento de compostos fenólicos em amostras de erva-mate	32
Figura 13. Ensaio de adição e recuperação em extrato de compostos fenólicos livres de folhas e talos de erva-mate convencional	39
Figura 14. Compostos fenólicos totais em folhas e talos de erva-mate orgânica e convencional	43
Figura 15. Fração livre de compostos em folha e talo de erva-mate	49

Figura 16. Fração conjugada de compostos fenólicos em folha e talo de erva-mate....	50
Figura 17. Fração livre de compostos fenólicos em folhas de erva-mate orgânica e convencional	53
Figura 18. Fração livre de compostos fenólicos em talos de erva-mate orgânica e convencional.....	54
Figura 19. Fração conjugada de compostos fenólicos em folhas de erva-mate orgânica e convencional.....	55
Figura 20. Fração conjugada de compostos fenólicos em talos de erva-mate orgânica e convencional	56
Figura 21. Média do teor de compostos fenólicos (soma das frações) em folhas e talos de erva-mate orgânica e convencional.....	58
Figura 22. Média do teor de compostos fenólicos livres e conjugados em folhas e talos de erva-mate orgânica e convencional.....	59
Figura 23. Compostos fenólicos livres e conjugados em folhas de erva-mate orgânica e convencional.....	65
Figura 24. Compostos fenólicos livres e conjugados em talos de erva-mate orgânica e convencional.....	66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Comparação da eficiência de extração de compostos fenólicos totais (mg GAE g⁻¹ DW) com diferentes concentrações de etanol. 37
- Tabela 2.** Dados do ensaio de adição e recuperação nas frações livre e conjugada de amostras de erva-mate orgânica e convencional. 38
- Tabela 03.** Compostos fenólicos totais (mg GAE g⁻¹ DW) livre e conjugados em amostras de folhas e talos de erva-mate orgânica e convencional.....41
- Tabela 04.** Médias dos teores de compostos fenólicos (mg GAE g⁻¹ DW) em amostras de folhas e talos de erva-mate orgânica e convencional.....57
- Tabela 05.** Média do teor de compostos fenólicos (soma das frações em mg GAE g⁻¹ DW) em folhas e talos de erva-mate orgânica e convencional.....57

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. **CP**, compostos fenólicos;
2. **DW**, peso seco, do inglês “*dry weight*”;
3. **EA**, acetato de etila, do inglês “*etil acetate*”;
4. **EDTA**, ácido etilenodiamino tetra-acético;
5. **EE**, éter etílico;
6. **EE:AE**, eter etílico: acetato de etila;
7. **EMBRAPA**, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;
8. **GAE**, ácido gálico equivalente, do inglês, “*gallic acid equivalent*”;
9. **IFOAM**, Federação Internacional de Movimentos de Agricultura Orgânica, do inglês, “*International Federation of Organic Agriculture Movements*”;
10. **PA**, para análise;
11. **PAL**, fenilalanina amoníaco-liase, do inglês, “*phenilalanine amonia liase*”;
12. **TGI**, trato gastrointestinal;
13. **TPC**, compostos fenólicos totais, do inglês, total phenolic compounds e;
14. **TFC**, compostos flavonoídeos totais, do inglês, total flavonoid compounds.

RESUMO

Título: FRACIONAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) ORGÂNICA E CONVENCIONAL

Autor: Juliana Martins Dias

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Carapelli

Coorientadora: Dra. Michele Moraes de Souza

As folhas e talos utilizados na produção de erva-mate são oriundas de árvores da espécie *Ilex paraguariensis* e possuem grande valor cultural e potencial tecnológico evidente, fato que se dá devido a expressiva presença de compostos bioativos, como os compostos fenólicos, que são reconhecidos por sua capacidade de regularizar estados de estresse oxidativo, agindo na manutenção da vida vegetal e animal. Esses compostos podem ser extraídos em sua forma livre ou conjugada a partir de um procedimento de fracionamento, que aplica estratégias hidrolíticas para melhor recuperação destes das matrizes vegetais. A síntese dessas moléculas pode ser modulada por condições ambientais, como por exemplo estresse biótico e abiótico, e o estudo de produtos cultivados a partir de sistemas de cultivo fundamentalmente distintos, como o sistema de cultivo orgânico e convencional, pode evidenciar comportamento diferente no perfil fenólicos dos produtos. No presente trabalho utilizou-se a metodologia de fracionamento para avaliar o teor de compostos fenólicos livre e conjugados em amostras de folhas e talos de erva-mate orgânica e convencional e constatou que: a) as folhas de erva-mate são mais concentradas do que os talos; b) a estratégia de fracionamento incrementou a concentração de compostos fenólicos determinados nas amostras estudadas; c) a fração conjugada é mais concentrada do que a livre e; d) os grupos amostrais orgânico e convencional demonstraram paridade, indicando que o sistema de cultivo pode ser uma característica de menor impacto na modulação da síntese fenólica em erva-mate.

Palavras-chave: erva-mate, compostos fenólicos, compostos fenólicos livres, compostos fenólicos conjugados, sistemas de cultivo e partes da planta.

ABSTRACT

Title: FRACTIONING OF PHENOLIC COMPOUNDS IN ORGANIC AND NON-ORGANIC YERBA MATE (*Ilex paraguariensis*) SAMPLE.

Author: Juliana Martins Dias

Advisor: Prof. Dr. Rodolfo Carapelli

The leaves and stems used in the production of yerba mate come from trees of the species *Ilex paraguariensis* and have great cultural value and evident technological potential. This is due to the significant presence of bioactive compounds, such as phenolic compounds, which are recognized for their ability to regulate states of oxidative stress, acting in the maintenance of plant and animal life. These compounds can be extracted in their free or conjugated form from a fractionation procedure, which applies hydrolytic strategies for a better recovery of these compounds from the vegetable matrices. The synthesis of these molecules can be modulated by environmental conditions, such as biotic and abiotic stress, and the study of products grown from fundamentally different cultivation systems, such as organic and non-organic, can show different behavior in the phenolic profile of the products. In the present work, the fractionation methodology was used to evaluate the content of free and conjugated phenolic compounds in leaf and stem samples of organic and non-organic yerba mate and found that: (a) yerba mate leaves are more concentrated than stalks; (b) the fractionation strategy increased the concentration of phenolic compounds determined in the samples studied; (c) the conjugated fraction is more concentrated than the free and; (d) the organic and non-organic sample groups showed parity, indicating that the cultivation system may be a characteristic of less impact on the modulation of phenolic synthesis in yerba mate.

Keywords: yerba mate, phenolic compounds, free phenolic compounds, conjugated phenolic compounds, farming system and part plants.

1. INTRODUÇÃO

As espécies arbóreas são, normalmente, identificadas por seus produtos frutíferos ou madeireiros. A *Ilex paraguariensis* é um exemplo importante, sendo reconhecida pela sua utilização na produção da erva-mate, que vem ganhando espaço no mercado nacional e internacional devido sua utilização típica (preparo e consumo das bebidas ‘chimarrão’ e ‘tererê’), além de um crescente interesse tecnológico. Os seus extratos podem apresentar características benéficas à saúde, bem como a própria matriz pode ser aplicada na formulação de bebidas e alimentos como pães e energéticos (BRANCO *et al.*, 2013; SANTETTI *et al.*, 2021). Outro fator interessante quanto aos produtos dessa matriz vegetal está na mistura entre duas partes da planta (folhas e talos) pois, assim com discutido por WANG *et al.*, (2020), os tecidos e órgãos vegetais sintetizam metabólitos de forma distintas e o aproveitamento dessas características pode enriquecer a capacidade nutricional dos produtos.

A erva-mate é reconhecida como fonte de compostos fenólicos na dieta (MEINHART *et al.*, 2010), apesar de, em geral, os estudos realizados sobre esse tema considerarem apenas a fração livre de compostos fenólicos, por isso, o aprofundamento desses estudos é necessário e a aplicação de estratégias para a extração seletiva de compostos fenólicos, originalmente inacessíveis, a partir do rompimento de suas interações com outras biomoléculas presentes nos vegetais, o que se configura em um fracionamento entre os compostos fenólicos extraíveis (ou solúveis) e não extraíveis (ou insolúveis) (PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2020). Com base nessas descrições alguns trabalhos otimizam o processo de extração de compostos fenólicos, e descrevem a combinação de métodos tradicionais, que utilizam misturas de solvente orgânico e água para o procedimento, com diferentes tipos de hidrólises utilizadas na liberação de fenóis, dentre elas a hidrólise ácida e a hidrólise alcalina (ACOSTA-ESTRADA *et al.* 2014; LI *et al.*, 2020 e ZHANG *et al.*, 2020). Essas abordagens se mostram

eficientes para obtenção de extratos fenólicos pois combina a fração solúvel, extraída no procedimento tradicional, com as frações extraídas nos processos hidrolíticos, que apresenta como característica maior resistência em ser removida da matriz devido a suas interações químicas. Dessa forma, o fracionamento proporciona determinação de compostos fenólicos mais condizente com a presença destes na matriz vegetal (PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2020).

Assim como diversos produtos, a erva-mate pode ser oriunda e ervais cultivados pelo sistema orgânico ou convencional, a produção orgânica não é novidade no Brasil e no mundo, tendo suas raízes na década de 1970, contudo, no território brasileiro, as diferenças entre o sistema de cultivo orgânico e o sistema de cultivo dito como convencional foi esclarecida fundamental e praticamente apenas em 2003, com a publicação da lei nº 10.831, que alicerça os pilares legais para a produção orgânica e direciona o setor para órgãos de regulamentação, um fato importante para que haja garantia quanto a origem do produto. Um produto orgânico é aquele produzido na ausência de fertilização sintética, biocidas, irradiação e aditivos químicos, e muitas dessas características não são vistas na produção convencional, que engloba todos os produtos não classificados como orgânicos, e é caracteristicamente permissiva quanto uso de fertilização artificial, agrotóxicos e espécies transgênicas (ESTEVES *et al.*, 2020; RAHMAN *et al.*, 2021). Esses diferentes sistemas aplicados para cultivar um alimento são capazes de ditar aspectos importantes quanto sua capacidade nutricional, alterando a concentração de nutrientes, como por exemplo Cu, Fe, Mg, Mn e Zn, assim como influenciando no perfil de macromoléculas pertencentes ao metabolismo primário, como os lipídios, proteína e carboidratos (NEVES *et al.*, 2021; POPA *et al.*, 2019).

O cultivo também afeta a síntese de metabólitos secundários nos vegetais, como os compostos fenólicos, que são reconhecidos por diversas funcionalidades, como contribuição para as características organolépticas (cor,

odor, sabor e textura) e ação de defesa contra estresses físico, químico e biológico (ARAÚJO *et al.*, 2021; TAIZ e ZEIGER, 2013; ZHANG *et al.*, 2020). Devido a essas características os compostos fenólicos são de grande valia para as plantas que os sintetizam, assim como apresentam potencial tecnológico evidente e são aproveitados entre setores industriais como o farmacêutico, cosmético, alimentar e têxtil (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021). Os alimentos orgânicos se mostram mais concentrados quanto ao teor de fenólicos solúveis, em amostras de frutas e vegetais, segundo FALLER E FIALHO, 2010, e maiores teores de flavonoides e taninos (classes de compostos fenólicos) também foram encontrados em amostras orgânicas de chá verde estudadas por KAZIMIERCZAK *et al.*, (2013). Tais informações corroboram com a discussão estabelecida por RAHMAN *et al.*, (2021), que discute a qualidade nutricional e segurança de produtos orgânicos e convencionais e conclui que os produtos orgânicos são mais concentrados em compostos fenólicos e seguros ao consumidor e produtor. Contudo, é necessário maior aprofundamento e disseminação de estudos a certa do comparativo entre os produtos orgânicos e convencionais, principalmente, aqueles que consideram estratégias mais robustas para a extração dos compostos fenólicos, como o fracionamento, em diferentes órgãos vegetais, como a proposta deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo avaliar perfil de compostos fenólicos através da extração fracionada desses compostos em amostras de folhas e talos de erva-mate de origem orgânica e convencional (disponíveis comercialmente) e visa compreender como as características típicas de cada sistema de cultivo influenciam no perfil fenólico, assim como distribuição dessas moléculas nos diferentes órgãos vegetais (folhas e talos).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar o método de fracionamento de compostos fenólicos em amostras de folhas e talos de erva-mate;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais nas frações obtidas;
- Comparar estatisticamente as variáveis: a) partes da planta (folhas e talos); b) sistema de cultivo (orgânico e convencional) e; c) fracionamento de compostos fenólicos (frações livre e conjugada) e;
- Interpretar e relatar os resultados encontrados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ERVA-MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*)

A árvore de maior reconhecimento econômico, por produtos não madeireiro, é a *Ilex paraguariensis*, que dá origem a produtos como o chá mate e a erva-mate, sendo a segunda a fonte para preparos de bebidas populares em países da América Latina, o ‘chimarrão’ e o ‘tererê’, que são, em sua essência, infusões produzidas a partir das folhas e talos dessa planta e se diferenciam na forma de preparo, enquanto a primeira se trata de um preparo quente, a segunda é caracteristicamente um preparo frio. A árvore de erva-mate é uma angiosperma natural das regiões de clima subtropical na América do Sul que pode ser descrita com alturas de até 25 metros, e copa com intensa quantidade de folhas de coloração esverdeada, além de frutos arroxeados, com sementes, e flores (figura 01) (LANDAU, SILVA e TORRES, 2020). A Taxonomia dessa planta segue a seguinte classificação: classe das dicotiledôneas, família *Aquifoliaceae*, gênero *Ilex* e espécie *paraguariensis* e recebeu o nome científico de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., em homenagem ao seu primeiro descritor, August de Saint Hillaire, no século XIX, mais especificamente no ano de 1822 (SAINT-HILARE, 1822; LINHARES, 1969; GERHARDT, 2013).

Figura 01. Árvore da erva-mate (*Ilex paraguariensis*).



Fonte: Adaptado de Manual ERVA20 (EMBRAPA, 2020).

Sua distribuição natural se dá entre a Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil, sendo que no território brasileiro há predominância desses cultivos nas regiões sul e centro-oeste, em estados como o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro, e em 2016 os ervais já ocupavam cerca de 3% de todo o território Sul-Americano, aproximadamente 540.000 Km² (GAWRON- GZELLA *et al.*, 2021; GOULART *et al.*, 2022). Ao se atentar para a produção brasileira nota-se que dois estados tomam a frente desse setor no país, sendo eles o Rio Grande do Sul e o Paraná, seguidos de Santa Catarina e do Mato Grosso do Sul, sendo que o último ainda apresenta baixa representatividade em comparação a sua própria área produtiva, bem como a de outros estados (LANDAU, SILVA e TORRES, 2020).

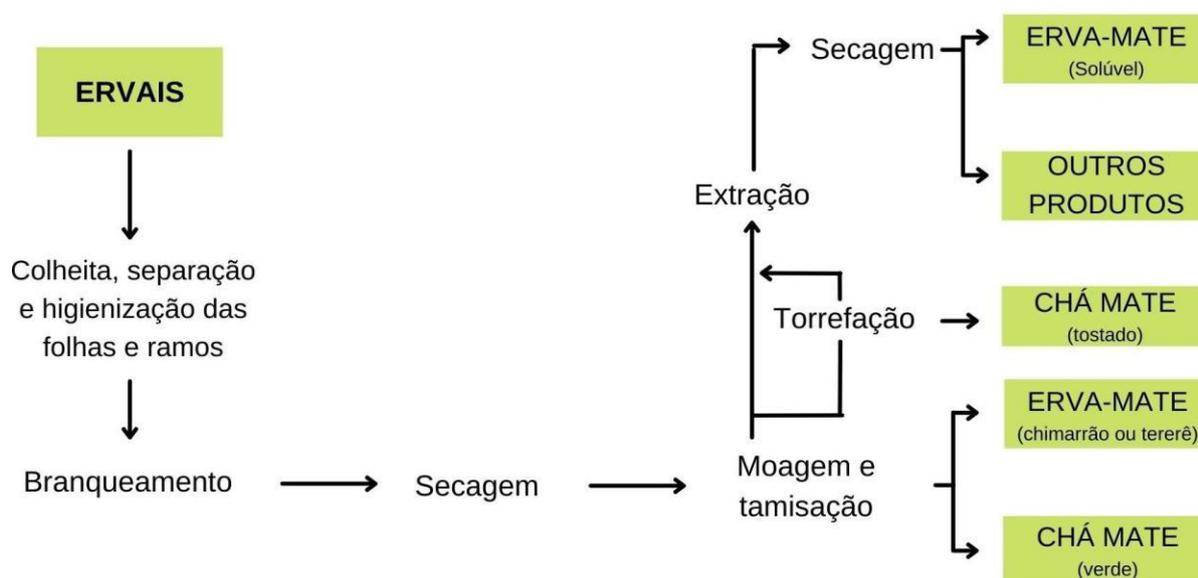
Sob a perspectiva econômica, o mercado ervateiro mundial produz cerca de 1.4 milhões de toneladas da erva por ano, dos quais cerca de 80% se mantêm em comércio interno, enquanto o restante é destinado a exportação (LANDAU, SILVA e TORRES, 2020; GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021). Esse setor agroflorestal orquestrou desenvolvimento de cidades na região sul do Brasil ao participar de um ciclo econômico relevante para o país e efetivamente ajudou a reestabelecer a economia paranaense, a partir do século XVIII, e a economia riograndense na mesma época, promovendo a industrialização e urbanização (RESENDE, 2017; OLIVEIRA E WAQUIL, 2015). Nos dias atuais, o setor segue contribuindo para a economia nacional a partir de cooperativas de produtores menores e, segundo os dados de Extração Vegetal e Silvicultura, disponibilizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2020 o estado de Paraná foi responsável pelo maior volume produtivo do país, atingindo mais de 372 mil toneladas de erva-mate colhida e gerando um rendimento de mais de meio milhão de reais, seguido dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com produções acima de 25 mil toneladas.

O produto mais produzido a base de *I. paraguariensis* é a erva-mate que, legalmente, deve ser constituída apenas de folhas e talos da árvore, segundo a regulamentação prescrita pela Resolução RDC nº 277, de 25 de setembro de 2005 e pela portaria nº 303, de 07 de novembro de 2002 da Secretaria de Vigilância Sanitária. Além disso, a erva-mate pode ou não conter adição de açúcares, devendo ser identificado no rótulo do produto como “Erva-Mate com Açúcar” (BRASIL, 2002; BRASIL, 2005). A classificação dessas mercadorias é dada pelas características de cultivo e granulometria, dessa forma, a erva-mate pode ser categorizada como moída grossa ou fina; com ou sem adição de açúcares e; proveniente de cultivo orgânico ou convencional. Além disso, através dos meios de comercialização é possível se encontrar produtos compostos, que resultantes da união entre a *I. paraguariensis* e outras ervas, como por exemplo a camomila, funcho, erva doce, cidreira e entre outros e, nesses casos, os produtos são chamados de “erva-mate composta”.

As etapas para produção dessas mercadorias foram esquematizadas na figura 02 e se iniciam nos ervais, onde as árvores são cultivadas, as folhas e talos

são colhidos e em seguida, envolvem-se etapas de separação das partes da planta, limpeza, branqueamento (ou sapeco), secagem e moagem. Além de uma fase de estacionamento, que reserva a erva durante um período de até dois meses para aguçar característica de sabor e odor do produto (GERHARDT, 2013; BASTOS, 2007). Essas práticas influenciam diretamente na qualidade dos produtos gerados, que podem ser a erva-mate para chimarrão ou tererê e o chá mate, bem como podem definir as características de procura dos consumidores, como a granulometria da erva (DONADUZZI, 2000). Uma particularidade quanto a proporção dos constituintes para produção da erva-mate é que, no mercado interno brasileiro, são aceitos até 30% de talos e 70% de folhas ou 40% de talos e 60% de folhas. Essas formulações podem ser classificadas, respectivamente, como Produção Nacional 1 (PN1) e Produção Nacional 2 (PN2), já para a exportação é convencional que se comercializem produtos elaborados apenas com as folhas da planta (BRASIL, 2002). É fato que todas essas medidas auxiliam na estruturação de um mercado ervateiro mais tradicional, voltado ao consumo de bebidas, contudo, a migração para outras áreas, como a alimentícia, farmacêutica e cosmética é um movimento existente e relevante e prova disso é o crescimento no desenvolvimento de publicação de patentes a base de *I. paraguariensis* (BASTOS *et al.*, 2007; LANDAU, SILVA e TORRES, 2020, GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021; GERBER *et al.*, 2022).

Figura 02. Etapas para geração de produtos à base de erva-mate.



Para além dos termos técnicos, um ponto de reflexão é origem do hábito de consumir a erva-mate, que remete a hábitos indígenas ancestrais que, no século XVI, foram valorados pelos jesuítas devido entendimento de que essa prática é benéfica e complementa a alimentação, desde então o consumo foi enraizado em parte da cultura sul-americana e são consumidos até 10 Kg de erva-mate per capita por ano (LIMA, 2010; OLIVEIRA E WAQUIL, 2015; GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021). Os consumidores mais assíduos dessa erva são os brasileiros, argentinos, paraguaios e uruguaios e ela é consumida na forma de bebidas, servidas com utensílios denominados “cuia” e “bomba”, o primeiro acomoda a erva para receber a água (quente ou fria), e o segundo é utilizado para fazer a sucção da infusão, facilitando a ingestão (GERHARDT, 2013). Os avanços científicos puderam corroborar com a perpetuação desse hábito, revelando o grande potencial nutricional deste, bem como os benefícios a saúde, relacionados a consumo de *I. paraguariensis*. Segundo a revisão de BASTOS *et al.* (2007) a erva-mate pode ser indicada para tratamento de sintomas como: fadiga e retenção de líquidos, além de auxiliar na reversão de quadros de hipertensão, obesidade, diabetes, artrite e enxaqueca, e ser associada a efeitos anti carcinogênico e anti-inflamatório, causando proteção contra doenças crônicas.

A constituição dessa planta se dá, segundo GAWRON-GZELLA *et al.*, (2021), como sendo de 80% carboidratos, 4% de proteínas e menos de 1% de lipídios (ácido linoleico e ácido α -linolênico), além de minerais como Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Ferro (Fe), Alumínio (Al) e, Zinco (Zn), as vitaminas A, B1, B2, B6, C e E, e os metabólitos secundários. A *I. paraguariensis* por si só é repleta em moléculas bioativas e promove extratos igualmente valiosos, ricos em substâncias como os alcaloides, terpenos, saponinas e compostos fenólicos (BASTOS *et al.*, 2007; MEINHART *et al.*, 2010; GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021). Obter esse conhecimento sobre a composição dessa planta, bem como estudos específicos de mecanismo de atuação são importantes para a descoberta das vias metabólicas que possivelmente geram esses efeitos, como por exemplo a estimulação de enzimas chamadas de lipases, responsáveis pela quebra de lipídios, que auxiliam no efeito antiobesidade quando se ingere erva-mate (JAKOBEK, 2015). O que corrobora com a discussão de LUTOMSKI *et al.*, 2020, que descreve a redução de peso

e da circunferência da cintura de ratos que consumiram erva-mate por 12 semanas e que sugere o consumo da erva para o tratamento de obesidade, por reduzir a presença de tecido adiposo e a resistência a insulina.

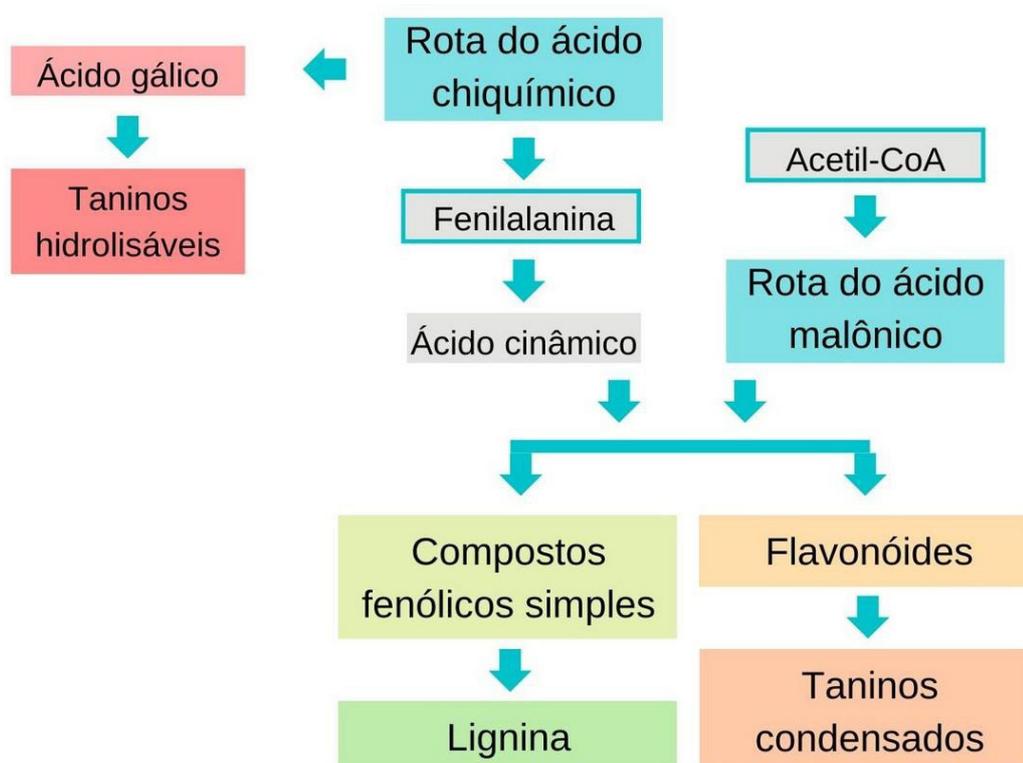
Em outros trabalhos, TAMURA (2013) relatou a capacidade preventiva de extratos de erva-mate sobre lesões hepáticas induzidas por etanol e, KRAKOWSKA-SIEPRAWKA *et al.*, (2020) relatam que a erva-mate é uma ótima fonte de compostos bioativos, como os polifenóis e que o seu aproveitamento na formulação de alimentos pode ser uma prática vantajosa, afirmação que pode ser reforçada a partir do trabalho feito por SANTETTI *et al.*, (2021), que ao incorporar folhas de erva-mate na formulação de pães obteve um aumento de até 1382% no teor de fenólicos, fortalecendo sua capacidade antioxidante e potencializando nutricionalmente o pão. Os compostos fenólicos são bastante estudados e já foram feitas relações com a sua presença nos extratos de erva-mate, sendo que o efeito mais recorrente na literatura é a sua atividade antioxidante (RICCIO, 2019; SOARES, 2002; ARAÚJO *et al.*, 2021; GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021). O que vai ao encontro do fato de que os compostos fenólicos possuem função sequestradora de radicais livres e agem fundamentalmente no balanceamento oxidativo, um processo crucial para integridade celular e, de forma escalonada, os tecidos e órgãos, conferindo homeostase ao organismo (BARBOSA *et al.*, 2010; SOARES, 2002).

