

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**PERFIL FITOQUÍMICO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE
ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A.St. Hill.)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Zilda Ceolin Colpo

Uruguaiana, RS, Brasil

2012

**PERFIL FITOQUÍMICO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE
ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A.St. Hill.)**

por

Ana Zilda Ceolin Colpo

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestra em Bioquímica**, pelo programa de
Pós-graduação em Bioquímica, da
Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Folmer

Uruguaiana, RS, Brasil

2012

Ana Zilda Ceolin Colpo

PERFIL FITOQUÍMICO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE
ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A.St. Hill.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestra em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 16 de novembro de 2012.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Vanderlei Folmer
(UNIPAMPA)

Prof^a. Dr^a. Flávia Carla Meotti
(USP)

Prof^a. Dr^a Francielli Weber Santos Cibin
(UNIPAMPA)

REFLEXÃO

“Não importa onde você parou... em que momento da vida você cansou...
O que importa é que sempre é possível e necessário “recomeçar”.
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo... renovar as esperanças na vida
e, o mais importante...acreditar em você de novo.
Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado...
Chorou muito? Foi limpeza da alma...
Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia...
Sentiu-se só por diversas vezes? É porque fechaste a porta até para os anjos...
Acreditou que tudo está perdido? Era o início, tua melhora...
Aonde você quer chegar? Ir alto? Sonhe alto...
Queira o melhor do melhor...
Se pensamos pequeno... coisas pequenas teremos...
Mas se desejarmos fortemente o melhor e principalmente lutarmos pelo melhor...
o melhor vai se instalar em nossa vida.
Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura.”

Carlos Drummond de Andrade

Dedico ao velho...
Obrigada pai,
Saudade...

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Fundação Universidade Federal do Pampa

PERFIL FITOQUÍMICO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A.St. Hill.)

AUTORA: Ana Zilda Ceolin Colpo

ORIENTADOR: Vanderlei Folmer

Uruguiana, 16 de novembro de 2012

A erva-mate, cientificamente denominada, *Ilex paraguariensis* St. Hil. Var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae), trata-se de uma árvore que cresce naturalmente em florestas da América do Sul (na Argentina, sul do Brasil, Uruguai e Paraguai). Bebidas a base de ervas-mate denominadas “mate”, “chimarrão” ou “tererê” fazem parte dos hábitos e costumes da população local. Nos últimos anos, através da ampliação do conhecimento científico a respeito de seus efeitos na saúde, os usos da planta têm se expandido para outras partes do mundo e são descritas diversas possibilidades de aplicação. Suas ações incluem atividades antioxidante, antiinflamatória, antimutagênica, antiglicação entre outras, sendo estas diretamente relacionadas aos compostos bioativos presentes, especialmente na folha da árvore (principal parte utilizada para produção da erva-mate). Entre as substâncias conhecidas estão os polifenóis, saponinas, xantinas, minerais e vitaminas. Muitos fatores influenciam o teor desses compostos no produto final que é comercializado e por conseqüência no que é ingerido pelo consumidor. O presente estudo avaliou a composição fitoquímica e os potenciais antioxidantes de extratos de ervas comercializados no Brasil, Argentina e Uruguai. Objetivando a obtenção de extratos com composição similar aos ingeridos pela população, preparou-se a bebida da forma tradicional e empregou-se uma forma de extração que mimetiza seu consumo. A partir desses extratos (mates) foram quantificados o conteúdo total de polifenóis, as concentrações das substâncias: ácido

clorogênico, ácido cafeico, cafeína e teobromina e analisados os potenciais antioxidantes dos extratos. Para este fim foram utilizadas análises cromatográficas, espectrofotométricas e desenvolvidos ensaios, *in vitro*, que testaram a capacidade dos extratos seqüestrarem óxido nítrico e quelarem ferro. Foi possível verificar que a seqüência de extrações é um fator que influencia no conteúdo extraído, visto que houveram diferenças significativas entre os primeiros e os últimos extratos. Além disso, verificou-se que a capacidade antioxidante dos extratos é expressiva e se mantém mesmo em extratos onde a concentração de compostos apresenta decaimento significativo. No entanto, foram notadas variações relacionadas principalmente às nacionalidades das ervas. Este estudo sintetiza uma contribuição importante para futuras pesquisas, pois elucidada o que é ingerido quando a bebida é consumida da forma que a população o faz, colocando a forma de extração como um importante fator, relacionado ao desfecho de seu consumo na saúde.

Palavras-chave: erva-mate; antioxidante; polifenóis; metilxantinas; chimarrão

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

PHYTOCHEMICAL PROFILE AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF YERBA
MATE EXTRACTS (*Ilex paraguariensis* A.St. Hill.)

AUTHOR: Ana Zilda Ceolin Colpo

ADVISOR: Vanderlei Folmer

Uruguiana, November 16, 2012

The yerba-mate, scientifically named, *Ilex paraguariensis* St. Hil. Var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae), it is a tree that grows naturally in forests of South America (in Argentina, southern Brazil, Uruguay and Paraguay). Yerba mate based drinks are part of the customs and habits of the population and are called "mate", "chimarrão" or "tererê". In recent years, through the expansion of scientific knowledge about their effects in health, the plant uses has been expanded to other parts of the world and are described various possibilities of the application. Their actions include antioxidant capacity, anti-inflammatory, antimutagenic, anti-glycation and others, which are directly related to the bioactive compounds presents, especially in the leaves of the tree (the main part used for the production of yerba mate). Among the substances known are polyphenols, saponins, xanthines, vitamins and minerals. Many factors influence the content of these compounds in the end product that is marketed, and consequently in what is ingested by the consumer. The present study evaluated the phytochemical composition and the antioxidant potential of yerba-mate extracts sold in Brazil, Argentina and Uruguay. Aiming to get extracts with composition similar to the population consumes, the beverage was prepared in the traditional way and to extraction was used a method that mimics its consumption. From these extracts (mates) were quantified the total polyphenol content, the concentrations of the substances: chlorogenic acid, caffeic acid,

caffeine and theobromine, and analyzed the antioxidant potential of the extracts. To this end were developed chromatographic, spectrophotometric analysis and, *in vitro*, carried out trials that tested the ability of the extracts to scavenger oxide nitric and to chelate iron. Was observed that the sequence of extraction is a factor that influences the extracted content, since there were significant differences between the first few and the last ones extracts. It was found that the antioxidant activity of the extracts is quite significant and remains in extracts where the concentration of compounds presents significant decline. However variations were noted, it's related primarily to the nationalities of herbs. This study summarizes an important contribution to other research, because it clarifies what is ingested when it is drunk the way that people do it, putting the extraction as an important factor related to the outcome of their consumption on health.

Keywords: yerba-mate; antioxidant; polyphenols; methylxanthines; mate

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1- Distribuição das áreas de ocorrência da erva-mate.	8
Figura 2- Aparatos utilizados para preparar e beber o chimarrão ou mate.....	9
Figura 3- Tabela ilustrativa de aplicações da erva-mate.	11
Figura 4- A erva-mate do produtor ao consumidor	17
Figura 5- Amostras da erva-mate comercializadas na Argentina.	18
Figura 6- Amostras da erva-mate comercializadas no Brasil.....	19
Figura 7- Amostras da erva-mate comercializadas no Uruguai.	20
Figura 8- Resumo da principal via de biossíntese de polifenóis, com exemplos das estruturas de parte desta classe de compostos.	23
Figura 9- Exemplos de alguns polifenóis conhecidos e estudados..	24
Figura 10- Estrutura química do ácido clorogênico.	25
Figura 11- Estrutura química das principais metilxantinas.....	26
Figura 12- Visão geral da produção de ROS mitocondrial.....	29

Figura 13- Estresse oxidativo no contexto da doença.....	30
---	----

MANUSCRITO

Figure1- Utensils used for preparation and consumption of “chimarrão” beverage.....	64
---	----

Figure 2- Suction system.....	65
-------------------------------	----

Figure 3- Substances detected by HPLC in extracts (mates).....	66/67/68/69
--	-------------

Figure 4- Effects of extracts on NO scavenging assay.....	70
---	----

Figure 5 - Iron chelating properties of mates (extracts).....	71
---	----

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1- Quantification of the total polyphenolic compounds (TPC), from the different herbs used in this study, expressed in g GAE/100 ml of the sample. **Ar 1, Ar 2, Ar 3-** Argentine brands; **Br 1, Br 2, Br 3-** Brazilian brands; **Uy 1, Uy 2, Uy 3-**Uruguayan brands. 1, 2, 5, 10, 15- mates (extracts) analyzed. Values were expressed as means \pm standard deviation. Values marked by the same lower-case superscript letters (from “a” to “d”) within a line denote statistically significant differences in the concentration of the compounds between the mates..... 62

Table 2- Pearson correlations between TPC and antioxidant capacity in extracts. **Ar 1, Ar 2, Ar 3-** Argentine brands; **Br 1, Br 2, Br 3-** Brazilian brands; **Uy 1, Uy 2, Uy 3-**Uruguayan brands.....63

LISTA DE ABREVIATURAS

5-CQA- Ácido 5-cafeoilquínico

AGE- Produtos da glicação avançada

CASPASE- Cisteína- aspártica- protease específica

CAT- Catalase

CLAE- Cromatografia Líquida de alta eficiência

COX₂/PGE- Cicloxigenase 2/prostaglandina

CGA- Ácido clorogênico

DPPH- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GAE- ácido gálico

GPX- Glutathione peroxidase

HDL-C- Lipoproteína de alta densidade- colesterol

HOCL/OCL⁻ - Ácido hipocloroso / íon hipoclorito

iNOS/NO- Óxido nítrico sintase induzida

INYM- Instituto Nacional de La Yerba-Mate

LDL- Lipoproteína de baixa densidade

PON-1- Paroxonase 1

ROS- Espécies reativas de oxigênio

SIAL- Rede Científica de Sistemas Agroalimentares Localizados

SOD- Superóxido- dismutase

TBARS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

UV- Ultra-violeta

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	I
RESUMO.....	II
ABSTRACT	IV
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1 APRESENTAÇÃO	1
2 INTRODUÇÃO	2
3 JUSTIFICATIVA	4
4 OBJETIVOS	5
4.1 Objetivo Geral.....	5
4.2 Objetivos Específicos	5
5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
5.1 Erva- mate.....	6
5.2 Principais produtos e usos da erva-mate	8
5.3 Industrialização e beneficiamento da erva-mate	11
5.3.1 Colheita	12

5.3.2	Sapeco	12
5.3.3	Secagem	12
5.3.4	Cancheamento	13
5.3.5	Beneficiamento.....	14
5.3.6	Envelhecimento ou estacionamento.....	15
5.4	Composição fitoquímica da erva-mate	21
5.4.1	Compostos fenólicos	22
5.4.2	Metilxantinas	26
5.5	Estresse oxidativo e compostos antioxidantes	27
5.6	Atividades biológicas dos compostos a base de erva-mate	32
6	MANUSCRITO CIENTÍFICO	35
7	CONCLUSÕES	72
8	PERSPECTIVAS	73
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXO 1.....	86

1 APRESENTAÇÃO

As informações aqui contidas descrevem a organização textual desta dissertação. Os temas abordados estão apresentados no item INTRODUÇÃO. Na REVISÃO DE LITERATURA são descritas informações a respeito dos temas projetados para este estudo.

Os RESULTADOS obtidos na pesquisa, METODOLOGIA e MATERIAIS utilizados, bem como DISCUSSÃO dos resultados e REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS encontram-se no MANUSCRITO CIENTÍFICO que representa o estudo na íntegra.

A CONCLUSÃO refere-se às interpretações e comentários sobre os resultados apresentados no manuscrito científico. No item PERSPECTIVAS são observadas possibilidades de continuidade do estudo.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS reportam citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E CONCLUSÕES desta dissertação.

2 INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* St. Hil. Var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate é uma espécie nativa da América do Sul e tem sua área de ocorrência natural restrita a três países: Brasil, Paraguai e Argentina (VIEIRA et al., 2010).

Folhas secas e moídas de *Ilex paraguariensis* são usadas no preparo de uma bebida peculiar, consumida por parte da população da América do Sul. Nos países onde é consumida recebe diferentes denominações, sendo “chimarrão” no sul do Brasil, “mate” na Argentina e Uruguai e “tererê” no Paraguai (BRACESCO et al., 2010; HECK E MEJIA, 2007).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) pode ser considerada para inúmeras possibilidades, porém a literatura aponta que há necessidade de aprimoramento na qualidade dos seus produtos e na projeção das suas potencialidades. Um dos focos principais dos estudos sobre erva-mate envolve o conhecimento de compostos presentes em bebidas produzidas a partir da suas folhas, visto que nas últimas décadas o interesse por produtos com capacidade antioxidante apresentou elevado crescimento. No entanto, seus usos não se limitam a este, no Brasil um demonstrativo de sua viabilidade econômica é o projeto Carbona 4, que consiste em plantar erva-mate consorciada com árvores nativas, com os objetivos de reconstituir o habitat natural da planta e ampliar ganhos sociais e ambientais (CORREA et al.,2011).

Em relação às investigações que vinculam o consumo de produtos a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) com a saúde foram verificados avanços nos últimos anos. Vários estudos demonstram os benefícios de substâncias presentes em extratos de erva-mate e suas ações como antioxidante, antiinflamatório, antimutagênico, agente antiglicação e redutor de peso. Entre os compostos conhecidos estão ácidos fenólicos, saponinas, xantinas, minerais e vitaminas (BRACESCO et al., 2003; MATSUMOTO, 2009; HECK E MEJIA, 2007; FILIP et al., 2010).

Além disso, a utilização de substratos da planta e desenvolvimento de produtos com maior potencial tecnológico também vêm ganhando notoriedade nos estudos da erva-mate. Pagliosa et al. (2010) analisaram o perfil

cromatográfico e a capacidade antioxidante da casca dos ramos da árvore *Ilex paraguariensis* e compararam com as folhas, observando que a casca também possui elevado teor de compostos e significativa capacidade antioxidante, merecendo ser considerado seu potencial para aplicação no desenvolvimento de novos produtos. Berté et al.(2011) desenvolveram extratos de erva-mate utilizando a tecnologia *spray drying*, e através da análise da capacidade antioxidante e composição fitoquímica do produto obtido concluíram que o uso dessa tecnologia pode compor uma fonte de matéria prima para indústria.

Em relação à questão principal deste estudo que visa sistematizar a análise dos extratos ingeridos pela população há poucos estudos, sendo o mais atual o de Meinhart et al.(2010). A maioria das publicações utiliza extratos aquosos ou etanólicos desenvolvendo metodologias de grande relevância pelos resultados apresentados. Porém a exploração da situação real de consumo das bebidas a base de erva-mate, especialmente onde é um hábito referencial como na região fronteira Argentina/Brasil/Uruguai, pode ser de importância singular.

Com o intuito de obter extratos com composição similar aos ingeridos pela população, neste estudo preparou-se a bebida da forma tradicional e empregou-se uma forma de extração que mimetiza seu uso. A partir das amostras obtidas analisou-se a composição fitoquímica e os potenciais antioxidantes de nove ervas comercializadas, sendo três obtidas no Brasil, três na Argentina e três no Uruguai.

O conteúdo total de polifenóis foi analisado por espectrofotometria e as concentrações das substâncias: ácido clorogênico, ácido cafeico, cafeína e teobromina foram quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Além disso, foram analisados os potenciais antioxidantes dos extratos, sendo desenvolvidos, *in vitro*, ensaios que avaliaram a habilidade “scavenger” de óxido nítrico e de quelação ferro.

3 JUSTIFICATIVA

O consumo de bebidas a base de erva-mate faz parte dos hábitos e costumes de algumas sociedades do sul da América do Sul. Especialmente para as populações da fronteira Argentina, Brasil e Uruguai desempenha um papel “ritualístico”, simbolicamente associado à camaradagem, diálogo, compartilhamento e sentimento de comunidade (RAU, 2008; BRACESCO et al., 2010).

A justificativa para este estudo fundamenta-se no propósito de investigar o que é consumido pela população da fronteira oeste do Rio Grande do Sul, onde o “chimarrão” ou “mate” é tradição. Alguns fatores relacionados à produção da erva-mate e ao preparo e consumo da bebida podem afetar o teor de compostos presentes nos extratos (mates). Desta forma, busca-se saber se há diferenças na composição fitoquímica das ervas comercializadas em estabelecimentos desta região e entender em que intensidade possíveis diferenças nas ervas e a seqüência de infusões e extrações, que ocorre quando se toma a bebida, afeta o teor de compostos bioativos nos extratos e a capacidade antioxidante dos mesmos.

Estes dados são relevantes no contexto regional visto que englobam particularidades da erva-mate e sintetizam a análise de algumas potencialidades dos extratos. Além disso, poderão contribuir como um importante referencial para embasamentos de estudos epidemiológicos que visem avaliar o impacto do consumo da bebida na saúde humana.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil fitoquímico e o potencial antioxidante de ervas (*Ilex paraguariensis*) comercializadas em três países da América Latina (Argentina, Brasil e Uruguai), através de extratos obtidos mimetizando a bebida denominada “chimarrão” ou “mate”.

4.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos de erva-mate mimetizando o chimarrão ou mate;
- Armazenar o primeiro, segundo, quinto, décimo e décimo quintos extratos (mates) e a partir da análise destes desenvolver as demais proposições que fazem parte do estudo;
- Quantificar a concentração de polifenóis em extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*);
- Por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), determinar o perfil fitoquímico dos extratos, verificando a concentração de: ácido cafeico, ácido clorogênico, cafeína e teobromina;
- Investigar o potencial antioxidante dos extratos através da avaliação da habilidade dos mesmos seqüestrarem óxido nítrico e quelarem ferro;
- Verificar se nos extratos analisados (que representam o consumo do chimarrão ao longo de 1 litro de água) há variações na concentração das substâncias analisadas e na capacidade antioxidante;
- Comparar, entre si, as marcas e nacionalidades das ervas utilizadas para obtenção dos extratos (Argentinas, Brasileiras e Uruguaias).

5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 Erva- mate

A origem da planta *Ilex paraguariensis* St. Hil. está localizada em uma região que se estende do leste do Paraguai, através de Missões do Norte da Argentina para os estados do Paraná e Santa Catarina no Brasil. Antes da chegada dos europeus na América, a erva era consumida pelos nativos como uma infusão de folhas secas e esmagadas. A secagem era feita usando uma lâmpada rudimentar feita a partir de uma vara de bambu e fibras vegetais. Existem indicações do comércio entre os Guaranis e os habitantes do Império Inca, porém não se sabe a magnitude (BURTNIK, 2006 p.7).

A árvore de erva-mate é uma espécie da América do Sul, nativa das florestas paranaenses, 80% de sua ocorrência é no Brasil, mas também existe naturalmente na Argentina e no Paraguai. De acordo com a classificação botânica oficial seu nome científico é *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. (SAINT-HILAIRE, 1995). Sua classificação científica é descrita como:

Reino: Plantas

Divisão: espermatófitos

Filial: Angiospermas

Classe: dicotiledôneas

Ordenação: Sapindales

Família: Aquifoliaceae

Gênero: *Ilex*

Espécie: *paraguariensis*

Nome científico: *Ilex paraguariensis*

Nome comum: Erva-Mate

(BURTNIK, 2006 p.8).

