

**INFLUÊNCIA DA ERVA MATE (*ILEX  
PARAGUARIENSIS*) SOBRE OS PARÂMETROS  
BIOQUÍMICOS E ÓSSEOS DE CÁLCIO E DE  
FÓSFORO EM RATAS *WISTAR***

---

**Cristielle Aguzzi Cougo de Leon  
Julia Neitzel Uecker  
Jenifer Heller Cerqueira  
Augusto Schneider  
Carlos Castilho Barros  
Simone Pieniz**

# INFLUÊNCIA DA ERVA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E ÓSSEOS DE CÁLCIO E DE FÓSFORO EM RATAS WISTAR

## **Cristielle Aguzzi Cougo de Leon**

Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição  
Pelotas – Rio Grande do Sul

## **Julia Neitzel Uecker**

Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição  
Pelotas – Rio Grande do Sul

## **Jenifer Heller Cerqueira**

Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição  
Pelotas – Rio Grande do Sul

## **Augusto Schneider**

Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição  
Pelotas – Rio Grande do Sul

## **Carlos Castilho Barros**

Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição  
Pelotas – Rio Grande do Sul

## **Simone Pieniz**

Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição  
Pelotas – Rio Grande do Sul

**RESUMO:** Este estudo tem por objetivo avaliar o extrato da erva mate (*Ilex paraguariensis*) sobre os parâmetros bioquímicos e ósseos de cálcio e fósforo em ratas da linhagem *Wistar*, bem como quantificar compostos fenólicos totais e taninos, e determinar a força máxima óssea. Os 32 animais foram divididos em quatro grupos: dieta padrão + água *ad libitum*; dieta padrão + extrato de erva mate *ad libitum*; dieta hiperlipídica + água *ad libitum*; dieta hiperlipídica + extrato de erva mate *ad libitum*. Tanto nos níveis de cálcio e fósforo séricos quanto ósseos a erva mate administrada não interferiu na absorção de ambos minerais, porém a dieta hiperlipídica reduziu a concentração dos níveis plasmáticos de fósforo. Com relação à excreção de cálcio e fósforo fecal observou-se diferença significativa entre os grupos, com maior excreção no grupo tratamento com chimarrão. Quanto à análise de força máxima não houve diferença significativa entre o grupo controle e tratamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** cálcio; fósforo; taninos; fatores antinutricionais.

## 1. INTRODUÇÃO

A erva mate (*Ilex paraguariensis*) é uma bebida característica consumida principalmente pela população do Sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Paraguai. No extrato aquoso de suas folhas é encontrada uma variedade de compostos

químicos, entre eles os compostos fenólicos responsáveis por diversas atividades biológicas conhecidas dessa planta, principalmente pela atividade antioxidante.

Dentre os compostos químicos presentes na erva mate encontram-se os taninos. Os taninos são compostos fenólicos comumente vinculados a macromoléculas com atividade antioxidante (Soares, 2010). A complexação dos taninos com as proteínas tornam-as insolúveis e inativam as enzimas. Essa complexação é a principal base do efeito biológico, sendo dependente do pH, envolvendo ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. Além disso, se ligam a outras macromoléculas como o amido causando dessa maneira uma redução no valor nutricional dos alimentos. Da mesma forma, os taninos inibem algumas enzimas digestivas e diminuem absorção de nutrientes devido à formação de complexos com íons divalentes de metais ( $\text{Ca}^{++}$ ) provocando erosão de células epiteliais do intestino (Moraes, 2009).

Estudos sobre biodisponibilidade de minerais apontam que os fatores fisiológicos e nutricionais podem interferir na absorção, no transporte e no armazenamento, com subsequente aumento da suscetibilidade à deficiência ou toxicidade (Lobo e Tramonte, 2004). O cálcio (Ca) é um nutriente essencial e necessário para as funções biológicas do organismo. Na alimentação humana tem sido estabelecido em todas as etapas da vida exercendo funções fisiológicas como componente do tecido ósseo, de cofator enzimático ou como mensageiro celular (Weaver, 2003). Aproximadamente 99% do cálcio corporal encontram-se no esqueleto e o restante encontra-se distribuído nos dentes, tecidos moles, plasma e fluido extracelular (Nordin, 1997).