3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são resultantes do metabolismo secundário das plantas e algumas espécies de fungos e formam a maior família de metabólitos secundários estudados, contando com mais de 8 mil moléculas identificadas, sendo que boa parte delas são sintetizadas a partir de aminoácidos aromáticos, que são utilizados na síntese proteica, mas também para a síntese de compostos fenólicos (WANG *et al.*, 2020). O principal aminoácido envolvido nessa síntese é a fenilalanina e por isso pode-se dizer que os compostos fenólicos são fenilpropanóides, esse aminoácido integra a via do ácido chiquímico, conforme

ilustrado na figura 03, na qual ingressa a partir de transformações estruturais (perda do grupamento nitrogenado) causadas pela enzima fenilalanina amoníase (PAL, do inglês '*phenylalanine ammonia lyase*') gerando o cinamato, que passa por derivatizações que culminam na formação de outras estruturas fenólicas, como por exemplo os ácidos fenólicos. Todo esse processo de biossíntese ocorre no citosol da célula, as margens do retículo endoplasmático (TSAO 2010; SHAHIDI e YEO 2016).

Figura 03. Possíveis vias de biossíntese dos compostos fenólicos em vegetais.

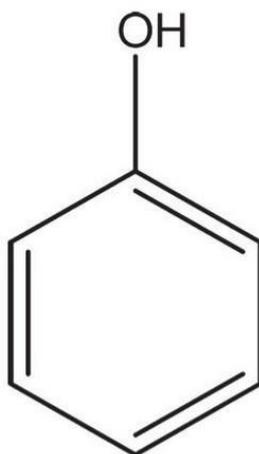


Fonte: adaptado de TAIZ e ZEIGER, 2013.

ANKU, MAMO e GOVENDER (2017) descrevem que a característica que unifica os compostos fenólicos em uma grande família é a presença de, pelo menos, um grupamento fenol, que se constitui de um anel aromático ligado covalentemente a uma ou mais hidroxilas (OH), conforme ilustrado na figura 04,

logo, estruturalmente, os compostos fenólicos são entendidos como um grupo de moléculas heterogêneas, que compartilham essa semelhança estrutural. Entretanto, essa característica em comum, por si só, é pouco específica quando se consideram a diversidade de moléculas que constituem essa família de compostos, por isso setorizações foram criadas considerando outras particularidades, como a cadeia carbônica, o grau de polimerização e os padrões estruturais em que essa polimerização resulta (ARAÚJO *et al.*, 2021; TAIZ e ZEIGER, 2013).

Figura 04. Grupamento fenol.



Fonte: ANKU, MAMO e GOVENDER (2017)

Ao retratar a família de compostos fenólicos diversos subgrupos são relatados na literatura científica e alguns deles foram compilados na figura 05. Dentre esses subgrupos existentes dois que se destacam, os ácidos fenólicos e os flavonoides, os ácidos fenólicos são estruturalmente simples, e podem possuir um anel aromático associado a uma pequena cadeia carbônica com um grupamento carboxílico terminal, como os ácidos hidroxicinâmicos, como por exemplo, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido cinâmico e ácido cafeico, conforme ilustrado na figura 06 A. Ou o anel aromático ligado apenas ao grupamento

carboxílico, como os ácidos hidroxibenzoicos, que podem ser representados pelos ácidos vanílico, 4- hidroxibenzoico, protocatecuico e gálico, conforme ilustrado na figura 06 B (KHODDAMI, WILKES e ROBERTS, 2013; CLIFFORD, 1999). Os ácidos fenólicos podem se manter como moléculas de estrutura não polimerizada (fenóis simples), embora seja comum que se mantenham no meio intracelular interagindo com outras biomoléculas, como os açúcares, formando glicosídeos ou se polimerizarem, o que resulta nos chamados polifenóis, como os ácidos clorogênicos que são gerados a partir da esterificação de ácido quínico com um ácido hidroxicinâmico, conforme ilustrado na figura 06 C (CLIFFORD, 1999).

Figura 05. Classes de compostos fenólicos.

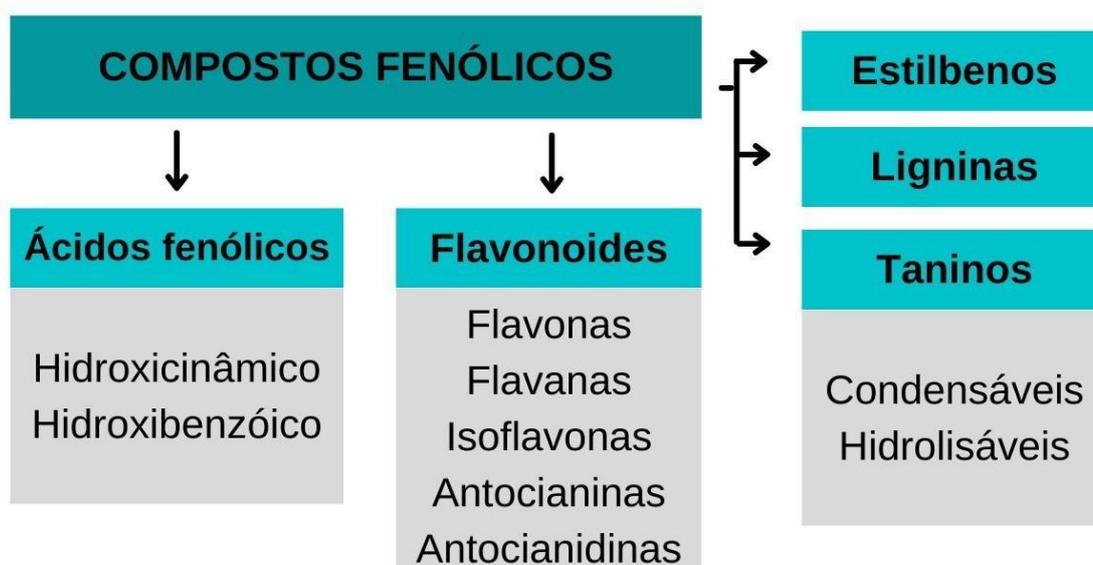
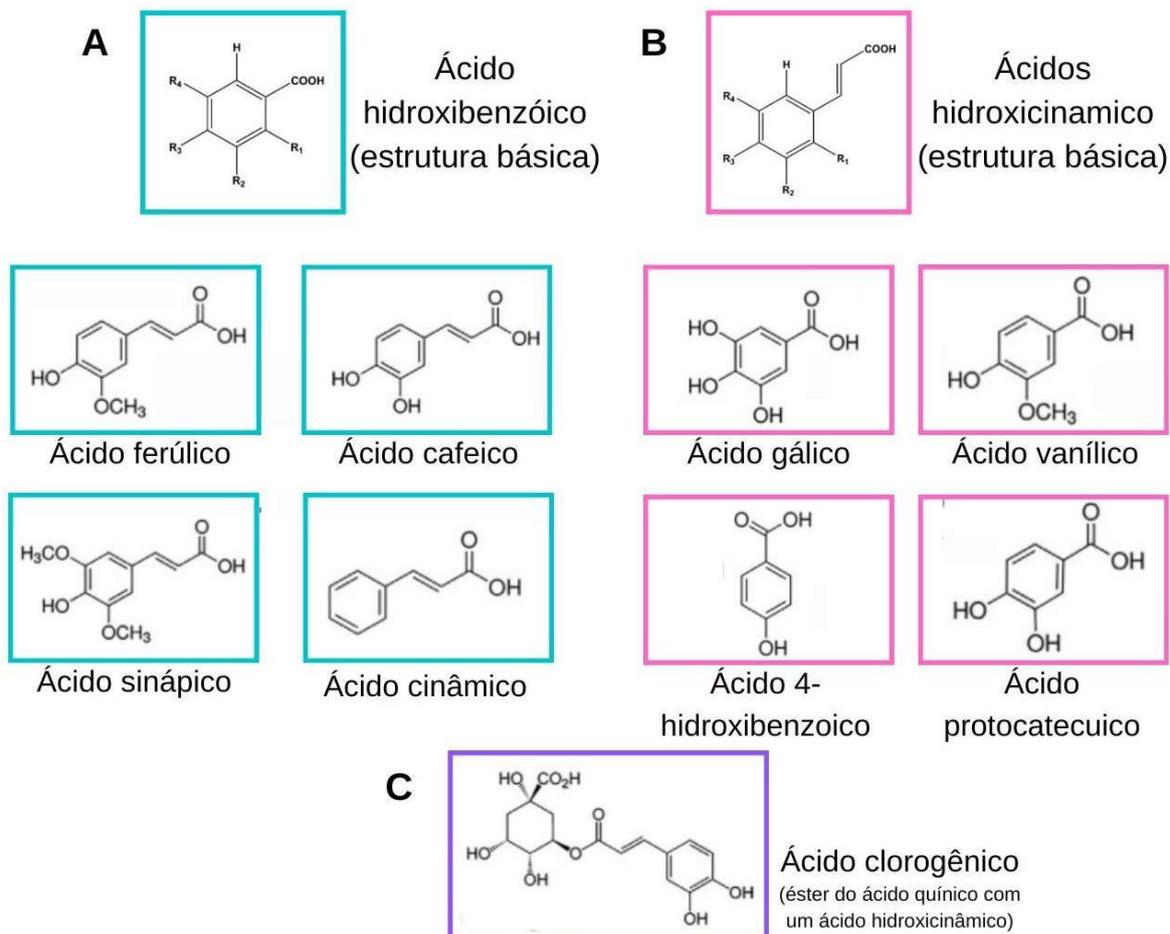


Figura 06. Ácidos fólicos

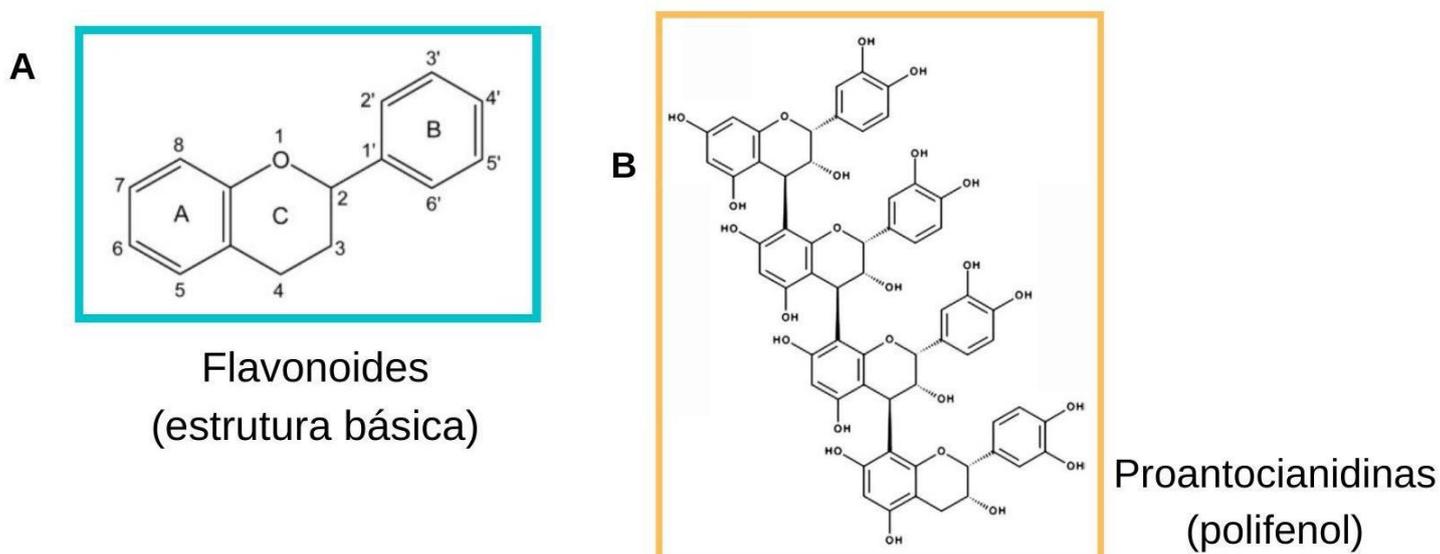


GARAMBONE e ROSA (2007) revisaram as relações entre os ácidos fenólicos e benefícios a saúde e citam que polímeros de compostos fenólicos promovem a redução dos níveis de colesterol na corrente sanguínea em estudos com modelos *in vivo*, além de ensaios *in vitro* que demonstram atividade antioxidante de extratos ricos em ácidos clorogênicos. A revisão de ARAÚJO *et al.*, (2021) cita diversas funções biológicas dos ácidos fenólicos, dentre elas: antidepressiva, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, neuro protetiva, anti-hiperglicêmica e anticâncer, bem como relata a melhora no desempenho cardiovascular, hepático e metabólico em modelos biológicos (ratos *Wistar*) que

ingeriram regularmente doses de 100 mg Kg⁻¹ ao dia de ácido clorogênico (BHRANDARKARET *et al.*, 2019).

Os flavonoides possuem estrutura polifenólica composta por dois anéis benzênicos (A e B), que se interligam a um anel de tetraidropirano, conforme ilustrado na figura 07 A, esse esqueleto básico pode sofrer algumas alterações de forma a gerar outros padrões estruturais, por isso também são subdivididos entre: flavonóis, flavanóis, flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas e antocianidinas. Um exemplo prático das alterações estruturais pode ser notado com as isoflavonas que, diferente dos outros grupos de flavonóides, apresentam uma divergência na ligação entre o anel benzênico B e o tetraidropirano, que ocorre no carbono 3 e não no carbono 2, como comumente. Cabe ressaltar que a forma livre dos flavonóides, assim como a dos ácidos fenólicos, não é única possibilidade de encontrá-los nos vegetais, sendo comum sua existência de forma associada a outras moléculas como os açucars, proteínas e outros fenólicos, sendo que ao se polimerizarem podem ser chamados de polifenóis, como os proantocianidinas, representadas na figura 07 B. (TAIZ E ZEIGER, 2013; ARNOSO *et al.*, 2019; ARAÚJO *et al.*, 2021).

Figura 07. Estrutura básica de flavonoides e polifenóis baseados em flavonoides (proantocianidinas).



De forma semelhante as estruturas, as atividades desempenhadas pelos flavonoides são variadas, as isoflavonas, por exemplo, se assemelham ao estrogênio e são chamadas de fitoestrógeno por terem a capacidade de interagir com os receptores desse hormônio. Já os flavanóis, como catequina e epicatequina, contribuem para as características organolépticas das plantas, conferindo sabores mais amargos e sensação de adstringências a bebidas fermentadas, como vinhos. A função de pigmentação é bastante característica das antocianinas, que podem apresentar cores avermelhadas, azuladas ou arroxeadas, a depender do pH (ARNOSO *et al.*, 2019). Dentre os flavonoides mais conhecidos estão: quercetina, kaempferol, catequinas e luteolina que, de modo geral, desempenham papel no sistema de defesa contra patógenos e danos ao material genético, ocasionados pela radiação ultravioleta (UV) e pigmentam os tecidos vegetais de forma a atrair polinizadores, que efetuam a dispersão de sementes, auxiliando na capacidade de conquista territorial e perpetuação das espécies de comportamento sésil, como os vegetais (TAIZ E ZEIGER, 2013; LEICACH e CHLUDIL 2014). Os polifenóis com maior grau de polimerização apresentam maior peso molecular, como as proantocianidinas, taninos e as ligninas. As ligninas estabelecem interações com os filamentos de celulose e hemicelulose das paredes celulares, formando o complexo de lignocelulose que é descrito por conferir rigidez aos tecidos vegetais, contribuindo para a sua estruturação e dificultando o acesso de patógenos, o que aumenta as defesas da planta (KABIR e HAMEED, 2017).

A disposição dos compostos fenólicos dentro das células vegetais necessita de certos aparatos celulares, como por exemplo os sistemas de transporte por vesículas ou por membranas. No primeiro caso as vesículas citoplasmáticas (de composição lipídica) englobam os fenólicos liberados no citosol, permitindo seu transporte no meio intracelular e nesse sistema pode ocorrer a associação das vesículas com a camada lipídica das membranas, facilitando as interações do fenólicos com a mesma. No sistema de transporte por membranas, os transportadores proteicos permitem a passagem dos fenólicos do citosol para o interior do vacúolo, uma organela conhecida por permitir o armazenamento de ácidos fenólicos, e os transportadores ABC (do inglês *ATP binding cassette*) e MATE

(do inglês *multidrug and toxic compound extrusion*) desempenham bem essa função (SHAHIDI e YEO, 2016).

As interações das quais os fenólicos podem fazer parte também são outro aspecto relevante quanto essa classe de biomoléculas, pois servem como pretexto para classificá-los com base na sua solubilidade e capacidade de extração, assim como ajudam a explicar como os efeitos dos fenólicos se manifestam nos sistemas biológicos. JAKOBEK (2015) descreve a interação dos compostos fenólicos com as seguintes macromoléculas: proteínas, carboidratos e lipídios e aponta que é com base nestas interações que os fenólicos são transportados através do trato gastrointestinal (TGI) de forma mais estável o que modula a sua absorção, principalmente no intestino delgado. Na prática, as associações entre os fenólicos e outras macromoléculas depende da possibilidade de interações hidrofóbicas e hidrofílicas, que se concretizam a partir do encapsulamento, de ligações covalente (carbono-carbono, éster e éter) e não covalentes (ligação de hidrogênio). Um exemplo disso é a relação estabelecida com os lipídios, na qual essas moléculas podem ser incorporadas por capsulas lipídicas, na qual o fenólico se associa a interface lipídica, compondo a capsula. Ou a partir da parte hidrofílica da fosfatidilcolina, aonde o fenólico tem função permeante. Nesse caso, se criam complexos fenólicos ao redor da estrutura lipídica, o que aumenta o tamanho da capsula e reduz a área superficial de contato. Essas características dificultam a ação das enzimas lipase e, dessa forma, geram um efeito de menor absorção de gorduras, uma vez que a despolimerização lipídica e a sua absorção são reduzidas (JAKOBEK, 2015).

ARAVIND *et al.*, (2021) revisam efeitos dos polifenóis sobre parte do trato gastrointestinal (TGI) concluindo que esses compostos atuam como moduladores do perfil microbiológico intestinal (ação prebiótica) e estabilizam os probióticos, inibindo a proliferação de patógenos, o que resulta em menor incidência de quadros inflamatórios. O que, de forma direta e indireta, minimiza a incidência de doenças crônicas como o câncer, diabetes e doenças cardiovasculares. ARNOSO *et al.*, 2019 discute que a capacidade anti-inflamatória dos fenóis é bastante relevante e um dos mecanismos pelo qual ela pode se manifestar é através da inibição de fatores pró-inflamatórios, como a enzima ciclooxigenase 2

(COX-2), na presença dos estilbenos. Em outro trabalho relata-se que extratos de erva-mate possuem efetividade na inibição das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, necessitando de concentração mínima para inibição de 50 µg/L, efeito associado a alta concentração de rutina e ácido clorogênico nos extratos (KRAKOWSKA-SIEPRAWKA *et al.*, 2020). De modo geral, os fenóis possuem muitas funções biológicas, agregando características de cor, sabor, textura e odor as plantas e efeitos já relatados a saúde humana e animal, o que despertou a o interesse dos pesquisadores em utilizá-los como objeto de estudo para a compreensão dos mecanismos bioquímicos de suas propriedades, avaliando sua aplicação comercial como suplemento alimentar, ativo em cosméticos e fármacos, produção de biofilmes, pigmentos naturais e entre outros. Além disso, mais de 60 mil patentes relacionadas a polifenóis, ácidos fenóis e derivados, foram registradas internacionalmente o que concretiza o potencial tecnológico dessas moléculas (ARAÚJO *et al.*, 2021; LEICACH e CHIUDIL, 2014).

3.3 SISTEMA DE CULTIVO

A disponibilidade de recursos para o desenvolvimento de uma planta é um tema pertinente quando se aborda a produtividade de um sistema de cultivo e assim como todas as plantas e organismos, os ervais se desenvolvem plenamente sob condições ambientais adequadas. Nesse sentido, é possível elencar fatores como: clima, altitude, precipitação e temperatura como importantes para a garantia de um sistema adequado e produtivo. LANDAU, SILVA e TORRES, 2020 compila essas condições ideais como sendo: altitude entre 400 e 1.800 metros (m); precipitação anual entre 1.100 e 2.300 milímetros (mm); clima temperado ou subtropical e; temperatura entre 12 e 24°C. Os autores ainda descrevem que essa árvore apresentar melhor desenvolvimento em solos com teores apreciáveis de Ferro (Fe), Fósforo (P), Nitrogênio (N) e Potássio (K). Cabe ressaltar que a árvore de erva-mate pode ser considerada bastante tolerante e suporta condições de baixa temperatura (até -12°C), solos ácidos (pH em torno de 5) e teores elevados de

Alumínio (Al), sendo que esse último já foi comprovadamente benéfico ao crescimento da erva-mate, sendo comum declarar que essa espécie arbórea se desenvolve em solos com fertilidade baixa (BENETTI, 2012; LANDAU, SILVA e TORRES, 2020).

No Brasil, o cultivo de *Ilex paraguariensis* foi recentemente fomentado pela lei N° 13.971 de 3 de janeiro de 2019, responsável por instituir a Política Nacional da Erva-Mate, que visa elevar a qualidade e intensificar a comercialização do produto erva-mate por meio da pesquisa, desenvolvimento científico, crédito e assistência técnica ao produtor e entre outros recursos (BRASIL, 2019). Além disso, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) disponibilizou o documento intitulado como ERVA20, que conta com uma série de procedimentos capazes de aumentar a produtividade dos ervais da espécie *I. paraguariensis*, o que contribui com conhecimento tecno-científico para a expansão do cultivo no país. O estudo das características do cultivo, inevitavelmente, se relaciona com o sistema de cultivo adotado pelos produtores, seja ele orgânico ou convencional, e é possível encontrar o produto erva-mate oriundos dos dois sistemas produtivos. No Brasil, a Lei N° 10.831, de 23 de dezembro de 2003 rege o cultivo orgânico e descreve que a finalidade desse sistema de produção é a oferta de produtos saudáveis e livres de contaminantes intencionais, por meio do uso consciente de atividades antrópicas e preservação dos recursos naturais, o que se contrapõem aos princípios da produção convencional (BRASIL, 2003).

Um produto orgânico é aquele produzido sem a aplicação de pesticidas, aditivos e fertilizantes sintéticos, que não é oriundo de espécies modificadas geneticamente e segue os princípios da preservação ambiental. O cultivo orgânico visa a melhorar a ciclagem de nutrientes do solo através de estratégias naturais e ecológicas, fundamentadas em tecnologias sustentáveis, assim como é menos impactante para os produtores e consumidores, que não se expõem a produtos químicos tóxicos ou de toxidez ainda desconhecida (YU *et al.*, 2018). Por isso, os produtos orgânicos são vistos como mais seguros e sustentáveis, uma prerrogativa que conquista o consumidor, sendo que os dados quanto ao avanço desse nicho produtivo tornam isso claro (RAHMAN *et al.*, 2021). Uma característica importante dos produtos orgânicos no Brasil é a presença do selo de produto orgânico, ilustrados na figura

08, uma marca que valida a sua procedência e o diferencia dos produtos convencionais, pois só são obtidos a partir de certificação junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2003).

Figura 08. Selos de certificação orgânica no Brasil.



