Rev. Cienc. Tecnol.
Año 15 / Nº 20 / 2013 / 38–43

Evaluación del contenido de cafeína en la oxidación en hojas de *Ilex paraguariensis* St. Hil

Evaluation Of The Caffeine Content In The Oxidation Of *Ilex Paraguariensis* St. Hil Leaves

Avaliação do conteúdo de cafeína na oxidação de folhas de *Ilex paraguariensis* st. Hil

Ana C. Piovezan Borges, Nessana Dartora, Franciele T. Ril, Itamar L. Gonçalves, Alice T. Valduga

Resumen

La cafeína es una sustancia derivada de bases púricas que confiere muchos beneficios a la salud y ha sido ampliamente estudiada en las áreas relacionadas a la salud y al rendimiento humano. En este sentido, este estudio estuvo dirigido a estimular la oxidación de las hojas de *Ilex paraguariensis*, para obtener un producto similar al té negro, producido a partir de *Camellia sinensis* y controlar el contenido de cafeína por HPLC. En el experimento se cruzaron tres variables relacionadas a la cámara: temperatura, humedad y luz, y dos asociadas con las hojas: edad y humedad. Los resultados indican que el contenido de cafeína se reduce con el aumento de la edad de la hoja, dejando claro que hojas de 6,5 meses exhiben valores intermedios de cafeína, en relación a las de 12 meses.

Palabras clave: Yerba mate; Metilxantinas; Metabolitos secundarios; *Ilex paraguariensis.*

Abstract

Caffeine is a substance derivate of purine basis that has many benefits, has been widely studied in areas related to health and human performance. In this sense, this work aims to simulate the oxidation of leaves of yerba mate, a process used to obtain the black tea from the *Camellia sinensis* leaves and monitor these to their caffeine content for HPLC. A factorial design of experiments was performed for five variables: temperature, humidity and light camera, moisture and age leaf. The results indicate that caffeine tend to decrease their content (%) with increasing leaf age. Making clear that 6,5 months is the intermediate age of the leaf whose values of caffeine are also intermediate.

Keywords: Yerba-mate; Methylxanthine; Secondary metabolites; *Ilex paraguariensis.*

Resumo

A cafeína é uma substância derivada de bases purínicas que confere muitos benefícios à saúde e tem sido amplamente estudada em áreas relacionadas à saúde e ao desempenho humano. Neste sentido, esse estudo visou estimular a oxidação das folhas de *Ilex paraguariensis*, para obtenção de um produto semelhante ao chá-preto, produzido a partir de *Camellia sinensis* e, monitorar o teor de cafeína por HPLC. No delineamento experimental cruzaram-se três variáveis relacionadas à câmara: temperatura, umidade e luz, e duas associadas às folhas: umidade e idade. Os resultados indicam que o teor de cafeína decresce com o aumento da idade da folha, tornando nítido que folhas de 6,5 meses apresentam valores intermediários de cafeína, em relação às de 12 meses.

Palavras-chave: Erva-mate; Metilxantinas; Metabólitos secundários; *Ilex paraguariensis.*

Introdução

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) é uma espécie natural da América do Sul, tendo um importante papel econômico, social e ecológico para as regiões produtivas como o Sul do Brasil, o Norte e o Leste da Argentina e do Paraguai. No Brasil a maior produção se concentra nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina e em pequeno percentual no Mato Grosso do Sul, abastecendo indústrias de processamento de erva-mate tipo chimarrão para consumo nacional e exportação (1).

A pesquisa para o uso da matéria-prima erva-mate no desenvolvimento de outros produtos, além do chimarrão, ainda é incipiente. Estudos efetuados por numerosos autores indicam possibilidades de uso da erva-mate em novos produtos, entre eles, na forma de chá preto, produto que poderia atingir mercados externos (2,3,4).