Ilex paraguariensis é uma árvore perene, que pode crescer a uma elevação de até 8-15 metros, as folhas possuem de 5- 8 cm de comprimento

são verdes, duradouras e com bordas serrilhadas. O florescimento ocorre durante a primavera, predominantemente no mês de outubro produzindo flores pequenas, unissexuais, que têm em torno de quatro ou cinco pétalas brancas, agrupadas em cimeiras fasciculadas nas axilas das folhas. As bagas são de cor vermelha contendo 4-5 sementes que são dispersas por aves. Há certa dificuldade na polimerização natural, pois muitas sementes que parecem ser maduras não têm mais do que uma fração de um embrião, o que ocorre por que embora em todas elas se encontrem estames e pistilos, nas femininas, os estames não funcionam e, nas masculinas, o pistilo aborta. (ZANON, 1988; HECK e MEJIA, 2007; BRACESCO et al.,2010).

A extensão da dispersão atinge uma área de aproximadamente 540.000 km², que abrange, no Brasil, os estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, na Argentina a Província de Misiones, parte da Província de Corrientes e pequena parte da Província de Tucumã e no Paraguai a área entre os rios Paraná e Paraguai (MEDRADO, 2005). Figura 1.



Figura 1- Distribuição das áreas de ocorrência da erva-mate.

Fonte: <http://mreugenio.wordpress.com/2012/07/03/chimarrao-mate>
Consultado em 01/08/2012

5.2 Principais produtos e usos da erva-mate

A tradicional bebida a base de erva-mate, chamada “chimarrão” no sul do Brasil, “mate” na Argentina e no Uruguai e “tererê” no Paraguai é muito peculiar, sendo para sua preparação e consumo utilizados aparatos específicos. No preparo do “chimarrão” ou “mate” utiliza-se um recipiente feito da fruta porongo que é chamado de “cuiá”, neste a erva ocupa dois terços do espaço interno e o volume livre é completado com água quente formando uma infusão parcial (parte da erva permanece seca) (MEINHART et al., 2010). O extrato aquoso resultante é sugado pelo consumidor usando um canudo de

metal, conhecido como bomba (HECK e MEJIA, 2007). A adição de água quente é repetida várias vezes, geralmente acompanhando as atividades diárias de tal forma que 1litro é bebido durante o período médio de uma hora (BRACESCO et al., 2010). Figura 2.



Figura 2- Aparatos utilizados para preparar e beber o chimarrão ou mate.

Fonte: o autor. <http://images.google.com.br/>, acessado em 05/08/2012

Nesta imagem: 1- cuia; 2- bomba; 3-erva-mate; 4-água quente; 5-mate

A preparação tererê é muito similar a do mate, porém obtido pela maceração da erva em água fria ou gelada. É costume no Paraguai e apreciado na região Centro-Oeste do Brasil (BASTOS e TORRES, 2003; MEINHART et al., 2010). Além dessas formas o mate também é consumido como chá, este produzido a partir da infusão da erva-mate submetida a processo de torrefação (BASTOS et al., 2007).

A Argentina é o maior produtor e exportador mundial de erva-mate (RAU, 2008; BRACESCO et al., 2010). No Uruguai o mate é considerado a bebida típica. De acordo com Bracesco et al., 2010 em relação ao uso de erva-mate este país tem o maior consumo per capita, sendo consumidos de 6-8 kg/pessoa/ano, em segundo lugar está a Argentina com média de 5 kg/pessoa/ano. No Brasil, é valorizado principalmente em três estados: Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, onde 70% da população masculina bebe “chimarrão” diariamente (BASTOS e TORRES, 2003; BRACESCO et al., 2010).

Atualmente, em função das demonstrações científicas dos efeitos benéficos do consumo de bebidas a base de erva-mate, seus usos estão se expandindo para países da Europa e América do Norte. No primeiro, em combinação com outras ervas, é usado para controle de peso, nos Estados Unidos é comercializado como bebida energética (VIEIRA et al., 2009; BRACESCO et al., 2010). Além disso, a erva-mate possui potencial que ultrapassa seu uso como bebida. Na década de 90 foram descritas algumas possibilidades, como mostra a Figura 3 (MAZUCHOWSKI e RUCKER, 1997 *apud* MEDRADO e MOSELE, 2010). No entanto, alguns autores vêm enfatizando que há muito a ser aprimorado com relação à qualidade dos produtos (ESMELINDRO et al., 2002).

Aplicação industrial	Subprodutos comerciais	Forma de consumo
Bebidas	- Chimarrão e tererê - Chá mate: queimado, verde ou cozido - Mate solúvel	Infusão quente ou fria
Insumos de alimentos	- Corante natural e conservante alimentar - Sorvete, balas, bombons, chicletes e gomas	Clorofila e óleo essencial
Medicamentos	- Estimulante do sistema nervoso central - Compostos para tratamento de hipertensão, bronquite e pneumonia	Extratos de cafeína e teobromina Extratos de Favonóides
Higiene geral	- Bactericida e antioxidante hospitalar e doméstico - Esterilizante e emulsificante	Extrato de saponinas e óleos essenciais
Produtos de uso pessoal	- Perfumes, desodorantes, cosméticos e sabonetes	Extrato de folhas (clorofila)

Figura 3- Tabela ilustrativa de aplicações da erva-mate.

Fonte: MAZUCHOWSKI e RUCKER (1997); *apud* MEDRADO e MOSELE, Embrapa Florestas Sistemas de Produção, 1 - 2ª edição ISSN 1678-8281 - Versão Eletrônica Ago/2010

5.3 Industrialização e beneficiamento da erva-mate

O processo básico de produção da erva-mate pouco se modificou ao longo dos anos, basicamente existem dois ciclos: o do cancheamento e o do beneficiamento (ROCHA JÚNIOR, 2001). Destes ciclos fazem parte as seguintes etapas:

5.3.1 Colheita

A colheita das folhas de erva-mate pode ser feita a cada dois ou três anos. É realizada retirando-se das árvores as partes dos ramos com galhos de diâmetro de aproximadamente 20 milímetros, que são desbastados da planta e depositados numa manta denominada “poncho”, ao redor das árvores (ROCHA JUNIOR, 2001).

5.3.2 Sapeco

Etapa feita em um cilindro rotativo metálico, que é inclinado e possui pequenas perfurações e pás internas que conduzem as folhas colhidas pelo seu interior onde entram em contato com as chamas. A temperatura média da erva na entrada do sapecador é de 400° C e na saída é de 65° C, sendo que o tempo de residência oscila em torno de 8 minutos. Os principais objetivos desta etapa são reduzir a umidade e inativar enzimas (peroxidases e polifenoloxidasas) que causam a oxidação do produto e escurecimento das folhas (VALDUGA, 1995; ROCHA JÚNIOR, 2001; ESMELINDRO et al., 2002; MENDES, 2005).

5.3.3 Secagem

Consiste em desidratar as folhas até que elas adquiram uma consistência quebradiça e crespa.

A operação de secagem de erva-mate pode ser feita no carijó, barbaquá ou em secadores mecânicos. No carijó, que é o processo mais primitivo, as

chamas atuam diretamente sobre a erva e no barbaquá o material recebe o calor por um canal subterrâneo na entrada do qual há uma fornalha (MENDES, 2005).

Atualmente, no processo de industrialização, inicialmente é feita a pré-secagem onde é realizada a redução de teor de água nas folhas e partes dos ramos. O processo é executado em cilindro rotativo semelhante ao de sapecamento, com tempo de residência de 2 a 9 minutos e temperatura em torno de 80° C, deixando o material com umidade final de 15% (NIETSCHE, 2002). Nesse processo são usados os secadores mecânicos que podem ser de dois tipos: rotativo ou de esteira.

A principal diferença entre os dois tipos de secadores está relacionada com o contato da matéria-prima com a fumaça durante o processo, o que influencia severamente o sabor do produto final (ESMELINDRO et al., 2002, ISOLABELA et al., 2010). No secador rotativo, a fumaça entra em contato direto com o produto, no secador de esteira, o contato é indireto, causando menores danos à matéria-prima (CONTRERAS, 2007).

Nas etapas de sapeco e secagem, o contato da matéria-prima com a fumaça da queima da madeira e temperaturas elevadas levam a geração de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), que são compostos formados pela combustão incompleta de material orgânico, e que em animais experimentais demonstraram potencial carcinogênico. De acordo com Ballus (2008) a presença desses compostos, nas ervas comercializadas, pode justificar a associação do consumo do mate com a incidência de alguns tipos de câncer.

5.3.4 Cancheamento

Após secas, as folhas passam pelo processo de peneiramento, denominado cancheamento, que pode ser feito por meio de um triturador de madeira dura (pequena escala), ou um cancheador metálico (escala industrial).

O método rústico e antigo de fragmentação consiste em colocar a erva-mate num galão de madeira circular, chamado “cancha”, cujo assoalho possui orifícios, sobre a cancha passa um cone dentado que fragmenta e tritura as folhas. Na indústria a redução de tamanho é feita por roscas, que moem e trituram as folhas secas de acordo com a rotação que é dada à rosca. Após esse processo o produto passa a denominar-se erva “cancheada” (ROCHA JUNIOR, 2001; ESMELINDRO et al., 2002).

A folha cancheada pode ser usada diretamente como matéria-prima para a produção de chás ou passar pelo processo de beneficiamento e ser denominada erva-mate (ESMELINDRO et al., 2002).

5.3.5 Beneficiamento

No beneficiamento propriamente dito, a erva adquire as características desejadas comercialmente e passa basicamente por três operações: o soque, a separação e a mistura.

O soque consiste em uma bateria de pilões mecânicos onde a erva-mate é socada até atingir a granulometria desejada. Quanto mais tempo a erva ficar nessa fase, mais fina ela será. A fase seguinte consiste em fazer a limpeza da erva-mate por meio de peneiras, ventiladores e filtros coletores de pó, o material é separado por uma série de peneiras, de acordo com os tamanhos das partículas, sendo os palitos também separados. Os palitos e as folhas são desidratados separadamente e, depois, agregados novamente na confecção das misturas (*blend*). Um dos fatores que pode influenciar a suavidade do sabor é a quantidade de palito que há na erva (ROCHA JUNIOR, 2001; HANSEL et al., 2008; ISOLABELLA et al., 2010).

5.3.6 Envelhecimento ou estacionamento

É o período de tempo necessário para o produto adquirir o sabor, o aroma e a cor desejados. Rau (2008) observou, em seu relato no IV Congresso da rede SIAL, que a obtenção de ervas de boa qualidade exige uma preparação cuidadosa, conhecimento e respeito aos tempos necessários de estacionamento.

O envelhecimento pode ser realizado em condições controladas de temperatura, umidade e circulação de ar, neste caso o processo é acelerado e leva de 30 a 60 dias, enquanto que no processo de envelhecimento natural o produto é armazenado em condições naturais de temperatura e umidade durante cerca de 9-12 meses (ISOLABELLA et al., 2010).

Segundo Contreras (2007) esta etapa é uma das mais importantes, pois nesta fase são atingidos os perfis de sabor necessários ao produto final. Em relação a erva produzida na Argentina, Burtinik (2006) observa que no processo de estacionamento natural o aroma e sabor da erva se tornam bastante apurados, já no acelerado há modificações na cor, sabor e aroma e isso faz com que o produto não seja aceito em todos os mercados. Porém Isolabella et al. (2010) demonstraram não haver diferenças no conteúdo metilxantinas, fenóis e flavonóides encontrados no produto final submetido aos diferentes tipos de envelhecimento.

Durante as fases do processo industrial, são produzidas mudanças na formação do sabor e na concentração dos compostos bioativos dos produtos a base de *Ilex paraguariensis*. A formação do sabor se dá pela auto-oxidação dos lipídios presentes nas folhas, que é bastante influenciada pelo tamanho das mesmas (a redução do tamanho aumenta a superfície de contato com o ar atmosférico), temperatura e grau de aeração da erva no estacionamento. Um exemplo disso é que a erva-mate sapecada apresenta teores de flavonóides e polifenóis cerca de 1,3 vezes maior que da erva seca ao ar. Esta última, no entanto, apresenta teores de xantinas duas vezes mais elevados (MENDES, 2005; CONTRERAS, 2007; ISOLABELLA et al., 2010).

Feita a composição da erva-mate, ela segue para ser embalada e é comercializada. A erva-mate beneficiada pode ter basicamente dois destinos (CONTRERAS, 2007):

1- Mercado consumidor: fabricação de compostos de chimarrão. Produto embalado em pacotes de papel, polietileno e aluminizados, para evitar o contato do produto com a umidade;

2- Mercado industrial: diferentes partes obtidas no beneficiamento (pó, goma, talos, folha cancheada) são embaladas separadamente e levadas à mistura para obter os produtos desejados, ou vendidas a terceiros.

Em função das preferências sensoriais da população consumidora, o produto final se apresenta com variações principalmente relacionadas à granulometria, presença de talos e envelhecimento, o que torna os produtos bastante diferenciados.

Na Argentina a erva moída com paus é consumida na Capital Federal e arredores, o restante do país consome erva-mate sem paus, em relação ao grau de trituração também existem diferenças, sendo a mais consumida a moída fina no litoral, norte e sul do país (INYM, 2001).

Os Uruguaios de modo geral preferem o mate com sabor forte, o tipo de erva-mate consumida no país é com folhas cortadas muito pequenas, sem paus, e com quantidade significativa de pó (YERBA MATE CAFÉ, 2008).

No Brasil há variações, porém na industrialização da erva-mate, são utilizadas folhas, pecíolos e ramos finos, tendo uma composição aproximada de 30% ramos e 70% folhas (HEINRICHS e MALAVOLTA, 2001).

Na figura 4 estão representadas as etapas envolvidas na produção da erva-mate. Nas figuras 5, 6 e 7 são apresentadas amostras das ervas-mates utilizadas neste estudo (as ervas foram adquiridas embaladas em estabelecimentos comerciais dos países Argentina, Brasil e Uruguai).

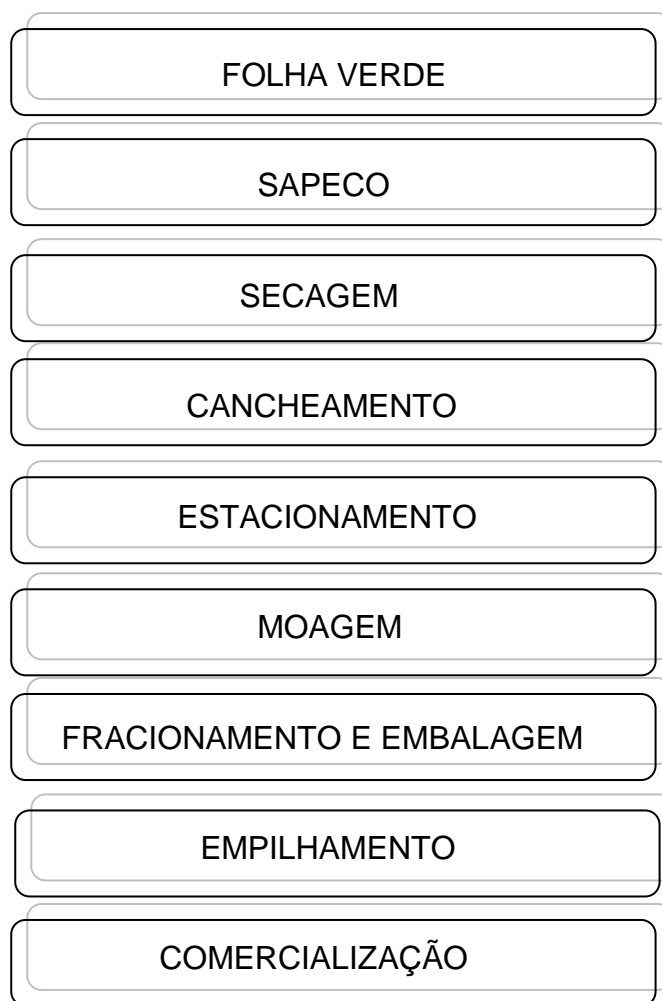


Figura 4- A erva-mate do produtor ao consumidor.

Fonte: Adaptado do Instituto Nacional de La Yerba-mate, 2006

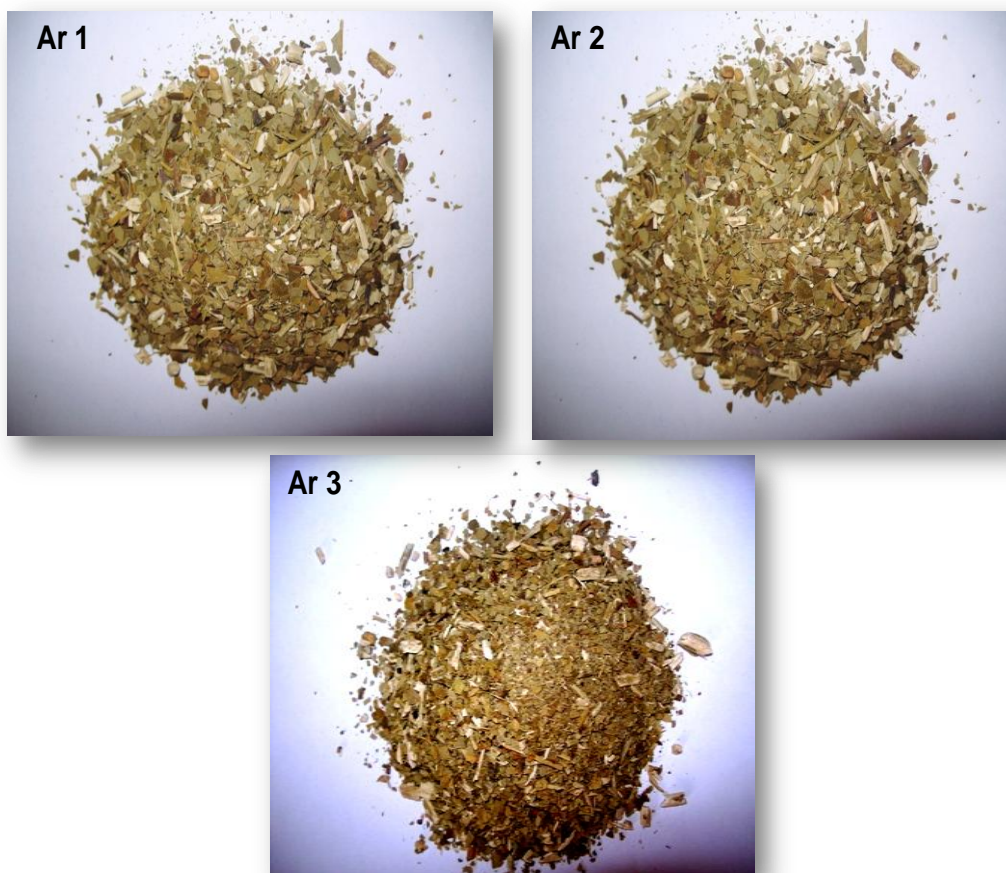


Figura 5- Amostras da erva-mate comercializadas na Argentina.