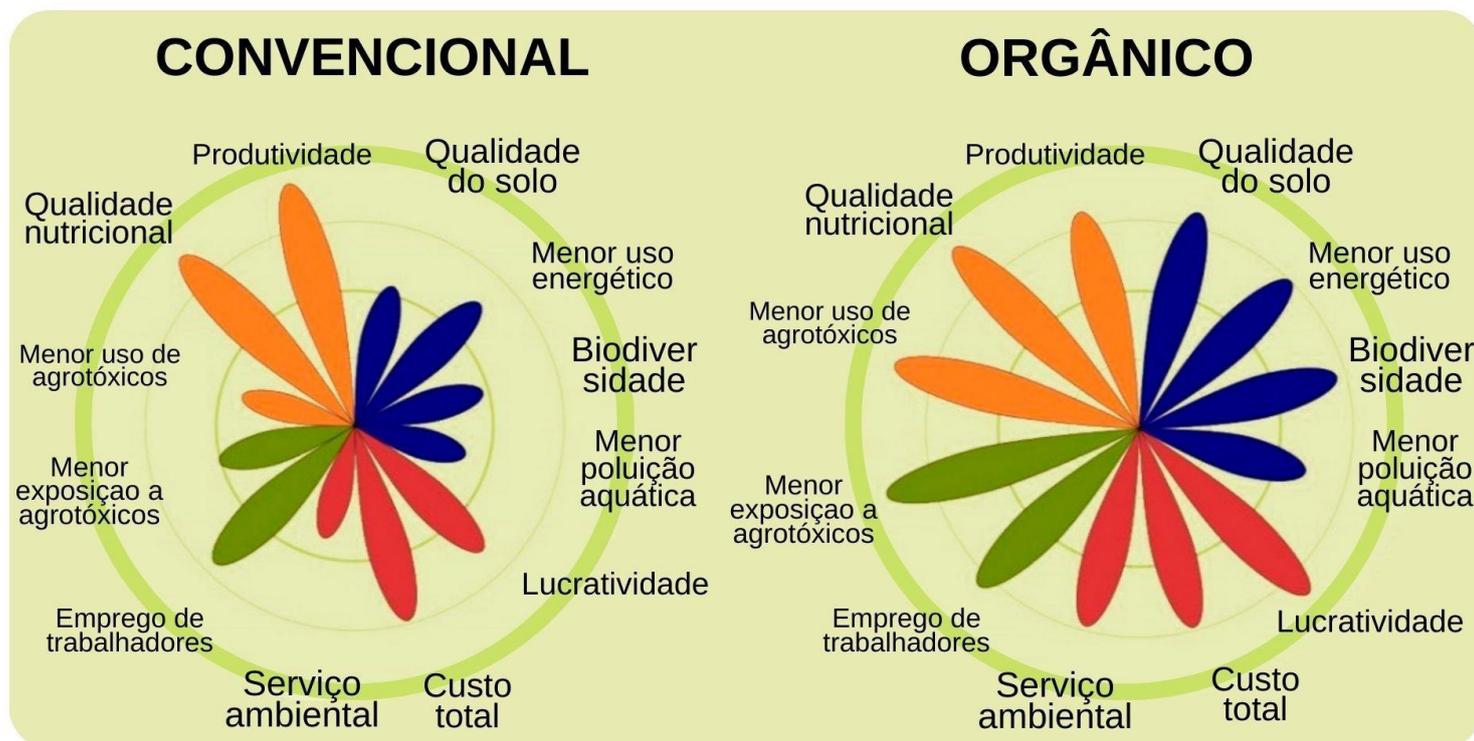
Fonte: Adaptado de < <https://www.organicsnet.com.br/saiba-o-que-e-analisado-para-certificar-uma-producao-organica/> > acesso em: 02 de julho de 2022.

O mercado orgânico mundial está em expansão e este cenário é ambientalmente favorável, mas também é fato que há algumas características mercadológicas menos vantajosas do manejo orgânico, como por exemplo o maior custo aos produtores, devido aos procedimentos de certificação e as alternativas necessárias para a manutenção dos cultivos, o que faz com que os produtos tenham precificação maior e, em alguns casos, tempo de vida útil reduzido (ESTEVES *et al.*, 2020). Entretanto, esses fatores não parecem frear o crescimento do mercado orgânico, que se expandiu de 15 milhões de hectares (ha), nos anos 2000, para 72,3 milhões de ha em 2019 e atualmente conta com 2 milhões de produtores registrados no mundo e movimenta cerca de 48 bilhões de euros, só

na América do Norte (FiBL & IFOAM, 2021; RAHMAN *et al.*, 2021; ESTEVES *et al.*, 2021). Em território nacional esses avanços são acompanhados desde a década de 1980 e, em 2017, o Brasil já contava com mais de 15 mil unidades de produção orgânica registradas e quase dois milhões de hectares de área destinada a esses cultivos (EMBRAPA, 2018). Além disso, políticas públicas fomentam o mercado, como a Lei paulistana nº 16.140, de 17 março de 2015, que promovem o incentivo do consumo de orgânicos através da obrigatoriedade a inclusão de alimentos orgânicos na alimentação escolar no sistema municipal de ensino, contribuindo para o avanço do setor.

Discussões sobre os aspectos de cada cultivo são relevantes e promovem o conhecimento acerca da segurança, impacto ambiental, produtividade e a qualidade nutricional dos produtos, o que está diretamente associado com a composição de minerais e metabólitos primários e secundário. YU *et al.*, 2018 compila informações sobre o sistema de cultivo orgânico e é categórico ao afirmar que essa modalidade produtiva é capaz de gerar produtos de maior segurança e qualidade, isso por que contam com menores teores de metais pesados, ausência de resíduos de agrotóxicos e maiores concentrações de bioativos causadores de efeitos benéficos a saúde humana e animal (como as vitaminas e compostos fenólicos). RAHMAN *et al.*, 2021 colabora com a discussão ao comparar frutas, vegetais e cereais orgânicos e convencionais e descrever que, enquanto sistema de cultivo convencional apresenta maior produtividade o sistema de cultivo orgânico se caracteriza por maior qualidade do solo, maior biodiversidade, minimização do uso energético, poluição aquática e resíduos de agrotóxicos, assim como menor exposição do produtor a pesticidas e maior qualidade nutricional, informações expostas na figura 09.

Figura 09. Comparação entre o cultivo orgânico e convencional.



Fonte: adaptado de RAHMAN *et al.*, 2021.

Tais diferenças entre os sistemas de cultivo são abordadas na literatura científica e diversos trabalhos abordam a prevalência nutritiva dos alimentos orgânicos, não só relacionados com os teores de micro e macronutrientes, mas também em relação aos metabólitos secundários (RAHMAN *et al.*, 2021; YU *et al.*, 2018; CARTEA *et al.*, 2011; POPA *et al.*, 2019). Nesse sentido, FALLER e FIALHO (2010) analisaram o teor de fenóis solúveis (extraídos com metanol 50%) e hidrolisáveis (extraídos com metanol 50% acidificado) em amostras de frutas e vegetais e relata que os alimentos orgânicos tendem a possuir maior teor de fenóis e atividade antioxidante proporcional. PONDER e HALLMANN (2019) avaliaram a fração solúvel dos fenólicos e relataram o mesmo comportamento em amostras de framboesas cultivadas em sistema orgânico quando comparada com as cultivadas em sistema convencional e demonstram que os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas foram maiores em amostras orgânicas (93,53; 11,00 e 82,53 g 100 g⁻¹, respectivamente) em comparação a convencional (82,65; 8,82 e 73,83 g 100 g⁻¹, respectivamente). Em amostras de erva-cidreira e alecrim,

os resultados foram semelhantes, e os teores de ácidos fenólicos totais, e dos ácidos clorogênico, sinápico e ferúlico foram maiores em amostras orgânicas estudadas por KAZIMIERCZAK *et al.*, 2014, bem como o flavonoide rutina foi mais concentrado nas amostras orgânicas de erva de trigo sarraceno estudadas por ZIVIKAS *et al.*, 2017.

Há grande complexidade nas vias metabólicas de um organismo, seja ele vegetal ou animal, e as condições ambientais são critérios importantes para guiar a síntese de metabólitos e abrir espaço para a teorização do comportamento metabólico (ZIVIKAS *et al.*, 2017). Nesse sentido, algumas explicações são hipotetizadas quanto aos padrões discutidos anteriormente, no qual há prevalência de compostos fenólicos em amostras orgânica, podendo ser estabelecidas em decorrência da presença de patógenos ou condições abióticas desfavoráveis, que levam a intensificação da síntese de compostos fenólicos, com o intuito de incrementar as defesas da planta, como por exemplo, enrijecendo as paredes celulares para a formação de barreiras físicas (ACOSTA-ESTRADA *et al.*, 2014; RIGUEIRA *et al.*, 2016; ASAMI *et al.*, 2013; TAROZZI *et al.*, 2006). Outras abordagens interessantes são a hipótese de balanço entre o carbono (C) e o nitrogênio (N) e a teoria do equilíbrio entre o crescimento e diferenciação, no primeiro caso é prevista relação entre níveis de N disponíveis no solo e a síntese de compostos carbonados, de modo que, quanto maior a disponibilidade de N, mais recursos a planta terá para a biossíntese de metabólitos nitrogenados, incluindo aminoácidos, proteínas e alcaloides, em detrimento dos metabólitos carbonados, que incluem os compostos fenólicos. Essa hipótese também descreve que quando os níveis de N forem limitados, o metabolismo vegetal é direcionado a diferenciação das moléculas (metabolismo secundário), reduzindo a capacidade de crescimento e aumentando a síntese de metabólitos secundários (WU *et al.*, 2020). A teoria do equilíbrio entre o crescimento e diferenciação descreve que o crescimento é privilegiado nas plantas, exceto em situações nas quais as condições ambientais (disponibilidade de nutrientes e água, não só os níveis de N) forem limitantes de forma que seu crescimento seja prejudicado mas, não o suficiente para frear a fotossíntese e, nesse momento a diferenciação das moléculas é intensificada, levando a síntese de metabólitos de defesa, incluindo os compostos fenólicos (HANLEY *et al.*, 2017).

Em vista da ausência de fertilização sintética no sistema de cultivo orgânico, prática que eleva os níveis de N no solo, e considerando este nutriente como limitante na síntese de fenólicos, assim como explicado na teoria de balanço entre C:N, pode-se esperar que os produtos orgânicos apresentem maiores teores de compostos fenólicos (produtos da diferenciação/metabólitos carbonados). Ainda, RAHMAN *et al.*, 2021 descreve que a maior concentração de compostos fenólicos pode ter relação com outras condições ambientais e, nesse sentido, a biossíntese de compostos fenólico pode ser impulsionada por fatores estressores do ambiente, o que se justifica, por exemplo, com o fato de que esse sistema de cultivo (sem aplicação de agrotóxicos) cria um ambiente menos hostil para a proliferação de micro-organismos e presença de predadores. Esses fatores bióticos permitem a criação de situações estressoras como ataque de patógenos ou herbívoros, que ativam as vias de biossíntese de compostos fenólicos e, dessa forma, intensificam as defesas antioxidantes para lidar com o estresse. Em complemento, HECK *et al.*, 2008 exemplifica também que as folhas de erva-mate cultivadas a pleno sol apresentaram maiores teores de compostos fenólicos quando comparadas às folhas oriundas de plantio consorciado (com sombra), o que indica que em casos de estresse por incidência de luz ocorre síntese de fenólicos para exercerem a proteção contra os raios UV (HATTAS *et al.*, 2011 e HANLEY *et al.*, 2007).

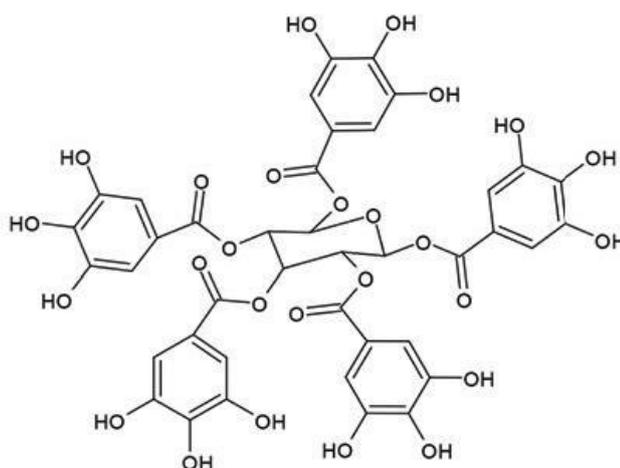
3.4 FRACIONAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

O acesso aos componentes de um alimento após a sua ingestão e passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) caracteriza a bioacessibilidade destes e, conseqüentemente, sua potencial biodisponibilidade (absorção e presença na circulação sistêmica) para que então sua bioatividade seja exercida. Esses conceitos são relevantes para elucidar algumas etapas que precedem a concretização dos efeitos esperados quando há ingestão de alimentos. Para os compostos fenólicos não é diferente, e a capacidade de extrai-los da matriz é crucial para compreender seus comportamentos e suas aplicações, nesse sentido, as discussões quanto a forma com que os compostos fenólicos são encontrados na

matriz é ponto chave, uma vez que é por meio destas que sua extratibilidade é afetada (CARTEA *et al.*, 2011; PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2014). Logo, a proposta de fracionamento de compostos fenólicos está fundamentada na diferenciação dessas moléculas, a partir das interações que estabelecem com integrantes celulares.

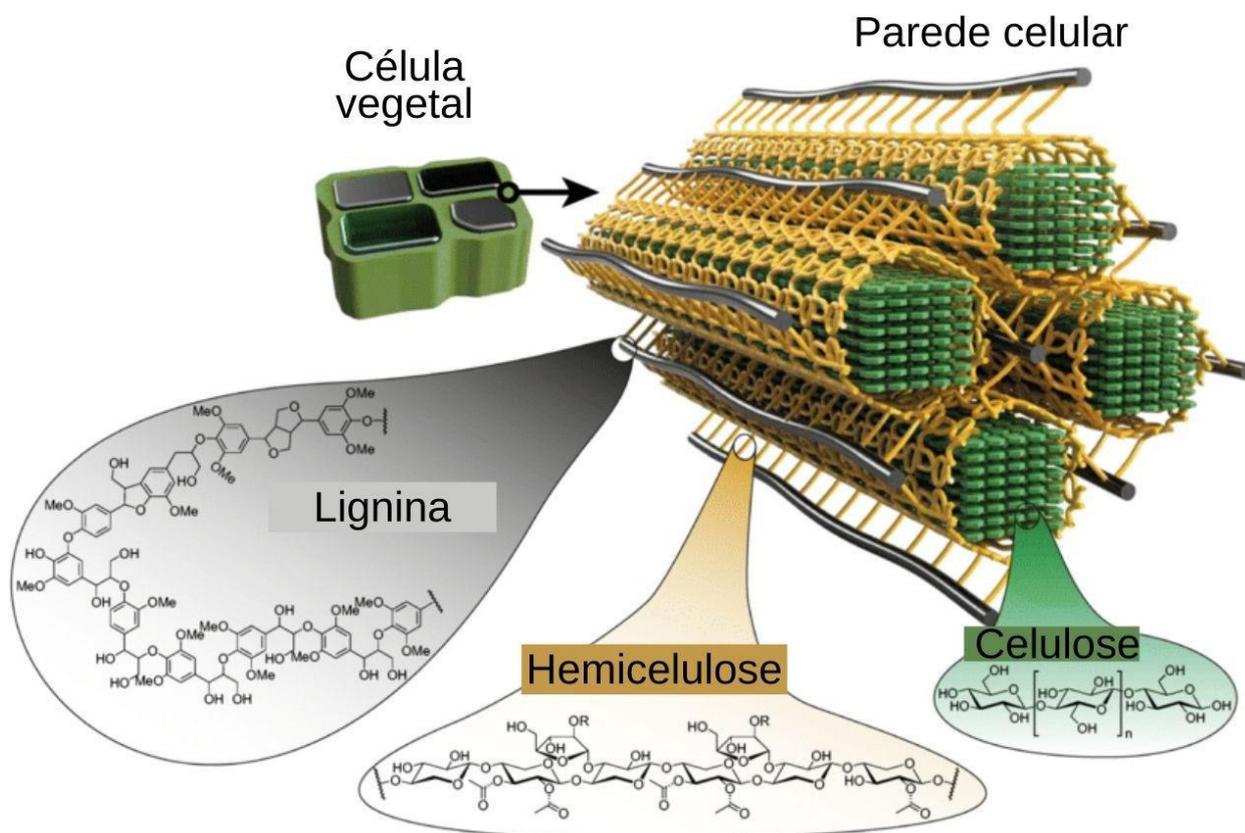
Com base nisso, algumas frações de compostos fenólicos podem ser estabelecidas, sendo elas: fenóis livres, fenóis conjugados e fenóis ligados. A primeira fração diz respeito a moléculas de maior simplicidade, com menor peso molecular, pouca interação intermolecular e, geralmente, armazenamento no vacúolo das células vegetais, como por exemplo, os ácidos fenólicos. Nos segundo e terceiro casos é notada maior complexidade estrutural, que pode ser advinda da polimerização (polifenóis) ou interações intermoleculares, como por exemplo, os taninos hidrolisáveis, que estão ilustrados na figura 10 e se caracterizam pela esterificação entre ácidos fenólicos e carboidratos e, representam bem os fenóis conjugados. Outro exemplo são as ligninas, representadas na figura 11 e que são definidas como estruturas polifenólicas de alta complexidade que constituem a parede celular das células vegetais, representando bem os fenóis ligados (ACOSTRA-ESTRADA *et al.*, 2014; SHAHIDI e YEO 2016; ARAVIND *et al.*, 2021).

Figura 10. Estrutura de tanino hidrolisável.



Fonte: adaptado de ALBUQUERQUE *et al.*, 2022.

Figura 11. Estrutura das paredes celulares.



Fonte: adaptado de BRETHAUER, SHAHAB e STUDER, 2019.

A extração dos compostos fenólicos livres se dá comumente com a aplicação de infusões simples (água) ou extrações com solventes orgânicos, como a estratégia de utilizar água aquecida para recuperar fenólicos de amostras de erva-mate (MEINHART *et al.*, 2010; DELADINO *et al.*, 2008). Nesses casos, apesar de cumprir a proposta a qual os autores se submeteram, não há aproveitamento otimizado das matrizes pois esse procedimento de extração não é capaz de extrair compostos fenólicos que participam de estruturas mais complexas, como os taninos, e apresentam maior resistência em serem extraídos. Em seus trabalhos corroboram com a discussão e descrevem que alguns compostos fenólicos conjugados podem ser recuperados pelos métodos tradicionais de extração, entretanto essa extração não é completa e parte dos fenólicos conjugados, assim como os fenólicos ligados, ficam retidos a matriz e, por conta desse comportamento as terminologias “solúvel” ou “extraível” e “insolúvel” ou “não extraível”, podem ser

usadas para exemplificar os comportamentos discutidos até então. Fato é que utilizar apenas das estratégias já conhecidas e mencionadas limita a capacidade de extração desses compostos, subestimando a sua concentração nas matrizes vegetais e, nesse cenário, não revelando o real potencial tecnológico que determinadas matrizes podem oferecer, uma vez que a aplicabilidade dos compostos fenólicos é objeto de estudo de diversos trabalhos, que direcionam esses compostos para diversos setores industriais como por exemplo: a) farmacêutico: aonde podem atuar como agentes terapêuticos para doenças (câncer, diabetes, doenças neurológicas); b) cosmético: aonde são requisitados como antioxidantes, antimicrobianos e por promoverem a proteção UV; c) têxtil: aonde são requisitados como corantes e também por sua capacidade de proteção UV; d) embalagens: aonde agem como ativos para embalagens inteligentes; e e) alimentos: aonde são utilizados como ingredientes funcionais, corantes naturais, estabilizantes (capacidade antioxidante e anti microbiológica) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021).

Cabe destacar também que mesmo os glicosídeos (fenólicos conjugados) estando solubilizados, esses complexos não atendem as prerrogativas de determinação segundo o método de Folin-Ciocalteu, que é o mais utilizado na determinação de compostos fenólicos totais, um vez que, devido as ligações estabelecidas não há um ânion com potencial redutor, por parte dos fenólicos. Que é o responsável por reduzir o reagente de folin a óxido de tungstênio ($W^{8}O^{23}$) e óxido de molibdênio ($Mo^{8}O^{23}$), gerando a cor necessária para a determinação espectrofotométrica (CICCO *et al.*, 2009; PIRES *et al.*, 2017). O que leva a subestimação dos teores de fenólicos presentes nos extratos e esclarece a necessidade de desconjugá-los mesmo após solubilizados, por isso, é importante adotar estratégias para promover melhor recuperação dessas moléculas das matrizes vegetais bem como a distinção dos compostos fenólicos livres dos conjugados nos extratos gerados, visando a valoração dos extratos (STALIKAS, 2007; PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2013, ANKU *et al.*, 2018).

Na prática, existem algumas estratégias para otimizar a extração dos compostos fenólicos, KRAKOWSKA-SIEPRAWKA *et al.*, (2020) discute que durante o procedimento de extração um ponto chave é a capacidade de

transferência de um analito da matriz para o solvente de extração, bem como a capacidade que o solvente possui de penetrar as paredes celulares e entrar em contato com o meio intracelular, para que essa transferência seja satisfatória. Os autores também descrevem que açúcares como a celulose, hemicelulose e pectina dificultam a extração dos compostos fenólicos pois, interagem através de ligações covalentes e interações por ponte de hidrogênio, que podem ser rompidas por procedimento hidrolítico. Um exemplo prático dessa abordagem é a utilização da hidrólise enzimática que elevou a recuperação dos compostos fenólicos de modo que a soma dos fenólicos extraídos partisse de $107,85 \pm 23,47 \mu\text{g/g}$ para $345,77 \pm 46,58 \mu\text{g/g}$, evidenciando a parcela insolúvel. Tal alteração foi explicada devido a atuação das enzimas que comprometeram a integridade da parede celular, alterando sua morfologia e permitindo a impregnação do solvente na matriz, o que facilitou a extração dos polifenóis e tornou o procedimento mais eficiente (KRAKOWSKA-SIEPRAWSKA *et al.*, 2020).

Apesar desde resultado positivo, a hidrólise enzimática não é a única alternativa hidrolítica para o processo tão pouco a mais utilizada, e as hidrólises ácida e alcalina ganharam espaço entre as metodologias de extração de fenólicos, resultando em extrações otimizadas para diversas amostras de frutas, vegetais e cereais, bem como integram estratégias sequenciais de extração nas quais os compostos fenólicos são separados em suas diferentes frações por procedimentos que podem ser chamados de fracionamento (WANG *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020). O uso da hidrólise ácida para a diferenciação do perfil fenólico através da liberação de formas glicosiladas e esterificadas de fenólicos em extratos de erva-mate foi avaliada por BIZZOTO *et al.*, (2012) que, para comparar a influência do processo hidrolítico utilizou da identificação de 3 compostos, a rutina (representante dos flavonoides), ácido cafeico (representante dos ácidos hidroxicinâmicos) e o ácido 3,4- dihidroxibenzoico (representante dos ácidos hidroxibenzoicos). Os resultados esclarecem que, após a hidrólise ácida, há expressivo aumento na concentração dos seguintes compostos: o ácido cafeico que passa de $3,77$ a $7,58 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ para $443,14$ a $737,49 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, e o ácido 3,4-dihidroxibenzoico que de zero se eleva para entre $22,61$ e $35,59 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$. O comportamento da rutina frente ao ambiente

ácido foi desfavorável e promoveu a degradação completa, determinada previamente em concentrações de até 516 mg 100g⁻¹.

Em seu trabalho WANG *et al.*, (2020) indica que a hidrólise ácida é eficiente para a liberação de compostos fenólicos insolúveis, assim como o trabalho de BIZZOTO *et al.*, (2012) que aborda essa capacidade de liberação exercida pela hidrólise ácida ao passo que relaciona o procedimento com a degradação de alguns fenólicos. Os resultados para a aplicação direta da hidrólise ácida em amostras de bagaço de maçã demonstram favorecimento da extração de ácido 4- hidroxibenzoico, ácido cripto clorogênico e ácido siríngico mas promoveu a degradação de flavonoides, mais especificamente, derivados de quercetina (LI *et al.*, 2020). Assim como no trabalho de TANG *et al.* (2016), que promoveu a extração dos ácidos: 2,4- hidroxibenzoico e vanílico em quinoa. A hidrólise ácida atua sobre os ésteres e as ligações glicosídicas e, perante as evidências apontadas, parece estar fortemente associada a liberação de derivados do ácido hidroxicinâmico (WANG *et al.*, 2021; ACOSTA-ESTRADA *et al.*, 2014). Por fim, as condições aplicadas de forma mais recorrentes ao se fazer esse tipo de hidrólise são: solução de ácido clorídrico (HCl) em concentrações de 0,1 a 6 mol L⁻¹, altas temperaturas (85°C) e tempo de extração de até 1 hora. No presente trabalho essa estratégia que foi combinada com a extração com solvente orgânico para aumentar a extração de compostos fenólicos e, dessa forma, foi estabelecido o fracionamento de compostos fenólicos em que a primeira etapa é a extração com solvente orgânico para obtenção dos compostos fenólicos livres, em seguida o resíduo líquido gerado é exposto a hidrólise ácida para liberar da fração conjugada de compostos fenólicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os seguintes equipamentos foram utilizados para o desenvolvimento deste trabalho: Agitador orbital (Nova ética); capela de exaustão; centrífuga (Quimis, Q335D); estufa de circulação e renovação de ar forçado (SP Labor, modelo SP-102/100, Brasil); espectrofotômetro UV/Vis de duplo feixe (Shimadzu, UV-2550); lavadora ultrassônica (Eco-sonics, Ultronique); moedor de café di grano (Cadence, MDR302); purificador de água (Millipore, Direct-Q UV3) e; rotaevaporador (Laborota 4000, Heidolph). Todos foram disponibilizados pela Escola de Química e Alimentos (EQA), que se encontra na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.2 REAGENTES

Os seguintes reagentes foram utilizados no desenvolvimento deste trabalho: água purificada pelo sistema Direct-Q UV3 da Millipore; ácido clorídrico P.A. - 37% (vv⁻¹) (Alphatec, Brasil); álcool Metílico P.A. — ACS, 99,8% (vv⁻¹) (Química Moderna, Brasil); álcool Metílico UV/HPLC, 99,9% (vv⁻¹) (Dinâmica, Brasil); álcool Etílico Absoluto, 99,8% (vv⁻¹) (Neon, Brasil); acetato de etila P.A. — ACS, 99,5% (vv⁻¹) (Synth, Brasil); ácido clorídrico P.A. — ACS, 38% (vv⁻¹) (Química Moderna, Brasil); carbonato de Sódio P.A. (Synth, Brasil); éter etílico P.A. — ACS, 98% (vv⁻¹) (Synth, Brasil); hexano P.A. (Êxodo científica, Brasil); hidróxido de Bário P.A., 95% (m/m) (Dinâmica, Brasil); reagente Fenol Folin-Ciocalteu, (Merck, Alemanha); sulfato de Zinco P.A. — ACS, 99% (mm⁻¹) (Química Moderna, Brasil) e sulfato de Cobre P.A. - ACS, 98% (mm⁻¹) (Synth, Brasil).