Um dos principais constituintes das folhas de erva-mate

utilizadas para chás são as metilxantinas, cafeína (0,7 a 2,3%), teobromina (0,3%) e traços de teofilina (5). Além do chá, esses compostos também são encontrados em bebidas como café e refrigerantes, assim como em produtos contendo cacau e em uma variedade de medicamentos e suplementos alimentares (6). Dentre os três compostos citados, a cafeína é o mais abundante deles. A quantidade de cafeína nas bebidas varia em função da espécie, das condições ambientais, do cultivo e do método utilizado para a fabricação de cada bebida (7,8).

Entre as bebidas acima citadas, o chá, em especial o de erva-mate possui um teor consideravelmente maior de cafeína do que as outras, sendo a concentração dessa metilxantina na erva-mate comparável com a das bebidas energéticas (8,9). Considerável teor de teobromina também é encontrado na erva-mate, enquanto que a presença de teofilina na maioria dos estudos não é detectada (5,10).

A ação da cafeína tem sido investigada como opção terapêutica em uma variedade de problemas relacionados à saúde e ao desempenho humano (11). Muitos estudos confirmam a capacidade da cafeína em melhorar o humor e o estado de alerta (12) o desempenho do exercício, (13), o desempenho intelectual, a atenção e o tempo de reação (14). Também contribui potencialmente para reduzir fatores de risco envolvidos na síndrome metabólica, incluindo diabetes mellitus tipo 2 e obesidade (15). Além disso, pesquisas sugerem que a cafeína pode auxiliar na redução dos sintomas associados à doença de Parkinson, tais como a deterioração das habilidades motoras e tremores (16).

Uma vez ingerida, a cafeína é rapidamente absorvida e sofre metabolismo hepático (17), formando 3 metabólitos principais: 3,7-dimetilxantina, 1,7-dimetilxantina e 1,3-dimetilxantina (18). Doses orais de cafeína (100 a 200 mg) estimulam o córtex cerebral, produzindo um fluxo de pensamentos mais claro e rápido, em pacientes com fadiga produz alerta e melhora a coordenação motora. Existe uma considerável diferença entre a dose terapêutica e a dose letal de cafeína, esta última está compreendida entre 5 e 10g (19).

Devido a importância socioeconômica da erva-mate no Brasil buscou-se simular o processamento de chá preto utilizando a erva-mate (acrescentando hífen), visto que esta espécie apresenta metabólitos secundários benéficos à saúde semelhantes aos encontrados na *Camellia sinensis.* O processamento da *Camellia sinensis* para obtenção do chá preto envolve as etapas colheita de folhas imaturas, pré-desidratação, rolagem e oxidação. A etapa de rolagem destina-se a promover o rompimento das células para expor as enzimas polifenoloxidases e peroxidases responsáveis pela oxidação. O tempo e a temperatura são fatores importantes para a qualidade do chá-preto (20).

Este estudo objetivou acompanhar o teor de cafeína em diferentes condições de processo oxidativo de folhas de erva-mate.

Material e métodos

Matéria-prima

A erva-mate utilizada neste estudo foi proveniente de um cultivo homogêneo de produção a pleno sol, localizado no interior do município de Barão de Cotegipe - RS, Brasil, a 27º37'15" de latitude Sul 52°22'47'' e longitude Oeste, altitude de 765 m.

Coleta e preparo das amostras

Folhas de pequenos ramos (1,5 cm de diâmetro) com idades de 1, 6,5 e 12 meses foram coletadas no período da manhã, sendo estas acondicionadas em redes de tecido e levadas ao laboratório para posterior processamento. As folhas foram colocadas em estufa com circulação de ar a 30 ºC para a perda de umidade de acordo com o planejamento (Tabela 1) e submetidas ao processo de rolamento, com a finalidade de expor as peroxidases e polifenoloxidases. Posteriormente foram acondicionadas em bandejas e postas em uma câmara durante 24 horas com diferentes temperaturas e umidades relativas, com a finalidade de estimular o processo oxidativo, medindo os teores de cafeína ao longo do mesmo.