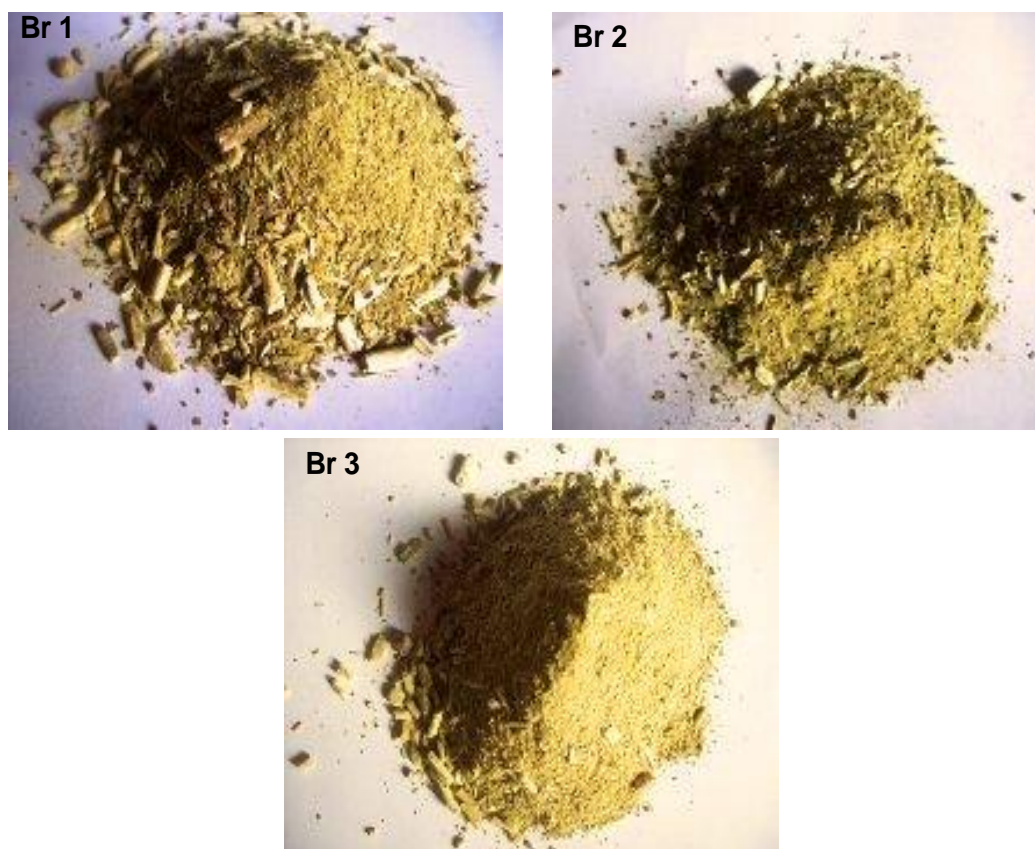


Figura 6- Amostras da erva-mate comercializadas no Brasil.

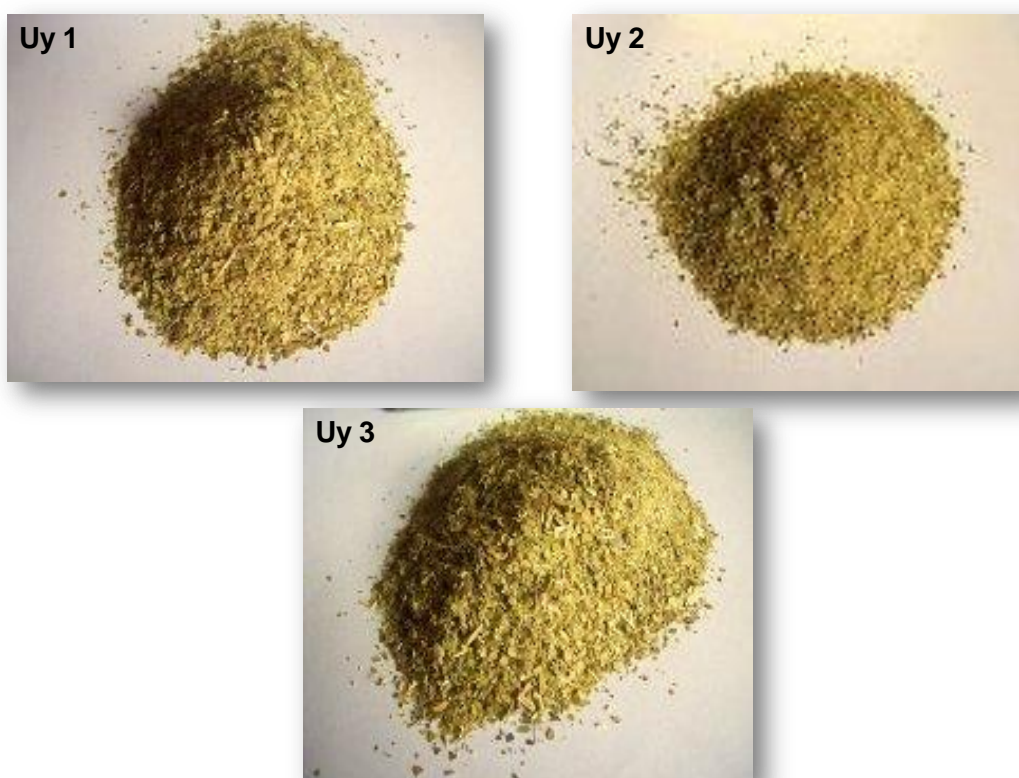


Figura 7- Amostras da erva-mate comercializadas no Uruguai.

Fonte: o autor. As imagens 5, 6 e 7 são de amostras das ervas-mates utilizadas para obtenção dos extratos analisados nos manuscritos desenvolvidos neste estudo.

5.4 Composição fitoquímica da erva-mate

O processo de produção da erva-mate é um fator que pode influenciar na composição do produto final. Bastos et al. (2006) relataram, em estudo de alguns compostos por cromatografia líquida de alta eficiência, que o teor de sólidos solúveis da extração preparada com folhas secas de erva-mate foi aproximadamente quatro vezes maior do que a do extrato preparado com folhas frescas. Isto pode ser devido a fatores como rompimento celular e impacto mecânico que ocorrem durante as fases de processamento.

Isolabella et al. (2010) avaliaram o perfil cromatográfico de amostras de erva-mate em diferentes fases do processamento e observaram aumento no conteúdo de metilxantinas no sapeco quando comparado com as folhas verdes, seguido por diminuição durante o processo de secagem. O mesmo foi observado para derivados cafeóis, neste caso o conteúdo encontrado foi significativamente maior na fase de sapeco em comparação com as folhas verdes. Entre os compostos testados no estudo supracitado o ácido caféico foi o único que manteve níveis constantes durante todo o processo.

Nas folhas frescas a concentração de compostos pode variar em função de fatores como intensidade da luz, idade das folhas, componentes do solo, condições agronômicas e fatores genéticos (JACQUES et al., 2007). Entre os compostos fitoquímicos presentes em produtos a base de *Ilex paraguariensis*, vêm sendo indicados principalmente a presença de minerais, vitaminas e constituintes que são metabólitos secundários da planta (HEINRICHS e MALAVOLTA, 2001; BIXBY et al., 2005; BASTOS et al., 2007; HECK e MEJIA, 2007; SUGIMOTO, 2009; BRACESCO et al., 2010). Metabólitos secundários são substâncias biossintetizadas pelas plantas que são importantes para sua adaptação e propagação. Entre os compostos secundários estão os alcalóides onde se encontram as metilxantinas e os terpenos, e os compostos fenólicos que são os taninos, os flavonóides e os ácidos fenólicos (SCHUBERT et al., 2007; KHAN E MUKHTAR, 2007).

Metilxantinas e compostos fenólicos são tidos como compostos fundamentais para conferir capacidade antioxidante aos extratos de erva-mate.

Experimentos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que estes compostos podem atuar como “seqüestradores” de radicais livres e quelantes de metais agindo tanto na etapa de iniciação como na de propagação de processos oxidativos.

5.4.1 Compostos fenólicos

Compostos polifenólicos nas plantas estão envolvidos em uma grande variedade de funções incluindo proteção contra insetos invasores, ações antimicrobiana e antifúngica, atrativos para os polinizadores, pigmentação, proteção contra raios UV, entre outros. Nos alimentos os compostos fenólicos podem contribuir para o amargor, adstringência, cor, sabor, odor e estabilidade oxidativa dos produtos (NACZH e SHAHIDI, 2004; FRIEDMAN, 2007).

De modo geral fenóis são compostos que contém um grupo - OH ligado a um anel benzeno, polifenóis possuem mais do que dois (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O termo compostos fenólicos abrange aproximadamente 8000 compostos de ocorrência natural, todos possuindo uma característica estrutural comum, um anel aromático, no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (SIMÕES et al., 2000; HECK e MEJIA, 2007; LEOPOLDINI et al., 2012).

Outra classificação divide esses compostos em polifenóis e fenóis simples, dependendo do número de subunidades fenólicas. Fenóis simples incluem ácidos fenólicos. Polifenóis possuem, pelo menos, duas subunidades fenólicas incluindo os flavonóides e os estilbenos. Compostos que possuem três ou mais subunidades fenólicas são chamados taninos (SIMÕES et al., 2000; LEOPOLDINI et al., 2012). A figura 8 mostra de forma resumida a origem de algumas vias de biossíntese de polifenóis e a figura 9 alguns polifenóis estudados.

De acordo com Simões et al. (2000), os compostos fenólicos são divididos em grupos, entre eles: derivados do ácido cinâmico, derivados do ácido benzóico e derivados do ácido fenilacrílico (ésteres e heterosídeos de ácidos fenólicos e do ácido cinâmico) .

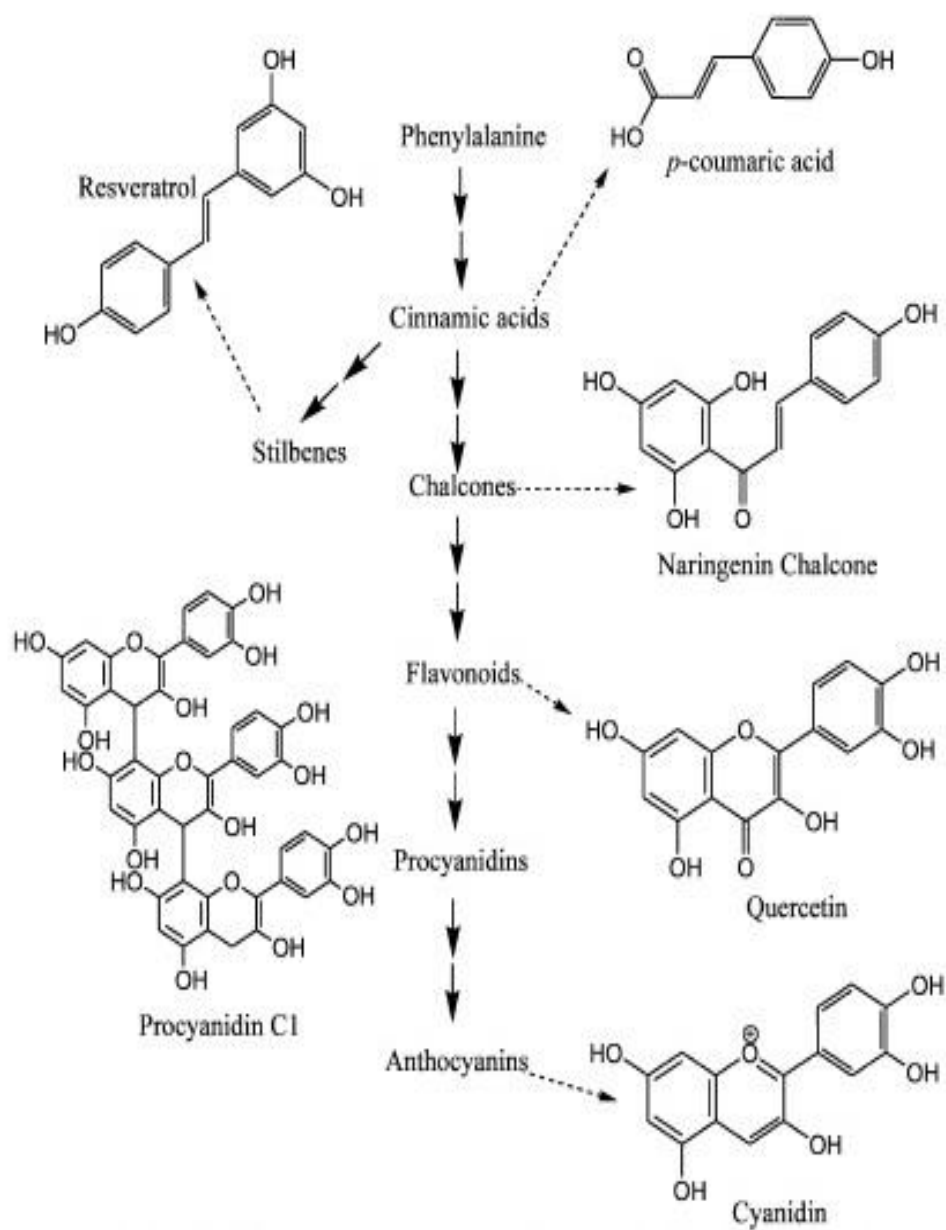


Figura 8- Resumo da principal via de biossíntese de polifenóis, com exemplos das estruturas de parte desta classe de compostos.

Fonte: STEVENSON e HURST, 2007

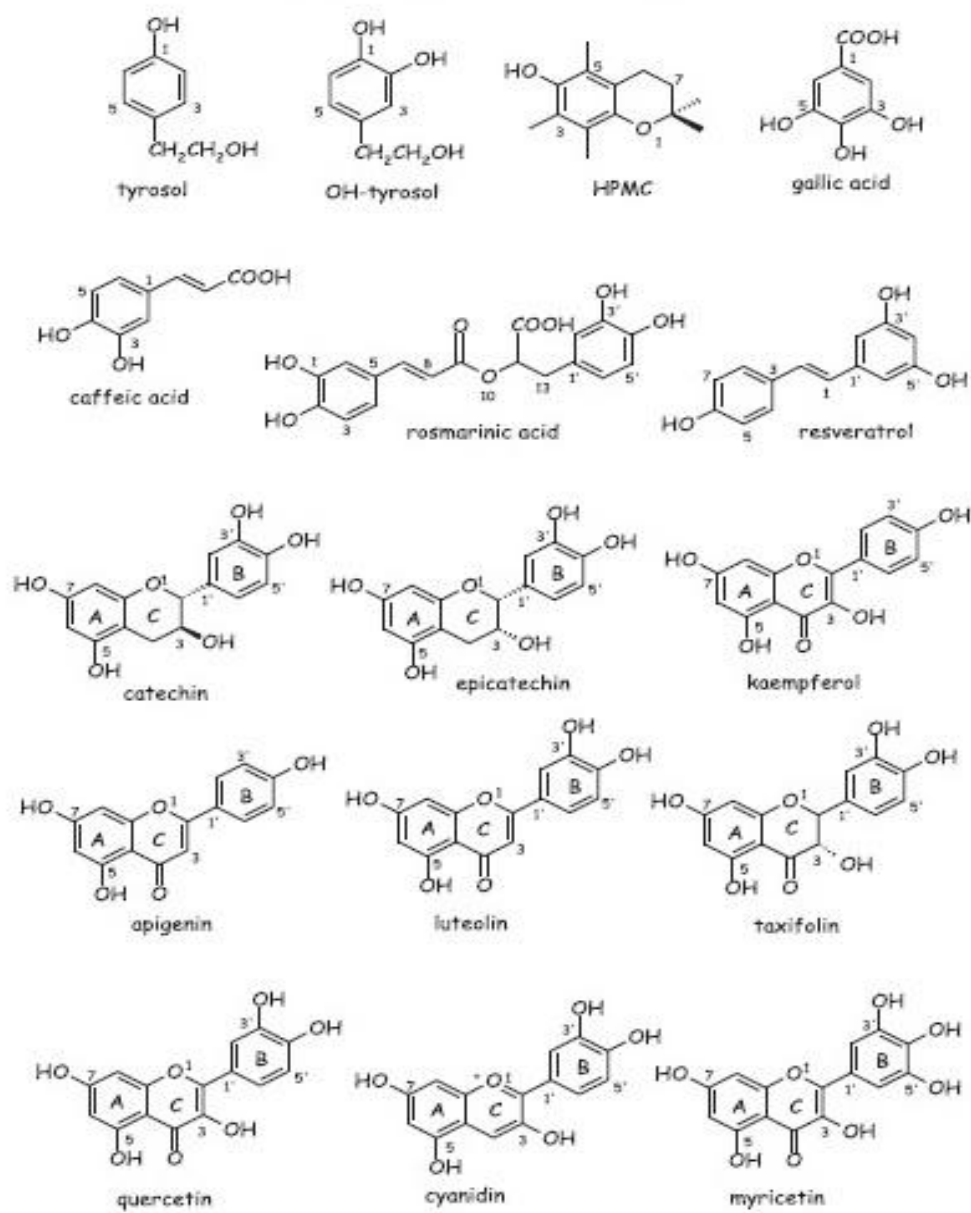


Figura 9- Exemplos de alguns polifenóis conhecidos e estudados.

Fonte: LEOPOLDINI et al., 2011

Os derivados do ácido benzóico têm como estrutura comum C6-C1 e incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, elágico e siríngico.

Derivados do ácido cinâmico possuem a estrutura comum C6-C3 são amplamente distribuídos no reino vegetal e existem nas plantas, usualmente na forma de ésteres. São: ácido p-cumarínico, ácido caféico, ácido ferúlico, e ácido sináptico.

Os derivados do ácido fenilacrílico são encontrados na forma de ésteres, glicosídeos e amidas, destacam-se os derivados do ácido cafeico, entre eles o ácido clorogênico (SIMÕES et al., 2000), composto encontrado em altas concentrações nos extratos de erva-mate (BASTOS et al., 2007). O 5 cafeoilquínico (5-CQA) é o membro mais abundante deste grupo de compostos bioativos, é o único ácido clorogênico comercialmente disponível e tem sido extensivamente estudado (FIUZA et al., 2004; SANTOS et al., 2010).

Dall'Orto et al.(2005) relataram que, em média, a quantidade de polifenóis extraída do chá mate é de 92 mg equivalentes de ácido clorogênico por grama de folhas secas. Segundo Bracesco et al.(2010) o ácido clorogênico corresponde a 42% dos compostos extraídos durante o consumo do chimarrão.

Figura 10.¹

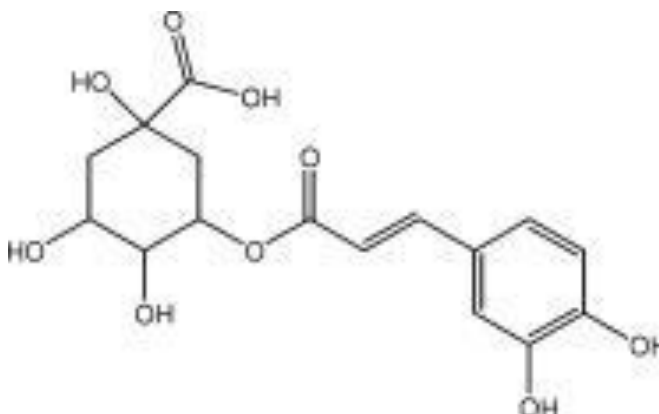


Figura 10- Estrutura química do ácido clorogênico.

Fonte: MORÓN et al., 2012

¹ Ácido clorogênico: éster onde a parte ácida do ácido cafeico está ligada ao grupo hidroxilo na posição 5' do ácido quínico.