O fósforo (P) está intimamente associado ao cálcio na nutrição humana, sendo chamado de seu gêmeo metabólico. Desta forma, os fatores que favorecem ou dificultam a absorção do fósforo são praticamente os mesmos do cálcio. Para manter o equilíbrio normal sérico cálcio-fósforo, suas quantidades na dieta devem ser equilibradas (1:1) (Lobo e Tramonte, 2004).

O fósforo tem a função de tamponar sistemas ácidos ou alcalinos, auxiliando na manutenção do pH, no armazenamento temporário de energia provinda do metabolismo de macronutrientes, na forma de Adenosina Trifosfato (ATP), sendo responsável também pela ativação, por meio da fosforilação de diversas cascatas enzimáticas (Cozzolino, 2007). Assim como o cálcio, o fósforo é importante no desenvolvimento ósseo animal, e juntos, eles formam o principal constituinte da matriz inorgânica, a hidroxiapatita (Henry, 1995). O fósforo atua na formação da estrutura óssea, participa da formação de membranas celulares, é componente dos ácidos nucléicos envolvidos no crescimento e na diferenciação celular. Seus níveis sanguíneos em excesso, que também são controlados pelo hormônio da paratireóide (PTH), vitamina D e calcitonina (Macari, 2002).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do extrato da erva mate (*Ilex paraguariensis*) sobre os parâmetros bioquímicos e ósseos

de cálcio e de fósforo em ratas da linhagem *Wistar*, bem como quantificar compostos fenólicos totais e taninos, e determinar a força máxima óssea.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 32 ratas (*Rattus Novergicus*) da linhagem *Wistar*, fêmeas, com 60 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Os animais foram mantidos em gabinetes ventilados, em caixas de polipropileno agrupados em quatro ratas por caixa, sendo a temperatura e umidade relativa do ar controladas na faixa de 22-24°C e 65-75%, respectivamente, e ciclo claro/escuro de 12 horas. Após um período de cinco dias de adaptação, as ratas foram divididas aleatoriamente em quatro grupos experimentais, com oito animais cada, conforme apresentado a seguir: dieta padrão (4% de lipídios) + água *ad libitum*; dieta padrão (4% de lipídios) + extrato de erva mate *ad libitum*; dieta hiperlipídica (25% de teor lipídico) + água *ad libitum*; dieta hiperlipídica (25% de teor lipídico) + extrato de erva mate *ad libitum*. As dietas padrão (4% de teor lipídico) e hiperlipídicas (25% de teor lipídico) foram elaboradas em laboratório, segundo as recomendações do *American Institute of Nutrition - AIN93-M* para roedores. O extrato da erva mate foi preparado na respectiva concentração e temperatura 10% a 70°C, por se assemelhar a ingestão humana.

Os 32 animais foram eutanasiados no 34º dia os quais foram mantidos em jejum de 12 horas e, em seguida, submetidos ao procedimento de decapitação conforme a Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) nº 714 de junho de 2002, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPEL (Protocolo nº 1641). Após a eutanásia, o fêmur dos animais foi coletado e a parte muscular removida, sendo posteriormente congelados a -20°C. Os ossos foram secos em estufa (100°C) por 24 horas e, posteriormente, digeridos em ácido nítrico-perclórico. As fezes coletadas semanalmente foram secas em estufa (100°C) por 24h, pesadas, trituradas e, posteriormente, digeridas em ácido nítrico-perclórico.

A concentração de cálcio e fósforo no material ósseo e nas fezes foi determinada por Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) de acordo com a metodologia de Zhang et al. (2009), foram realizadas as leituras em ICP-OES. Os teores de cálcio (Cálcio liquiform (Ref. 90-2/60) e fósforo (Ref. 42-100) séricos foram determinados a partir de amostras sanguíneas pelo método colorimétrico comercialmente disponível (Labtest, Minas Gerais, MG – Brasil). A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu adaptado de Swain e Hillis (1959) e os taninos totais pelo método da precipitação da caseína. Os resultados foram expressos em µg mL<sup>-1</sup>.