4.3 OBTENÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

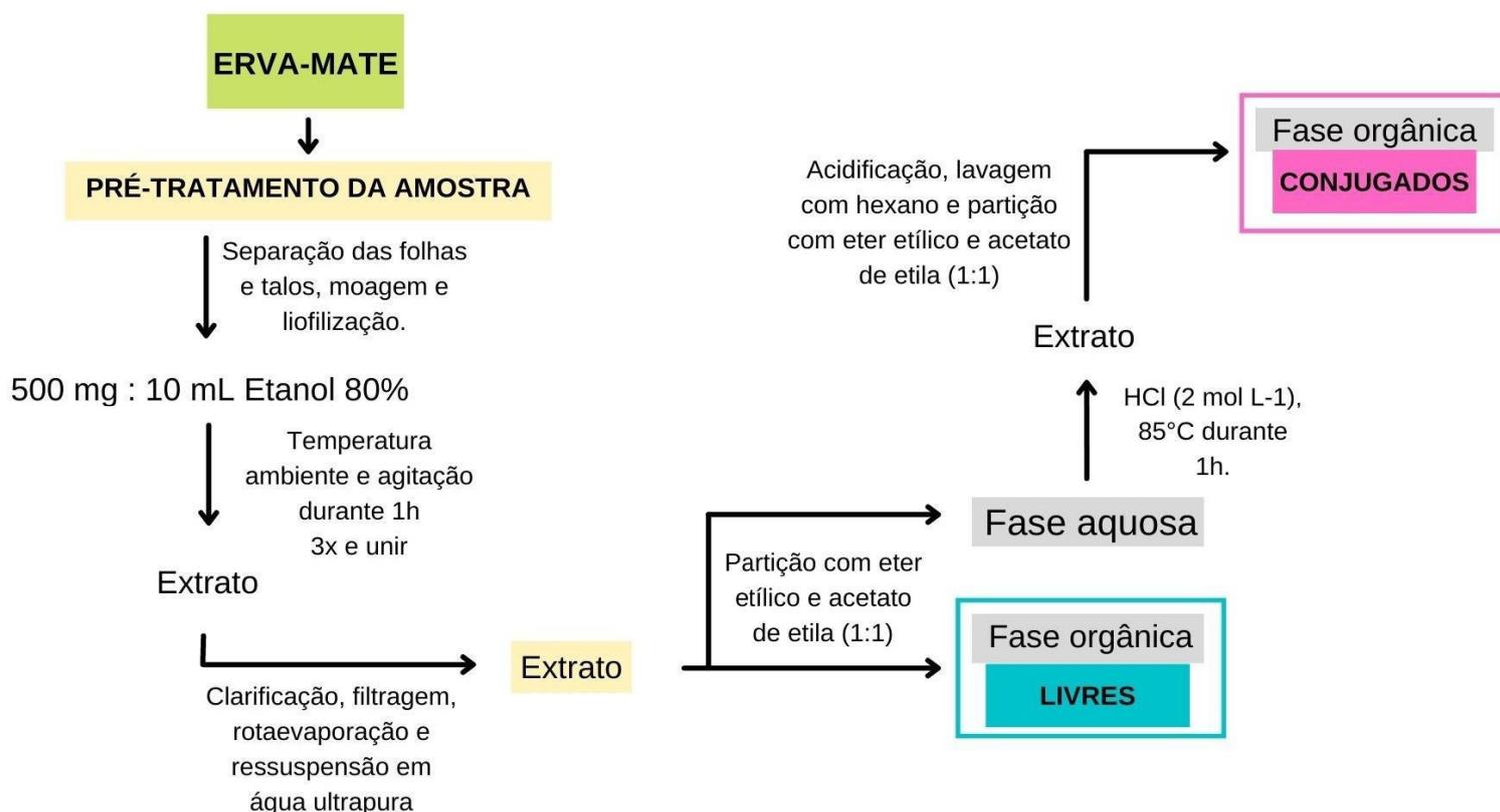
As amostras foram adquiridas em comércio local da cidade de Rio Grande, no Rio Grande do Sul (RS) e em redes de compra e distribuição online, totalizando 10 amostras oriundas de sistema de cultivo convencional, e 8 amostras orgânicas. Cabe ressaltar que só foram adquiridos produtos orgânicos que apresentaram o selo de certificação do MAPA, e que não se adquiriu erva-mate com açúcar ou qualquer outro componente além das folhas e talos da *Ilex paraguariensis*.

Em laboratório, as amostras foram peneiradas, com o auxílio de peneira com duas malhas. Através da malha mais fina (0,420 milímetros (mm)) passaram-se as folhas de baixa granulometria, que foram recolhidas, transferidas para frascos de poliestireno devidamente rotuladas. Já na malha superior (2,0 mm) foram retidos os talos e folhas de alta granulometria. Os talos foram separados das folhas retidas, ambos foram, separadamente, triturados em moedor de café (Cadence, MDR302) até que apresentassem diâmetro suficiente para passarem através da malha mais fina. Após as folhas foram juntas às previamente peneiradas e os talos foram recolhidos, transferidos para frascos de poliestireno e devidamente rotulados. As amostras foram armazenadas em dessecador, protegidas da incidência de luz e com temperatura ambiente (20°C) controlada por ar-condicionado, até o uso.

4.4 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO (FRACIONAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS)

O modelo de fracionamento aplicado no presente trabalho está alinhado com as estratégias descritas nos trabalhos de KRYGIER *et al.*, 1982, KIM *et al.*, 2006 e, LI *et al.*, 2020, e passa por etapas de extração que incluem a extração com solvente orgânico e procedimentos de hidrólise ácida, que foram esquematizados na figura 12.

Figura 12. Fluxograma de procedimento de fracionamento de compostos fenólicos em amostras de erva-mate.



4.4.1 EXTRAÇÃO COM SOLVENTE SOLVENTE ORGÂNICO (FRAÇÃO LIVRE)

A 500 mg das folhas ou talos foram adicionados 10 mL de etanol 80% (vv^{-1}) e essa suspensão foi mantida sob as seguintes condições: temperatura ambiente (20°C) e agitação constante em agitador orbital (120 SP) durante 1 hora, seguiu-se com centrifugação (2000 RPM durante 1 minuto) e separação do sobrenadante. Esse procedimento ocorreu 3 vezes, os sobrenadantes foram unidos e o volume final foi ajustado a 30 mL com o solvente de extração (etanol 80% (vv^{-1})). Nessa etapa todas as amostras passaram pelo procedimento de clarificação descrito no item 4.5. Essa metodologia também foi aplicada, inicialmente, para a definição do

solvente utilizado para todas as mostras estudadas, comparando-se a extração com etanol 50 e 80% (vv⁻¹).

Em seguida os extratos resultantes foram rotaevaporados a 100°C até atingirem 1% do seu volume inicial e se procedeu com a ressuspensão em 10 mL de água ultra pura, que foi particionada com 10 mL de uma mistura de éter etílico (EE) e acetato de etila (AE) (1:1 vv⁻¹) (EE/AE). A fase orgânica foi recolhida, pois contém os compostos fenólicos livres, e então foi seca em banho maria (50°C) durante 16 horas em capela de exaustão e ressuspensa em metanol grau HPLC para posterior determinação dos compostos fenólicos.

4.4.2 EXTRAÇÃO POR HIDRÓLISE ÁCIDA (FRAÇÃO CONJUGADA)

A obtenção dos compostos fenólicos conjugados está baseada em um procedimento sequencial que aplica a hidrólise ácida na fase aquosa obtida na etapa de partição do extrato com EE/AE descrita no item 4.4.1. Dessa forma, à 9 mL da fase aquosa se adicionou 9 mL de solução de HCl (2 mol L⁻¹) e essa mistura foi mantida a 85°C por 1 hora, ao final foi feita uma lavagem com hexano, que permite a remoção de potenciais interferentes liberados após a hidrólise, conforme descrito por TZIMA, BRUNTON e RAI (2019). Dessa forma, 10 mL de hexano foram adicionado ao extrato hidrolisado, que foi vortexado e então o hexano foi removido e no extrato aquoso remanescente foi feita partição com EE/EA e a fase orgânica foi recolhida para secagem em banho maria (50°C) durante 16 horas em capela de exaustão e, posteriormente, ressuspensa em 10 mL de metanol grau HPLC, para determinação dos compostos fenólicos.

4.5 CLARIFICAÇÃO (“*clean-up*”)

O procedimento de clarificação foi aplicado em todos os extratos como estratégia de minimização de interferências espectrais no momento da determinação de compostos fenólicos totais, essa estratégia consistiu na

precipitação da clorofila, possivelmente extraída em conjunto com os fenóis, através da adição de solução de hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e sulfato de zinco (ZnSO_4) 5% (m v^{-1}). Essas soluções são adicionadas de forma proporcional aos extratos, de modo que para cada 10 mL de extrato foram adicionados 2 mL de cada solução (BaOH e ZnSO_4), essa mistura foi mantida em repouso durante 15 minutos para que houvesse a formação do precipitado e, em seguida, foi feita a centrifugação (2000 RPM durante 1 minuto) e o sobrenadante foi recolhido e filtrado através de papel filtro (SOUZA, 2009).

4.6 PROCEDIMENTO DE DETERMINAÇÃO COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

O procedimento para determinação de compostos fenólicos totais (TPC, do inglês “*total phenolic compounds*”) foi baseada no trabalho de Souza *et al.*, (2009) e consiste na combinação de 500 μL dos extratos finalizados à 500 μL de água ultrapura e 4,5 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3 4% (m v^{-1})) com 1% (v v^{-1}) de sulfato de cobre (CuSO_4 2% (m v)). Essa combinação foi mantida em banho maria (40°C) por 15 minutos e, em seguida, foram adicionados 500 μL do reagente de Folin- Ciocalteu (1:2) e a solução foi mantida em descanso por 10 minutos. Todos os procedimentos foram executados em triplicata e a determinação se deu por espectrometria de UV/VIS, em comprimento de onda de 760 nm. A quantificação dos extratos se deu a partir de uma curva de calibração, construída com 6 pontos de concentração de padrão de ácido gálico (GA, do inglês, “*gallic acid*”) sendo eles: 0, 5, 10, 25, 50, 75 e 100 mg GA. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por grama de peso seco ($\text{mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$, do inglês, “*mg gallic acid equivalent for gram dry weight*”).

4.7 EXATIDÃO

Quanto a metodologia de determinação de TPC (item 4.6) foi feito ensaio de adição e recuperação, avaliando a exatidão do procedimento.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL.

Diversos solventes podem ser utilizados no processo de extração de compostos fenólicos, desde água até solventes orgânicos como o metanol e o etanol, não sendo unânime a melhor opção para o procedimento (ZHANG *et al.*, 2020). A escolha de utilizar com o etanol no presente trabalho está fundamentada no estudo de MENDES *et al.*, (2019) em que a seletividade de extração de compostos fenólicos ao se aplicar diferentes solventes (etanol, metanol, acetona e água) e suas misturas binárias, terciárias e quaternárias, em amostras de castanha, foi avaliada. Os autores descobriram que altas concentrações de etanol e a mistura terciária entre: acetona, metanol e etanol foram os extratores de compostos fenólicos totais mais eficientes, entretanto, o uso da mistura terciária extrai, além dos fenólicos, moléculas interferentes como: açúcares, fosfolipídios e ácidos graxos, característica não encontrada ao se utilizar apenas etanol, fato que o rotulou como a opção mais adequada. Os autores ainda relatam que em ambientes de polaridade intermediária é esperado que haja boa extração dos compostos fenólicos, o que pode ser notado no trabalho de KRAKOWSKA-SIEPRAWKA *et al.*, (2020), que estabelece um comparativo entre a extratibilidade de compostos fenólicos em amostras de erva-matee tremoço amarelo a partir de um procedimento de extração por maceração e, relata que, para a erva-mate, o uso de etanol 70% (vv⁻¹) foi mais eficiente no procedimento, quando comparado com o metanol na mesma concentração (80,33 mg GAE g⁻¹ DW e 65,74 mg GAE g⁻¹ DW, respectivamente). No mesmo trabalho demonstraram que o aumento na concentração do solvente gerou extratos mais concentrados de compostos fenólicos, um comportamento também notado em outras ervas e especiarias (SINGH *et al.*, 2011, SEPAHPOUR *et al.*, 2018; e LAZZAROTTO *et al.*, 2019).

A avaliação da extração com diferentes concentrações de etanol (50 e 80% (vv⁻¹)) foi feita com duas amostras aleatórias, a orgânica O1 e orgânica O7, os

resultados estão expressos na tabela 01 e demonstram que, para os talos, o solvente menos concentrado foi mais eficiente na extração (O1: 3192 ± 10 e O7: 3253 ± 10 mg GAE g^{-1} DW) do que o mais concentrado (O1: 3054 ± 16 e O7: 1365 ± 7 mg GAE g^{-1} DW). Nas folhas o comportamento foi igual para a mostra orgânica O1 em que o etanol 50% (vv-1) rendeu extratos com 3198 ± 10 mg GAE g^{-1} DW enquanto o etanol 80% (vv- 1) extratos com concentração de 2808 ± 12 mg GAE g^{-1} DW. Já para a amostra orgânica O7 o comportamento foi diferente e o solvente mais concentrado rendeu extratos mais concentrados em compostos fenólicos (3041 ± 4 mg GAE g^{-1} DW) do que o menos concentrado (2862 ± 8 mg GAE g^{-1} DW). Por si só, tais resultados indicam o etanol 50% (vv-1) como o mais adequado para a extração de compostos fenólicos, entretanto, a mistura de partes iguais entre o solvente orgânico e a água ocasiona um comportamento azeotrópico na mistura, o que altera as características físico-químicas do solvente e, nesse caso, ao dar sequência com o procedimento de fracionamento (rotaevaporação e ressuspensão para partição e seraparação das frações) notou-se que o etanol 50% dificultou a viabilização do processo de rotaevaporação. De forma a prolongar o tempo de rotaevaporação por amostra (cerca de 1 hora por réplica) e necessitar temperaturas muito elevadas para a evaporação do solvente (acima de $100^{\circ}C$), o que pode comprometer a integridade dos compostos fenólicos e aumenta a chance de interferentes no procedimento de determinação dos compostos fenólicos. Esse comportamento não foi observado ao utilizar o etanol 80% (vv-1) para a extração, e as características de tempo e temperatura para rotaevaporação foram de 10 a 15 minutos por réplica, com temperaturas mais amenas ($80^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$), o que foi um diferencial para a decisão de se trabalhar com essa concentração do solvente (etanol 80%).

Tabela 01. Comparação da eficiência de extração de compostos fenólicos totais (mg GAE g⁻¹ DW) com diferentes concentrações de etanol.

	Folhas		Talos	
	EtOH 50%	EtOH 80%	EtOH 50%	EtOH 80%
Orgânica O1	3198 ± 10 Aa	2808 ± 12 Ab	3192 ± 10 Aa	3054 ± 16 Ac
Orgânica O7	2862 ± 8 Ba	3041 ± 4 Bb	3253 ± 10 Bc	1365 ± 7 Bd

Legenda: Os valores tabelados referem-se a média ± o desvio padrão. A análise estatística comparou a diferença entre as amostras (colunas, letras maiúsculas) e os solventes e partes da planta (linhas, letras minúsculas). As letras iguais indicam igualdade estatística (p-valor < 0,05) segundo o teste t, e as letras diferentes indicam diferença estatística (p-valor > 0,05).

5.2 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E EXATIDÃO

A determinação de compostos fenólicos totais foi feita conforme o método com reagente de Folin-Ciocalteu, que é uma estratégia de medida indireta dos analitos, em que uma curva analítica de um ácido fenólico, no caso o ácido gálico (GA), é usada como base para o cálculo das concentrações presentes nos extratos. Como forma de compreender se há conformidade entre o comportamento do padrão na construção da curva analítica (meio aquoso) e os extratos obtidos aplicou-se o ensaio de adição de padrão e o coeficiente angular das curvas no extrato e em meio aquoso foram comparadas de forma a avaliar a correspondência do comportamento nos dois meios e verificar a capacidade da curva analítica em representar as concentrações medidas nos extratos. Os resultados apresentados na tabela 02 e figuras 13, e demonstram que na faixa de trabalho empregada (5 a 100 mg GAE g⁻¹) há uma boa correlação entre a concentração de ácido gálico e a absorbância medida, como pode ser confirmado pelos coeficientes de correlação linear (R²) apresentados, em R² = 0,99 para a maioria das amostras. Assim como há correspondência entre o coeficiente

angular da curva analítica construída em meio aquoso e as curvas construídas nos extratos de folhas e talos o que indica ausência de efeito de matriz, logo, a curva analítica em meio aquoso pode ser referência para o cálculo da concentração de compostos fenólicos em presentes nos extratos de folhas e talos de erva-mate.

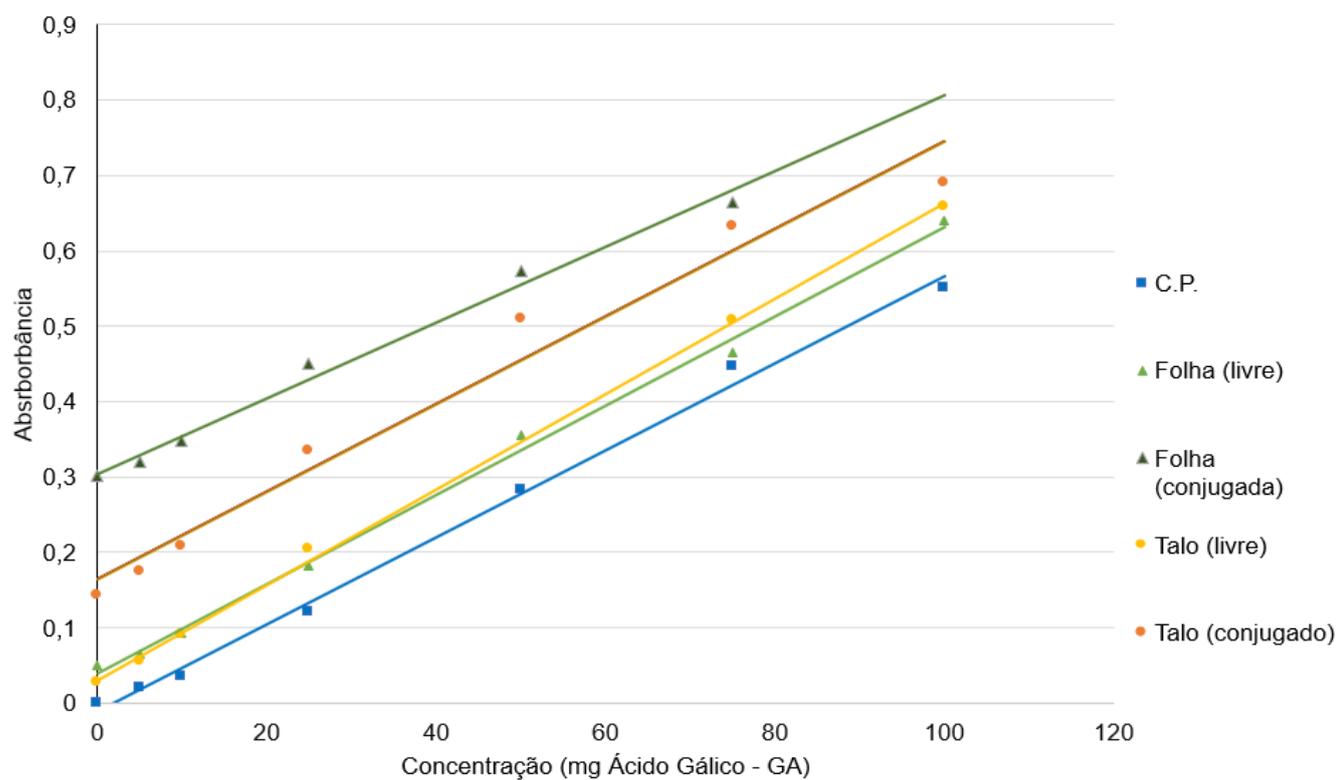
Tabela 02. Dados do ensaio de adição e recuperação nas frações livre e conjugada amostras de erva-mate orgânica e convencional.

	Fração Livre		Fração Conjugada	
	R ²	Coefficiente angular	R ²	Coefficiente angular
Curva Padrão (CP)	0,995	0,0058 a	0,995	0,0058 a
Folhas - C1	0,996	0,0059 a	0,989	0,0050 b
Talos – C1	0,999	0,0063 a	0,972	0,0058 a

Legenda: CP: curva analítica construída em meio aquoso (padrão); C1: amostra convencional C1.

A análise estatística foi aplicada para comparação do coeficiente angular da CP com o coeficiente angular da curva analítica construída nos extratos das amostras. As letras iguais representam igualdade estatística segundo o teste t (p-valor > 0,05).

Figura 13. Ensaio de adição e recuperação em extrato de compostos fenólicos livre e conjugados em amostras de folhas e talos de erva-mate convencional.



Legenda: CP: curva analítica padrão (construída em meio aquoso); e curva analítica construída nos extratos de compostos fenólicos livres e conjugados de folha e talo de erva-mate convencional.

5.3 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Estudos sobre o teor de compostos fenólicos em amostras de ervas podem ser encontrados na literatura, como por exemplo o trabalho de PORT'S *et al.*, 2013, que avaliaram infusões de ervas da região amazônica e seus extratos geraram concentrações variadas entre 13,61 e 68,13 mg GAE g⁻¹ DW, em amostras de: agirú (51,30 mg GAE g⁻¹ DW), açoita cavalo (47,54); capim santo (13,61); erva cidreira (37,12); graviola (32,61); jucá (68,13); pata de vaca (23,67); parirí (39,85) e; sacaca comum (26,02). Além disso, os autores relatam que a atividade antioxidante desses extratos é condizente com as concentrações dos fenólicos, no sentido de que quanto maior a concentração, maior a atividade antioxidante. DELADINO (2008) estudou a erva-mate e quantificou o teor de compostos fenólicos totais obtidos por extrato aquoso como sendo de 62,11 mg GAE g⁻¹ DW, concentração superior à maioria das ervas amazônicas estudadas por PORT'S. MEINHART *et al.*, (2010) avaliaram o teor dos fenólicos, relacionando com a prática de ingestão dos preparos típicos com a erva-mate, os autores simularam as sucções feitas durante o consumo de chimarrão e tererê e conseguiram quantificar 41,8 e 52,2 mg GAE g⁻¹ DW, respectivamente, e estabeleceram uma relação com a prática e o consumo de fenólicos a partir da erva-mate. No presente trabalho os resultados obtidos quanto aos compostos fenólicos totais em fração livre e conjugada de amostras de folhas e talos de erva-mate orgânica e convencional estão expostos na tabela 03 e figura 14. E pode-se notar que as concentrações totais extraídas durante o fracionamento (soma da fração livre conjugada) ficaram entre 204,31 mg GAE g⁻¹ DW e 2641,53 mg GAE g⁻¹ DW, uma ampla faixa de concentrações, que comporta a distinção entre as frações (livre e conjugada), sistema de cultivo (amostras orgânicas e convencionais) e partes da planta (folhas e talos).