A mais importante propriedade descrita para os compostos fenólicos é a defesa a radicais livres, produzidos normalmente pelo metabolismo das células ou em resposta a fatores externos. Porém a literatura recente está sugerindo que suas ações *in vivo* vão além, visto que podem atuar interferindo em vias inflamatórias (SOTO VACA, 2012), na regulação do metabolismo energético e na saúde do intestino (STEVENSON e HURST , 2007).

5.4.2 Metilxantinas

Plantas ricas em metilxantinas são utilizadas em preparações caseiras ou para elaborar em escala industrial bebidas estimulantes não alcoólicas, como por exemplo, o mate e o café (PAGLIOSA, 2009). As mais abundantes são a cafeína, a teofilina e a teobromina. A figura 11 apresenta a estrutura das principais metilxantinas encontradas em plantas.



Figura 11- Estrutura química das principais metilxantinas.

Fonte: FRIEDMAN, 2007

Essas substâncias apresentam caráter anfótero, são originárias de bases púricas e compreendem os derivados metilados de 2,6-dioxipurina (xantina). A cafeína corresponde ao composto 1,3,7- trimetilxantina, a teofilina ao composto 1,3-dimetilxantina e a teobromina ao composto 3,7 dimetilxantina (SIMÕES et al., 2000).

Nos vegetais as metilxantinas estão envolvidas no metabolismo do nitrogênio e do carbono. O estágio de desenvolvimento, alterações sazonais, fatores ambientais e métodos agrônômicos podem influenciar os teores de metilxantinas nas plantas (SIMÕES et al., 2000).

Vários autores que avaliaram cromatograficamente os teores de cafeína, teobromina e teofilina na erva-mate descrevem que há variações. Sendo estas influenciados por uma série de fatores, onde estão incluídos: aspectos genéticos (REGINATO et al., 1999), método e condições de cultivo (DA CROCE, 2002), idade da planta (MAZZAFERA, 1994), época de colheita (DA CROCE, 2002), tipo de processamento (ESMELINDRO et al., 2002) e metodologia de análise (GNOATTO et al., 2007; DUTRA e HOFFMANN-RIBANI, 2010).

Em relação aos efeitos na saúde as metilxantinas podem atuar como estimulantes do sistema nervoso central e cardiorespiratório, analgésico, relaxante da musculatura lisa entre outros (MEINHART et al., 2010; AZAM et al., 2003).

5.5 Estresse oxidativo e compostos antioxidantes

A ingestão de extratos de *Ilex paraguariensis* pode contribuir para aumento das defesas antioxidantes do organismo, minimizando os ataques de radicais livres (SCHINELLA et al., 2000). As bebidas a base de erva-mate são reconhecidas como fonte de compostos fenólicos e, estes, descritos como capazes de diminuir o estresse oxidativo (BASTOS et al., 2006).

Estresse oxidativo compreende o conjunto de condições, intra e extracelulares, que levam a geração excessiva de espécies reativas. Durante o

metabolismo basal normal das células aeróbicas existe uma produção constante de espécies reativas de oxigênio. No entanto, um aumento na produção destas espécies reativas ou uma diminuição das defesas antioxidantes pode levar ao estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Um radical livre é uma estrutura química que possui um elétron desemparelhado, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho, o que o torna instável, reativo e capaz de combinar-se com diversas moléculas integrantes da estrutura celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A produção de espécies reativas dentro da mitocôndria pode levar a danos oxidativos em proteínas, membranas e DNA. Além disso, EROs podem atuar nas vias de sinalização celular que modulam várias funções. O dano oxidativo mitocondrial conduz a apoptose (GALLEY, 2011). Figura 12.

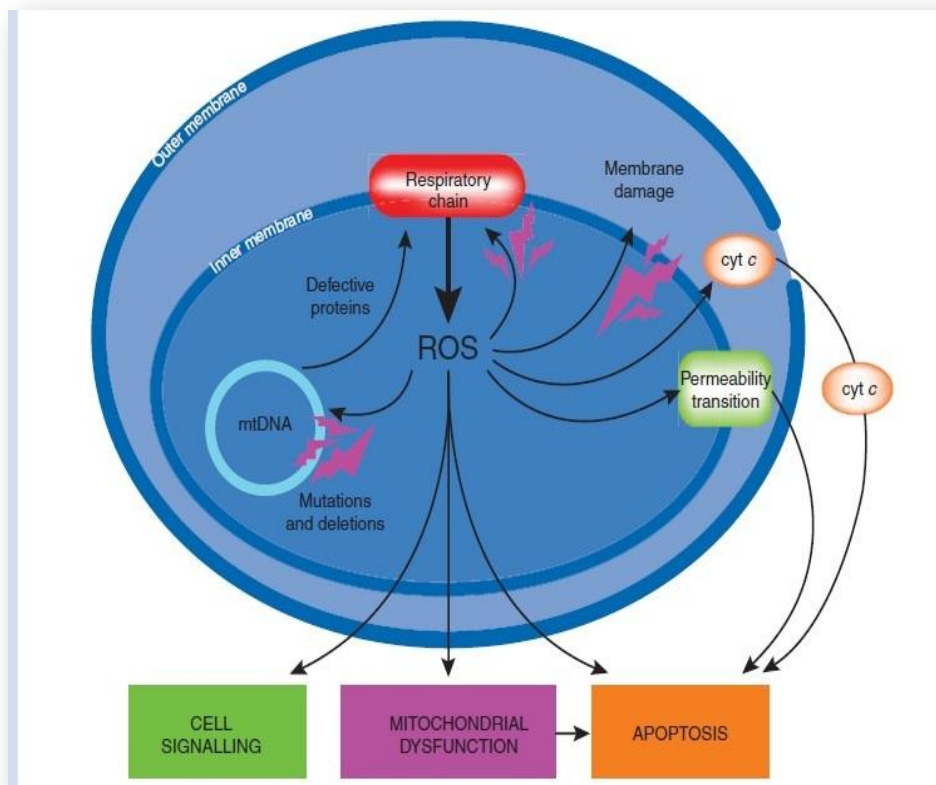


Figura 12-Visão geral da produção de EROs mitocondrial.

Fonte: GALLEY, 2011

Na oxidação ocorre ganho de oxigênio ou perda de elétrons, enquanto na redução ocorre perda de oxigênio ou um ganho de elétrons. Pró-oxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que possuem a capacidade de oxidar moléculas-alvo promovendo dano oxidativo, enquanto que os antioxidantes inibem a produção de radicais livres (CERQUEIRA, MEDEIROS e AUGUSTO, 2007; GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2010).

Os radicais livres formam-se em condições fisiológicas em proporções controladas pelos mecanismos de defesa celular, porém em situações patológicas essa produção pode aumentar substancialmente (SALVADOR e HENRIQUES, 2004), como exemplificado na figura 13.

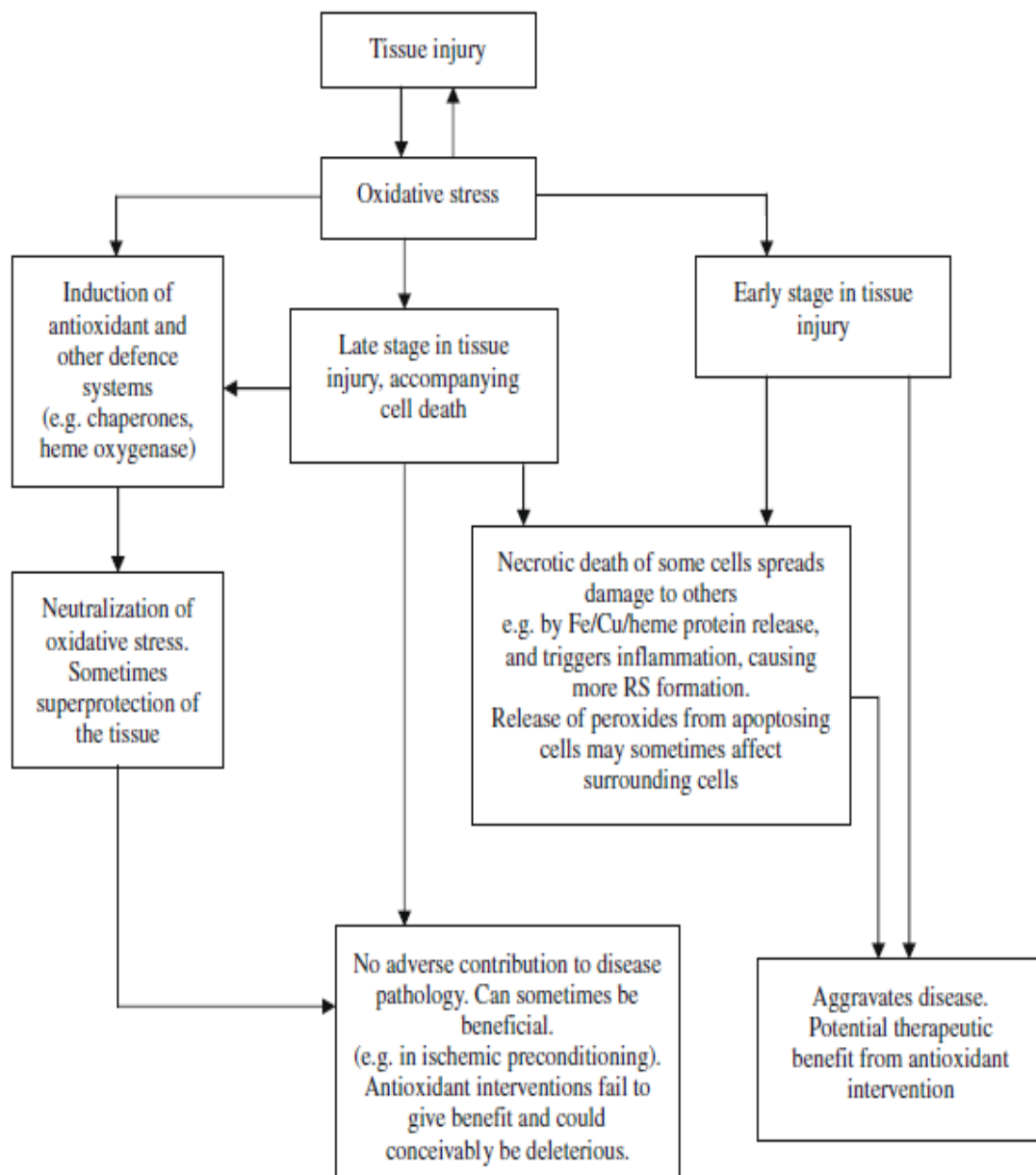


Figura 13- Estresse oxidativo no contexto da doença.

Fonte: GUTTERIDGE E HALLIWELL, 2010. Significado do stress oxidativo no contexto da doença humana. (adaptado por GUTTERIDGE e HALLIWELL com permissão da Oxford University Press).

No passado apontou-se que antioxidantes são capazes de influenciar significativamente a progressão de doenças, porém é importante considerar que a administração de altas doses de suplementos antioxidantes poderiam chegar ao local de formação de radicais livres aumentando sua geração e promovendo ações deletérias. Alimentos que contêm antioxidantes naturalmente, mas não ricos em calorias, ou seja, frutas, legumes e grãos, ajudam a manter a saúde e retardar o início de doenças (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2010).

Antioxidantes reagem diretamente com os radicais livres, levando a formação de produtos menos reativos, além disso, participam na ativação de genes que codificam proteínas envolvidas no sistema enzimático antioxidante e/ou no silenciamento de genes que podem contribuir para ocorrência de estresse oxidativo (FONSECA, 2007). Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato. Esta definição compreende compostos de natureza enzimática e não enzimática (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O sistema antioxidante enzimático constitui a primeira defesa endógena a agir aos ataques das espécies reativas de oxigênio, impedindo sua formação ou sequestram-nas de forma a não permitir sua interação com alvos celulares (ROVER JÚNIOR et al., 2001). O sistema antioxidante enzimático é formado por enzimas, entre elas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Os antioxidantes não enzimáticos são adquiridos principalmente a partir de frutas e vegetais. Dentre eles estão a taurina, a coenzima Q, vitamina C, E e caroteno (CUERDA et al., 2011). A vitamina E é considerada a mais significativa dos antioxidantes lipofílicos e participa ativamente da inibição da oxidação de LDL (CANTERLE, 2005).

5.6 Atividades biológicas dos compostos a base de erva-mate

Matsumoto et al. (2009) observam que o consumo regular de chá mate pode melhorar as defesas antioxidantes por múltiplos mecanismos, tanto pelo aumento da circulação de compostos bioativos como pela regulação dos mecanismos celulares enzimáticos que combatem o estresse oxidativo.

Gugliucci e Stahl (1995) e Gugliucci (1996) foram os primeiros estudiosos a relatarem a forte proteção, dos extratos de *Ilex paraguariensis*, à oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). De Moraes et al. (2009) demonstraram que ingestão de infusões de erva-mate melhorou os parâmetros lipídicos séricos em indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos e proporcionou aumento do HDL. Em indivíduos hipercolesterolêmicos estáveis, em tratamento com estatinas, produziu diminuição adicional do LDL. Este efeito pode contribuir para diminuição do risco de doenças cardiovasculares.

Schinella, Fantinelli e Mosca (2005) demonstraram que o extrato de *Ilex paraguariensis* atenua disfunções miocárdicas provocadas por isquemia e que a cardioproteção envolve a diminuição de dano oxidativo através de um mecanismo dependente de óxido nítrico. Em adição, Gugliucci e Bastos (2009) mostraram que o ácido clorogênico pode ser suficiente para anular os efeitos deletérios causados pelo ácido hipocloroso na Paroxonase 1, o que lhe confere efeito ateroprotetor. Outros estudos indicaram que a ação do ácido clorogênico interfere na absorção da glicose e pode estar relacionada com a modulação da expressão gênica por enzimas antioxidantes.

O ácido clorogênico (CGA) em concentrações específicas mostrou ser eficaz para destruir células cancerosas do pulmão, sem afetar fibroblastos normais, apoiando descobertas anteriores de que a CGA deve também ser investigado como agente anticancerígeno (MORÓN et al., 2012).

Os efeitos antiinflamatórios e imuno-moduladores das ervas que contém polifenóis também tem sido alvo de muitos estudos (BRACESCO et al., 2010). Puangpraphant e Mejia (2009) investigaram o potencial antiinflamatório dos extratos de erva-mate, através da avaliação da capacidade de alguns

fitoquímicos e suas interações produzirem inibição da COX2/PGE e INOS/NO. Os resultados foram promissores principalmente pela via COX2 /PGE.

In vitro, metasaponinas, contidas nas folhas secas de *Ilex paraguariensis*, apresentaram ação antiinflamatória e inibiram a proliferação de células de câncer de cólon, através da ativação de um caminho de apoptose intracelular em células específicas que pode estar associada a cascata CASPASE dependente (PUANGPRAPHANT, BERHOW e MEJIA, 2011).

Estudos *in vivo* demonstraram efeitos antiobesidade da *Ilex paraguariensis* (GUGLIUCCI e BASTOS, 2009; PRZYGODDA et al., 2010; ARÇANI et al., 2009; PEDROSO, 2010). Sugimoto et al. (2009) isolaram três novas saponinas juntamente com dezoito compostos já conhecidos e demonstraram seus efeitos inibitórios nos principais constituintes da lipase pancreática e sugerem que está ação é uma das responsáveis pela atividade antiobesidade das bebidas a base de erva-mate.

Em uma pesquisa desenvolvida por Prediger et al. (2008) foi observado que administração de extrato de *Ilex paraguariensis* modulou a memória e a aprendizagem a curto e longo prazo em ratos, provavelmente através de sua ação sobre o receptor de adenosina, sugerindo que a planta pode desempenhar um importante papel na prevenção de déficits cognitivos associados com doenças degenerativas.

Gugliucci et al. (2009) mostraram em um de seus estudos que compostos bioativos (ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido aleanólico) presentes no mate possuem potente efeito antiglicação, sendo este, em muitos casos, mais potente que a aminoguanidina, um conhecido agente antiglicação. A suposição é que diferentes classes de substâncias atuem sinergicamente para produzir esse efeito. Outro recente estudo mostrou que infusões de erva-mate foram capazes de melhorar o *status* diabético, observando-se aumento da tolerância à glicose, aumento do glicogênio hepático e redução da glicação de proteínas. Além disso, neste estudo houve aumento da secreção de insulina o que corrobora para o papel da *Ilex paraguariensis* na redução da glicose sérica, provavelmente pela atuação de compostos em sítios específicos que modulam essas ações (PEREIRA et al., 2012).

Nesta revisão estão registradas algumas propriedades da *Ilex paraguariensis*. Os efeitos benéficos do consumo de bebidas a base de erva-mate, as análises de seus compostos, bem como, suas propriedades são um importante campo de pesquisa, sendo a ampliação dos conhecimentos nessa área uma animadora perspectiva.

6 MANUSCRITO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão representados sob a forma de um manuscrito científico, o qual encontra-se aqui organizado. O referido estudo foi submetido à revista: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* e está apresentado de acordo com as normas desta revista.

Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito.

Yerba- mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) based beverages: how the successive extraction influences the composition and the capacity of the extracts chelate iron and scavenger nitric oxide

Ana C. Colpo^{1,3}, Hemerson Rosa^{2,3}, Vanessa B. de Camargo², Felipa E. M. Bassante¹, Maria Eduarda Lima^{1,3}, Robson Puntel^{1,3}, Daiana Silva Ávila^{1,3}, Andreas Mendez^{2,3}, Vanderlei Folmer^{1,3*}

¹ Laboratório de Bioquímica e Toxicologia de Produtos Naturais e Sintéticos, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana-RS, Brazil.

² Laboratório de Pesquisa em Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Medicamentos, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana-RS, Brazil.

³ Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana-RS, Brazil.

***Corresponding author** : Vanderlei Folmer

Universidade Federal do Pampa, BR 472 Km 585 Prédio Administrativo,
CEP 97500-970, Uruguaiana-RS, Brazil.

E-mail: vanderleifolmer@unipampa.edu.br

Fone: +55 55 34011859 Fax: +55 55 34011859

Abstract

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St.Hil.) is used to prepare a traditional beverage consumed in Brazil, Argentina and Uruguay, named “mate” or “chimarrão”. In the traditional consumption of this beverage successive infusions are carried out and these intake by the consumer. In order to analyze what is consumed when the drink is taken, we simulate the traditional preparation of the beverage and studied the extracts. Using these extracts we investigated possible change in its chromatographic profile, in the total polyphenol content and in the ability of the extracts to chelate iron and scavenger nitric oxide. The results showed that the amount of compounds extracted followed this order: Brazilians<Argentines<Uruguayans being the major compound extracted chlorogenic acid and the highest concentrations in the first and the second extracts, with descent over the extraction. The extracts present antioxidant capacity generally greater than 50%, and these properties are kept along of the consumes of about 1 liter of water (as is tradition), a what may be one of the highlights of this beverage consumption in relation to their effects on the health.

Keywords: Phenolic compounds; HPLC; *Ilex paraguariensis*; mate yerba-mate; “chimarrão”, antioxidant capacity

1. INTRODUCTION

Ilex paraguariensis is a tree of the Aquifoliaceae family, extensively studied by having beneficial properties to health. Yerba mate is one of the principal products obtained from dry leaves of the plant. It is consumed in Brazil, Argentine, Uruguay and Paraguay as a beverage that is part of the habits and culture of this population. In the first three countries is named “mate” or “chimarrão” and is made with hot water, in Paraguay is appreciated with cold water, being called “Tererê”.