Para a determinação do parâmetro biomecânico de força máxima (N) óssea, o fêmur esquerdo e direito dos animais foi descongelado até atingir temperatura ambiente e, posteriormente, submetidos a um ensaio de flexão em máquina universal de ensaios mecânicos da marca EMIC®, dotada de célula de carga de 100 kgf ajustada para a escala de 10 kgf. Todos os fêmures foram testados na mesma posição, com suas extremidades apoiadas em dois suportes apropriadamente afastados de acordo com seus comprimentos, e a carga sendo aplicada no centro. A velocidade de aplicação de carga foi de 10 mm/min. Os resultados foram expressos em força máxima (N).

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 1% e 5% para comparação das médias, através do programa Assistat versão 7.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação à absorção de cálcio e fósforo a nível ósseo não houve diferença significativa (ns) entre os diferentes grupos analisados (controle (água) e tratamento (chimarrão)) (Tabela 1), indicando que os grupos que receberam chimarrão não apresentaram interferência na absorção dos minerais cálcio e fósforo, quando comparados com os animais do grupo controle.

Ao analisar os dados referentes à excreção semanal dos minerais observou-se que em relação ao cálcio houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os diferentes grupos analisados (Tabela 1). Tanto na dieta padrão como na dieta hiperlipídica os níveis de excreção foram maiores nos grupos que receberam chimarrão ( $23,67 \text{ mg g}^{-1} \pm 2,90$  e  $28,00 \text{ mg g}^{-1} \pm 0,77$ ). Da mesma forma, quando analisados os dados de excreção do fósforo observou-se diferença significativa entre os diferentes grupos analisados ( $p < 0,05$ ). Ao analisar o grupo alimentado com dieta hiperlipídica e chimarrão observou-se uma maior excreção de fósforo ( $9,67 \text{ mg g}^{-1} \pm 1,59$ ), quando comparado ao grupo alimentado com dieta padrão e chimarrão ( $8,70 \text{ mg g}^{-1} \pm 0,89$ ). Além disso, quando analisado o grupo controle observou-se valores de excreção menores quando comparado com o grupo chimarrão.

Tabela 1 - Concentração de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e fósforo (P) ósseo (fêmur) e excreção de  $\text{Ca}^{+2}$  e P pelas fezes analisados em ICP-OES. Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão e expressos em  $\text{mg g}^{-1}$ .

Tratamento	Ósseo		Excreção fezes	
	$\text{Ca}^{+2}$	P	$\text{Ca}^{+2}$	P
	----- $\text{mg g}^{-1}$ -----			
Dieta padrão + água	$24,00 \pm 2,71^{\text{ns}}$	$9,63 \pm 1,04^{\text{ns}}$	$15,00 \pm 5,09^{\text{b**}}$	$7,37 \pm 2,05^{\text{ab*}}$
Dieta padrão + chimarrão	$16,25 \pm 5,74^{\text{ns}}$	$7,53 \pm 1,27^{\text{ns}}$	$23,67 \pm 2,90^{\text{ab**}}$	$8,70 \pm 0,89^{\text{ab*}}$
Dieta hiperlipídica + água	$21,25 \pm$	$8,93 \pm 1,05^{\text{ns}}$	$12,43 \pm 9,49^{\text{b**}}$	$4,60 \pm 2,50^{\text{b*}}$

			3,30 <sup>ns</sup>			
Dieta hiperlipídica	+	19,00 ±	7,83 ± 1,50 <sup>ns</sup>	28,00 ± 0,77 <sup>a**</sup>	9,67 ± 1,59 <sup>a*</sup>	
chimarrão		3,50 <sup>ns</sup>				

Valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa entre os grupos.

\* probabilidade de erro a 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* probabilidade de erro a 1% ( $p < 0,01$ ); ns = não significativo

Os teores de cálcio e fósforo séricos, analisados pelo método colorimétrico, indicaram que quanto aos níveis de cálcio sérico não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os diferentes grupos analisados. Ao analisar o fósforo observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos (água e chimarrão), porém, observou-se interação entre as dietas, sendo que na dieta hiperlipídica houve uma redução significativa no teor de fósforo sérico tanto no grupo controle ( $10,60 \text{ mg g}^{-1} \pm 2,55$ ) quanto no grupo tratamento com chimarrão ( $11,83 \text{ mg g}^{-1} \pm 2,23$ ) (Tabela 2).