Delineamento Experimental

Um planejamento fatorial do tipo Plackett-Burman (21) de 12 ensaios com 3 repetições no ponto central foi efetuado, tendo como variáveis independentes: folha (idade e umidade); câmara de oxidação (temperatura, umidade e iluminação). As variáveis máximas foram denominadas (+1), as variáveis mínimas denominadas (-1) e as variáveis intermediárias (0), como descrito na Tabela 1. A variável dependente foi a quantidade de cafeína. Os dados foram analisados pelo programa Statistica 6.0 (Stat. Soft. Ine, 1997) e para verificação dos efeitos utilizou-se o gráfico de Pareto.

Tabela 1: Delineamento experimental dos tratamentos para verificação do teor de cafeína em folhas de erva-mate submetidas a diferentes processos

Experimento	Folha		Câmara		
	Umidade	Idade	Temperatura	Luz	Umidade
1	-1 (35)	+1 (12)	+1 (40)	-1 (escuro)	-1 (80)
2	+1 (65)	-1 (1)	+1 (40)	-1 (escuro)	+1 (100)
3	-1 (35)	+1 (12)	-1 (26)	+1 (claro)	+1 (100)
4	+1 (65)	+1 (12)	+1 (40)	-1 (escuro)	-1 (80)
5	+1 (65)	-1 (1)	+1 (40)	+1 (claro)	+1 (100)
6	-1 (35)	+1 (12)	+1 (40)	-1 (escuro)	+1 (100)
7	+1 (65)	+1 (12)	-1 (26)	-1 (escuro)	+1 (100)
8	+1 (65)	+1 (12)	-1 (26)	+1 (claro)	-1 (80)
9	+1 (65)	-1 (1)	-1 (26)	+1 (claro)	-1 (80)
10	-1 (35)	-1 (1)	+1 (40)	+1 (claro)	-1 (80)
11	-1 (35)	-1 (1)	-1 (26)	-1 (escuro)	+1 (100)
12	-1 (35)	-1 (1)	-1 (26)	-1 (escuro)	-1 (80)
13	0 (50)	0 (6,5)	0 (33)	0 (intermediário)	0 (90)

Análise de cafeína

Para a análise de cafeína foram utilizadas cinco (5,0) gramas de amostra, limpa e finamente dividida, essa foi deixada em ebulição com 100 mL de água ultra pura (Milli-Q), por 30 minutos. Em seguida, a infusão foi filtrada a vácuo, lavando-se o resíduo sólido com cerca de 20 mL de água quente. O extrato resultante foi recolhido em um balão volumétrico de 200 mL, o qual teve seu volume final aferido com água.

As análises foram efetuadas em um cromatógrafo Agilent 1100 Series com sistema de eluição gradiente, composto por: Coluna analítica SB-C18 ZORBAX (4,6' x 250mm) 5 micron; Pré-coluna C18 (4,6' x 12,5mm) 5 micron; Injetor Automático Agilent 1100 Series; Detector espectrofotométrico UV-visível Agilent 1100 Séries, operando em 280 nm; Sistema de aquisição de dados Chem Stations Agilent. Como fase móvel empregou-se uma mistura metanol: água (40/60), com vazão de 1 $mL \cdot min^{-1}$.

A curva padrão de cafeína foi obtida por meio da análise de soluções metanólicas deste padrão nas concentrações de 1, 5, 10, 30 e 50 $mg \cdot L^{-1}$. As áreas dos picos referentes a cada concentração foram medidas eletronicamente e plotadas em diagrama de área *versus* concentração, calculando-seo coeficiente de regressão linear e a equação da reta.

Resultados e discussões

Nas condições cromatográficas empregadas, o padrão de cafeína apresentou tempo de retenção de 7,4 min enquanto nas amostras em estudo o tempo foi de 8,2 min. A Figura 1.a representa a eluição do padrão de cafeína e a Figura 1.b da cafeína presente no extrato de erva-mate submetida à oxidação (b).

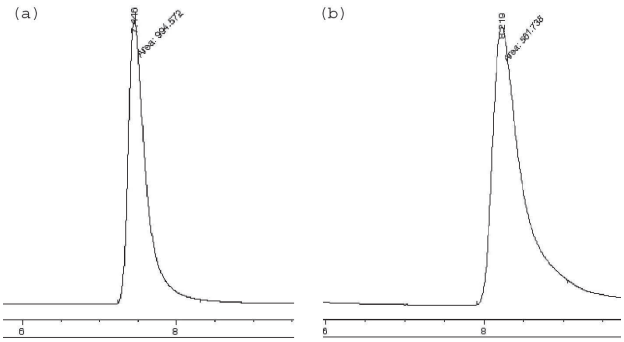

Figura 1: Perfis cromatográficos de cafeína padrão (a) e cafeína em erva-mate oxidada (b).