The beverage is prepared in a dried gourd, named “cuia” and drunk using a metal straw called “bombilla”. Along its consumption water is poured over the herb forming a partial infusion, the herb fills two thirds of volume of the container and part of the herb stays dry. The process of adding water is repeated multiple times using about a liter and half of water^{1,2,3} as demonstrated in **Figure1**.

In the past years, there was an increase in the number of studies regarding the use of *Ilex paraguariensis* extracts and their isolated compounds. Some of the reported effects of the consumption of the yerba mate based products are: vaso-dilating and lipid reduction properties, antimutagenic, anti-glycation actions and weight reduction properties just to name a few^{4,5}.

The antioxidant activity of the yerba mate is directly related to the effects reported above, because they can protect from the free radicals reactivity. It is generally accepted that free radicals play an important role in the development of tissue damage and pathological events in living organisms^{6,7}. *In vitro*, phenolic compounds are important elements, they act as free radicals scavenger through several mechanisms, including delocalization of electrons and formation of intramolecular hydrogen bonds, but other forms of antioxidant action of the extracts also are related, among them inhibition of chain reactions, trapping free radicals and repair of lesions caused by reactive species⁸.

The phytochemical composition of the plant is fundamental to provide antioxidant protection. However it is important to note that there are many factors that can affect the characteristics and composition of the final product

marketed, among them the industrial process, that include harvesting, roasting or zapecado, drying, milling, aging and final preparation⁹⁻¹². In this way Isolabella et al.¹² developed comparative and quantitative analysis of leave samples and indicated that those obtained after the zapecado, drying and aging processes has higher content of biologically active principle when compared with green leaves.

Progenies of *Ilex paraguariensis* were analyzed and it was related significant changes in total methylxanthines, caffeine and theobromine contents in progenies, according to their origin¹³. The conditions under which the plant is cultivated are of high importance. For example, too much sunlight might lead to increased production of polyphenols, therefore yerba mate plants coming from natural forests may contain more caffeine than those cultivated in farms, once has been reported that this metabolite can protect the plant against fungi and insects^{13,14,15}.

Schinella et al.¹⁶ suggest that the ingestion of mate might be a very effective and economic way to provide an important amount of compounds that increase the antioxidant defense system of an organism. Relative to a consumption of mate beverages Matsumoto et al.⁵ argued that regular consumption may improve antioxidant defenses by the increase in the circulation of the active compounds, regulating cellular enzymatic mechanisms that counteract oxidative stress.

To the development of this study it was considered the hypothesis that there are variations in the herbs composition due to changes in the cultivation and storage and in the manner of the beverage preparation. Furthermore we consider the fact that the sequential extractions, that occur in along the consume may influence the concentration of the substances extracted and the antioxidant potential of the beverage. The main aims were to analyze the antioxidant capacity, quantify the Total Polyphenol Content (TPC) and by High-performance Liquid Chromatography (HPLC), to determine the concentration of theobromine, chlorogenic acid, caffeine and caffeic acid in yerba mate extracts. About the beverage consumption were observed if there were decrease in the concentration of the bioactive substances and whether the antioxidant properties are maintained with sequential extractions that occurring along the

intake of the mate. Moreover, to improve our knowledge about this, correlation analysis was performed combining the TPC with the antioxidant activity observed in the assays. Hence this research aims to contribute in the establishment of inedited researches that synthesize some outcomes of the consume of this peculiar beverage.

2. MATERIALS AND METHODS

To develop this study were used herbs purchased in markets, being three different brands acquired in Argentina, three in Brazil and three in Uruguay. In the choice of herbs was considered the "traditional" presentation form. The herbs were named **Ar 1**, **Ar 2** and **Ar 3** to Argentine brands; **Br 1**, **Br 2** and **Br 3** to Brazilian brands and **Uy 1**, **Uy 2** and **Uy 3** to Uruguayan brands.

2.1. Obtaining of the extracts

The aqueous extracts were obtained by mimicking the "Chimarrão", preparation, these were prepared in a medium size gourd, with the amount of herb enough to occupy two third of the volume of the bowl (85 g), the free volume was completed successively with water (70 ml) at 80°C. The water in the bowl remained in contact with the herb, for one minute, after water was taken out through a "pump" mate attached to a suction system (described below). Extracts from the 1, 2, 5, 10 and 15 mates (infusions) were stored for analysis³. The time of extraction was one minute. The extractions among those were discarded. The preparation "chimarrão" was performed in triplicate to each herb.

The "mate pump" was attached by means of a rubber, to a Kitasato flask. The bottle cap allows the connection, because it is composed of a silicone stopper with a hole through which passes a glass tube. The extract passes through the system and falls into the Kitasato flask, which is connected to a vacuum pump that is responsible by the suction (based in the method described by Meinhart et al.³). Afterwards the extracts were filtered using filter paper and stored in eppendorfs and again filtered with nylon filter to Vials (procedure described in detail in the sequence). After extraction, the material was stored

and kept frozen in a freezer (-18°C) until analysis. The analysis of all extracts was performed in triplicate. The **Figure 2** shows the suction system that was utilized.

2.2 Determination of total polyphenol content (TPC)

The concentration of total polyphenols in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts was determined by UV-visible spectrophotometry, using Folin-Cioacalteau method, with modifications^{17,18}. The total polyphenolic content was expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per ml of aqueous extract. Was used 0.05 ml of extract. Mean and standard deviation (n=3) were calculated.

2.3 Quantification of the methylxanthines and phenolic compounds

Liquid Chromatography apparatus:

An LC analysis was performed in a Prominence Liquid Chromatography Shimadzu® equipped with a LC-20AT pump, a SIL-20A auto sampler, a SPD-20AT PDA detector and a CTO-20A column oven (Kyoto, Japan). LC Solution V. 1.24 SP1 system software was used to control the equipment and to obtain data and responses from the LC system.

Chromatographic conditions:

The method was conducted using a reversed phase technique. The analyses of the yerba mate extracts and the standards theobromine, chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine were performed in a linear gradient elution mode with a flow rate of 1.0 ml/min, using a mobile phase consisted of (A) water with 0.3% acetic acid and (B) methanol. The run was conducted by this gradient: 15-20% B in 20 min; 20-85% B in 5 min; 85% B in 5 min¹⁹. Detection by PDA system was monitored at 265nm for caffeine and theobromine, and at 325nm for caffeic and chlorogenic acids. The mobile phase was prepared daily, filtered through a 0.45-µm membrane filter from Millipore (Milford, MA, USA) and sonicated before use. An ODS-Hypersil Thermo Scientific C18 column (250 x 4.6 mm i.d., 5-µm particle size) (Bellefonte, United States) was used. The HPLC system was operated at 25 ± 1°C. The injection volume was 20 µL.

The reference standards were prepared in 50% hydroethanolic solvent at final concentration of 50 g/ml. All solutions, including mates, were filtered with 0.45 mm nylon filters and injected into the HPLC. All samples were run in triplicate.

2.4 Determination of antioxidant capacity of the extracts

The antioxidant capacity in extracts was measured by the *in vitro* assays as follow:

Nitric oxide (NO) scavenging assay

Scavenging of NO was assessed by incubating sodium nitroprusside (SNP) (1 mM) with 0.02 mL of the extracts at room temperature. After 120 min, 0.25 mL of incubation solution was sampled and mixed with 0.25 mL of Griess reagent. The absorbance was measured at 550 nm.

The values were compared to control to determine the percentage of inhibition of nitrite reaction with Griess reagent depicted by extracts as an index of its NO scavenger activity^{20,21,22}.

To prevent that the extracts color could interfere in the results, color controls were done for all the extracts examined, 0.25 mL of incubation solution was mixed with 0.25 mL of Milli-Q water. Tests were carried out in triplicate and values are expressed as % of control.

Iron chelating properties of the extracts

To examine the iron chelating properties of the extracts, we used the o-phenantroline method as previously described by Bucber et al.²³, Minotti & Aust²⁴ and Puntel²⁵. The mixture containing Fe²⁺ (1μM) and 0.03 mL of the extracts were allowed to react for 5 min to form complex between Fe²⁺ and the related compounds. After that, a solution of o-phenantroline was added to determine the colored complex(es) formation between o-phenantroline and free Fe²⁺. The absorbance was recorded at 510 nm.

The tests were carried out in triplicate and values were expressed in % of control determined in the absence of extracts. Solutions of FeSO₄ were made just before use in distilled water.

2.5 Statistical Analysis

This study is characterized by an experimental study where the analysis of the data was expressed as means \pm standard deviations (SD). The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) one or two way, when appropriate. Differences between the groups were considered significant when $p \leq 0.05$. To compare the means was used Bonfferoni's test. To analyze the degree of relationship between TPC and the antioxidant capacity Pearson correlation was carried out.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In this investigation extracts of yerba mate that are marketed in countries that compose the southern Rio Grande do Sul- Brazil and in two other countries that make borders to this state (Argentina and Uruguay), were analyzed by *in vitro* assays to determine their antioxidant capacity. From the mates (extracts) also was quantified the TPC and by HPLC quantified the concentration of the substances chlorogenic acid, caffeic acid, caffeine and theobromine. The extracts were obtained simulating the consumption of the "chimarrão".

Total polyphenol content (TPC)

Our results showed variations in the TPC in the samples, related mainly to the nationalities. Along the sequential extractions was not possible to establish a pattern of the drop in the TPC of the extracts. However, higher concentrations were maintained between the first and second mates, with reduction over of the sequential extractions.

When the results of the nine herbs were compared, the highest extraction was in the second mate of **Uy 1** (1,451EAG/mL) and the lowest in the fifteenth of **Br 2** (0,057 EAG/mL). The TPC, expressed in terms of GAE per mL of aqueous extract and the significant differences between the extracts are shown in the **Table 1**. These values were similar to Meinhart et al.³ and Bravo et al.²⁶ findings. The first used an extraction method similar to ours, which is an

important factor considering the manner how the population consumes *Ilex paraguariensis* based beverages.

It is suggested that the continuous manner in which mate is drunk may produce sustained plasma concentrations of compounds and may thus afford antioxidant and other effects in a more constant way². Furthermore when the herb preparation is made in the way that is usually drunk, it displays higher inhibition of protein nitration and higher promotion of cell survival, were of green tea or red wines²⁷. Although we have no data about the plasmatic concentration of compounds, we consider that this can be one of the highlights of the mate consumption. Our data contribute to this assumption because in all mates there was extraction of bioactive compounds in a very reasonable concentration and, as will be discussed in the sequence, was observed important antioxidant capacity in the assays that were carried out *in vitro*.

The yerba mate might be considered one of the main antioxidant beverage consumed in South American countries²⁸. The antioxidant activity of yerba mate infusions has long been attributed to the polyphenolic content^{1,15,29}, but the functional effects of the compounds depends not only on the amount ingested, but on its bioavailability³⁰. The antioxidant capacity of the variety of foods and beverages commonly consumed in United States were studied and the results suggest that phenolic compounds are the major contributor to the antioxidant capacity of the products analyzed³¹.

In this context we evaluated the correlation among TPC and antioxidant potential to chelate iron and scavenger NO (the assays carried out in this investigation) and observed by the **p** values that is not possible quantify the probability of the variation between the concentration of polyphenols to be related to antioxidant capacity. Some results show negative correlation and it means that the pairing was counterproductive, we believe that this is due to the fact that the variations in content of polyphenols and in antioxidant capacity as are not too high, namely we can say that the variation between a mate and the other is not directly affecting the relationship between the two variables. These results are shown in the **Table 2**.

Phenolic compounds and methylxantines

Through the analysis of the substances by HPLC was observed that there is considerable concentration of chlorogenic acid, caffeic acid, caffeine and theobromine in extracts analyzed. These remarks are shown in the **Figures 3.1, 3.2, 3.3, 3.4** and will be discussed in the sequence of the results presentation.

In general, the Brazilian herbs were the ones that presented the lowest concentrations of the bioactive compounds. The Uruguayan brands had concentrations about 40% higher than Brazilians. We suppose that these variations can be influenced by the herb constitution because Uruguayan and Argentine brands have more leaves in their composition, and these are in larger sizes. In the commercial presentation of Brazilian herbs are also found many branches. A study reported that the leaves of yerba mate have larger nutrient content when compared with branches of the plant³². When were analyzed different herbs, the lowest levels of the bioactive compounds were obtained for samples with higher amounts of twigs, lower degrees of milling, or with mixtures of different species³³.

In relation to the decline in the concentrations of the substances analyzed along the extractions, the compounds that were analyzed by HPLC showed similar pattern. However it is interesting to observe that when we compare the herbs within their nationalities there were variations in the constituents extracted. This report is shown in **Figure 3**, where it is noted that the substances appear in different order of concentration and this can be related to the nationality of the herbs, being: Argentine herbs: chlorogenic acid> caffeic acid> caffeine> theobromine. Brazilian herbs: chlorogenic acid> caffeine> caffeic acid> theobromine. To Uruguayan herbs there are a fine variation between caffeine and caffeic acid, allowing to suggest that they are in equal concentrations. The other compounds show the same order of other nationalities.

The variations, associated with the nationalities of the herbs and their constituents are influenced by many factors, these can alter their

physicochemical characteristics and also the content of compounds extracted along of the mate consumption. The time of harvest plays a role in the concentration of methylxanthines found in mate³⁷. A study carried out by Jacques et al.¹³ observed that trees that grow in shady places have more caffeine, sometimes even twice as much as those growing in full sunlight. Another research with 16 progenies report that if there are low caffeine contents there are more theobromine and that is probable that this caffeine / theobromine relation may be due to methylxanthine biosynthesis¹².

Moreover, the concentration of the substances presented in the extracts can be influenced by factors related with the beverage preparation such as, time, temperature of infusion, mass ratio of herbs/water volume and particle size^{15,41}. Our results showed that the sequence of extractions is another factor that interferes in the concentration of the compounds extracted, since there were significant differences between the mate with a higher concentration of compounds and the mate with the lower concentration. This pattern was observed in the analysis of TPC and on the individual evaluation of the substances by HPLC.

Regarding the concentration of the compounds analyzed our findings demonstrate that the substance found in higher concentrations was the chlorogenic acid, in all brands tested, being the highest levels in the first and second mates. These results are in accordance with Helck and Mejia¹ and Bracesco et al.⁴, who observed that *Ilex paraguariensis* extracts are especially rich in chlorogenic acid. This compound corresponds to 42% of the polyphenols found in extracts from yerba mate. It is also reported that about 3% of the weight of *Ilex paraguariensis* leaves, or 1–10% of compound in aqueous extract, is in the form of chlorogenic acid and its isomers¹⁵. Among the herbs analyzed was observed the higher concentration of this compound in **Uy 1**, a Uruguayan brand followed by the Argentine brand **Ar 1 (Figure 3.1)**.

Still with reference to chlorogenic acid, examining the brands of each nationality were observed some differences. In Argentine brands the highest concentration of chlorogenic acid was detected in the second mate. To Brazilian brands the highest concentration of this compound was found in the first mate, moreover the concentrations did not vary significantly between the mate one

and two. As already mentioned Uruguayan herbs showed higher levels of this compound, in this case the statistical analysis showed no significant decline in the first three extracts. It appears that the extraction of this substance, in these herbs, occurred in a more linear way, having a subsequent drop.

The results obtained by HPLC analysis of mate composition are consistent with findings obtained in the quantification of total polyphenol content, where the **Uy 1** brand had the highest concentration. Chlorogenic acid may be contributing in an important way to these findings.

Chlorogenic acid is a free radical and metal scavenger and has been shown to modulate gene expression of antioxidant enzymes, among other biological activities³⁴, as in the protection of the low-density lipoprotein (LDL) from oxidation and as the main substances responsible for the anti-glycation effect of mate tea³⁵. Acute intake of yerba mate infusion improved the antioxidant capacity and the resistance of plasma and LDL particles *to ex vivo* lipid peroxidation²⁹. Moreover, it was reported the action of the 5-caffeoylquinic acid (5- CQA) in the protection of paraoxonase 1, the enzyme activity was positively affected on the concentration of 5 CQA³⁶.

Relative to caffeic acid, this compound is an important biosynthetic precursor³⁷, having high capacity for free radical scavenging, which probably contributed to the high antioxidant capacity of the yerba mate extracts³⁸. A study that evaluated if this substance is able to inhibit the advanced glycation end product (AGEs) demonstrated more than 95% of inhibition at the lower concentration used (0.05 mmol/L)³⁵. In addition, the antioxidant activity showed by caffeic acid is related to its ability to chelate the complex iron (II) ions being observed the formation of a complex with iron involving catechol sites of caffeic acid³⁹.

The decline along the extractions to this element was similar in Argentinean and Uruguayan brands, once we found that the most concentrated mate was the second. In the matter of decreasing the concentration, in overall there was a significant difference between the more concentrated mate and the tenth and fifteenth mates ($p < 0, 01$ or $p < 0,001$). In Brazilian brands the mate that had more concentration of this compound was the first. There was a decline between this and the fifth, tenth and fifteenth ($p < 0,001$). In this case, we believe

that, these results also can be attributed to factors that affect the distribution of compounds in the plant and in final product, as discussed previously. The **Figure 3.2** illustrates these observations.

The caffeine content in mate is extremely variable, being indicated levels between 0,8% and 0,6% of the total organic compounds presents in the yerba mate^{2,12,38}. The **Figure 3.3** shows the concentrations of caffeine in extracts of nine herbs analyzed.

Meinhart et al.³ compared extracts of herbs consumed in the form of “chimarrão” and “tererê” and verified that “tererê” showed 6 times more caffeine than “chimarrão” and refer that the extraction of higher levels in the beverage, with cold water, could be correlated with the complete infusion of herb. In the hot beverages (“chimarrão”) the water is partially in contact with the herb. Studies that assessed the caffeine consumption demonstrated that caffeine can be a potential contributor for the reducing risk factors involved in the metabolic syndrome, including type 2 diabetes mellitus (DM) and obesity^{40,41}.

Among the substances that we analyzed theobromine was at the lowest concentrations in all brands of the herbs tested. Research that evaluated the content of theobromine in *Ilex Paraguariensis* by HPLC showed the same result and observed that the major quantities of these methylxanthines are present inside the leaves, small amounts were detected in epicuticular wax⁴². The major quantities of this compound inside the leaves, could be explained by the fact that it plays a role in avoiding attack by phytophagous insects^{1,42}. We found the highest concentration of this compound in an Uruguayan brand, the lowest concentrations was found in a Brazilian herbs. Considering the extract (mate) more concentrated, within each nationality, statistical differences were observed between Argentines/Brazilian ($p < 0,01$) and Uruguayan/Brazilian ($p < 0,01$), so **Uy 1 > Ar 1 > Br 1**. We believe that these results are related to greater amount of leaf present in Uruguayan and Argentine, Brazilian have many twigs in composition. The **Figure 3.4** illustrates these findings.

Theobromine isolated can inhibit Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) action, reducing the falls in nicotidamine adenine (NAD⁺) seen in cells with extensive DNA damage, for example after treatment with irradiation, maintaining cell viability³⁷. Caffeine, theobromine and xanthine have a

quenching effect on the production of hydroxyl radicals, as well as in oxidative DNA breakage by hydroxyl radicals⁴³.