Suplementos de cálcio ou elevadas ingestões de cálcio podem comprometer o equilíbrio de cálcio e fósforo e alterar a absorção do fósforo. Os efeitos do cálcio no metabolismo do fósforo foram estudados em adultos por Spencer et al. (1984), utilizando 200, 800 e 2000 mg/dia de cálcio e 200 e 800mg/dia de fósforo. A adição de diferentes quantidades de cálcio levou a uma significativa diminuição na excreção urinária de fósforo e a um aumento na excreção fecal de fósforo.

Tabela 2 - Teores séricos de  $\text{Ca}^{+2}$  e P analisados no plasma. Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão e expressos em  $\text{mg dL}^{-1}$ .

Tratamento	Cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ )	Fósforo (P)
	----- $\text{mg dL}^{-1}$ -----	
Valor de referência padrão	10	5
Dieta padrão + água	$11,81 \pm 0,47^{\text{a*}}$	$16,10 \pm 2,92^{\text{a}}$
Dieta padrão + chimarrão	$12,02 \pm 0,57^{\text{a}}$	$16,28 \pm 3,41^{\text{a}}$
Dieta hiperlipídica + água	$12,09 \pm 0,75^{\text{a}}$	$10,60 \pm 2,55^{\text{b}}$
Dieta hiperlipídica + chimarrão	$12,48 \pm 0,50^{\text{a}}$	$11,83 \pm 2,23^{\text{b}}$

\* Valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa entre os grupos.

Foi encontrado no presente estudo, por meio da quantificação de compostos fenólicos totais realizada pelo método Folin-Ciocalteu, um valor médio de  $7,25 \mu\text{g g}^{-1} \pm 0,04$  no extrato aquoso de erva mate usando como padrão a curva de ácido gálico. Asolini et al. (2006) relata em seu estudo teores menores de compostos fenólicos ( $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ ) em folhas secas de diferentes tipos de erva mate.

A análise de taninos revelou um valor de  $5,82 \mu\text{g g}^{-1} \pm 0,01$ , sendo calculado a partir dos valores obtidos da análise de compostos fenólicos totais. Os dados encontrados corroboram com os resultados encontrados por Proulx et al. (1993) os quais não observaram em ratos, efeito negativo de taninos na

absorção de cálcio em três variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*) crus e cozidos. Para os autores a explicação dos resultados não é clara, entretanto, os taninos podem preferencialmente ligarem-se ao ferro deixando o cálcio livre.

Da mesma forma, com a finalidade de verificar se houve interferência dos taninos presentes na erva mate e a absorção de cálcio e fósforo óssea foi realizada análise de força máxima no fêmur dos animais anterior a digestão em ácido nítrico-perclórico. A determinação da resistência óssea à quebra tem sido utilizada como indicadora do estado geral ósseo, podendo ser influenciada pela linhagem, idade e nutrição (Kocabagli, 2001). As médias dos valores de força máxima obtidas estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Força máxima expressa em ossos das ratas. Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão e expressos em força máxima (N).

Dietas	Tratamento	
	Controle	Chimarrão
	----- N -----	
Dieta padrão	22,19 $\pm$ 3,73 <sup>a</sup>	22,19 $\pm$ 5,19 <sup>a</sup>
Dieta hiperlipídica	25,15 $\pm$ 2,48 <sup>a</sup>	24,65 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup>

\* Valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa entre os grupos.

Observou-se entre os grupos analisados que não houve diferença significativa entre os tratamentos (controle e chimarrão), porém ocorreu interação entre as dietas analisadas (padrão e hiperlipídica), sendo que os grupos que receberam dieta hiperlipídica apresentaram força máxima maior em relação aos grupos que receberam dieta padrão. Os testes de resistência óssea à quebra são utilizados para expressar a quantidade máxima de força que o osso é capaz de suportar antes da sua ruptura (Sá, 2004). O conteúdo de cinzas que expressa o teor de minerais do osso está diretamente relacionado à resistência óssea (Rath, 1999). Segundo Pizzolante (2000), o fósforo está envolvido na formação do colágeno e mineralização óssea, aumentando a resistência tênsil do osso e acelerando a cicatrização de fraturas, é ativador de coenzimas para o funcionamento de vitamina B.