A curva de calibração da cafeína mostrou-se linear nas faixas de concentração empregadas, apresentando, coeficiente de regressão (r^2) 0,9999. A equação da reta obtida por regressão linear para cafeína foi $y = 32,261 \cdot x - 15,235$, onde *y* representa a área do pico (mV.s) e *x* representa a concentração de cafeína ($mg \cdot L^{-1}$).

Análise dos efeitos experimentais

As variáveis que tiveram efeito significativo negativo consistiram na idade da folha e umidade da câmara. A cafeína tende a diminuir seu teor (%) conforme o aumento da idade das folhas. Isto pode estar relacionado com a quantidade de massa seca presente na folha, a qual aumenta com a idade e consequentemente na folha pré-desidratada, enquanto que na folha jovem a cafeína encontra-se mais concentrada.

Nos vegetais, as metilxantinas estão envolvidas no metabolismo do nitrogênio e do carbono, participando de reações de transmetilação-desmetilação, sendo precursoras de outros metabólitos, em algumas circunstâncias com papel alelopático e autotóxico, bem como favorecendo a adaptação do vegetal a ambientes desfavoráveis. Apresentam um papel diferenciado dependente da espécie vegetal e do órgão (5). No presente estudo é possível que os percentuais variados de cafeína obtidos estejam relacionados ao estresse emitido à folha pelo processo de rolagem com a exposição das enzimas responsáveis pelo processo oxidativo.

Estudo prévio indicou ser necessária a retirada de parte da umidade da folha, para efetuar o processo de rolagem e liberar enzimas oxidativas sem modificar a anatomia da folha (2).

Além da idade da folha, fatores climáticos podem interferir no teor de umidade das folhas. Estudos anteriores demonstram que além da influência da emissão de folhas, outros fatores podem desempenhar papel relevante nos teores de metilxantinas, como intensidade de luz e temperatura, idade da planta, condições de estresse, ataque de predadores, tipo de poda e intervalo entre podas, entre outros, além de diferenças entre as metodologias de coleta, extração e quantificação utilizadas (22).

As variações no teor de cafeína em folhas de erva-mate submetidas à oxidação nos tempos de 0 e 24 horas são mostradas na Figura 2, em diferentes condições experimentais (temperatura: 26 °C; 33 °C e 40 °C, umidade da câmara: 80%; 90% e 100%, idade das folhas: 1,0 mês; 6,5 meses e 12,0 meses, umidade das folhas: 35%; 50% e 65%). Nas condições do experimento 10 houve uma redução de 12% no teor de cafeína, enquanto nas condições do experimento 5 aumentou em 148%.

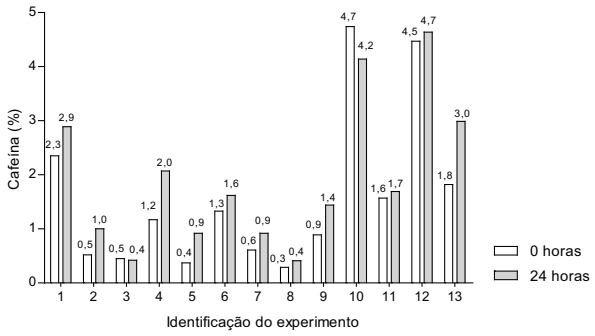

Figura 2: Teor de cafeína (%) nos tempos de 0 e 24 horas em folhas de erva-mate submetidas a oxidação sobre diferentes condições experimentais. As condições de cada experimento estão descritas na Tabela 1.

A temperatura e a umidade da câmara exerceram influência no teor de cafeína, durante o período de oxidação. A idade das folhas influenciou este processo e quando folhas de diferentes idades foram submetidas à oxidação em diferentes condições de temperatura e umidade em câmara de incubação, houve variação nos teores de cafeína, tendendo a um aumento.