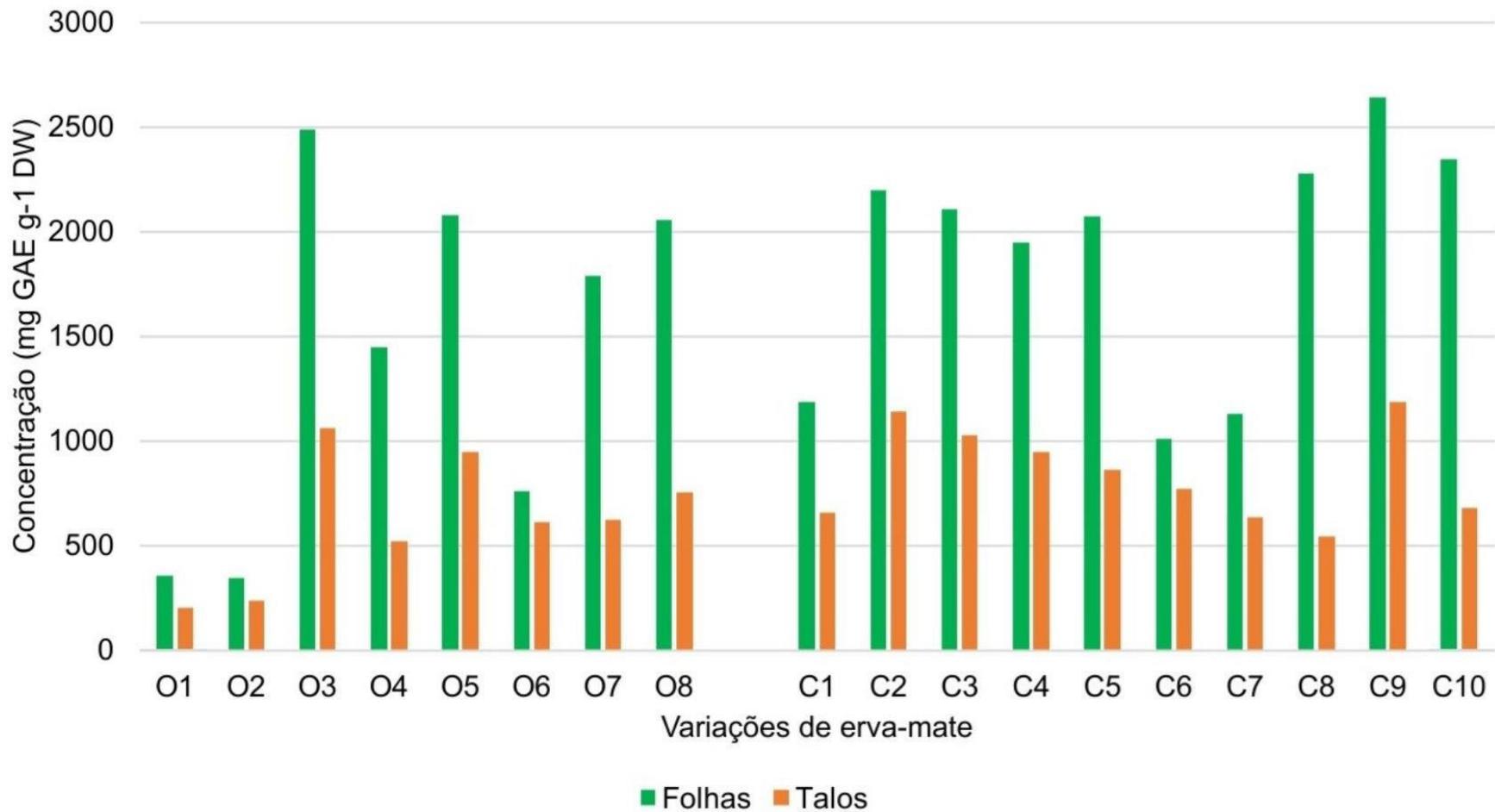
Tabela 03. Compostos fenólicos totais (mg GAE g⁻¹ DW) livre e conjugados em amostras de folhas e talos de erva-mate orgânica e convencional.

	Folhas			Talos		
	Fração Livre	Fração conjugada	Total	Fração Livre	Fração conjugada	Total
O1	112,71 ± 3,85 Aa	245,81 ± 5,15 Ba	358,52	81,59 ± 2,17 Aa	122,72 ± 8,59 Ba	204,31
O2	125,34 ± 1,58 Ab	221,14 ± 12,67 Ba	346,48	142,32 ± 26,46 Ab	94,73 ± 0,77 Bb	237,05
O3	510,56 ± 65,75 Ace	1976,13 ± 87,93 Bb	2.486,69	293,76 ± 12,15 Ac	767,83 ± 26,22 Bc	1.061,59
O4	286,60 ± 21,73 Ad	1163,78 ± 53,93 Bc	1.450,38	310,32 ± 21,03 Acd	210,15 ± 3,35 Bd	520,47
O5	486,33 ± 23,44 Ace	1593,70 ± 41,75 Bde	2.080,04	235,55 ± 19,85 Ae	710,25 ± 1,38 Be	945,81
O6	225,33 ± 6,04 Afjk	537,12 ± 126,15 Bf	762,46	102,84 ± 12,80 Af	506,97 ± 27,83 Bfg	609,81
O7	296,65 ± 6,06 Adl	1489,87 ± 133,35 Bde	1.786,52	136,57 ± 6,32 Ab	488,13 ± 40,28 Bfg	624,70

O8	403,16 ± 2,07 Ag	1653,68 ± 63,85 Bd	2.055,84	173,50 ± 1,95 Ag	580,05 ± 20,02 Bh	753,56
C1	193,18 ± 40,64 Ajk	992,33 ± 22,63 Bg	1.185,18	127,54 ± 16,15 Abf	529,90 ± 39,45 Bfgh	657,45
C2	407,39 ± 22,71 Agh	1789,02 ± 8,64 Bh	2.196,41	266,90 ± 33,60 Acdeh	871,87 ± 43,54 Bi	1.138,77
C3	558,71 ± 85,05 Ac	1550,41 ± 106,62 Bde	2.108,71	310,14 ± 43,62 Aceh	719,03 ± 7,27 Br	1.029,17
C4	318,94 ± 8,13 Aim	1629,63 ± 69,23 Bde	1.948,57	251,97 ± 33,37 Acdeh	698,17 ± 57,23 Bcej	950,15
C5	365,33 ± 21,55 Ahm	1705,20 ± 58,87 Bdeh	2.070,53	252,53 ± 17,96 Aeh	609,04 ± 35,48 Bhj	861,58
C6	351,04 ± 27,65 Ahiklm	658,64 ± 44,10 Bf	1.009,68	137,14 ± 19,89 Abf	632,23 ± 35,59 Bhj	769,37
C7	245,48 ± 27,45 Adfjkl	885,22 ± 62,26 Bg	1.130,70	141,84 ± 8,92 Ab	493,66 ± 54,80 Bfgh	635,31
C8	280,57 ± 18,09 Ad	1999,45 ± 82,80 Bb	2.280,02	95,52 ± 9,01 Afi	447,05 ± 12,38 Bg	542,60
C9	372,20 ± 23,26 Ag	2269,33 ± 34,23 Bi	2.641,53	109,64 ± 23,04 Abfi	1077,63 ± 14,93 Bk	1.187,27
C10	243,98 ± 31,20 Adfklm	2099,45 ± 81,76 Bb	2.343,43	82,78 ± 5,39 Aai	598,62 ± 56,90 Bfghj	680,40

Legenda: a análise estatística comparou as frações livre e conjugada nas folhas separadamente dos talos e é expressa pelas letras maiúsculas. Também foi aplicada análise estatística para comparação das amostras orgânicas e convencionais entre si (colunas), expressa pelas letras minúsculas. Em ambos os casos as letras iguais indicam igualdade estatística segundo o teste t (p-valor ≥ 0,05) e as letras diferentes indicam diferença (p-valor ≤ 0,05).

Figura 14. Compostos fenólicos totais em folhas e talos de erva-mate orgânica e convencional.



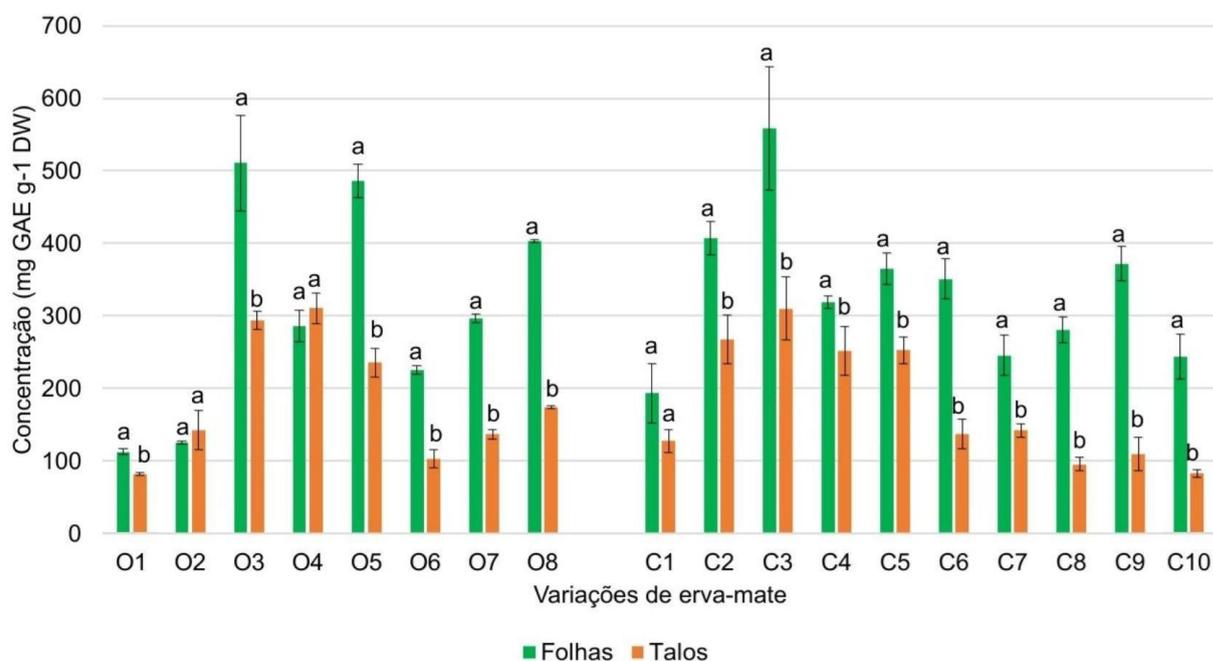
Legenda: Esse gráfico expressa a concentração de compostos fenólicos determinados nas frações livre e conjugada somadas. As concentrações então expressas em mg GAE g⁻¹DW.

Os estudos sobre a erva-mate são diversos, ZWYRZYKOWSKA *et al.*, (2015), por exemplo, avalia o teor de compostos fenólicos em extratos metanólicos produzidos a partir de diferentes espécies de *Ilex sp.*, e constata concentrações entre 9 e 51 mg g⁻¹ DW nas amostras de *I. aquifolium* 'Argenta Marginata' (38,78 mg g⁻¹ DW), *I. aquifolium* L. (27,16 mg g⁻¹ DW), *I. meservea* 'Blue Angel' (9,98 mg g⁻¹ DW) e na *I. paraguayensis*, que se mostrou a espécie mais concentrada nesses componentes, a concentração foi de 51,06 mg g⁻¹ de DW, resultado compatível com o trabalho de FILIP *et al.*, (2001), DELADINO (2008) e MEINHART *et al.*, (2010). Ainda em ZWYRZYKOWSKA *et al.*, (2015), a análise cromatográfica dos extratos gerados demonstrou que a *I. paraguayensis*, é a espécie com maior variação dos tipos de compostos fenólicos, 19 no total, sendo os principais: ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, derivados do ácido dicafeoilquínico e a rutina. Tais informações, associadas com os dados de teores de compostos fenólicos totais (soma das frações livre e conjugada) estudados no presente trabalho, tornam claro que os extratos gerados a partir das amostras orgânicas e convencionais estudadas nessa dissertação são mais concentrados. Tal fato pode ser ocasionado pela otimização do procedimento de extração através da aplicação da estratégia de fracionamento, assim como foi observado para amostras de bagaço de maçã estudadas por LI *et al.*, (2021), nas quais o procedimento de hidrólise ácida eleva a concentração de compostos fenólicos extraídos. Outra explicação é a escolha do solvente, que já foi discutida e parece haver uma correspondência entre a capacidade de extração dos compostos fenólicos e a constante dielétrica do solvente, dessa forma, quanto menor esta constante, melhor extrator o solvente será (WU *et al.*, 2021). Essa relação também foi visualizada em ervas e especiarias como: cúrcuma, gengibre, folhas de curry e capim-limão, aonde a comparação entre os solventes metanol 80% (vv⁻¹) (constante dielétrica: 36) e etanol 80% (vv⁻¹) (constante dielétrica: 24,3) resultou em maior extração dos compostos ao se utilizar do etanol 80% (vv⁻¹) para a extração dos fenólicos (SEPAHPOUR *et al.*, 2018).

5.4 COMPOSTOS FENÓLICOS NAS PARTES DA PLANTA (FOLHAS E TALOS)

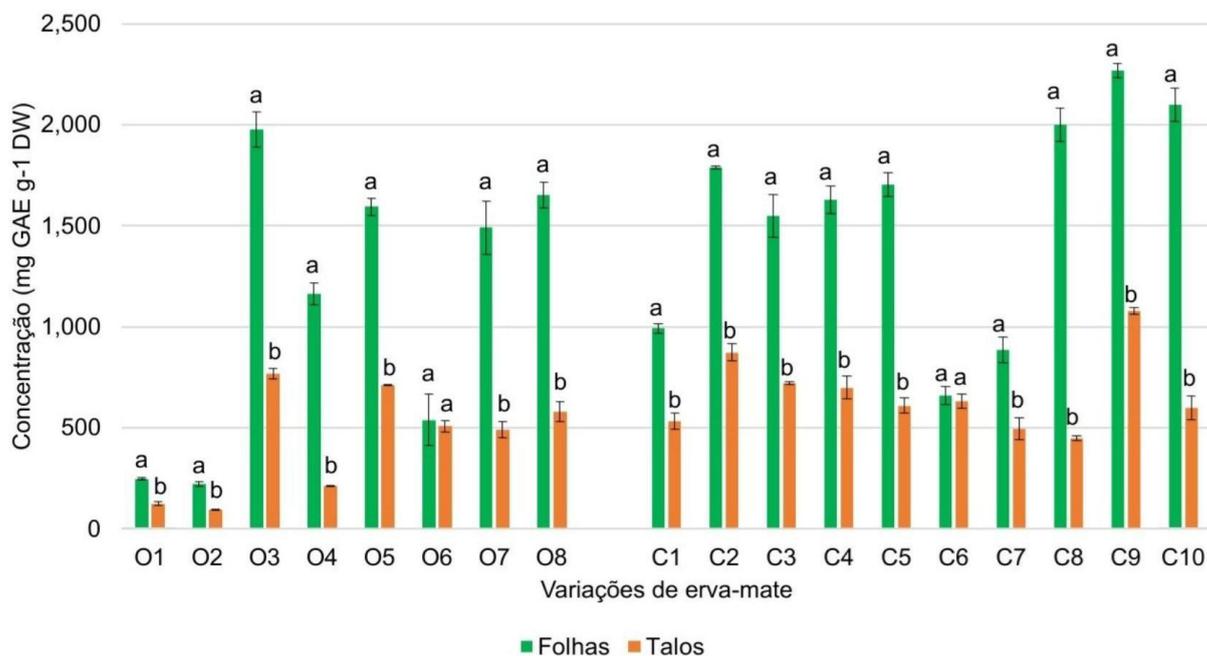
Os órgãos vegetais, assim como os animais, são responsáveis por funções diferentes, e seu metabolismo é modulado de forma específica a cumprir sua finalidade, é sabido que a erva-mate comercial é uma ótima fonte de compostos fenólicos e que esse produto é oriundo de uma mistura de diferentes partes da árvore, sendo estas as folhas e os talos que os acompanham (BRASIL,2002). A distinção dos fenólicos presentes em cada parte da erva-mate pode contribuir para a compreensão da compartimentalização desses compostos e suas aplicações individuais, por isso, decidiu-se aplicar essa variável no trabalho e pôde-se notar que a soma das frações livre e conjugada nas folhas de erva-mate rendeu um teor de fenólicos totais entre 346,48 e 2641,53 mg GAE g⁻¹ DW e para os talos, as somas apontam teores entre 204,31 e 1187,27 mg GAE g⁻¹ DW. A exposição dos resultados se deu a partir da tabela 03 e figuras 15 e 16.

Figura 15. Fração livre de compostos em folha e talo de erva-mate.



Legenda: a análise estatística foi aplicada para a comparação da folha e talo de cada amostra de erva-mate. As letras iguais indicam igualdade estatística se segundo o teste t (p -valor > 0,05) e letras diferentes indicam diferença estatística (p -valor < 0,05).

Figura 16. Fração conjugada de compostos fenólicos em folha e talo de erva-mate.



Legenda: a análise estatística foi aplicada para a comparação da folha e talo de cada amostra de erva-mate. As letras iguais indicam igualdade estatística se segundo o teste t (p -valor $> 0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística (p -valor $< 0,05$).

A análise estatística que comparou diretamente as folhas e talos correspondentes da mesma amostra demonstrou que, na fração livre (figura 15), as amostras orgânicas apresentaram mais compostos fenólicos em suas folhas do que em seus talos, com exceção da O6, que não diferiu estatisticamente os teores de $125,34 \pm 1,58$ mg GAE g⁻¹ DW para as folhas e de $142,32 \pm 26,46$ mg GAE g⁻¹ DW para os talos. Dentre as amostras convencionais o comportamento foi semelhante às amostras orgânicas, também se mantendo quase unânime e, com exceção das folhas ($193,18 \pm 40,64$ mg GAE g⁻¹ DW) e talos ($127,54 \pm 16,15$ mg GAE g⁻¹ DW) da amostra C1, que não diferiram estatisticamente, em todas as amostras as folhas são mais concentradas quando comparadas com os talos. A análise comparativa entre as folhas e talos na fração conjugada de compostos fenólicos (figura 16) apresentou resultados semelhantes, todas as folhas foram mais concentradas do que os talos. Com exceção das amostras orgânica e convencional 6, nas quais as folhas tiveram concentração de $537,12 \pm 126,15$ e $658,64 \pm 44,06$ mg GAE g⁻¹ DW, respectivamente, enquanto

que os talos tiveram concentração de $506,97 \pm 27,83$ para a orgânica 6 e de $632,23 \pm 35,59$ mg GAE g^{-1} DW para a convencional.

Trabalhos como os de BASTOS *et al.*, 2007; ZWYRZYKOWSKA *et al.*, 2015; GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021 corroboram com o fato de que as folhas de *I. sp.* são ricas em compostos fenólicos e, na literatura, a comparação das diferentes partes das plantas demonstra correspondência com os resultados obtidos. Nesse sentido, a determinação dos compostos fenólicos totais (TPC, do inglês, 'total phenolic compounds') em caules e folhas de *Crescentia cujete*, demonstrou que as folhas são mais concentradas ($247,56$ — $371,23$ mg GAE g^{-1} de extrato) do que os caules ($234,83$ — $326,75$ mg GAE g^{-1} de extrato) e o mesmo padrão se repete para as determinações de flavonoides totais (TFC, do inglês, 'total flavonoid compounds') em folhas ($101,20$ — $144,64$ mg GAE g^{-1} de extrato) e talos ($42,62$ — $82,7$ mg GAE g^{-1} de extrato) (DAS *et al.*, 2014). Um padrão semelhante é visto no trabalho de RIGUEIRA *et al.*, (2018), os compostos fenólicos foram avaliados nas folhas e talos de couve manteiga (*brassica oleracea L. var. Acephala*), sendo reportado pelos autores que as folhas dessa hortaliça (173 a 244 mg GAE $100 g^{-1}$) são significativamente mais concentradas do que os talos (86 a 180 mg GAE $100 g^{-1}$). Os resultados gerados por FALLER e FIALHO (2008), em amostra de brócolis (*brassica oleracea var. Italica*), também possui a prevalência dos compostos fenólicos nas folhas e flores, quando comparadas aos talos e esse padrão observado para diferentes partes da planta se justifica devido a compartimentalização dos bioativos de acordo com a sua necessidade nos tecidos. Um exemplo disso, é a alta presença de compostos fenólicos em flores e folhas, onde agem como pigmentos, uma função importante para atração de polinizadores. Além disso, há uma maior concentração de fenólicos nos órgãos expostos a situações estressoras, como pode ser o caso de folhas expostas a radiação UV, pois estes agem na proteção do tecido folhear frente a este estresse (TAIZ e ZEIGLER, 2013).

Sabe-se que a erva-mate pode ser cultivada em manejo solteiro ou consorciado, o segundo adiciona à área de plantio árvores de porte maior, que fornecem o sombreamento à *I. paraguariensis*, já o manejo solteiro tem a característica de cultivo a pleno sol, o aumenta a incidência da radiação solar nas regiões folhosas da árvore, e explica a relação que há entre produtos ervateiros originários de manejo a pleno sol,

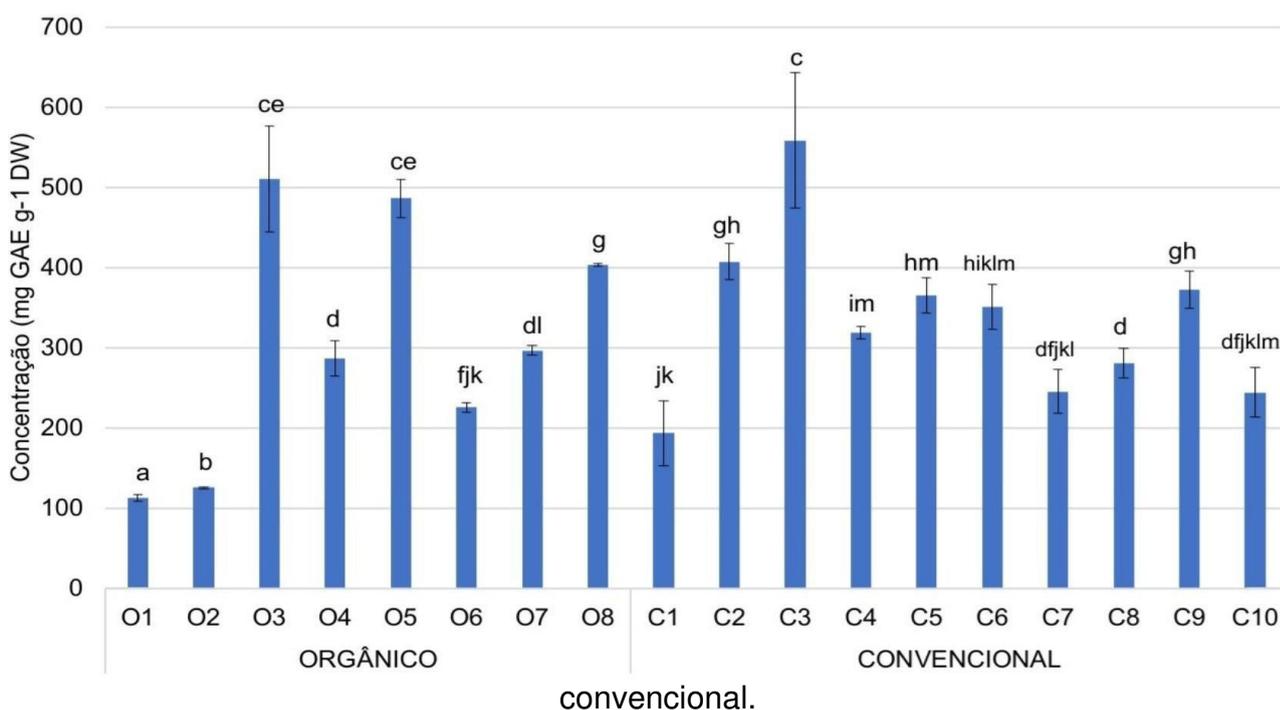
com maior estresse abiótico, como radiação UV, apresentarem incremento de fenólicos nas folhas, em comparação aos talos. Em BUTIUK *et al.*, (2016) os autores descrevem que as folhas e talos verdes (pré-processamento) de erva-mate foram estudadas quanto ao seu teor de ácido clorogênico (éster entre o ácido cafeico e ácido quínico) e dois isômeros, o ácido neoclorogênico e criptoclorogênico, não exibindo diferença significativa entre si quando as amostras foram obtidas da colheita do outono (folhas: 80,8 e talos: 78,9 mg de ácidos clorogênicos totais g⁻¹) e primavera (folhas: 50,0 e talos: 50,5 mg de ácidos clorogênicos totais g⁻¹). Evidências que podem sustentar a hipótese de que a diferenciação dos compostos fenólicos entre as folhas e talos não é unânime para todas as classes de compostos fenólicos e que as amostras que não diferiram estatisticamente entre suas folhas e talos, no presente trabalho, podem possuir concentrações expressivas de ácidos clorogênicos.

5.5 COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO (ORGÂNICO E CONVENCIONAL)

O estudo de produtos comerciais está sujeito a considerável variabilidade dos resultados devido a quantidade de fatores que podem interferir no metabolismo vegetal e influenciar a composição de compostos fenólicos e outros fitoquímicos, esses fatores se dão ao longo do processo de cultivo, colheita e processamento e podem estar associados a características genéticas, sistema de cultivo e condições ambientais, grau de maturação da planta e entre outros (ARBOS *et al.*, 2010; BUTIUK *et al.*, 2016). Os resultados de comparação entre as erva-mate orgânica e convencional encontrados nesse trabalho são representados e discutidos de duas formas diferentes, a partir da interpretação das médias dos grupos amostrais e de forma pontual sobre cada amostra considerando sua fração de compostos fenólicos, parte da planta e sistema de cultivo. A soma das frações livre e conjugada permite a observação geral das concentrações de compostos fenólicos que foram determinados a partir dos extratos de erva-mate orgânica e convencional e observar a média das amostras de cada grupo é uma forma de interpretar o impacto que o sistema de cultivo pode exercer sobre a síntese desses compostos nas amostras de erva-mate.

A avaliação individual das amostras, considerando as frações estudadas, permite observar a variabilidade dos grupos amostrais (orgânico e convencional) e quando se trata da fração livre de compostos fenólicos em folhas de erva-mate orgânica e convencional, as principais diferenças estatísticas observadas estão entre as duas amostras menos concentradas (O1 e O2) e as três mais concentradas (O3, O4 e C3), que chegaram a ter um teor de compostos fenólicos 4 vezes maior. Também foi observada igualdade estatística entre as amostras C2 e O8, assim como as amostras convencionais que apresentaram certa paridade entre suas concentrações, como por exemplo, C4, C5, C6 e C9, que se sobressaem significativamente as orgânicas O4, O7 e as convencionais C7 e C8, que são estatisticamente equivalentes, resultados expressos na figura 17.