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que tanto na análise de cálcio e fósforo a nível ósseo quanto a nível sanguíneo a erva mate administrada na forma de chimarrão não interferiu na absorção de ambos minerais. Observou-se ainda que, a dieta hiperlipídica interferiu nos níveis séricos de fósforo reduzindo a concentração plasmática. Com relação à excreção de cálcio e fósforo fecal observou-se diferença significativa entre os grupos analisados, demonstrando uma maior excreção nos grupos tratamento com chimarrão. Ressalta-se ainda que, os resultados

encontrados na análise de força máxima não diferiram entre o grupo controle (água) e o grupo tratamento (chimarrão).

## REFERÊNCIAS

ASOLINI, F. C., TEDESCO, A.M., CA, S.A. **Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás.** Braz. Journal of Food Technology, v. 9, n. 3, p. 209-215, 2006.

COBEA. **Princípios éticos na experimentação animal.** (1991). [Acesso 2014 mai 8]. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>>.

COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes.** São Paulo: Editora Manole Ltda, 2007, 67-175.

HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais.** 18 ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1995, 1678.

KOCABAGLI, N. **Effect of dietary phytase supplementation at diferente levels on tibial boné characteristics and strength in broilers.** Turkish Journal or Veterinary and Animal Sciencis, v.25, p.797-802, 2001.

LOBO, A.S., TRAMONTE, V.L.C. **Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais.** Revista de Nutrição.v. 17. n. 1, p.107-113, 2004.

MACARI, M., FURLAN, R.L., GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada à frangos de corte.** Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002, 375.

MORAES, E.C. **Avaliação dos efeitos hipocolesterolêmico, antioxidante e anti-inflamatório da infusão da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em indivíduos normolipidêmicos ou dislipidêmicos, usuários ou não de estatinas.** 2009. 139 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

NORDIN, B.E.C. **Calcium and osteoporosis.** Nutrition. v.13, p.664-686, 1997.

PIZZOLANTE, C.C. **Estabilidade da fitase e sua utilização em frangos de corte.** 2000. 121 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG. 2000.

PROULX, W.R; WEAVER, C.M; BOCK, M.A. **Trypsin inhibitor activity and tannin content do not affect calcium bioavailability of three commonly consumed legumes.** Journal of Food Science, v. 58, n. 2, p.382-384, 1993.

RATH, N.C; BALOG, J.M; HUFF, W.E. **Comparative differences in the composition and biomechanical properties of tibiae of seven- and seventy-two-week-old male and female broiler breeder chickens.** Poultry Science, v. 78, n. 8, p.1232-1239, 1999.

SÁ, L.M; GOMES, P.C; ROSTAGNO, H.S; ALBINO, L.F.T; CECON, P.C; D'AGOSTINI, P. **Exigência nutricional de cálcio para frangos de corte, nas fases de crescimento e terminação.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 32, n. 2, p.397-406, 2004.

SOARES, S.E. **Ácidos fenólicos como antioxidants.** Revista de Nutrição, v.15, p.71-81, 2002.

SPENCER, H; KRAMER, L; OSIS, D. **Effect of calcium on phosphorus metabolism in man.** Journal of Clinical Nutrition, v.40, p.219-25, 1984.

SWAIN, T; HILLIS, W.E. **The phenolic constituents of *prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 10, p.63-68, 1959.

ZHANG ,B; ZHOU, K; ZHANG, J; CHEN, Q; LIU, G; SHANG, N. **Accumulation and species distribution of selenium in Se-enriched bacterial cells of the *Bifidobacterium animalis* 01.** Food Chemistry, v.115, p.127-134, 2009.

WEAVER, C.M.E; HEANEY, R.P; SHILS, M; OLSON, J. A; SHIKE, M; ROSS, A. C. **Tratado de Nutrição Moderna na saúde e na doença.** São Paulo: Editora Manole Ltda, 2003.

**ABSTRACT:** This study aimed at evaluating the yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) on the biochemical and bone parameters of calcium and phosphorus in Wistar rats and quantify total phenolics and tannins, and determine bone maximum strength. The 32 animals were divided into four groups: standard diet + water *ad libitum*; standard diet + yerba mate extract *ad libitum*; hyperlipidemic diet + water *ad libitum*; hyperlipidemic diet + yerba mate extract *ad libitum*. Both levels of calcium and serum phosphorus as the bone administered mate did not affect the absorption of both minerals, but the fat diet reduced the concentration of serum phosphorus levels. Regarding the fecal excretion of calcium and phosphorus there was significant difference between the groups, with increased excretion in the treatment group mate. As the