Os teores de cafeína variaram na faixa de 0,37 a 4,74% no tempo zero para folhas de um mês de idade e 0,29 a 2,35% no tempo zero para folhas de 12,0 meses. Para o tempo de 24 horas de oxidação a variação foi de 0,92 a 4,64% nas folhas de um mês de idade e de 0,41 a 2,89% nas folhas de 12,0 meses. As folhas oxidadas em condições intermediárias de incubação (33°C, 90% e 6,5 meses) apresentaram uma média entre as variações de folhas de 1 e 12 meses, para ambos os tempos avaliados (zero e 24 horas de oxidação).

Houve um aumento na concentração de cafeína em folhas de erva-mate durante o período de oxidação.

O resultado experimental representado pelo diagrama de Pareto mostra os valores do efeito de cada variável independente sobre a resposta. Observa-se que a umidade da câmara e da folha apresentaram efeito significativo negativo sobre o teor de cafeína. Quanto maior a umidade da folha e a umidade da câmara, menor o teor de cafeína durante o período de incubação. (Figura 3).

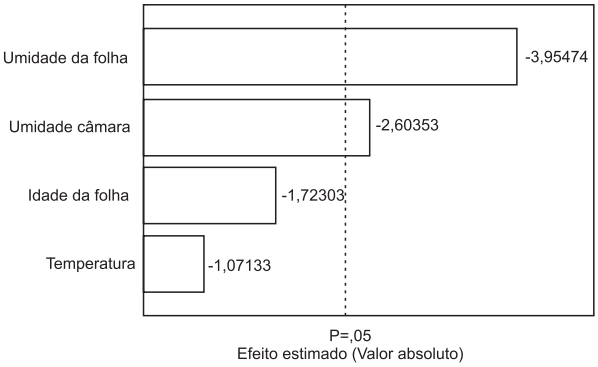

Figura 3: Diagrama de Pareto mostrando o efeito das variáveis em triplicata sobre a cafeína após 12h de oxidação.

Durante o processo de fermentação da *Camellia sinensis* para a obtenção do chá preto, também é descrito um aumento no teor de cafeína com o período de fermentação/oxidação (23, 24).

A erva-mate submetida ao processo oxidativo sofreu um estresse severo na etapa do "roolling" (prensagem de folhas), onde possivelmente a cafeína aumente sua concentração com o objetivo de servir de metabólito para certas reações oxidativas. Houve uma forte correlação positiva entre o teor de cafeína em 0 e 24 do processo oxidativo (Figura 4).

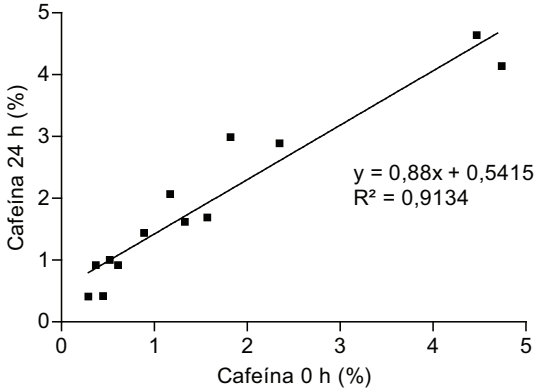

Figura 4: Relação linear entre o teor de cafeína no inicio e no final do processo oxidativo.

Estudos de morfogênese de erva-mate efetuados a campo por Rakocevik et al. (25), relatam dois picos máximos de crescimento: outubro, novembro e março, o que indica haver uma grande quantidade de folhas jovens nesses períodos. Schubert et al. (22) avaliando o teor de metilxantinas (cafeína e teobromina) em *I. paraguariensis*, durante os 12 meses do ano, demonstraram que este é diminuído nos meses de maio, junho, julho, agosto e setembro, o que corresponde a um período onde existe o mínimo de folhas jovens. Os picos de crescimento são mais altos no período de desenvolvimento pleno, o que confirma os dados obtidos neste estudo.