The analyze of the TPC and the concentration of the four substances by HPLC in mates (extracts) it was possible to establish that there were no statistically significant changes between the first and second mates, where the highest concentrations were found, but along of the extraction there are significant declines. To complete the observations related to these analyzes, it is important to note that in all herbs examined the lowest concentrations of these compounds were detected in the last extract, in addition to all the herbs did not observe significant differences between the tenth and fifteenth mates.

Antioxidant capacity of the extracts

Nitric oxide (NO) scavenging assay

Data regarding to the activity of the extracts in NO scavenging showed significant activity in all extracts subjected to this protocol.

The extracts of each brand were analyzed separately to check if along sequential extractions there were changes in their ability to scavenger nitric oxide. In extracts of Argentine brands the pattern in relation to capacity of NO inhibition was similar, getting around 59%, in this case was observed statistical difference between mates 2 and 15 ($p < 0,05$). To Brazilian and Uruguayan brands there were not significant differences in extracts (mates). The extracts of Brazilian herbs were able to inhibit nitric oxide production in 40% and the Uruguayan showed capacity around 62%. The **Figures 4** (a), (b) and (c) represents the results of statically analysis when was compared the extracts each other and herbs each other. In this image is possible to note that only in Argentine brands there were difference between the herbs.

Nitric oxide constitutes one of the most important mediators of intra and extra cellular processes, in human organism has a dubious role, sometimes it brings benefits, sometimes it is harmful, being potentially toxic in stress oxidative conditions^{37,44}. Nitric oxide can inhibit activation and expression of certain adhesion molecules, and influence production of superoxide anion and

plays a critical role in maintaining healthy endothelial function and vascular tone⁴⁵.

Mubarak et al.⁴⁶ developed a study, where the aim was to assess whether the consumption of pure chlorogenic acid can acutely augment NO status, improve endothelial function, and lower blood pressure in healthy men and women. Their results demonstrate that the acute intake of pure chlorogenic acid in a relevant achievable dietary dose can significantly lower blood pressure in healthy subjects.

Marcocci et al.⁴⁷ demonstrate the ability of plants to inhibit the pro-oxidant action of NO, their research suggest that the Ginkgo biloba leaves extracts is a potential therapeutic agent for the control of oxidative and non-oxidative damage caused by NO.

A study carried by Schinella et al.¹⁶ demonstrated that *Ilex paraguariensis* extract compounds cause a significant attenuation of endothelial and myocardial stunning and lipid peroxidation and that the NO is involved in the events that lead to the protection. The evidence from this study suggest the need for balance in the bioavailability of NO because a decrease of coronary resistance after mate treatment and its abolishment when NOS were inhibited indicates that NO is also the possible mediator of the vaso relaxing effect obtained with this extract.

Methylxanthines (caffeine and theophylline) can inhibited the expression/activity of iNOS (intracellular enzyme, inducible nitric oxide synthase), these results suggest that NO produced by iNOS acts as a metabolic switch during inflammation by inhibiting oxidative phosphorylation and forcing vascular endothelial cells to temporarily utilize anaerobic energy metabolism⁴⁸.

Iron chelating properties of the extracts

The iron chelating capacities of the extracts are shown in the **Figure 5 (a), (b) and (c)**. The extracts caused reduction of the formation of colored the Fe²⁺ phenanthroline complex, but there were variations related with the herbs used and with the sequence of extractions.

As in assay that we analyzed the ability of the extracts scavenger NO, in this assay we also analyzed each herb separately to see if there were changes along the extractions and whether these were significant.

About these results we can conclude that the extracts of all herbs were able to chelate iron and this ability was statistically significant. The percentage of inhibition to Argentine brands was around 50% at the first three and 30% in the last two extracts. In this case there were differences between the ability of chelation of iron in the different mates (extracts) and between the herbs (the **Figure 5** (a) shows these results.

The Brazilian and Uruguayan herbs exhibited significant ability to chelate iron in all extracts analyzed ($p < 0,001$) and there was no difference between them ($p < 0,001$). Their iron chelation capacity was about 80%. These results are expressed in the **Figures 5** (b) and 5 (c).

The analysis of the results reported above allow us to suggest that the extracts of yerba mate can be an important means of regulating free iron and thus reduce possible oxidative damage. Relative to the Pearson correlation are important the results of Brazilian herbs, in these where observed that the TPC and the ability of the extracts chelate iron don't have relationship. However, in these herbs the ability to chelate iron was very significant, being similar to Uruguayan brands, where the TPC was the largest. Since this activity was not directly related to the concentration of phenolics compounds we suppose that other substances may be contributing to this result.

Iron is an essential trace element present in almost all cells of the body. This metal is essential in diet, are needed for haemoglobin, myoglobin, cyclo-oxygenases and many others. Both iron excess and iron deficiency can cause oxidative stress. The generation of deleterious activated oxygen species capable of damaging DNA, lipids, and proteins requires a catalyst such as iron^{37,49,50}.

Bartsch and Nair⁵¹ related that patients with iron-overloaded show elevated level of lipid peroxidation, protein carbonyls and subnormal level of coenzyme Q, tocopherol and vitamin C. Puntel, Nogueira and Rocha,²⁵ demonstrated that iron chelating agents can reduce thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) production.

There is growing evidence that oxidative stress may play an important role in the pathogenesis of Alzheimer's disease, Parkinson disease, and Amyotrophic lateral sclerosis, since the brain, which consumes large amounts of oxygen, is particularly vulnerable to oxidative damage. Moreover, it has been proposed that hydroxyl radicals and Fe (III) are generated upon Fenton reaction that accounts for the increase of ferric ions and reactive oxygen species in these degenerating zones of the brain. Metal-chelating compounds, such as flavonoids, remove the metals and can alter their redox potentials rendering them inactive^{52,53}.

Pardo et al.⁵⁴ demonstrated that the extract of *Mangifera indica* L. (Vimang) is able to prevent iron mediated mitochondrial damage by means of oxidation of reduced transition metals required for the production of superoxide and hydroxyl radicals and direct free radical scavenging activity.

Relative to the extracts studied it was possible to observe that all herbs presented high polyphenol total content among then levels significant of the chlorogenic and caffeic acids, caffeine and theobromine. It is believed that these substances present important antioxidant effects and that act by different form, besides be able to prevent many kinds of diseases induced by oxidative stress. To name a few we can cite the iron distribution, the myocardial damage by the reduction of the ROS-induced lipid peroxidation and improves of the NO balance.

Of particular importance, this study presents evidence that overall antioxidant activity of the extracts is maintained throughout consumption, as even the latter mate (supposedly very diluted) has an antioxidant potential likely or very similar to the first. This is relevant because mate can be consumed in a circle of friends where one person can consume random mates or alone ingesting all content of water available. This knowledge is essential since the consumption of this beverage is part of the habits and costumes of the border region of the South America, in all social classes, ages and lifestyles.

References

- 1- Heck, C.I. and Mejia, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *Journal of food science*, 2007, 72,138-15.
- 2- Bracesco, N.; Sanchez, A.G.; Contreras, V., Menini, T.; Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, doi:10.1016/j.jep.2010.06.032.
- 3- Meinhart, A.D.; Bizzotto, C.S.; Ballus, C.A.; Poloni Rybka, A.C.; Sobrinho, M.R.; Cerro-Quintana, R.S.; Teixeira-Filho, J.; Godoy, H.T. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 24, 58(4), 2188-2193.
- 4- Bracesco, N.; Dell M.; Rocha, A.; Behtash, S.; Menini, T.; Gugliucci, A.; Nunes, E. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*, prevention of DNA double- strand breaks in *Saccharomyces Cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 2003, 9, 379-387.
- 5- Matsumoto, R.L.; Bastos, D.H.; Mendonça, S.; Nunes, V.S.; Bartchewsky, W.; Ribeiro, M.L.; De Oliveira Carvalho, P. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes ,lipid peroxidation, and total antioxidants status in healthy young women. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 1775–1780
- 6- Marroni, N.P. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In *Estresse oxidativo e antioxidantes*. Ed.1, Ed. ULBRA, Canoas, RS, Brazil, 2002, 189 pp.
- 7- Halliwell, B.; Gutteride, J.M.C. Antioxidant defenses: endogenous and diet derived. In *Free radicals in biology and medicine*, Ed. 4 , 2007, New York, 581pp.
- 8- Bastos, D.H.M.; Saldanha, L.A.; Catharino, R.R.; Sawaya, A.C.H.F.; Cunha, I.B.S.; Carvalho, P.O.; Eberlin, M.N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules*, 2007, 12, 423- 432.

- 9- Rocha Junior, W.F. Análise do Agronegócio da Erva-Mate com o Enfoque da Nova Economia Institucional e o Uso da Matriz Estrutural Prospectiva. *Graduate Program in Production Engineering*. 2001, UFSC,SC, Brazil.
- 10- Esmelindro, A.A.; Girardi, J.S.; Mossi, A.; Jacques, R.A.; Dariva, C. Influence of Agronomic Variables on the Composition of Mate Tea Leaves (*Ilex paraguariensis*) Extracts Obtained from CO₂ Extraction at 30 °C and 175 bar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 1990-1995
- 11- Mendes, R.M.O. Caracterização e avaliação da erva-mate (*Ilex paraguariensis* ST. HIL) beneficiada no estado de Santa Catarina.119f. . Dissertation (Master of chemistry Engineering), *Chemistry Institute*. 2005, UFSC,SC, Brazil.
- 12- Isolabella, S.; Cogoi, L.; Lópes, P.; Anesini, C.; Ferraro, G.; Filip, R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. *Food Chemistry*, 2010, 122, 695–699
- 13- Cardozo, E.L.; Jr., Ferrarese-Filho, O.; Cardozo Filho, L.; Ferrarese, M.L.L.; Donaduzzi, C.M.; Sturion, J.A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, 20, 553- 558
- 14- Jacques, R.A.; Arruda, E.J.; Oliveira, L.C.S.; Oliveira, A.P.; Dariva, C.; Oliveira, J.V.; Camarão, E.B. Influence of drying methods and agronomic variables on the chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) obtained from high-pressure CO₂ extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 10081-10085.
- 15- Streit, N.; Hecktheuer, L.; Docanto, M.; Mallmann, C.; Streck, L.; Parodi, T.; Canterle, L.P. Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). *Food Chemistry*, 2007, 102, 560-564.
- 16- Schinella, G. R.; Troiani, G.; Dávila, V.; Buschiazzi, P. M.; Tournier, H. A. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 269, 357-360.

- 17- Singleton, V.L.; Joseph, A.; Rossi, J. Colourimetry of total phenolics with phosphomolibdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965, 16, 144–149.
- 18- Chandra, S.; De Meija, G.E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 3583–3590.
- 19- Filip, R.; Lopez, P.; Giberti, G.; Coussio, J.; Ferraro, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*, 2001, 72, 774–778.
- 20- Green, L.C.; Wanger, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 1981, 126, 131–138.
- 21- Marcocci, L.; Maguire, J.J.; Droy-Lefaix, M.T.; Packer, L. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, 201, 748–755.
- 22- Puntel, G.O.; Gubert, P.; Peres, G.I.; Bresolin, L.; Rocha, J.B.T.; Pereira, M.E.; Carratu, V.S.; Soares, F.A.A. Antioxidant properties of oxime 3 (phenylhydrazono) butan-2-one. *Arch toxicology*, 2008, 82, 755 – 762.
- 23- Bucber, J.R.; Tien, M.; Morehouse, L.A.; Aust, S.D. Redox cycling and lipid peroxidation: the central role of iron chelates. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1983, 3, 222–226.
- 24- Minotti, G.; Aust, S.D. An investigation into the mechanism of citrate- Fe²⁺ dependent lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 1987, 3, 379–387.
- 25- Puntel, R.L.; Nogueira, C.W.; Rocha, J.B.T. Krebs Cycle Intermediates Modulate Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) Production in Rat Brain *In Vitro*. *Neurochemical research*, 2005, 30, 225–235.
- 26- Bravo, L.; Goya, L.; Lecumberri, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*, 2007, 40, 393–405.

- 27- Bixby, M.; Spieler, L.; Menini, T.; Gugliucci, A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. *Life Sciences*, 2005, 77, 345- 358.
- 28- Silva, E.L.; Neiva, T.J.C.; Shirai, M.; Terao, J.; Abdalla, D. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. *Food Research International*, 2008, 41, 973- 979.
- 29- Macedo, J.A.; Battestin, V.; Ribeiro, M.L.; Macedo, G.A. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. *Food Chemistry*, 2011, 126, 491- 497.
- 30- Holst, B.; Williamson, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(2), 73- 82.
- 31- Floegel, A.; Kim, D.; Chung, S.; Koo, S.I.; Chun, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal and Food Composition and Analysis*, 2011, 2, 1043- 1048.
- 32- Berté, K.A.S.; Beux, M.R.; Spada, P.K.; Salvador, M.; Hoffmann-ribani, R. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Yerba-Mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) Extract as Obtained by Spray Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59, 5523–5527.
- 33- Dall’Orto, V.C.; Vago, J.M.; Carballo, R.R.; Rezzano, I.N. Comparison of tyrosinase biosensor and colorimetric method for polyphenol analysis in different kinds of teas. *Analytical Letter*, 2005, 38, 19-33.
- 34- Fiuza, S.M.; Gomes, C.; Teixeira, L.J.; Girão da Cruz, M.T.; Cordeiro M.N.; Milhazes, N.; Borges, F.; Marques, M.P. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties - a structure-activity relationship study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004, 12, 3581- 3589.
- 35- Gugliucci, A.; Bastos, D.H.; Schulze, J.; Souza, M.F. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia*, 2009, 80, 339–344.
- 36- Gugliucci, A.; Bastos, D.H. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. *Fitoterapia*, 2009, 80, 138–142.

- 37- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In *Free radicals in biology and medicine*, Ed. 4, 2007, New York, 581pp.
- 38- Pagliosa, C.M.; Vieira, M.A.; Podestá, R.; Maraschin, M.; Zeni, A.L.B.; Amante, E.R.; Dias, R.; Amboni, R.D.M.C. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) *Food Chemistry*, 2010, 122, 173-178.
- 39- Maurício, A.Q. Estudo da atividade antioxidante do ácido caféico e da PDI: um polifenol natural e um quelante sintético. 95p. Dissertation (Master of analytical chemistry), *Chemistry Institute*, 2006, UNB, DF, Brazil.
- 40- Heckman M.A.; Weil J.; Mejia E.G. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *Journal of food science*, 2010, 75:3, 77-87.
- 41- Mubarak, A.; Bondonno, C.P.; Liu, A.H.; Considine, M.J.; Rich, L.; Mas, E.; Croft, K.D.; Hodgsson, J.M. Acute effects of chlorogenic acid on nitric oxide status, endothelial function, and blood pressure in healthy volunteers: a randomized trial. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2012, 60, 9130- 9136.
- 42- Athayde, M.L., Coelho, G.C., Schenkel, E.P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St-Hil *Phytochemical*, 2000, 55, 853– 857.
- 43- Azam, S.; Hadi, N.; Khan, N.U.; Hadi, S.M. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Medical science monitor*, 2003, 9, 325- 330.
- 44- Dusse, L.M.S.; Vieira, L.M.; Carvalho, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de patologia e medicina laboratorial*, 2003, 39:4, 343-350.
- 45- Vallance, P.; Chan, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Education in heart*, 2001, 84, 342-350.
- 46- Mubarak, A.; Bondonno, C.P.; Liu, A.H.; Considine, M.J.; Rich, L.; Mas, E.; Croft, K.D.; Hodgsson, J.M. Acute effects of chlorogenic acid on nitric oxide status, endothelial function, and blood pressure in healthy volunteers: a

randomized trial. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2012, 60, 9130-9136.

47- Marcocci, L.; Maguire, J.J.; Droy-Lefaix, M.T.; Packer, L. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, 201, 748- 755.

48- Bereta, M.; Bereta, J.; Georgoff I.; Coffman F.D.; Cohen S.; Cohen M.C. Methylxanthines and calcium-mobilizing agents inhibit the expression of cytokine-inducible nitric oxide synthase and vascular cell adhesion molecule-1 in murine microvascular endothelial cells. *Experimental Cell Research*, 1984, 212, 230- 242.

49- Reif, D.W. Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Radical Biology Medicine*, 1992, 12, 417- 427.

50- Shazia, Q.; Mohammad, Z.H.; Rahman, T.; Shekhar H.U. Correlation of Oxidative Stress with Serum Trace Element Levels and Antioxidant Enzyme Status in Beta Thalassemia Major Patients: A Review of the Literature. *Hindawi Publishing Corporation*. 2012, 2012, 1- 7.

51- Bartsch, H.; Nair, J. Accumulation of lipid peroxidation-derived DNA lesions: potential lead markers for chemoprevention of inflammation-driven malignancies. *Mutation Research*, 2005, 11, 591(1-2), 34- 44.

52- Esposito, E.; Rotilio, D.; Di Matteo, V.; Di Giulio, C.; Cacchio, M.; Algeri S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging*, 2002, 23: 5, 719- 735.

53- Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. The molecular basis of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 2011, 125, 288- 306.

54- Pardo, A. G.; Delgado, R.; Velho, J.; Inada, N. M.; Curti, C.; Vercesi, A. Mangifera indica L. extract (Vimang) inhibits Fe²⁺-citrate-induced lipoperoxidation in isolated rat liver mitochondria. *E. Pharmacological Research*, 2005, 51, 427- 435.

Tables

Table 1- Quantification of the total polyphenolic compounds (TPC), from the different herbs used in this study expressed in g GAE/100 mL of the sample. **Ar 1, Ar 2, Ar 3-** Argentine brands; **Br 1, Br 2, Br 3-** Brazilian brands; **Uy 1, Uy 2, Uy 3-**Uruguayan brands. 1, 2, 5, 10, 15- mates (extracts) analyzed. Values were expressed as means \pm standard deviation. Values marked by the same lower-case superscript letters (from “a” to “c”) within a line denote statistically significant differences in the concentration of the compounds between the mates.

Table 2- Pearson correlations between TPC and antioxidant capacity in extracts. **Ar 1, Ar 2, Ar 3-** Argentine brands; **Br 1, Br 2, Br 3-** Brazilian brands; **Uy 1, Uy 2, Uy 3-**Uruguayan brands.

Figure Captions

Figure 1- Utensils used for preparation and consumption of “chimarrão” beverage. 1- groud; 2- metal straw, named bomba or bombilla; 3- herb; 4- hot water; 5- person consuming chimarrão beverage.

Figure 2- Suction system- The metal straw (bomba or bombilla) is attached to a Kitasato flask capped with silicone stopper who has a hole where passes a glass tube. The extract gets sucked by the vacuum pump and falls into the Kitasato flask.

Figure 3- Substances detected by HPLC in extracts (mates). The samples concentration are expressed in $\mu\text{g/ml}$ with mean and SD of triplicate determination. The numbers 1, 2, 5, 10, 15 in the X axis of the graph indicated the extracts (mates) analyzed. **Ar 1**, **Ar 2** and **Ar 3** are Argentine brands; **Br 1**, **Br 2** and **Br 3** are Brazilian brands and **Uy 1**, **Uy 2** and **Uy 3** Uruguayan brands. The figures **3.1**, **3.2**, **3.3**, **3.4**: presented the variation in concentration of **Chlorogenic acid**, **Caffeic acid**, **Caffeine** and **Theobromine** in the extracts. *The small images below are fragments that exemplify the decline in the concentration of these substances in the sequence of extractions.*

Figure 4- Effects of extracts on NO scavenging assay. The values are expressed in percentage of inhibition in relation to control without extracts. Data are presented as mean \pm SD ($n = 3$). The letters above the figure indicated that the figures represent the different nationalists: **(a)** Argentine, **(b)** Brazilian and **(c)** Uruguayan brands. The numbers 1, 2, 5, 10, 15 in the **X** axis of the graph indicated the extracts (mates) analyzed. The symbols above the column bar indicates statistical differences between the herbs. Δ Indicated statically differences between **Ar 1** x **Ar 2**, \circ between **Ar 1** x **Ar 3** and between \blacklozenge **Ar 2** x **Ar 3**. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$. To Brazilian and Uruguayan brands the reference are the same, but in this case there was no statically differences in herbs.