Figura 17. Fração livre de compostos fenólicos em folhas de erva-mate orgânica e

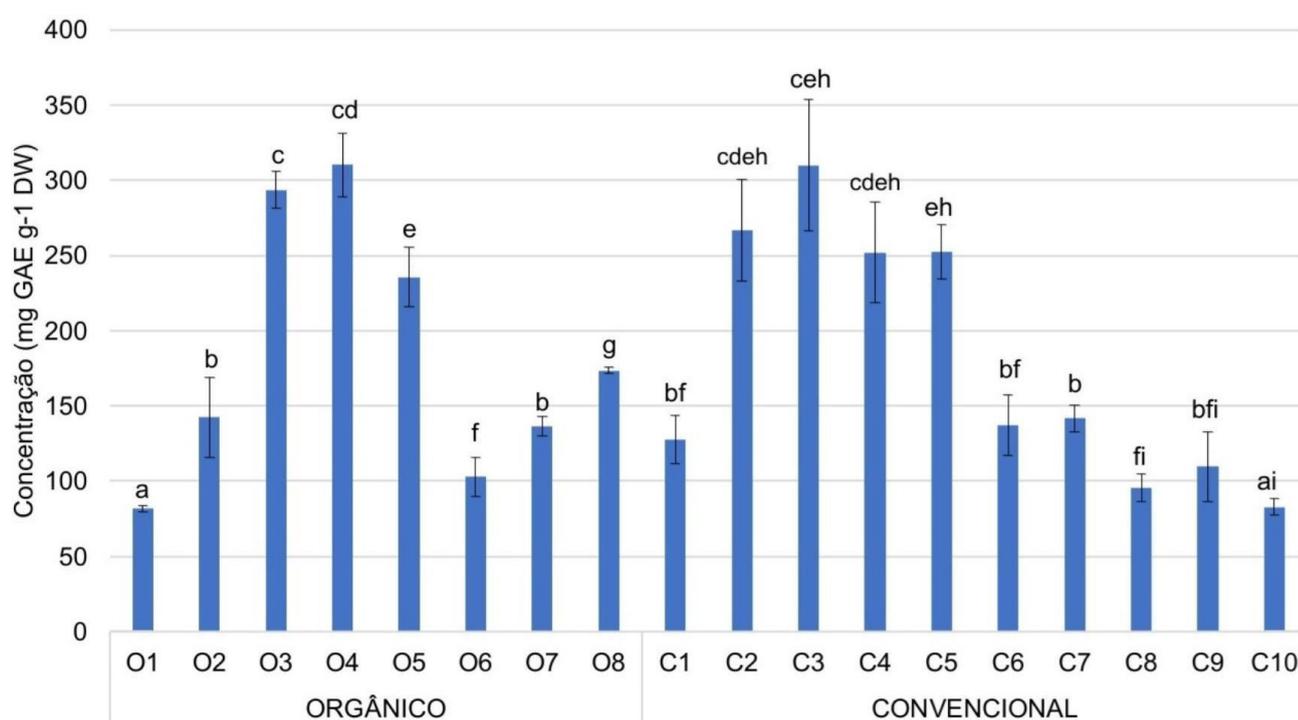


Legenda: a análise estatística comparou todas as variações de erva-mate entre si e é expressa nas letras iguais, como sendo igualdade estatística (p -valor $< 0,05$) segundo o teste t, e as letras diferentes indicam diferença estatística (p -valor $> 0,05$).

Já entre os talos da fração livre de compostos fenólicos nas amostras orgânicas e convencionais, observa-se, através da figura 18, que há prevalência de amostras convencionais (C2, C3, C4 e C5) entre as amostras mais concentradas, que

são acompanhadas das orgânicas O3, O4 e O5, assim como as amostras menos concentradas são integradas por uma orgânica (O1) e uma convencional (C10), que são estatisticamente iguais e possuem quase 4 vezes menos compostos fenólicos, comportamento também evidenciado nas folhas.

Figura 18. Fração livre de compostos fenólicos em talos de erva-mate orgânica e convencional.

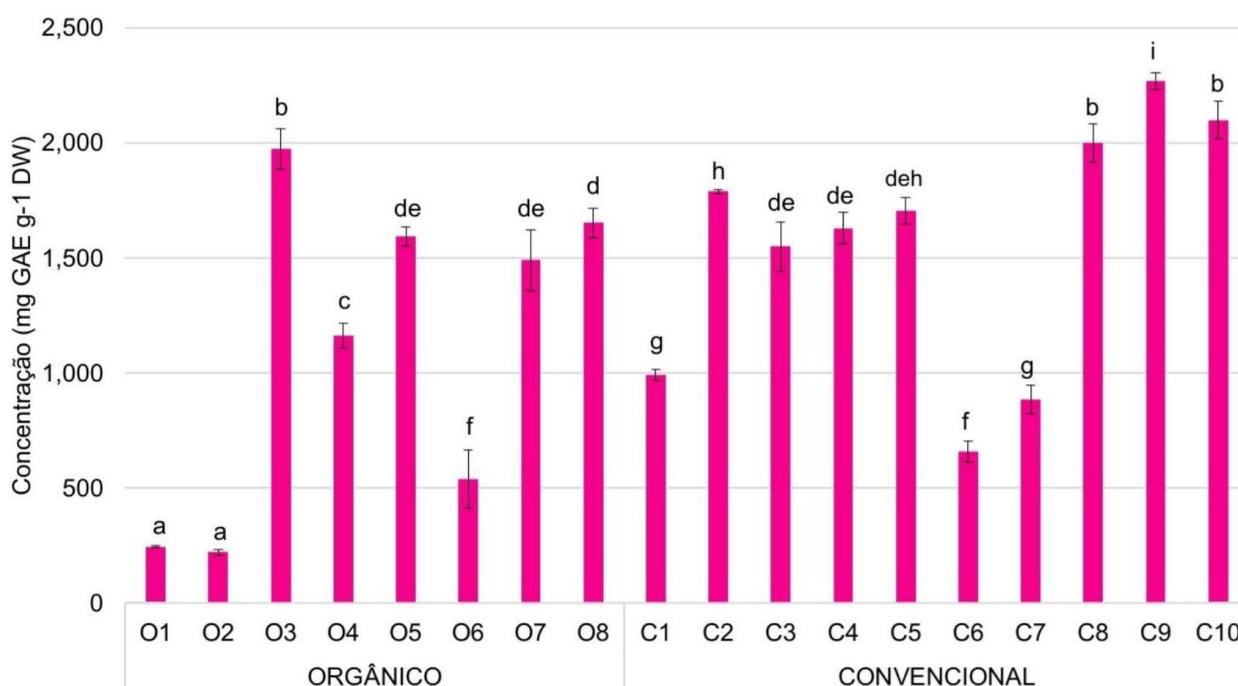


Legenda: a análise estatística comparou todas as variações de erva-mate entre si e é expressa nas letras iguais, como sendo igualdade estatística (p -valor $< 0,05$) segundo o teste t, e as letras diferentes indicam diferença estatística (p -valor $> 0,05$).

O comportamento das amostras de folhas de erva-mate orgânicas e convencionais, na fração conjugada, demonstrou que os maiores teores de compostos fenólicos estão entre as amostras convencionais (C8, C9 e C10), que foram equivalentes a orgânica O3, todas com cerca de 2000 mg GAE g⁻¹ DW. Nas concentrações entre 1500 e 1800 mg GAE g⁻¹ DW se enquadram 4 amostras convencionais (C2, C3, C4 e C5) e 3 orgânicas (O5, O7 e O8) enquanto, novamente, as amostras orgânicas O1 e O2 são reconhecidas como as que apresentam menores teores de compostos fenólicos, sendo eles de 245,81 e 221,14 mg GAE g⁻¹ DW, respectivamente, o que representa de 8 a 10 vezes menos

compostos fenólicos em comparação a amostra mais concentrada, resultados apresentados na figura 19.

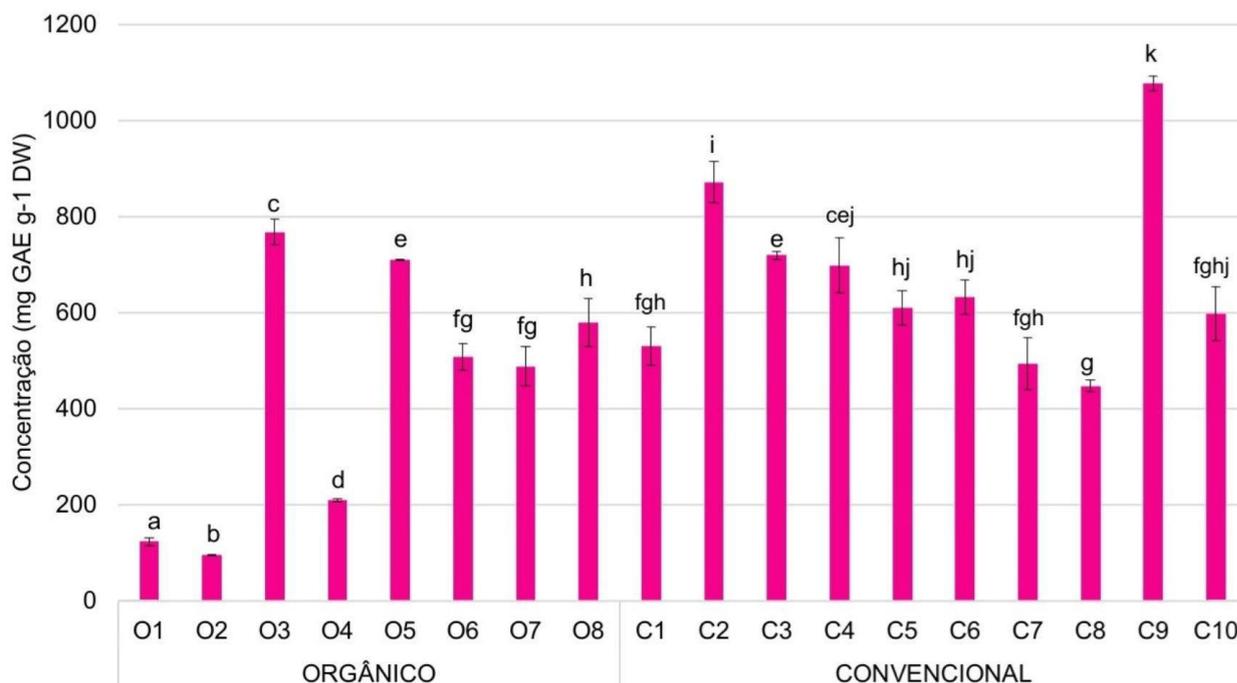
Figura 19. Fração conjugada de compostos fenólicos em folhas de erva-mate orgânica e convencional.



Legenda: a análise estatística comparou todas as variações de erva-mate entre si e é expressa nas letras iguais, como sendo igualdade estatística (p -valor $< 0,05$) segundo o teste t, e as letras diferentes indicam diferença estatística (p -valor $> 0,05$).

Os resultados para os talos da fração conjugada estão expressos na figura 20 e, assim como os da fração livre de compostos fenólicos em talos, evidenciam que há prevalência das amostras convencionais entre as mais concentradas sendo elas a convencional C9 e a C2, outro comportamento notável é a baixa concentração nas amostras orgânicas O1 e O2, que se diferenciam de todas as outras amostras estudadas com teores abaixo de $120 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$, assim como a orgânica O4, que também se distancia das demais, mas com teor de fenólicos de $210,15 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$.

Figura 20. Fração conjugada de compostos fenólicos em talos de erva-mate orgânica e convencional.



Legenda: a análise estatística comparou todas as variações de erva-mate entre si e é expressa nas letras iguais, como sendo igualdade estatística (p -valor $< 0,05$) segundo o teste t, e as letras diferentes indicam diferença estatística (p -valor $> 0,05$).

Em uma abordagem que considera as médias dos grupos de amostras observa-se, através das tabelas 04 e 05 e figura 21, que tanto para folhas quanto para talos, as médias para o grupo de amostras convencionais possuem maiores teores de compostos fenólicos em comparação ao grupo das amostras orgânicas, contudo, há expressiva variabilidade nos grupos e a análise estatística revela que não há distinção entre eles.

Tabela 04. Médias dos teores de compostos fenólicos (mg GAE g⁻¹ DW) em amostras de folhas e talos de erva-mate orgânica e convencional.

	Folhas		Talos	
	Fração Livre	Fração Conjugada	Fração Livre	Fração Conjugada
Orgânicas	305,84 ± 141,76 a	1110,03 ± 641,38 a	184,56 ± 80,49 a	435,11 ± 244,81a
Convencionais	333,68 ± 94,13 a	1557,79 ± 515,37 a	117,60 ± 79,03 a	667,60 ± 179,14 a

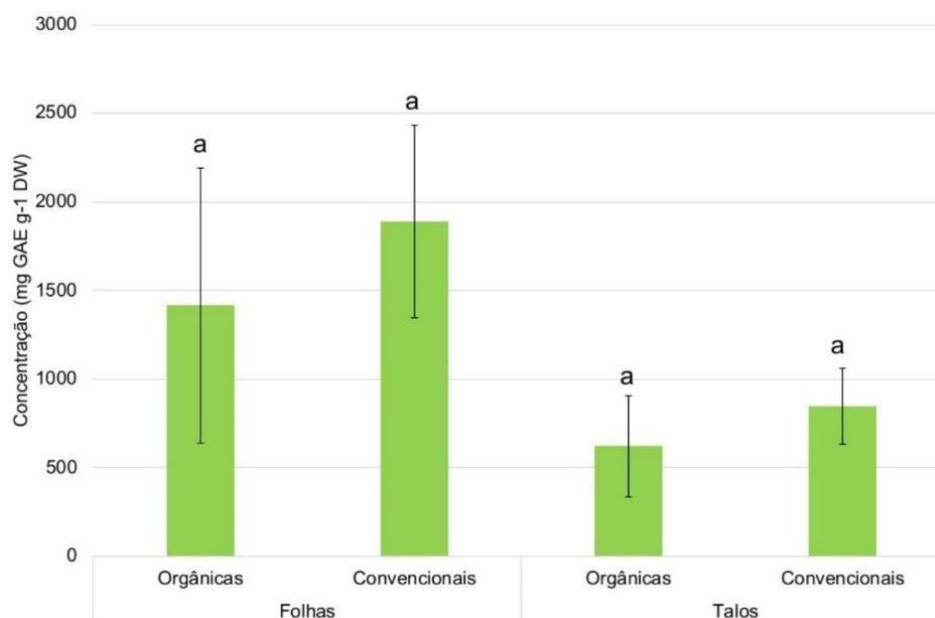
Legenda: A análise estatística avaliou a diferença entre os grupos amostrais orgânico e convencional (colunas) e foi expressa por letras iguais, que representam igualdade estatística segundo o teste t (p-valor > 0,05).

Tabela 05. Média do teor de compostos fenólicos (soma das frações em mg GAEg⁻¹ DW) em folhas e talos de erva-mate orgânica e convencional.

	Folhas	Talos
Orgânicas	1415,87 ± 776,57 a	619,66 ± 284,71 a
Convencionais	1891,48 ± 543,00 a	845,21 ± 212,63 a

Legenda: A análise estatística avaliou a diferença entre os grupos amostrais orgânico e convencional e foi expressa por letras iguais (colunas), que representam igualdade estatística segundo o teste t (p-valor > 0,05).

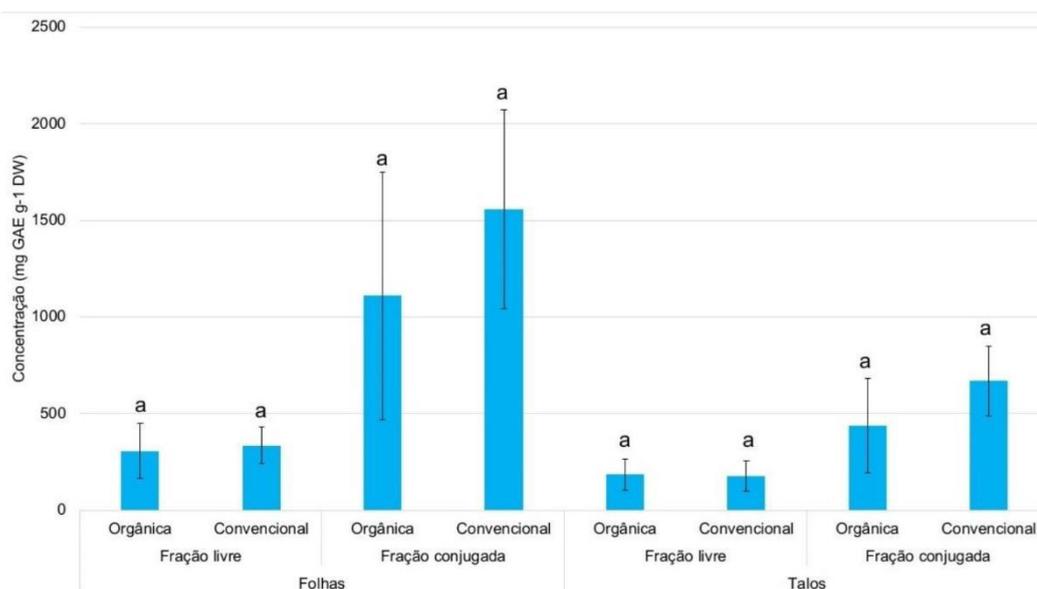
Figura 21. Média do teor de compostos fenólicos (soma das frações) em folhas e talos de erva-mate orgânica e convencional.



Legenda: A análise estatística compara os grupos orgânico e convencional, respeitando as partes da planta condizentes, e está expressa por letras iguais (a) pois, segundo o teste t, não há diferença significativa (p -valor > 0,05).

O mesmo padrão é observado quando se avalia a média dos grupos amostrais orgânico e convencional considerando a diferenciação das frações fenólicas, resultados expostos na tabela 04 e figura 22, onde o grupo de amostras convencionais apresentam concentrações maiores do que as orgânicas, com exceção da fração livre em talos que apresentou o comportamento oposto, contudo, devido a variabilidade dos grupos amostrais não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas. O que demonstra que o sistema de cultivo, por si só, pode não ser um fator determinante na síntese de compostos fenólicos em amostras de erva-mate. Tal resultado se diferencia de abordagens já feitas na literatura como, por exemplo, o trabalho de ARBOS *et al.*, 2010, no qual são relatados produtos orgânicos com maiores teores de compostos fenólicos do que os convencionais, abrindo espaço para a teorização das variáveis que podem estar associadas a modulação da síntese fenólica. Assim como, evidencia a importância de se trabalhar com um maior número de amostras de cada sistema de cultivo pois, apesar de serem notadas diferenças pontuais, os grupos não divergem devido a variabilidade.

Figura 22. Média do teor de compostos fenólicos livres e conjugados em folhas e talos de erva-mate orgânica e convencional.



Legenda: Esse gráfico evidencia a comparação entre as médias dos grupos de amostras orgânicas e convencionais nas diferentes frações (livre e conjugada) de compostos fenólicos em folhas e talos de erva-mate. A análise estatística compara os grupos orgânico e convencional, respeitando as frações e partes da planta condizentes, e está expressa por letras iguais (a) pois, segundo o teste t, não há diferença significativa (p -valor > 0,05).

Frente a esses resultados podem ser feitas algumas constatações quanto a presença dos compostos fenólicos em cada grupo de amostras, a primeira delas é que certa paridade entre as amostras orgânicas e convencionais, na fração livre, pode ser notada através de concentrações estatisticamente semelhantes entre si, não sendo adequado diferenciá-las categoricamente, um exemplo disso é a igualdade entre as amostras O2, O7, C6, C7 e C9 na fração livre de talos de erva-mate. Esses dados auxiliam a esclarecer as limitações de, concretamente, se identificar padrões no teor de compostos fenólicos na fração livre de amostras orgânicas e convencionais, tendo como exemplo a fração livre de compostos fenólicos em folhas de erva-mate orgânica que é um grupo que contém as menores (O1 e O2) e maiores (O3 e O5) concentrações, mesmo em comparação com as convencionais, dificultando a diferenciação do comportamento entre amostras orgânicas e convencionais. Um padrão reforçado ao se avaliar as médias dos grupos amostrais, que não diferiram estatisticamente.

A fração conjugada demonstra comportamento semelhante, havendo paridade estatística entre algumas amostras orgânicas e convencionais, como por exemplo entre as folhas orgânicas O5, O7 e O8 e as convencionais C3, C4 e C5. Também é possível perceber que existem alguns padrões entre as amostras mais e menos concentradas que, tanto para as de folhas quanto para as de talos as ervas convencionais se sobressaem na concentração de compostos fenólicos, enquanto que os menores teores são encontrados nas amostras orgânicas. Essa descoberta é interessante pois demonstra a importância da fração conjugada de compostos fenólicos em diferenciar o comportamento de amostras orgânicas e convencionais, uma abordagem que normalmente não é vista nos trabalhos que avaliam compostos fenólicos em produtos oriundos desses sistemas de cultivo e mantém seus estudos apenas pelas metodologias tradicionais, que não diferem a fração livre da fração conjugada de compostos fenólicos. Fato que pode enfraquecer a correspondência da discussão com a real presença dos fenólicos na matriz alimentícia, uma vez que na forma conjugada os compostos fenólicos dificilmente são determinados no método de Folin-Ciocalteu, como discutido anteriormente, devido sua associação com macromoléculas que leva à ausência de grupamentos OH livres para a formação de um ânion com potencial redutor, capaz de reduzir o reagente de Folin, permitindo a determinação pelo método (CICCO *et al.*, 2009; PIRES *et al.*, 2017).

Alguns trabalhos da literatura indicam que há prevalência de compostos fenólicos em amostras orgânicas e dentre as frações estudadas no presente trabalho, e mesmo com a soma destas (figura 14), é possível perceber que algumas amostras orgânicas de fato apresentam altos níveis de compostos fenólicos em comparação outras convencionais, um exemplo são as folhas e talos da amostra orgânica O3 em comparação com as folhas e talos da amostra convencional C1. Esse comportamento condiz com trabalhos como o de RIGUEIRA *et al.*, 2016, em que as folhas de couve manteiga (*brassica oleracea l. var. Acephala*) expostas a calor úmido contém maior teor de compostos fenólicos totais quando oriundas de cultivo orgânico (212,7 mg GAE/100mg) do que de cultivo convencional (182,5 mg GAE/100g) e o mesmo padrão foi notado nos talos crus (orgânico: $134,7 \pm 9,18$ mg GAE 100 g^{-1} DW e convencional: $83,7 \pm 8,8$) e expostos a calor úmido (orgânico: $158,3 \pm 28,9$ mg GAE 100 g^{-1} DW e convencional: $91,3 \pm 10,3$). Em outro estudo, ARBOS *et al.*, 2010, descreve que os teores de fenólicos em alface, almeirão e rúcula orgânicos

também são superiores (de 92,12 à 108,72 mg GAE 100 g⁻¹ DW) ao das amostras convencionais (de 81,04 à 91,22 mg GAE 100 g⁻¹ DW), e no trabalho de PONDER e HALLMANN (2019) os autores relataram o mesmo comportamento em amostras de framboesas cultivadas em sistema orgânico quando comparada com as cultivadas em sistema convencional.

Outro trabalho pertinente é o de FALLER e FIALHO (2010), em que os autores avaliaram o teor de fenóis solúveis e hidrolisáveis em amostras de frutas e vegetais e relatam que os alimentos orgânicos tendem a possuir maior teor de fenóis e atividade antioxidante proporcional. Entretanto, esse comportamento não é unânime e em algumas das amostras estudadas pelos autores, como por exemplo, os vegetais batata, brócolis, tomate, repolho branco; e as frutas maçã, manga e tangerina, não houve diferença estatística entre os produtos de origem orgânica e convencional, assim como foi observado para boa parte das amostras de erva-mate estudadas no presente trabalho para as médias de seus grupos amostrais, e as folhas de hortelã-pimenta e sálvia, estudadas por KAZIMIERCZAK *et al.*, 2014. Complementarmente, o estudo de ameixa amarela (*Prunus domestica L.*) indicou maiores teores de compostos fenólicos em amostra de cultivo convencional (122 mg tann.ac 100 g⁻¹ DW) do que as amostras de cultivo orgânico (88 mg tann.ac 100 g⁻¹ DW). Assim como as plantas medicinais: tomilho, hortelã e a chamada “*dropsy plant*”, também apresentaram maiores teores de compostos fenólicos em cultivo convencional (206,56; 506,53 e 724,84 mg de ácidos fenólicos 100 g⁻¹, respectivamente) quando comparadas as orgânicas (124,78; 216,64 e 34,01 mg de ácidos fenólicos 100 g⁻¹, respectivamente) (LOMBARDI-BOCCIA *et al.*, 2004).

Algumas abordagens relatadas na literatura corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, isso porque fundamentam discussões capazes de explicar comportamentos pontuais, como a característica de algumas amostras de erva-mate convencional apresentarem teor de compostos fenólicos maior do que as orgânicas e vice-versa, assim como ajuda a explicar a variabilidade observada nas médias dos grupos amostrais. Uma delas está fundamentada na importância do N nos solos e a sua capacidade de limitar o crescimento e interferir no desenvolvimento vegetal, essa abordagem é chamada de teoria do balanço de C:N, que tenta explicar a prevalência dos compostos carbonados (incluindo os compostos fenólicos) com base na disponibilidade de N presente no solo, de modo que, quanto menor a disponibilidade de N, maior será a síntese de compostos

carbonados (compostos fenólicos), proporcionalmente ao tamanho do vegetal (HATTAS *et al.*, 2017 e KAZIMIERCZAK *et al.*, 2014). O que pode ser uma explicação cabível para a maioria das amostras oriundas de cultivo orgânico, que não tem seus solos fertilizados sinteticamente com o N, o que resultaria em maiores teores de compostos fenólicos.