Alguns testes mostraram um valor discrepante de cafeína, o que pode estar relacionado ao fato de que durante a coleta podem ter sido retiradas muitas folhas de uma única progênese. Estudos desenvolvidos mostraram que em uma determinada progênese o teor de cafeína foi alto (26).

Conclusão

Folhas jovens de erva-mate (um mês de idade) possuem maior teor de cafeína (considerando-se o peso em massa seca) em relação às folhas com maior grau de maturação (6,5 meses) e maduras (12,0 meses).

O teor de cafeína em folhas de erva-mate aumenta com o período de oxidação de 24 horas. Folhas de erva-mate com 6,5 meses de idade apresentam teores de cafeína intermediários entre as folhas de 1,0 e 12,0 meses de idade.

No período de oxidação, a umidade da folha e a umidade da câmara apesentaram efeito significativo negativo sobre o teor de cafeína. O teor de cafeína foi inversamente proporcional a umidade da folha e da câmara, para o tempo de 24 horas de incubação.

Referências

1. **Sidra, Sistema IBGE de Recuperação Automática (1998),** Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. Página da web: http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp. (verificado 30 Nov. 1998).
2. **Molin, R. F.; Valduga, A. T.; Luccio, M.; Dartora, N.; Cichoski, A. J.; Pistore, M.; Rigo, E.,** Assessment of Oxidation of Leaves of *Ilex paraguariensis* (St. Hil). *Babt.* v.54: p.337-345. 2011.
3. **Dartora, N.; De Souza, L. M.; Santana-Filho, A. P.; Iacomini, M.; Valduga, A. T.; Gorin, P. A. J.; Sassaki, G. L.,** UPLC-PDA"MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing, *Food Chem.* v.129: p.1453-1461. 2011.
4. **Valduga, A. T.; Finzer, J. R. D.; Mosele, S. H.,** Processamento de Erva-mate. Erechim: Edifapes. 2003.
5. **Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org.)** Farmacognosia da planta ao medicamento. 3.ed Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001.
6. **Andrews, K.W.; Schweitzer, A.; Zhao, C.; Holden, J.M.; Roseland, J.M.; Brandt, M.; Dwyer, J.T.; Piccianom, F.; Saldanha, L.G.; Fisher, K.D.; Yetley, E.; Betz, J.M.; Douglass, L.,** The caffeine contents of dietary supplements commonly purchased in the US: analysis of 53 products with caffeine-containing ingredients, *Anal Bioanal Chem.* v.389: p.231-239. 2007.
7. **Mccusker, R.R.; Goldberger, B.A.; Cone, E.J.,** Caffeine content of specialty coffees, *J Anal Toxicol.* v.27: p.520-522. 2003.
8. **Heck, C.I.; De Mejia, E.G.,** Yerba Mate Tea *(Ilex paraguariensis):* A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations, *J. Food Sci.* v.72: p.138-151. 2007.
9. **Jun, X.,** Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing. *J. Food Eng.* v.94: p,105-109. 2009.
10. **Dutra, F. L. G.; Ribani, R. H.,** Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate, *Quim Nova,* v. 33: p.119-123. 2010.
11. **Smit, H. J.; Rogers, P. J.,** Effects of energy drinks on mood and mental performance: critical methodology, *Food Qual Pref.* v.13: p.317–326. 2002.
12. **Lorist, M.; Tops, M.M.,** Caffeine, fatigue and cognition, *Brain Cogn.* v.53: p.82–94. 2003.
13. **Doherty, M.; Smith, P.M.,** Effects of caffeine ingestion on exercise testing: a metaanalysis. *In tn J Sport Nutr Exerc Metab*. v.14: p. 626–646. 2004.
14. **Cysneiros, R.M.; Farkas, D.; Harmatz, J.S.; Von Moltke, L.L.; Greenblatt, D.J.,** Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between zolpidem and caffeine, *Clin Pharmacol Ther.* v.82: p.54–62. 2007.