Figure 5- Iron chelating properties of mates (extracts). Effect of yerba mate extracts on iron–phenantroline complex formation. The values are expressed as % of control. Absorbance obtained by reaction between free Fe²⁺ with o-phenantroline in the absence of extracts are considered 100%. Data are expressed as means \pm SD ($n=3$). All extracts presented iron chelation capacity statically significant $p<0.001$ from their respective control by Bonferroni's range test, and there were no difference among the extracts. The letters above the figure indicated that the figures represent the different nationalists: **(a)** Argentine, **(b)** Brazilian and **(c)** Uruguayan brands. The numbers 1, 2, 5, 10, 15 in the **X** axis of the graph indicated the extracts (mates) analyzed. The symbols above the column bar Indicated statically differences, being between Δ **Ar 1** x **Ar 2**, \circ between **Ar 1** x **Ar 3** and \blacklozenge between **Ar 2** x **Ar 3**. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$. To Brazilian and Uruguayan brands the reference are the same, but in this case there was not statically differences in herbs.

Tables

Table 1- Quantification of the TPC in extracts.

Herbs	1	2	5	10	15
Ar1	0,711 ±0,15 ^a	0,967 ±0,32 ^{bb}	0,694 ± 0,16	0,359 ±0,04 ^{b*}	0,221 ± 0,08 ^{ab**}
Ar2	0,638 ±0,18 ^{aa}	0,485 ±0,04	0,477 ±0,04	0,485 ±0,04 ^{a*}	0,477 ±0,04 ^{a**}
Ar3	0,433 ±0,18	0,620 ± 0,06 ^{bb}	0,488 ±0,16	0,272 ±0,01 ^{b*}	0,193 ±0,03 ^{b*}
Br1	0,598 ±0,26 ^{aaa}	0,307 ±0,01	0,116 ±0,04 ^{a**}	0,095 ±0,05 ^{a**}	0,067 ±0,03 ^{a**}
Br2	0,408± 0,12 ^{aaa}	0,220 ±0,03	0,097 ±0,05 ^{a**}	0,072 ±0,03 ^{a***}	0,056 ±0,01 ^{a***}
Br3	0,798 ±0,19 ^{aa}	0,599 ±0,14	0,459 ±0,06	0,338 ±0,21 ^{a*}	0,191 ±0,05 ^{a**}
Uy1	1,033 ±0,05 ^a	1,451 ±0,21 ^{bb}	1,233 ±0,13 ^{cc}	0,547 ±0,24 ^{b***c**}	0,514 ±0,14 ^{ab***c**}
Uy2	0,971 ±0,02 ^{aa}	1,300 ±0,19 ^{bb}	1,153± 0,08 ^{cc}	0,639 ±0,06 ^{ab***c**}	0,473 ±0,11 ^{a**b***c***}
Uy3	1,185 ±0,02 ^{aa}	1,177 ±0,18 ^{bb}	0,933 ±0,09 ^c	0,761 ±0,16 ^{ab*}	0,506 ±0,08 ^{a***b***c*}

a= statistically significant differences between the mate 1 and others.

b= statistically significant differences between the mate 2 and others.

c= statistically significant differences between the mate 5 and others.

Each value is presented as mean ± SD (n = 3).

* Indicated decrease in TPC along the extractions (mates), when p ≤ 0.05.

* (p ≤ 0,05) ** (p ≤ 0,01) *** (p ≤ 0,001)

Table 2- Pearson correlations between TPC and antioxidant capacity of the extracts.

Herbs	NO	Fe chelation
Ar 1	** r= - 0, 9826 p= 0, 0027	* r= - 0, 9498 p= 0, 0134
Ar 2	ns	ns
Ar 3	ns	ns
Br 1	** r=-0, 9852 p=0, 0022	ns
Br 2	* r=0, 8921 p=0, 0419	ns
Br 3	ns	ns
Uy 1	* r=-0, 9570 p=0, 0106	* r=-0, 8972 p=0, 0389
Uy 2	ns	ns
Uy 3	ns	* r= -0, 9058 p= 0, 0342

NO: Nitric oxide scavenging assay.

Fe chelation: Iron chelating properties of the extracts.

*or ** Significant correlation at indicated p value.

ns: not significant correlation.

Figure 1

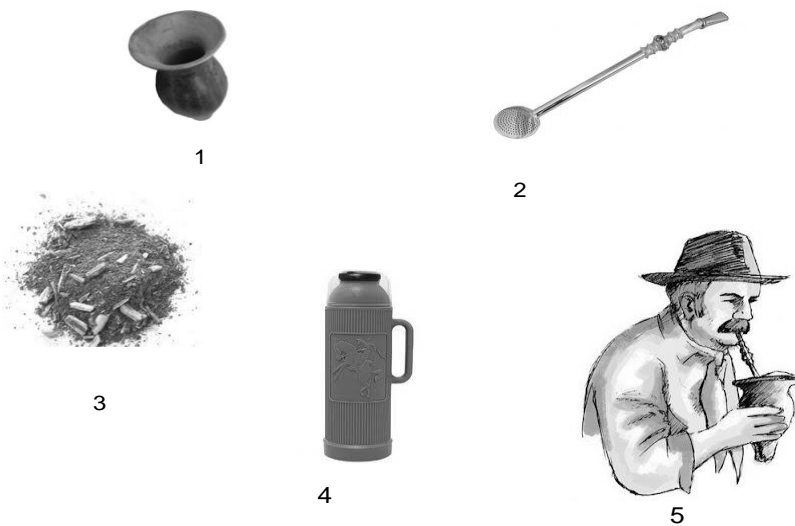
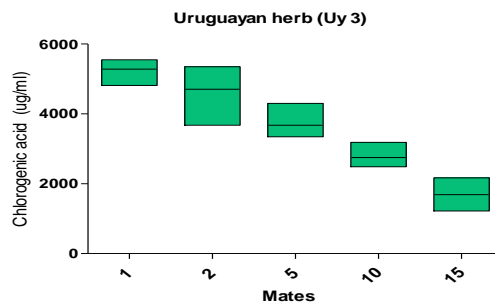
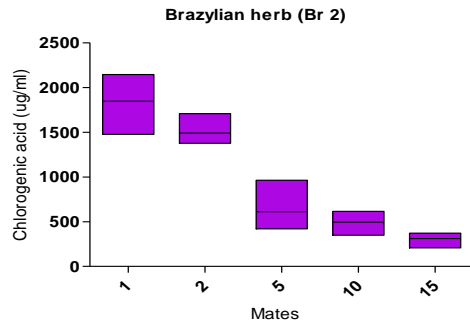
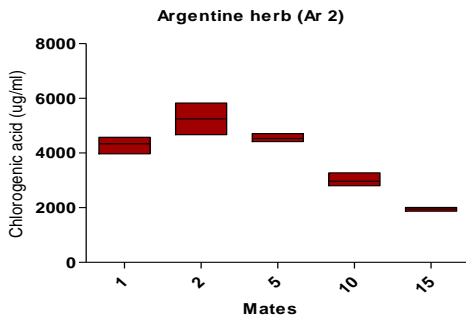
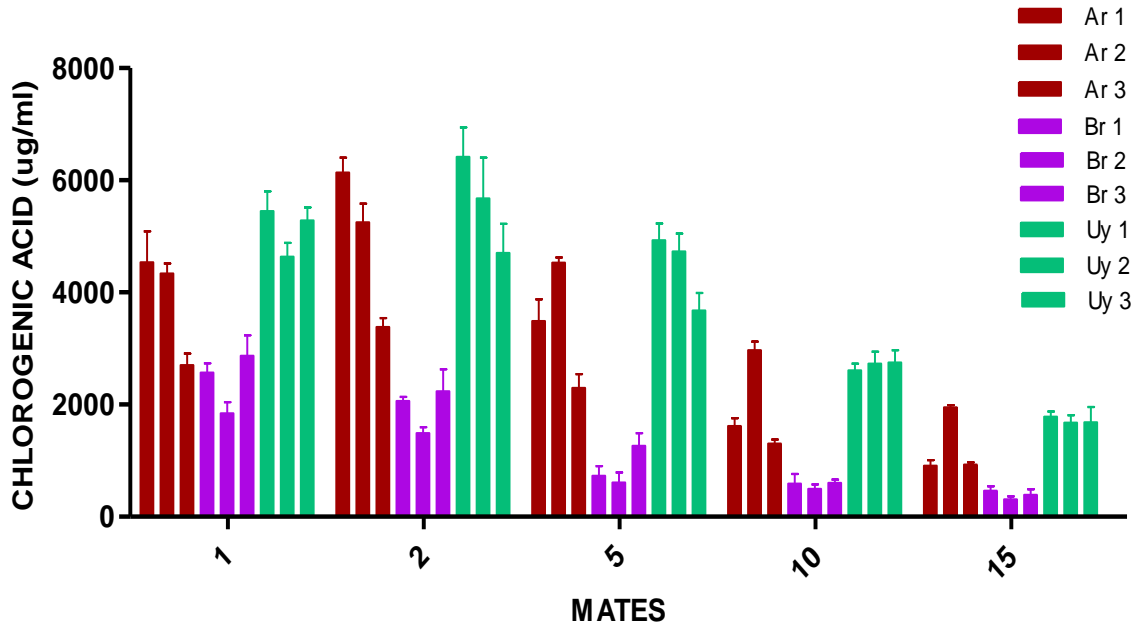


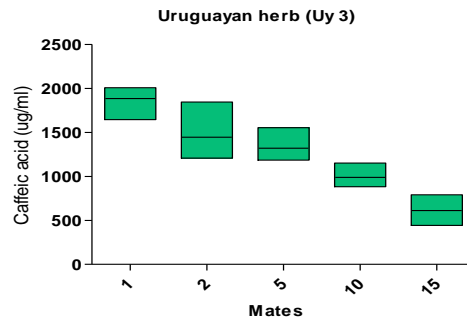
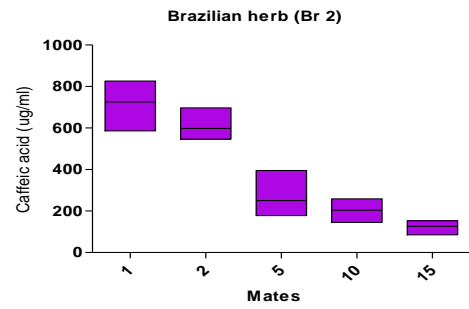
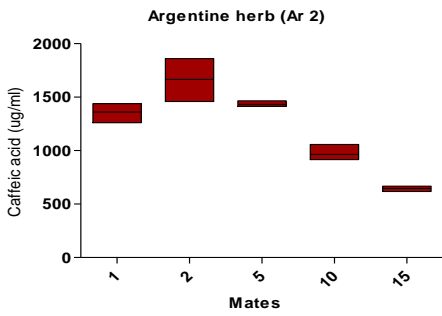
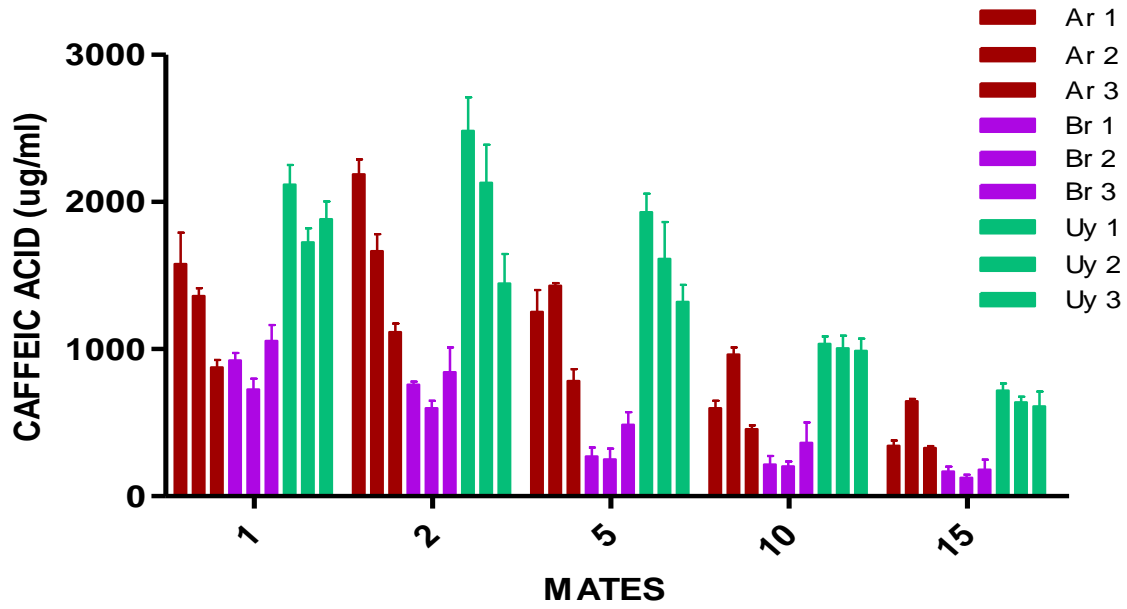
Figure 2

Figure 3

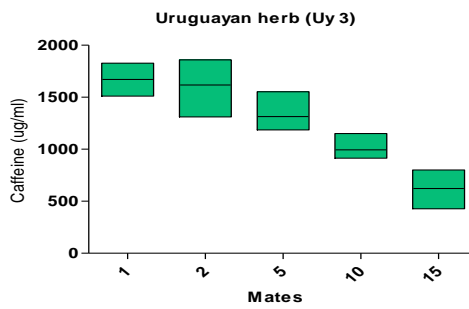
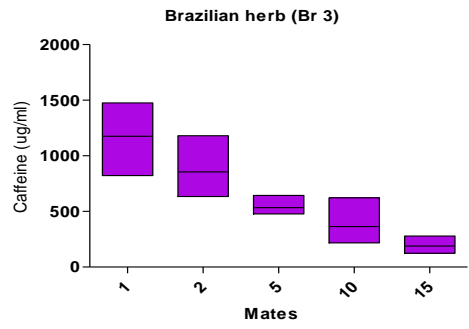
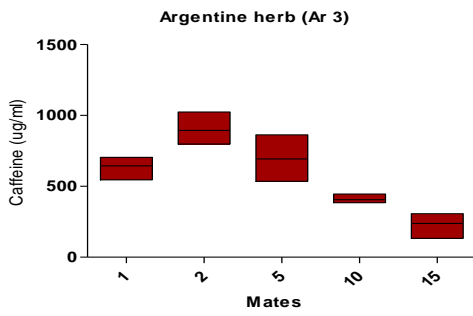
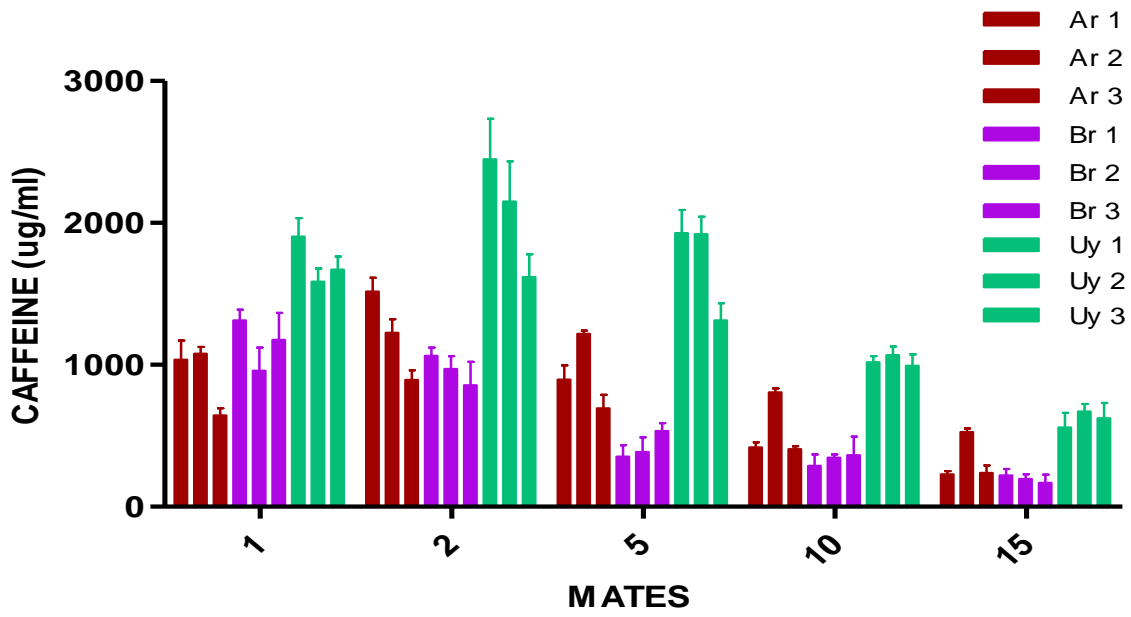
3.1- Chlorogenic acid