Contudo, essa explicação não parece abranger o comportamento observado para o perfil fenólico das amostras convencionais estudadas nesse trabalho, uma vez que seus teores foram expressivos, superando algumas amostras orgânicas, bem como apresentaram médias superiores às mostras orgânicas, ainda que sem diferença estatística, na maioria dos casos apresentados. Nesse caso, a biodisponibilidade de N no solo convencional possivelmente está relacionada ao crescimento e produção de metabólitos nitrogenados como as proteínas, alcaloides e aminoácidos, o que fornece os produtos para a síntese de fenólicos, através do aminoácido fenilalanina, podendo intensificar essa via. Além disso, algumas evidências demonstram que considerar apenas a teoria de balanço de C:N não é suficiente para sustentar os resultados em alguns casos, pois fatores combinantes, como por exemplo, condições de estresse biótico ou abiótico, podem ser capazes de ativar as vias de síntese de fenólicos para defesa dos tecidos vegetais (HATTAS *et al.*, 2017, FALLER e FIALHO, 2010, RAHMAN *et al.*, 2021).

Nesse sentido, FALLER e FIALHO (2010) discutem que quando as plantas estão expostas a situações estressoras há tendência de o metabolismo secundário ser estimulado, incentivando a síntese de fenólicos. Um mecanismo para que esse cenário seja real é a através da enzima fenilalanina amônia liase (PAL, do inglês, "*Phenylalanine ammonia lyase*") que se relaciona com o aminoácido fenilalanina para a síntese de ácidos hidroxicinâmicos, prevalência na erva-mate segundo BIZZOTTO *et al.*, (2012). Tais situações estressoras podem ser causadas por fatores bióticos como o ataque de patógenos e insetos, causando infecções, proliferações fúngicas ou herbivoria, como discutido nos trabalhos de HATTAS *et al.*, 2011 e HANLEY *et al.*, 2007, em que são estudados mecanismo de proteção contra estresse biótico (herbivoria) e os resultados demonstram correlação com o teor de fenólicos, de modo que a síntese de compostos fenólicos é intensificada como forma de aumentar as defesas contra herbivoria. Esse comportamento não é previsto na hipótese de balanço de C:N, entretanto, também é condizente com uma característica do sistema de cultivo orgânico, em que a ausência de agrotóxicos torna as árvores mais

susceptíveis a ataques bióticos e, correspondentemente, estimula a síntese de fenólicos, incrementando suas defesas. Cabe ressaltar que os estresses ambientais transcendem a característica de sistema de cultivo e podem ser observados em ervais orgânicos e convencionais, o que pode explicar a variabilidade entre os grupos orgânico e convencional.

FRIZON *et al.*, 2015 também trabalharam com amostra de erva-mate de diferentes regiões e características e seus resultados demonstraram que a região de melhor rendimento de massa foliar da *I. paraguariensis* também foi a de menores teores de compostos fenólicos (37,0 mg GAE/g), que a erva-mate cultivada à pleno sol resultou em teores de fenólicos intermediários (84,82 mg GAE/g), mas essas amostras foram as únicas para as quais foram relatados tratamento pós colheita (exposição a temperaturas de 100 a 110°C durante 4-6 horas), que são condições passíveis de alterar a concentração dos fenólicos (BASTOS *et al.*, 2006). FRIZON *et al.*, (2015) ainda relata que o cultivo consorciado apresentou melhor rendimento desses compostos (133,31 mg GAE/g), o que foi relacionado com o trabalho de COELHO e MARIATH (1996), aonde a erva-mate cultivada sobre sombreamento rendeu maiores teores de fenólicos pois a ausência do estresse exercido pela radiação UV permitiu a intensificação das defesas contra insetos, através do incremento nas concentrações de fenólicos. Em contraponto, HECK *et al.* (2008), descreve que as condições de cultivo a pleno sol (com maior incidência de radiação UV) elevou teor de compostos fenólicos em comparação ao cultivo consorciado. Não há relatos quanto a exposição à radiação UV para as amostras estudadas no presente trabalho, mas há possibilidade das amostras mais concentradas, tanto orgânicas quanto convencionais, serem resultado da exposição a esta condição, que não é específica do manejo orgânico ou convencional, e explicaria as altas concentrações entre as amostras de diferentes sistemas de cultivo, assim como a homogeneidade no teor de compostos fenólicos para certas amostras, principalmente na fração livre.

Ainda sobre as diferenças no manejo, que extrapolam o sistema de cultivo orgânico e convencional, BASTOS *et al.*, (2006) contribui com a literatura demonstrando uma discussão interessante quanto a diferenciação dos ácidos clorogênicos em amostras de ervais plantados e ervais nativos e seus resultados demonstraram que os ervais plantados para cultivo apresentaram maiores teores de compostos fenólicos totais (376.5 ± 24.2 ; 357.1 ± 73.7 e 447.1 ± 31.0 μg de ácido

clorogênico mL⁻¹ de infusão aquosa de erva-mate), em comparação com os ervais nativos (320.3 ± 51.5; 245.4 ± 8.7 e 258.6 ± 31.2 µg de ácido clorogênico mL⁻¹ de infusão aquosa de erva- mate), nas regiões de Paulo Frontin (PR), Cascavel (PR) e Santa Maria (RS). O que pode ser mais uma característica que se dissemina entre as amostras orgânicas e convencionais, de modo a dificultar o delineamento do perfil fenólico com base na informação de que o produto é oriundo do sistema de cultivo orgânico e convencional.

Outro seguimento lógico que pode estar associado com a disparidade encontrada entre as amostras é a relação da proteção exercida pelos fenólicos em órgãos não estudados nessas amostras, voltando-se a atenção para as raízes da erva-mate. Em BERGOTTINI *et al.*, (2016) é feita análise e descrição de diversas comunidades de fungos e bactérias em raízes de erva-mate e os autores descrevem que é possível que a microbiota do solo haja de forma benéfica para planta. Entretanto, pode haver casos em que os micro- organismos atuem de forma patogênica sobre o vegetal, o que ocorreu em uma das regiões estudadas na qual se identificou bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes*, nas raízes de uma monocultura de erva-mate com baixo rendimento, essas bactérias são conhecidos por desencadear doenças em plantas, e podem estar associados com intenso estresse biótico sofrido pelo erval, reduzindo a sua produtividade. As estratégias de cultivo orgânico não dependem do uso de bactericidas para eliminar esses organismos do solo e evitar o estresse e já é sabido das características dos fenólicos quanto a proteção de patógenos, logo, nesse cenário pode haver mobilização do metabolismo de síntese fenólica intensificado nas raízes, e não nas folhas ou talos, como os órgãos analisados no presente trabalho.

5.6 FRAÇÕES DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE.

Como visto até então, o fracionamento auxilia na diferenciação do comportamento de fenólicos em erva-mate orgânica e convencional e a fração conjugada é esclarecedora quanto a nitidez desses comportamentos, isso por que a fração livre de folhas e talos de erva-mate se mostrou homogênea quanto a

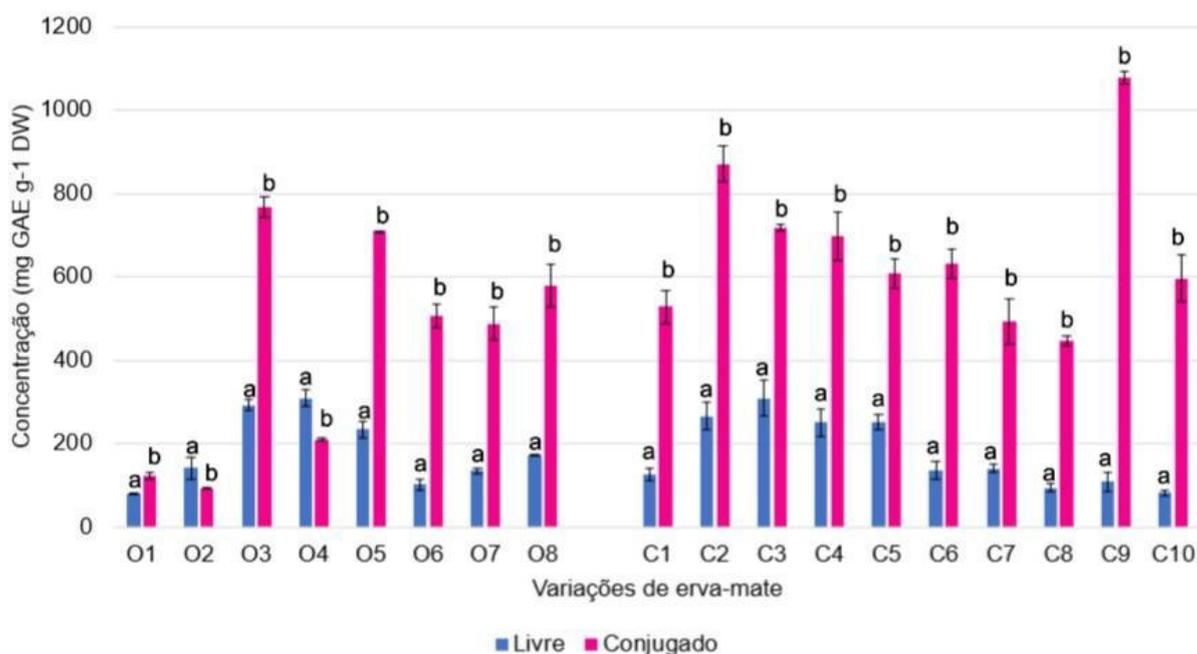
distribuição das concentrações entre os grupos orgânico e convencional, enquanto que, ao se observar a fração conjugada, é perceptível que as maiores concentrações estão, principalmente, entre as amostras convencionais, e as menores concentrações, principalmente, entre as amostras orgânicas. Além disso, as figuras 23 e 24 foram elaboradas a partir dos dados da tabela 04 para evidenciar, de forma mais objetiva, a comparação entre as frações livre e conjugada nas diferentes amostras de erva-mate e esses resultados demonstram que o principal comportamento para folhas e talos é a prevalência dos fenólicos na fração conjugada, com exceção dos talos das amostras de orgânicas O2 e O4, que tiveram comportamento inverso, no qual a fração livre apresentou concentração maior ($142,32 \pm 26,46$ e $310,32 \pm 21,03$ mg GAE g⁻¹ DW, respectivamente) do que a conjugada ($94,73 \pm 0,77$ e $210,15 \pm 3,35$ mg GAE g⁻¹ DW).

Figura 23. Compostos fenólicos livres e conjugados em folhas de erva-mate orgânica e convencional.



Legenda: a análise estatística foi aplicada para comparação direta entre a fração livre e conjugada de cada amostra, individualmente. Letras iguais indicam igualdade estatística segundo o teste t (p -valor > 0,05) e letras diferentes indicam diferença estatística (p -valor < 0,05).

Figura 24. Compostos fenólicos livres e conjugados em talos de erva-mate orgânica e convencional.



Legenda: a análise estatística foi aplicada para comparação direta entre a fração livre e conjugada de cada amostra, individualmente. Letras igual indicam igualdade estatística segundo teste t (p -valor > 0,05) e letras diferentes indicam diferença estatística (p -valor < 0,05).

O comportamento observado por LI *et al.*, (2020) ao comparar a hidrólise ácida e a extração com solvente orgânico para amostras de polpa de maçã foi: a extração com metanol separada da extração utilizando a hidrólise ácida resultaram no mesmo teor de compostos fenólicos totais (cerca de 5,55 mg GAE g⁻¹ DW) entretanto, ao combinar as duas formas de extração em um procedimento sequencial, como o utilizado no presente trabalho, em que a hidrólise ácida é aplicada na fase aquosa após a extração com o solvente orgânico, com o intuito de liberar os fenólicos conjugados, a igualdade das frações não é comum e o teor de fenólicos se eleva com a soma de ambas, devido aos compostos fenólicos fracionados pela hidrólise ácida. Para as amostras de polpa de maçã a fração conjugada obtida do processo de fracionamento é inferior a fração livre, assim como o comportamento observado nos talos das amostras orgânicas O2 e O4, o que pode ser decorrente da presença significativa de flavonoides, como a rutina, na fração conjugada, que já foram comprovadamente degradados em condições ácidas para amostras de erva-mate (BIZZOTTO *et al.*, 2012). Esse comportamento parece estar associado com

uma característica da hidrólise ácida que, apesar de estabelecer a liberação dos fenólicos em alguns casos também pode ser a causadora de sua degradação, fato que foi observado nos resultados de LI *et al.*, (2020), onde evidenciou-se perda de rutina e glicosídeos de flavonoides, especificamente da quercetina, ao mesmo passo que otimizou a extração de ácido protocatecuico e o ácido 4- hidroxibenzoico. Essa discussão evidencia um fato interessante que se relaciona com os padrões dos compostos fenólicos obtidos em diferentes extratos, associados ao ambiente ácido, de forma a intensificar a extração de ácidos fenólicos, em especial os ácidos hidroxibenzoicos.

Essa relação se firma com base no trabalho de BIZZOTTO *et al.*, (2012), em que extratos feitos a partir de variedades da *Ilex paraguayensis* foram expostos a hidrólise ácida e o teor de rutina (flavonoide), ácido cafeico (ácido hidroxicinâmico) e ácido 3,4-dihidroxibenzoico (ácido hidroxibenzoico) foram determinados antes e pós o procedimento hidrolítico. Os autores descobriram a presença de dois dos compostos antes da hidrólise sendo eles a rutina e o ácido cafeico, com concentrações de 343,55 a 516,74 mg 100 g⁻¹ DW e 3,77 a 7,58 mg 100 g⁻¹ DW, respectivamente, e após a hidrólise, os teores de rutina foram reduzidos a zero e a concentração do ácido cafeico se elevou consideravelmente, passando a estar entre 443,14 e 737,49 mg 100 g⁻¹ DW enquanto as concentrações de ácido 3,4-dihidroxibenzoico apareceram entre 22,61 e 35,59 mg 100 g⁻¹ DW. Os próprios autores discutem a presença dos compostos fenólicos associados a açúcares e que as suas interações podem 'esconder' parte dos fenólicos em extratos não hidrolisados, tornam claro que a hidrólise ácida alterou o perfil de fenólicos do extrato, reduzindo a presença de rutina e aumentando a concentração dos ácidos fenólicos, o que corrobora com as discussões quanto a liberação dos fenólicos conjugados perante o meio ácido. Dessa forma, um balanço diferenciado desses compostos pode explicar o comportamento divergente observado nas amostras orgânicas O2 e O4, considerando que haja mais flavonoides passíveis de serem degradados pelo procedimento hidrolítico, assim como pode ser fundamento para explicar o motivo pelo qual todas as folhas e a maioria dos talos de erva-mate possuem a fração conjugada mais concentrada do que a livre, uma vez que essas amostras podem ser representadas, principalmente, por ácidos fenólicos, como os ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzoicos, que tem sua extração favorecida no ambiente ácido.

A partir dos resultados gerado no presente trabalho, nota-se que há prevalência da fração conjugada em comparação com a fração livre e esse fato ainda pode ser relacionado com as evidências de DE MELO *et al.*, (2020), que relatam expressiva presença de diferentes tipos de carboidratos em amostras de erva-mate e se combinam com as informações de JAKOBEK (2015), que relata a interação dos compostos fenólicos com essas biomoléculas, de forma que estes estabelecem interações com carboidratos, como a pectina e celulose, formadores da parede celular, assim como fibras alimentares e açúcares solúveis. Que os mantém retidos na matriz vegetal de forma insolúvel (parede celular) ou solúvel conjugada (glicosídeos), e em ambos os casos os fenólicos se tornam indisponíveis para determinação e nesse sentido, a hidrólise ácida age eficientemente, pois associações, como as interações de hidrogênio e ligações covalentes (ésteres e ligação glicosídica), que geram essas conjugações mencionadas, podem ser rompidas com a sua ação, liberando os fenólicos no extrato e favorecendo uma determinação mais condizente com a sua presença na matriz (WANG *et al.*, 2020).

Outro fator relevante a ser considerado é a prevalência de cada grupo fenólico nas amostras, assim como discutido por BASTOS *et al.*, (2007), que menciona a presença dos ácidos clorogênicos em erva-mate, e descreve que o primeiro relato de algum ácido fenólico em suas folhas se deu na década de 1930, com a identificação do ácido cafeico, a partir da hidrólise de um composto conhecido como "*coffetannin*". O ácido cafeico pode assumir a posição de monômero para a formação dos ácidos clorogênicos, mais especificamente o ácido cafeoilquínico e esse conjunto de ácidos pertence ao grupo de ácidos hidroxicinâmicos, e são formas conjugadas destes com ácido quínico (ácido hidroxibenzoico) que, em erva-mate se apresentam nas formas: ácido p-coumaroilquínico; ácido cafeoilquínico e ácido feruloilquínico, podendo ainda ser identificados como ácido clorogênico, neoclorogênico e cripto-clorogênico. O que explicaria o aparecimento dos ácidos hidroxibenzoicos apenas após a hidrólise ácida aplicada nos extratos de BIZZOTTO (2012) e também justifica o aumento na concentração de ácidos hidroxicinâmicos pois, sem a hidrólise é possível que estes compostos se mantivessem na forma conjugada. Extrapolando essa discussão para o fracionamento aplicado e os resultados obtidos e considerando

que os ácidos clorogênicos são os fenólicos mais encontrados em erva-mate, assim como glicosídeos diversificados (VIEIRA et al., 2008; JUNIOR e MORAND, 2016 e KALTBACH *et al.*, 2020) é possível indicar a hidrólise ácida como atuante na soltura dessas formas conjugadas, fazendo sentido que a concentração de compostos fenólicos seja elevada na fração conjugada.

Em termos tecnológicos a descoberta do procedimento de fracionamento como uma estratégia capaz de aumentar a extração de compostos fenólicos, como visto no presente trabalho, pode ser de grande valia, uma vez que os compostos fenólicos estão relacionados com o tratamento e prevenção de diversas doenças e sintomas, como o câncer, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e obesidade, além de apresentarem alto poder antioxidante, que pode ser aproveitado pelas indústrias de alimentos e cosméticos. Os compostos fenólicos também possuem biocidas, prebiótica podendo ser aplicados em formulações de alimentos, como estabilizantes, e até mesmo na síntese de nano materiais (ARANVID *et al.*, 2021; BRITO *et al.*, 2022). De modo geral, são compostos bioativos de grande valor tecnológico, sendo requisitados em diversos setores industriais como por exemplo, a indústria de fármacos e cosméticos, têxtil, de embalagens e alimentos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020)

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho traz abordagens inovadoras em termos da avaliação de compostos fenólicos em amostras de erva-mate provenientes de diferentes sistemas de cultivo (orgânico e convencional) sob a perspectiva de uma metodologia emergente para a obtenção de tais compostos fenólicos, o fracionamento, e ainda aborda esse fracionamento de compostos fenólicos em diferentes partes da planta que compõem o produto comercializado (folhas e talos). Conclui-se com esse estudo que as folhas de erva-mate são mais concentradas de compostos fenólicos do que os talos. Que o fracionamento é uma estratégia promissora para a extração de compostos fenólicos, permitindo a liberação de compostos polimerizados ou associados a outras macromoléculas e, a partir desse efeito, permite a separação dos compostos fenólicos livre dos conjugados, permitindo determinações mais condizentes com a concentração desses componentes nas amostras estudadas e revelando que a fração conjugada é a que possui maiores teores de compostos fenólicos para a maioria das amostras estudadas.

Além disso, o fracionamento auxiliou a visualização do comportamento dos compostos fenólicos em amostras orgânicas e convencionais de erva-mate, as quais se mostraram mais homogêneas na fração livre, mas, certo padrão foi notado na fração conjugada, em que as amostras convencionais tenderam a ser mais concentradas enquanto as orgânicas expressaram concentrações mais baixas de compostos fenólicos. A ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos amostrais “orgânico” e “convencional” demonstra que o sistema de cultivo é um fator com pouca influência nessa diferenciação, sendo possível que o manejo de ervais sobre condições estressoras (bióticas e abióticas) o sobreponham.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-ESTRADA, B.A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J.A. e; SERNA-ALDÍVAR, S.O. Bound phenolic in food, a review. **Food chem.** 152. 46-55. 2014. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.093

ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **J. of Ethnopharmacology.** 20(2). 121-144. **1987**. DOI: 10.1016/0378-8741(87)90084-5

ANKU, W.W.; MAMO, M.A. e; GOVENDER, P.P. Phenolic compounds in water: sources, reactivity, toxicity and treatment methods. **Phenolic Compounds: Natural Sources, Importance and Applications - Chapter 17.** **2017**. DOI: 10.5772/66927

ARANVID, M.S.; WICHENCHOT, S.; TSAO, R.; RAMAKRISHNAN, S.; CHAKKARAVARTHI, S. Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefit. **Food Res. J.**, 142, 110189. **2021**. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110189

ARAÚJO, F.F., FARIAS, D.P., NERI-NUMA, I.A. e; PASTORE, G.M. Polyphenols and their applications: an approach in food chemistry and innovation potential. **Food Chem.** v. 338, p. 127535. **2021**. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127535.

ARBOS, K.A.; FREITAS R.J.S.; STERTZ, S.C. e; DORNAS, M.F. Atividade antioxidante e tere de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. **Ciencia e Tecnol de Alim.** 30(2). 501-506. **2010**. DOI: 10.1590/s0101 206120100002.

ARNOSO, B.J.M.; COSTA, G.F. e; SCHIMIDT, B. Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. **Nutri. Bras.** 18(1). 39-48. **2019**. DOI: 10.33233/nb.v18i1.1432

ASAMI, D.K.; HONG, Y.; BARRETTM D.M e ; MITCHELL, A.E. Comparison of the Total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. **J. Agric. Food Chem.** 51. 5. 1237-1241. **2003**. DOI: 10.1021/jf020635c

BASTOS, D.H.M., FORNARI, A.C., QUEIROZ, Y.S e TORRES, E.A.F.S. Bioactive Compounds Content of Chimarrão Infusions Related to the Moisture of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) Leaves. **Braz. Arch. Biol. Technol.** V. 49, n. 3, p. 399-404, **2006**.

BASTOS, D.H.M., OLIVEIRA, D.M., MATSUMOTO, R.L.T., CARVALHO, P.de O. e RIBEIRO, M.L. Yerba maté: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. **Med. Aromat. Plant. Sci. Biotechnol.** V. 1, n. 1, p. 37-46, **2007**.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, VP.R. e; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceitos, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.** 23. 4. **2010**. DOI: 10.1590/S1415-52732010000400013

BERGOTTINI, V.M.; HERVÉ, V.; SOSA, D.A.; OTEGUI, M.B.; ZAPATA, P.D. e; JUNIER, P. Exploring the diversity of the root-associated microbiome of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Yerba Mate). **App. Soil Ecol.** 109. 23-31. **2017**. DOI:10.1016/j.apsoil.2016.09.013

BIZOTTO, C.S.; MIENHART, A.D.; RYBKA, A.C.P.; SOBRINHO, M.R.; JUNIOR, S.B.; BALLUS, C.A. e GODOY, H.T. Quantification of phenolic compounds by capillary zone electrophoresis in extracts of four commercial types of mate herb before and after acid hydrolysis. **Food Res. Int.** 48(2). 763-768. 2012. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.06.020

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 302, de 07 de novembro de 2002. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade para erva-mate. Brasília. 05p. 2002. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0302_07_11_2002.html>. Acesso em: fevereiro/2021

BRASIL. Lei nº 10.831, de 24 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 dez. 2003. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/2003/L10.831.htm#:~:text=LEI%20No%2010.831%2C%20DE%2023%20DE%20DEZEMBRO%20DE%202003.&text=Regulamento.,Art.>. Acesso em: fevereiro/2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 277, de 25 de setembro de 2005. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. Brasília, 04p. 2005. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/anexo/anexo_res0277_22_09_2005.pdf>. Acesso em: fevereiro/2021.

BRASIL. Decreto de regulamentação da produção orgânica. 2007. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2007/Decreto/D6323.htm>. Acesso em: fevereiro/2021.

BRAVO, L.; GOYA, L. e; LEMCUMBERRI, E. LC-MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hill) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Res. Int.** 40(3). 393-405. **2007**. DOI: 10.1016/j.foodres.2006.10.01

BUTIUK, A.P.; MARTOS, M.A.; ADACHI, O e; HOURS, R.R. Study of the chlotogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hill): Effect of plant fraction, processing step and harvesting season. **J. App. Res. Med. Aromat. Plants.** 3(1). 27-33. **2016**. DOI: 10.1016/j.jarmap.2015.12.003

CARBONELL-CAPELLA, J.M.; BUNIEWSKA, M.; BARBA, F.J.; ESTEVES, M.J. e; FRÍGOLA, A. Analytical Methods of Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.** 13(2). 155-171. **2014**. DOI: 10.1111/1541-4337.12049

CARTEA, M.E.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P. e; VELASCO, P. Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. **Molecules.** 16(1). 251-280. **2011**. DOI: 10.3390/molecules16010251

CICCO, N. L.; M.T., PARAGGIO, M. e; LATTANZIO, V. A. reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. **Microchemical J.** V. 91. p. 107-110. **2009**. DOI: 10.1016/j.microc.2008.08.011

CLIFFORD, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. **J. Sci. Food Agricult**, v. 79. n. 3. p 362–372, **1999**. DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990301\)79:3%3C362::AID-JSFA256%3E3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3%3C362::AID-JSFA256%3E3.0.CO;2-D)

COELHO, G.C. e ; MARIATH, E.A. Inflorescences morphology of *Ilex* L. (Aquifoliaceae) species from Rio Grande do Sul, Brazil. **J. Botan. Tax. Geobot.** 107. 1-2. **1996**. DOI: 10.1002/fedr.19961070104

CONDEZO-HOYOS, L.; GAZI, C. e; PÉREZ-JIMÉNES, J. Design of polyphenol rich diets in clinical trials: A systematic review. **Food Res. Int.** 149. 110555. **2021** DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110655.