15. **Hino A.; Adachi, H.; Enomotom, F. K.; Shigetoh, Y.; Ohtsuka, M.; Kumagae, S.I.; Hirai, Y.; Jalaldin, A.; Satoh, A.; Imaizumi, T.,** Habitual coffee but not green tea consumption is inversely associated with metabolic syndrome an epidemiological study in a general Japanese population, *Diabetes Res Clin Practice*. v.76: p.383–389. 2007.
16. **Trevitt, J.; Kawa, K.; Jalali, A.; Larsen, C.,** Differential effects of adenosine antagonists in two models of parkinsonian tremor, *Pharmacol Biochem Behav.* v.94: p.24–29. 2009.
17. **Nawrot, P.; Jordan, S.; Eastwood, J.; Rotstein, J.; Hugenholtz, A.; Feely, M.,** Effects of caffeine on human health, *Food Addit Contam.* v. 20: p.1–30. 2003.
18. **Genaro, A. R. et al.,** Renington: The Science and praticeof pharmacology. 20.ed, University of Sciences in Philadelphia. 2000
19. **Bonati, M.; Latini, R.; Galletti, F.; Young, J.F.; Tognoni, G.; Garattini, S.,** Caffeine disposition after oral doses, *Clin Pharmacol Ther.,* v.32: p.98–106. 1982.
20. **Muthumani, T.; Kumar, K.,** Influence of fermentation time on the development of compounds responsible for quality in black tea, *Food Chem.* v.101: p.98-102. 2007.
21. **Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F.,** Planejamento de experimentos e otimização de processos. Casa do Pão: Campinas – SP. 2005.
22. **Schubert, A.; Zanin, F. F.;** Pereira, D. F.; Athayde, M. L., Annual variations of mehtylxanthines in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) samples in Ijuí and Santa Maria, State of Rio Grande Do Sul, *Quím Nova,* v.29: p.1233–1236. 2006.
23. **Wang, Z. S.; Tan, H. W.; Shi, L.,** Dynamics of major nitrogenous compounds during the primary processing of dark green tea, J.Tea Sci. v.11: p.29-33. 1991.
24. **Xiaogang, W.; Shuxia, H.; Xiaochun, W.; Caiyuan, P.,** Effect of Microbial Fermentation on Caffeine Content of Tea Leaves, *Journal Agric. Food Chem.* v.53: p.7238-7242. 2005.
25. **Rakocevik, M; Medrado, M. J. S; Lucambio, F; Valduga, A. T.** "Ritmicidade de emissão e de queda de folhas e as suas conseqüências no manejo da erva-mate". In: Anais do 4° Congresso Sudamericano de la yerba mate; 4ª Reunião técnica de la Yerba mate; Exposición de agronegocios de la yerba mate. Posadas, Misiones, Argentina, p.70-78. 2006.
26. **Valduga, A. T.,** *Uso Sustentado e Processamento de Ilex paraguariensis St. Hil* (Erva-mate). Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos. 2002.

Recibido: 16/10/2012
Aprobado: 05/04/2013

- Borges, Ana Cláudia Piovezan[1]
  Graduada em Ciências Biológicas. Mestranda em Ecologia - URI, Erechim, Brasil. anacpborges@hotmail.com

- Dartora, Nessana[3]
  Graduada em Ciências Biológicas, Mestre em Bioquímica, Doutoranda em Bioquímica – UFPR – Paraná, Brasil. nessa.dartora@gmail.com

- Ril, Franciele T.
  Graduada em Farmácia. Farmacêutica. Brasil. franciril@bol.com.br

- Gonçalves, Itamar L.
  Graduando em Farmácia. Brasil. itamar3141@yahoo.com.br

- Valduga, Alice Teresa[2]
  Graduada em Ciências Biológicas, Mestre em Bioquímica, Doutora em Ecologia e Recursos Naturais. Professora da URI – Campus de Erechim, Brasil. valice@uricer.edu.br

1. Departamento de Ciências Biológicas, URI - Campus de Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621 – Cx. Postal 743, Erechim, RS, Brasil.
2. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, UFPR, Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba, PR, Brasil.
3. Departamento de Ciências da Saúde, URI - Campus de Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621 – Cx. Postal 743, Erechim, RS, Brasil.