CORBIN *et al.* Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum L.*) seeds. **Ultrason. Sono chem.** v. 26. p 176–185. 2015. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2015.02.008

CORNELIS, R.; CREWS, H.; CARUSO, J.; HEUMANN, K.G. Handbook of Elemental Speciation II: Species in the Environment, Food Medicine & Occupational Health. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, **2005**, 1-768.

CROZIER, A.; JAGANATH, I.B. e; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nat. Prod. Rep.** 26(8). **2009**. DOI:10.1039/b802662a

DAS, N.; ISLAM, M.E.; JAHAN, N.; ISLAM, M.S.; KHAN, A. e; ISLAM, M.R. Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. **BMC Comp. Altern. Med.** 14. 45. 1472-6882. **2014**. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/45>

DEL BAÑO, M.J.; LORENTE, J.; CATILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; DEL RÍO, J.A.; ORTUÑO, A. e GERARD, D. Phenolic diterpenes, flavones and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, Flowers, stems and roots of *Rosmarinus officinalis* antioxidante activity. **J. Agric. Food Chem.** 51(15). 4247-4253. **2003**. DOI: 10.1021/jf0300745

DELADINO, L.; ANBINDER, P.S.; NAVARRO, A.S. e; MARTINO, M.N. Encapsulation of natural antioxidante extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbo. Polym.** 0144-8617. **2007**. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.05.030.

DE MELO, T.O; MARQUES, F.A.; WENDLING, I.; ERBAN, A e; HANSEL, F.A. Compostos presentes em exttayos metanólicos de tecido foliar de erva-mate, por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **EMBRAPA - Comunicado técnico nº458**. **2020**. ISSN 1980-3982.

DONADUZZI, C. M.; CARDOZO JR., E. L.; DONADUZZI, E. M.; SILVA, M. M.; STURION, J. A. e; CORREA, G. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênes de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em três municípios do Paraná. *Cienc. Unipar.* 2000.

DZAH, C.S.; DUAN, Y.; ZHANG, H.; SERWAH, N.A.B. e; MA, H. Latest developments in polyphenol recovery and purification from plant by-products: a review. **Trend Food Sci. Technol.** **2020**. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.03.003

EFING, L. C.; CALIARI, T. K.; NAKASHIMA, T. e DE FREITAS, R. J. S. Caracterização química e capacidade antioxidante da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Boletim Do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos.** 27(2). **2009**. DOI:10.5380/cep.v27i2.22034

EIBL, B.I.; MONTAGNINI, F; LÓPEZ, M.A.; LÓPEZ, L.N.; MONTECHIESI, R e; ESTERCHE, E. Organic yerba mate, *Ilex paraguariensis*, in association with native species: a sustainable production alternative. **Integ. Land.: Agrof. Biodiv. Conserv. Food Sov.** 261-281. **2017**. DOI: 10.1007/978-3-319-69371-2

ESTEVES, R.C.; VENDRAMINI, A.L.A. e; ACCIOLY, F. A qualitative meta- synthesis study of the convergence between organic crop regulations in the United States, Brazil, and Europe. **Trends in Food Sci. Technol.** 107. 343-357. **2021**. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.10.044

FALLER, A.L.K. e FIALHO, E. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. **J Food Compost Anal.** V. 23, p. 561-568, **2010**. DOI: 10.1016/j.jfca.2010.01.003

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GILBERTI, G.; COUSSIO, J e; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American Ilex species. **Fitoterapia**. 72(7). 774-778. **2001**. DOI: 10.1016/s0367-326x(01)0033

FRIEDMAN, M., KOZUKUE, N., KIM, H-J., CHOI, S-H. e MIZUMO, M. Glycoalkaloid, phenolic, and flavonoid content and antioxidative activities of conventional nonorganic and organic potato peel powders from commercial gold, red, and Russet potatoes. **J Food Compost Anal**. V. 62, p. 69-75, **2017**. DOI: 0.1016/j.jfca.2017.04.019

FRIZON, C.N.T. et al. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (Ilex paraguariensis) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **Food Sci. And Tec**. V. 60, p. 795-801, **2015**. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.10.030

GAO, Y.; WANG, D.; BA, L.; BAI, Y. e; LIU, B. Interactions between herbivory and resource availability on grazing tolerance of *Leymus chinensis*. **Environ. Experim. Botany**. 63(1-3). 113–122. **2008**. DOI:10.1016/j.envexpbot.2007.10.030

GARAMBONE, E. e; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico a saúde. **Alim. Nutr**. 18. 2. 229-235. **2007**. ISSN 0103-4235

GAWRON-GZELLA, A.; CHANAJ-KACZMAREK, J. e; CIELECKA-PIONTEK, J. Yerba mate - A long but current history. **Nutrients**. 13(11). 3706. **2021**. DOI: 10.3390/nu13113706

GERBER, T.; NUNES, A; MOREIRA, B.R. e; MARASCHIN, M. Yerba mate (Ilex paraguariensis A. St.-Hil.) for new therapeutic and nutraceutical interventions: A review of patents issued in the last 20 years (2000–2020). **Phytother Res**. **2022**. DOI: 10.1002/ptr.7632

GERHARDT, M. História ambiental da erva-mate. Florianópolis SC, **2013**.

GOULART, I.C.G.R.; SANTIN, D. e; BRASILEIRO, B.P. Fatores que afetam a produtividade na cultura da erva-mate. **Cienc. Florest**. 32. 3. 1345-1367. **2022**. DOI: 10.5902/1980509863661

GONZÁLEZ-CENTENO, M.R.; JOURDES, M.; FEMENIA, A.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C. e; TEISSEDRE, J.P. Proanthocyanidin Composition and Antioxidant Potential of the Stem Winemaking Byproducts from 10 Different Grape Varieties (*Vitis vinifera*L.). **J. Agric. Food Chem**. 60(48). 11850–11858. **2012**. DOI: 10.1021/jf303047k

GULLÓN, B.; EIBES, G.; MOREIRA, M.T.; HERRERA, R.; LABIDI, J. e; GULLÓN, P. Yerba mate waste: a sustainable resource of antioxidant compounds. **Ind. Crops Prod**. 113. 398-405. **2018**. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.01.064.

HANLEY, M. E.; LAMONT, B. B.; FAIRBANKS, M. M. e; RAFFERTY, C. M. Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. **Persp. Plant Ecol. Evol. System**. 8(4), 157–178. **2007**. DOI:10.1016/j.ppees.2007.01.001

HATTAS, D.; HJALTEN, J., JULKUNEN-TIITTO, R., SCOGINGS, P. F. e; ROOKE, T. Differential phenolic profiles in six African savanna woody species in relation to antiherbivore defense. **Phytochem**. 72(14-15). 1796–1803. **2011**. DOI:10.1016/j.phytochem.2011.05.007

HATTAS, D.; SCOGINGS, P. F. e; & JULKUNEN-TIITTO, R. Does the Growth Differentiation Balance Hypothesis Explain Allocation to Secondary Metabolites in *Combretum apiculatum* an African Savanna Woody Species?. **J. Chem. Ecol**. 43(2), 153–163. **2017**. DOI: 10.1007/s10886-016-0808-6

HECK, C.I.; SCHMALKO, M. e; MEJIA, E.G. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **J. Agric. Food Chem.** 56. 18. 8394-8403. **2008**. DOI: 10.1021/jf801748s

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Extração Vegetal e Silvicultura**. Brasil 1986 à 2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289>> acesso em: jan/2021

IGNAT, I.; VOLF, I. e; POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chem.** 126(4). 1821–1835. **2021**. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.02

ILANY, T.; ASHTON, M.S.; MONTAGNINI, F. e; MARTINEZ, C. Using agroforestry to improve soil fertility: effects of intercropping on *Ilex paraguariensis* (yerba mate) plantation with *Araucaria angustifolia*. **Agro. Syst.** 80(3). 399-409. **2010**. DOI: 10.1007/s10457-010-9317-8

IM, H.W.; SUH, B.S.; LEE, S.U.; KOZUKUE, N.; OHNISI-KAMEYAMA, M. LEVIN, C.E. e; FRIEDMAN, M. Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry in potato plant Flowers, leaves, stems, and tubers and in home-processed potatoes. **J. Agric. Food Chem.** 56(9). 3341-3349. **2008**. DOI: 10.1012/jf073476b.

JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chem.** 175. 556-567. **2015**. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.12.013

JUNIOR, E.L.C. e; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. **J. Func. Food.** 21. 440-454. **2016**. DOI: 10.1016/j.jff.2015.12.010

JUNIOR, J.F.P. e GOULART, I.C.G.R. Erva 20: sistema de produção para erva-mate. **Embrapa Florestas**. **2019**. ISBN: 978-85-7035-875-2

KABIR, G. e; HAMEED, B.H. Recent progress on catalytic pyrolysis of lignocellulosic biomass to high-grade bio-oil and bio-chemicals. *Renew. Sustainab. Ener. Rev.* 70. 945-967. **2017**. DOI: 10.1016/j.rser.2016.12.001

KALTBACH, P.; BALLERT, S.; KABRODT, K. e; SCHELLENBERG, I. New HPTLC methods for analysis of major bioactive compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) tea. **J. Food Comp. Anal.** 29. 103568. **2020**. DOI: 10.1016/j.jfca.2020.103568

KAZIMIERCZAK, R.; HALLMANN, E. e; REMBIALKOWSKA, E. Effects of organic and conventional production systems on the content of bioactive substances in four species of medicinal plants. **Biol. Agric. Hort.** 31(2). 118-127. **2014**. DOI: doi:10.1080/01448765.2014.97794

KIM, K.H., TSAO, R., YANG, R. e CUI, S.W. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. **Food Chem.** v. 95, p 466-473, **2006**. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.01.0

KIM, S.B.; BISSON, J.; FRIESEN, J.B.; PAULI, F. e; SIMMLER, C. Selective chlorophyll removal method to 'degreen' botanical extracts. *J. Nat. Prod.* **2020**. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.0c00005

KRAKOWSKA-SIEPRAWKA, A.; RAFINSKA, K.; WALCZAK-SKIERSKA, J. e; BUSZEWSKI, B. The influence of plant material enzymatic hydrolysis and extraction conditions

on the polyphenolic profiles and antioxidant activity of extracts: A green and efficient approach. *Molecules*. 25. 2074. 2020. DOI: 10.3390/molecules25092074

KRYGIER, K., SOSULSKI, F. e HOGGE, L. Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 1. Extractions Purification Procedure. *J. Agric. Food Chem*, v. 30, p 330-334. **1982**.

KRYGIER, K., SOSULSKI, F. e HOGGE, L. Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 2. Composition of Phenolic Acids in Rapeseeds Flour and Hulls. *J. Agric. Food Chem*, v. 30, p 334-336. **1982**.

KROLL, J., RAWEL, H. M., & ROHN, S. Reactions of Plant Phenolics with Food Proteins and Enzymes under Special Consideration of Covalent Bonds. *Food Sci. Technol. Res.* 9(3). 205–218. 2003. DOI: 10.3136/fstr.9.205

KHODDAMI, A.; WILKES, M.A. e; ROBERTS, T.H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 18(2). 2328-2375. **2013**. DOI: 10.3390/molecules18022328

LANDAU, E.C.; SILVA, G.A. e; TORRES, T. Evolução da produção de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, Aquifoliaceae). **Dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas** - Capítulo 22. **2020**.

LAZZAROTTO, S.R.S.; SCHERRUTH, M.S.F.; CALIXTO, P.S.; CARRARO, M.M.; SILVEIRA, A.C. e; LAZZAROTTO, M. Método de Folin Ciocalteu adaptado para quantificar polifenóis em extratos de erva-mate. *Movimenta*. v. 13. n. 3. p. 419-426, **2020**. ISSN:1984-4298.

LEICACH, S.R. e CHLUDIL, H.D. Plant Secondary metabolites: structure–activity relationships in human health prevention and treatment of common diseases. *Stud. in Nat. Prod. Chem.* V. 42, p. 267-304. **2014**.

LI, W.; YANG, R.; YING, D.; YU, J; SANGUANSRI, L. e; AUGUSTIN, M.A. Analysis of polyphenols in apple pomace: A comparative study of different extraction and hydrolysis procedures. *Ind. Crops Prod.* 147. 112250. **2020**. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112250

LIMA, M.E.; COLPO, A.C.; MAYA-LÓPEZ, M.; ROSA, H.; TÚNEZ, I.; GALVÁN-ARZATE, S.; SANTAMARÍA, A. e; FOLMER, V. Protective effect of Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) against oxidative damage in vitro in rat brain synaptosomal/mitochondrial P2 fractions. *J. Func. Food*. 34. 447-452. **2017**. DOI: 10.1016/j.jff.2017.05.026

LINHARES, T. História Econômica do Mate. Rio de Janeiro: Editora José Olympio, **1969**.

LOMBARDI-BOCCIA, G.; LUCARINI, M.; LANZI, S.; AUGUZZI, A. e; CAPPELLONI, M. Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: a comparative study. *J. Food Chem*. 52. 1. 90-94. **2003**. DOI: 10.10121/jf0344690

LUTOMSKI, P.; GOZDIEWSKA, M. e; FLOREK-LUSZCZKI, M. Health Properties of Yerba Mate. *Agric. Environ. Medic.* v 27. n 2. 310-313. 2020. DOI: 10.26444/aaem/119994

MANOUSI, N., SARAKATSIANOS, I. e SAMANIDOU, V. 10 - Extraction techniques of phenolic compounds and other bioactive compounds from medicinal and aromatic plants. *Engineering Tools in the Beverage Industry*. Ed. Woodhead Publishing. v. 3, p 283-314, **2019**. ISBN: 9780128152584

MARTINS, C.R.; LOPES, W.A. e; ANDRADE, J.B. Solubilidade das substâncias orgânicas. *Quim. Nova*. v. 36, n. 8, p. 1248-1255, **2013**.

MEINHART, A.D.; BIZZOTO, C.S.; BALLUS, C.A.; RYBKA, A.C.P.; SOBRINHO, M.R.; CERRO-QUINTANA, R.S.; TEIXEIRA-FILHO, J. e; GODOY, H.T. Methylxanthines and Phenolic Content EXtracted during the Consumption of Mate (*Iles paraguariensis* St. Hil) Beverages. **J. Agric. Food Chem.** v. 58, p. 2188-2193, **2010**. DOI: doi.org/10.1021/jf903781w

MENDES, K.A.M.; OLIVEIRA, B.S.C.; ARAÚJO, B.Q.; DANTAS, C.; CHAVES, M.H.; VIEIRA, E.C. Application of multivariate optimization for the selective extraction of phenolic compounds in cashew nuts (*Anacardium occidentale* L.) **Talanta.** **2019**. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.06.100

OLIVEIRA, S.V. e; WAQUIL, P.D. Dinâmica de produção e comercialização da erva-mate no Rio Grande do Sul, Brasil. **Cienc. Rural.** 45. 4. 750-756. **2015**. ISSN: 0103-8478

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; DÍAZ-RUBIO, M.E. e; SAURA-CALIXTO, F. Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidante: occurrence, metabolic fate and health effects. **Nutrit. Resea. Rev.** 26(2). 118-129. **2013**. DOI: 10.1017/s0954422413000097

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. DÍAZ-RUBIO, M.E. e SAURA-CALIXTO, F. Non-extractable polyphenols in plant foods: nature, isolations, and analysis. **Polyphenols in Plants, Chapter 10.** **2014**. DOI: 10.1016/B978-0-12-397934-6.00010-3

PIRES, J.S.; TORRES, P.B.; SANTOS, D.Y.A.C. e CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.** **2017**. ISBN 978-85-85658-70-0.

PONDER, A. e HALLMANN, E. The effects of organic and conventional farm management and harvest time on the polyphenol content in different raspberry cultivars. **Food Chem.** v. 301, p. 125295, **2019**. DOI: [10.1016/j.foodchem.2019.125295](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125295)

POPA, M.E.; MITELUT, A.C.; POPA, E.E.; STAN, A. e; POPA, V.I. Organic foods contribution to nutritional quality and value. **Trends Food Sci. Technol.** **2018**. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.01.003

PORT'S, P.S.; CHISTÉ, R.C.; GODOY, H.T. e; PRADO, M.A. The phenolic compounds and the antioxidante potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Res. Int.** 0963-9969. **2013**. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.02.010

RAHMAN, S.M.E.; MELE, M.A.; LEE, Y.T. e; ISLAM, M.Z. Consumer preference, quality and safety of organic and conventional fresh fruits, vegetables and cereals. **Foods.** **2021**. DOI: 10.3390/foods10010105

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. e; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova.** 27. 5. 771-780. **2004**.

RIGUEIRA, G.D.J.; BANDEIRA, A.V.M.; CHAGAS, C.G.A e; MILAGRES, R.C.R.M. Atividade antioxidante e teor de fenólicos em couve-manteiga (*brassica oleácea* l. var *acephala*) submetidas a diferentes sistemas de cultivo e métodos de preparo. **Cienc. Biol. Saúde.** v 37. n 2. p 3-12. **2016**; DOI: 10.5433/1679-0367.2016v37n2p3

SAINT-HILAIRE, A. Mémoires du muséum d'histoire naturelle. v. 9, p. 351, **1822**.

SANTETTI, G.S.; DACOREGGIO, M.V.; INACIO, H.P.; BIDUSK, B.; HOFF, R.B.; FREIRE, C.B.F.; GUTLOSKI, L.C. e; AMBONIA, R.D.M.C. The addition of yerba mate leaves on bread dough has influences on fermentation time and the availability of phenolic compounds?. **Food Sci. Technol.** 146. 111442. **2021**. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111442

SANTIAGO, R.; LÓPEZ-MALVAR, A.; SOUTO, C. e; BARROS-RÍOS, J. Methods for determining cell wall-bound phenolic in maize stem tissues. **J. Agric. Food Chem.** 66(5). 1279-1284. **2018**; DOI: 10.1021/acs.jafc.7b05752

SANTOS-BUELGA, C.; GONZALEZ-MANZANO, S.; DUEÑAS, M.; GONZALEZ-PARAMAS, A.M. Extraction and Isolation of Phenolic Compounds. In: Sarker, S., Nahar, L. (eds) **Natural Products Isolation**. Methods in Molecular Biology, vol 864. **2012**. DOI: 10.1007/978-1-61779-624-1_17

SEPAHPOUR, S.; SELAMAT, J.; MANAP, M.Y.A.; KHATIB, A. e; RAZIS, A.F.A. Comparative analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different solvent extraction systems. **Molecules**. 23(2). 402. **2018**. DOI: 10.3390/molecules23020402.

SHAHIDI, F. e; YEO, J.D. Insoluble-Bound Phenolics in Food. **Molecules**. 21. 1216. **2016**. DOI: 10.3390/molecules21091216

SINGH, A.; SABALLY, K.; KUBOW, S.; DONNELLY, D.J.; GARIEPY, Y.; ORSAT, V. e; RAGHAVAN, G.S.V. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant from potato peels. **Molecules**. 16(3). 2218-2232. **2011**. DOI: 10.3390/molecules16032218

SOUZA, A.H.P.; CORRÊA, R.C.G.; BARROS, L.; CALHELHA, R.C.; SANTOS-BUELGA, C; PERALTA, R.M. e; FERREIRA, I.C.F.R. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis* : An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Res. Int.** 78. 286-294. **2015**. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.09.032.

SOUZA, M.M.; RECARTE, V.M.; ROCHA, M.; PEREIRA, E. e; FURLONG, E.B. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.). **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. v 68. 192-200. **2009**.

STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **J. Sep. Sci.** v. 30, p. 3268-3295, **2007**.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Tradução de: Eliane Romanato Santarém. [et al.]. Porto Alegre: **Artmed**, 719 p, **2004**.

TAMURA, A.; SASAKI, M.; YAMASHITA, H.; MATSUI-YUASA, I.; HIKIMA, TADAMASA; TABUCHI, M. MUNAKATA, H. et al. Yerba-mate (*Ilex Paraguariensis*) extract prevents ethanol-induced liver injury in rats. **J. Funct. Foods**, v. 5. n. 4. p. 1714–1723. **2013**. DOI: [10.1016/j.jff.2013.07.017](https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.017)

TAROZZI, A.; HRELIA, S.; ANGELONI, C.; MORRONI, F.; BIAGI, P.; GUARDIGLI, M.; CANTELLI-FORTI, G. e; HRELIA, P. Antioxidant effectiveness of organically and non-organically grown red oranges in cell culture systems. **Europ. J. Nutr.** 45. 152-158. **2006**. DOI: 10.1007/s00394-005-0575-6

TOYODA, M.; TANAKA, K. HOSHINO, K.; AKIYAMA, H.; TANIMURA, A e; SAITO, Y. Profiles of Potentially Antiallergic Flavonoids in 27 Kinds of Health Tea and Green Tea Infusions. **J. Agric. Food Chem.** 45(7), 2561– 2564. **1997**. DOI: 10.1021/jf970024y

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**. 2(12). 1231-1246. **2010**. DOI: 10.3390/nu2121231

TZIMA, K.; BRUNTON, N.P. e; RAI, D.K. Evaluation of the impact of chlorophyll removal techniques on polyphenols in Rosemary and thyme by-products. **J. Food Biochem.** **2020**. DOI: 10.1111/jfbc.13148

VETELI, T. O., KUOKKANEN, K., JULKUNEN-TIITTO, R., ROININEN, H., & TAHVANAINEN, J. (2002). Effects of elevated CO₂ and temperature on plant growth and herbivore defensive chemistry. *Global Change Biology*, 8(12), 1240– 1252. doi:10.1046/j.1365-2486.2002.00553.x

VIEIRA, M.A.; ROVARIS, A.A.; MARASCHIN, M.; SIMAS, K.N.; PAGLIOSA, C.M.; PODESTÁ, R.; AMBONI, R.D.M.C.; BARRETO, P.L.M. e; AMANTE, E.R. Chemical characterization of candy made of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue. *J. Agric. Food. Chem.* 56. 4637-4642. 2008. DOI: 10.1021/jf8011085

TANG, Y.; ZHANG, B.; LI, X.; CHEN, P.X.; ZHANG, H.; LIU, R. e; TSAO, R. Bound phenolic og quinoa seeds released by acid, alkaline, and enzymatic treatments and their antioxidant and α -Glucosidase and pancreatic lipase inhibitory effects. **J. Agric. Food Chem.** 64. 8. 1712-1719. **2016**. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05761

YU, X.; GUO, L.; JIANG, G.; SONG, Y. e; MUMINOV, M.A. Advances of organic products over conventional Productions with respect to nutritional quality and food security. **Ecolo.** 38(1). 53-60. **2018**. DOI: 10.1016/j.chnaes.2018.01.0

YUKSEL, Z.; AVCI, E. e; ERDEM, Y.K. Characterization of binding interactions between tea flavanoids and milk proteins. **Food. Chem.** 121(2). 450-456. **2010**. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.12.064

WANG, Y.; ZHANG, X.; CHEN, G.; YU, J.; YANG, L. e; GAO, Y. Antioxidant property and their free, soluble conjugate and insoluble-bound phenolic contents in selected beans. **J. Funct. Foods.** 24. 359-372. **2018**. DOI: 10.1016/j.jff.2016.04.026.

WANG, Z., LI, S., GE, S., & LIN, S. A review of distribution, extraction methods and health benefits of bound phenolics in food plants. **J. Agric. Food Chem.** **2020**. doi:10.1021/acs.jafc.9b06574

WU, L.; YANG, R.; YING, D.; YU, J.; SANGANSRI, L. e AUGUSTIN, M.A. Analysis of polyphenols in apple pomace: A comparative study of diferente extraction and hydrolysis procedures. **Ind. Crops Prod.** 147. 112250. **2020**. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112250.

WU, N.; LI, H.; TAN, B; ZHANG, M.; XIAO, Z.; TIAN, X.; ZHAI, X.; LIU, M.; LIU, Y.; WANG, L. e; GAO, K. Free and bound phenolic profiles of the bran from different rice varieties and their antioxidant activity and inhibitory effects on α -amylase and aglucosidase, *J. Cereal Sci.* 82. 206-212. 2018. DOI: 10.1016/j.jcs.2018.06.013

ZHANG, B.; ZHANG, Y.; LI, H.; DENG, Z. e; TSAO, R; A review on insoluble-bound phenolic in plant-based food matrix and their contribution to human helath with future perspectives. **Trends Food Sci. Technol.** 105. 347-362. **2020**. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.09.029

ZVIKAS, V.; PUKELEVICIENE, V.; IVANAUSKAS, L.; ROMANOVSKAJA, D. e; JAKSTAS, V. Ecaluation of phenolic antioxidante contente in organically and conventionally grown buckwheat herb crop and its regrowth. **J. Sci. Food Agric.** 97(10). 327802383. **2017**. DOI: 10.1002/jsfa.8176

ZWYRZYKOWSKA, A.; KUPCZYNSKI, R.; JAROSZ, B.; SZUMNY, KUCHARSKA, A.Z. Qualitative and quantitative analysis of polyphenolic compounds in *Ilex* Sp. **De Gruyter Open.** 13. 1303-1312. **2015**. DOI: 10.1515/chem-2015-0142.