3.2 Caffeic acid



3.3 Caffeine



3.4 Theobromine

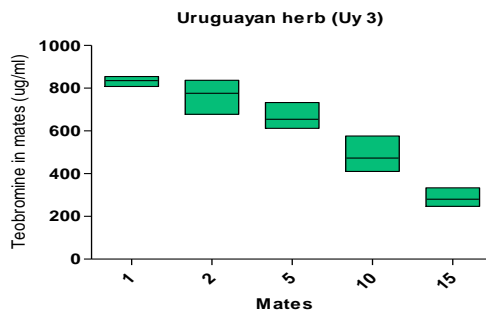
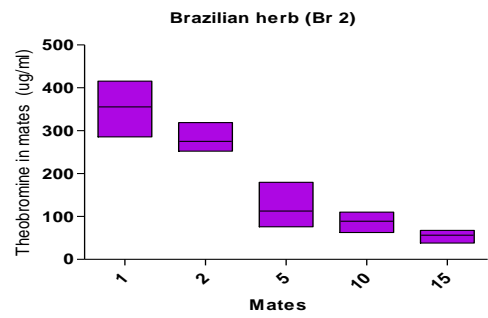
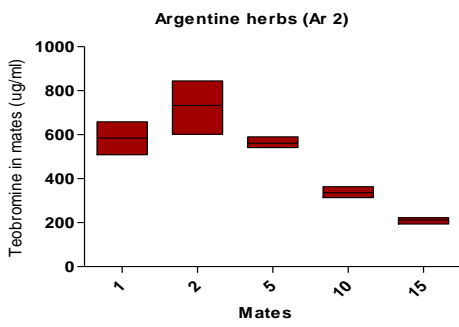
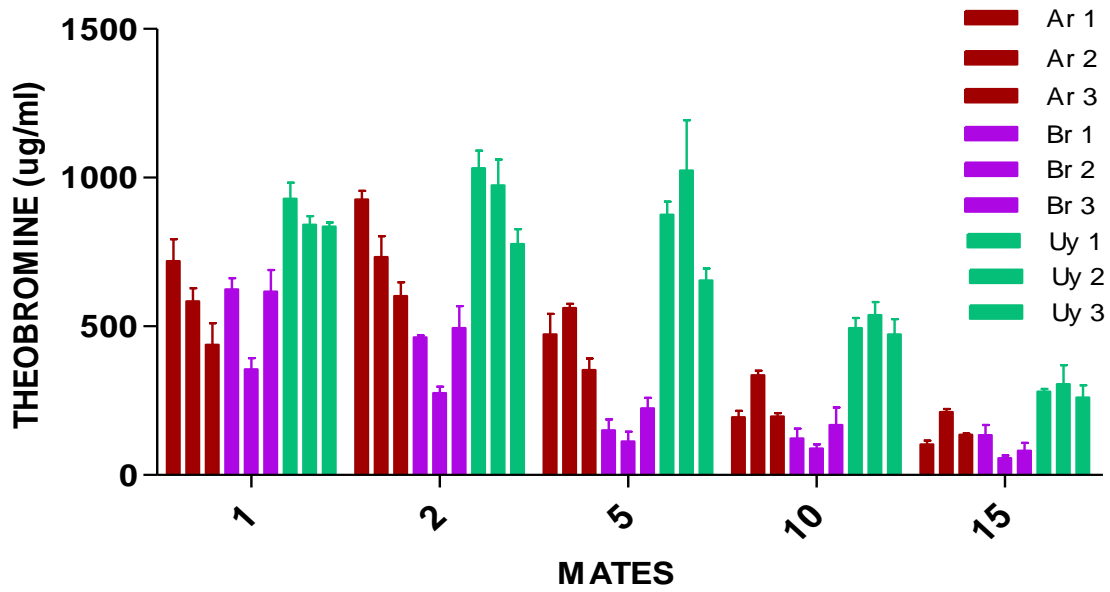


Figure 4

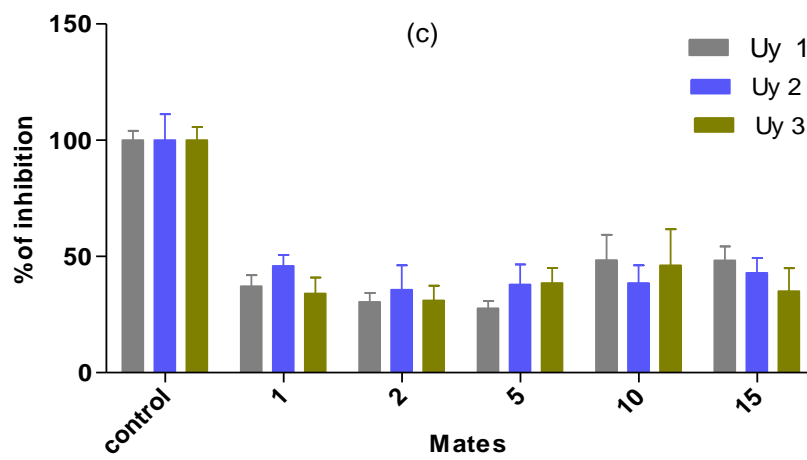
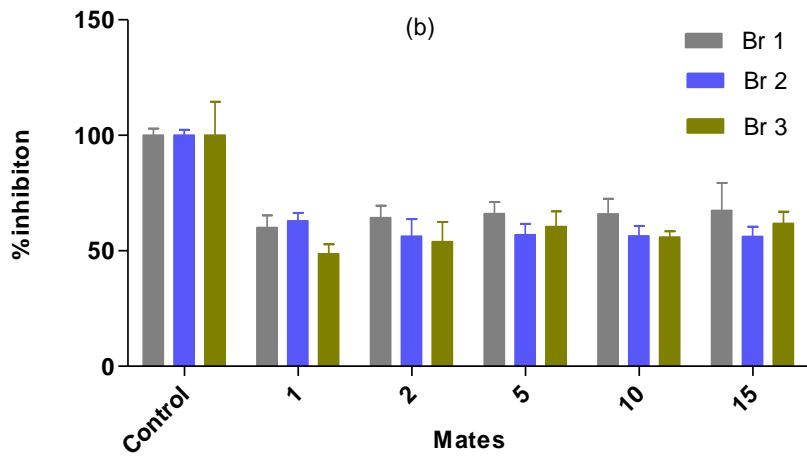
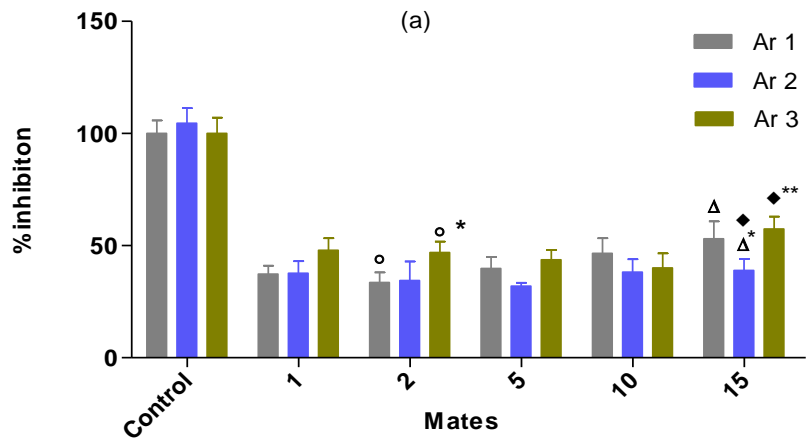
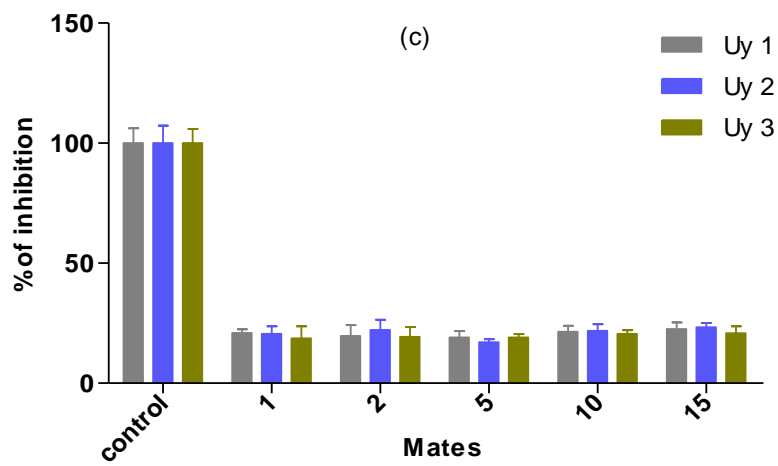
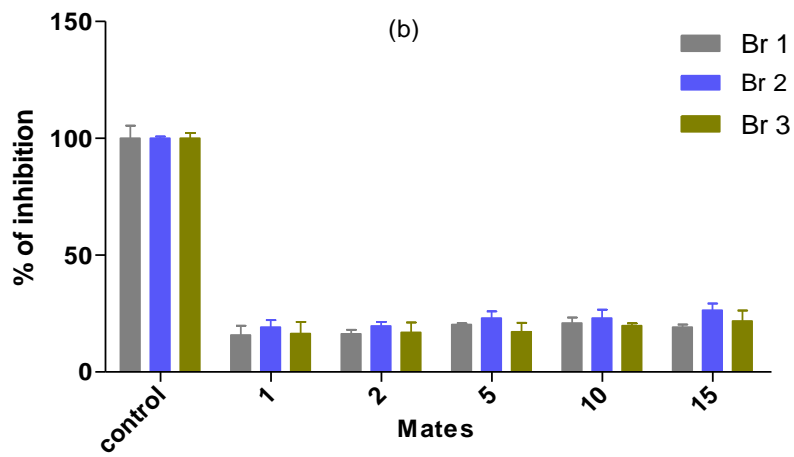
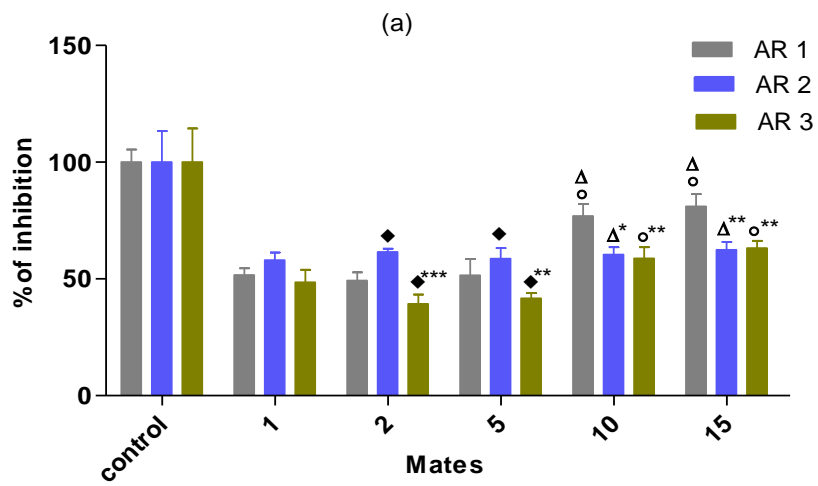


Figure 5



7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- Extratos de erva-mate possuem elevada concentração de polifenóis;
- Na seqüência de extrações processadas houve queda na concentrações de polifenóis;
- Entre as substâncias analisadas por CLAE, a encontrada em teores mais elevados foi o ácido clorogênico e a que apresentou menores concentrações foi a teobromina;
- Ao longo das extrações ocorreram quedas na concentrações de teobromina, cafeína, ácido cafeico e ácido clorogênico;
- Não houveram diferenças estatísticas em relação ao conteúdo de substâncias extraídas entre o primeiro e o segundo, nem entre o décimo e o décimo quinto extratos (mates);
- De modo geral os extratos exibiram ação antioxidante em relação aos protocolos desenvolvidos (atividade óxido nítrico "scavenger" e capacidade de quelação de ferro), porém houveram variações relacionadas as marcas e nacionalidades de ervas;
- As ervas de nacionalidade Uruguia apresentaram o maior teor de compostos fenólicos e das substâncias analisadas isoladamente por CLAE. Comparativamente pode-se estabelecer: Uruguai>Argentina>Brasil;
- A concentração dos elementos analisados não teve direta relação com as atividades antioxidantes das ervas podendo-se supor que quantidades pequenas desses compostos, em extratos de erva-mate, são capazes de gerar atividade antioxidante;
- Bebidas a base de erva-mate preparadas e consumidas do modo que é tradição entre a população da fronteira oeste do Rio Grande do Sul, levam a extração de compostos capazes de atuarem como antioxidantes e a extração destas substâncias é mantida ao longo do consumo de aproximadamente 1 litro de água.

8 PERSPECTIVAS

Este trabalho torna-se um importante referencial no que diz respeito à ampliação do conhecimento sobre o que é ingerido quando se consome a peculiar bebida, “mate” ou “chimarrão”.

Uma nova etapa de estudos, utilizando os mesmos extratos aplicados nesta pesquisa está em desenvolvimento, está visa avaliar a ação dos compostos presentes nos extratos, em relação à sobrevivência e viabilidade de organismos vivos, no caso *Caenorhabditis elegans*. Este nematódeo é um adequado modelo, pois tem seu o tempo de vida diretamente relacionado ao estresse oxidativo. Além disso, permite eliminar fatores que afetariam o estudo em seres humanos.

No entanto, a pesquisa com humanos visando investigar a ação dos extratos em diferentes células e níveis plasmáticos de compostos em situações de consumo agudo e crônico da bebida permeia a projeção de estudos futuros.

REFERÊNCIAS

AZAM, S.; HADI, N.; KHAN, N.U.; HADI, S.M. Antioxidant and pro oxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Medicinal Science Monitor**. v: 9: 325-30, 2003

BALLUS, C. A. Erva-mate: uma importante fonte de compostos bioativos. **Informativo Conselho Regional de Química**, Porto Alegre, n. 106, p.6-7, fev. 2008

BASTOS, D.H.M.; SALDANHA, L.A.; CATHARINO, R.R.; SAWAYA, A.C.H.F.; CUNHA, I.B.S.; CARVALHO, P.O.; EBERLIN, M.N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, 12, 423- 432, 2008

BASTOS, D. H. M.; FORNARI, A. C.; YARA, S. Q.; TORRES, E. A. F. S. Bioactive compounds Content of Chimarrão Infusions Related to the Moisture of Yerba Maté (*Ilex Paraguariensis*) Leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 399-404, 2006

BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba-maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camélia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, p. 423 – 432, 2007

BASTOS, D. H. M. & TORRES, E. A. F. S. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Nutrire: revista da Sociedade Brasileira de Alimentos**, v. 26, p. 77-89, 2003

BASTOS, D.H.M.; OLIVEIRA, D.M.; MATSUMOTO, R.L.T.; CARVALHO,P.O.; RIBEIRO,M. L. Yerba maté: pharmacological properties,

research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology** .v: 1: 37–46, 2007

BERTÉ, K.A.; BEUX, M.R.; SPADA, P.K.; SALVADOR, M.; HOFFMANN-RIBANI, R. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Yerba-Mate(*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) Extract as Obtained by Spray Drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v: 59, 5523–5527, 2011

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

BRACESCO, N.; DELL, M.; ROCHA, A.; BEHTASH, S.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A.; NUNES, E. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*, prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces Cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**. v. 9:378-387, 2003

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**. (2010), doi:10.1016/j.jep.2010.06.032

BURTNIK, O. J. **Yerba Mate: Manual de Producción**. INTA, AER Santo Tomé, Corrientes, Argentina. 52 pág. 2006

CARTELE, L.P. **Erva mate e atividade antioxidante**. 2005, 100f. Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v: 30, p: 441-449, 2007

CONTRERAS, P. D. **Desenvolvimento de bebida à base de subprodutos da indústria da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e verificação de sua atividade antioxidante**. 2007. 82f. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos– Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de alimentos da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007

CORREA, G.; FONSECA, T.M.; MELO, I.B.; GRISON, A.; RUFFATO, A.; MEDRADO, M.J.S.; CANSIAN, R.L.; VILCAHUAMÁN, L.J.M.; FELIZARI, S.R. Carbona 4: Desenvolvimento de uma progênie biclonal de erva-mate em Machadinho, RS. Colombo, Paraná: Embrapa Florestas, 2011 (Série Documentos).

CUERDA, C.; LUENGO, L.M.; VALERO, M.A.; VIDAL, A.; BURGOS, R.; CALVO, F.; MARTÍNEZ, C. Revisión Antioxidantes y diabetes mellitus: revisión de la evidencia. **Nutrición Hospitalaria**.v: 26:68-78, 2011

DA CROCE, D. M. Características físico-químicas de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) no estado de Santa Catarina. **Ciência Floresta**, v. 12, n. 2, p.107-113, 2002

DE MORAIS, E.C.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G.A.; BOAVENTURA, B.C.; DE ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; DI PIETRO, P.F.; MARASCHIN, M.; DA SILVA, E.L. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v: 57,8316–8324, 2009

DEMÉTRIUS, P.; ARÇARI, D.P.; BARTCHEWSKY, W.; SANTOS, T.W.; OLIVEIRA, K.A.; FUNCK, A.; PEDRAZZOLI, J.; DE SOUZA, M.F.F.; SAAD, M.J.; BASTOS, D.H.M.; GAMBERO, A.; CARVALHO, P.O.; RIBEIRO, M.L. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**. v: 17: 2127–2133, 2009

DUTRA, F.L.G. & HOFFMANN-RIBANI, R. Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate. **Química Nova**, v: 33: 1, 119-123, 2010

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 193-204, 2002

FILIP, R.; DAVICINO, R.; ANESINI, C. Antifungal Activity of the Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis* Against *Malassezia furfur*. **Phytotherapy research**. v. 24: 715-719, 2010

FIUZA, S.M.; GOMES, C.; TEIXEIRA, L.J.; GIRÃO DA CRUZ, M.T.; CORDEIRO, M.N.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; MARQUES, M.P. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties - a structure-activity relationship study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v:12: 3581-3589, 2004

FONSECA, T.R. **Efeitos do exercício físico e do extrato de soja no perfil lipídico, no estresse oxidativo e na aterosclerose em camundongos deficientes do gene para o receptor de LDL**.2007. 89f. Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007

FRIEDMAN, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. **Molecular Nutrition & Food Research**. v: 51: 116 – 134, 2007

GALEY, H.F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**. v:107(1):57-64, 2011

GNOATTO, S. C. B.; BASSANI, V. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. ST.-HIL., aquifoliaceae). **Química Nova**, v: 30: 304 – 307, 2007

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D.H.; SCHULZE, J.; SOUZA, M.F. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**. v: 80: 339–344, 2009

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*, induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V: 224,338–344, 1996

GUGLIUCCI, A.; BASTOS D.H. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. **Fitoterapia**, 80, 138–142, 2009

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A.J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry & Molecular Biology International**.v:35: 47–56, 1995

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v:19: 393(4), 561–564, 2010

HALLIWELL, B. & GUTTERIDE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. New York, (capítulos 3, 4, 5), 2007

HANSEL, F.A.; DOMINGOS, D.M.; LIMA, K.M.G.; PASQUINI, C. **Moagem e Sapeco/Secagem em forno de Microondas na Classificação Sensorial de Erva-Mate no Infravermelho Próximo**. Colombo, Paraná: Embrapa, 2008 (Série Comunicado técnico)

HEINRICHS, R.; MALAVOLTA, E. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 781-785, 2001

HECK, C.I.; MEJIA, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of food science**. v: 72:138-151, 2007

ISOLABELA,S.; COGOI, L.; LÓPEZ P.; ANESINI C.; FERRARO G.; FILIP R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**. v:122 : 695–699, 2010

JACQUES, R.A.; ARRUDA, E.J.; DE OLIVEIRA, L.C.S; OLIVEIRA, A.P.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V.; CARAMARÃO, E.B. Influence of Agronomic Variables on the Macronutrient and Micronutrient Contents and Thermal Behavior of Mate Tea Leaves (*Ilex paraguariensis*). **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**. v: 55: 7510-7516, 2007

JACQUES, R.A.; SANTOS, J.G.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V.; CARAMARÃO, E. B. GC/MS characterization of mate tea leaves extracts obtained from high-pressure CO₂ extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 354–359, 2007

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v:125:288-306, 2011

KHAN,N. & MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. **Life Sciences**, v: 81; 519–533, 2007

MATSUMOTO, R.L.; BASTOS, D.H.; MENDONÇA, S.; NUNES, V.S.; BARTCHEWSKY, W.; RIBEIRO, M.L.; DE OLIVEIRA CARVALHO, P. Effects of mate tea(*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes ,lipid peroxidation, and total antioxidants status in healthy young women.**Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v:57: 1775–1780, 2009

MAZZAFERA, P. Caffeine, Theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 6, n. 2, p. 149 – 151, 1994.

MEDRADO, M.J.S. **Cultivo da erva-mate**. Embrapa Florestas- Sistemas de Produção, ISSN 1678-8281, 2005 (Versão Eletrônica).

MEDRADO, M.J.S. & MOSELE, S.H. **Cultivo da erva-mate**. Embrapa Florestas- Sistemas de Produção, 1 - 2ª edição ISSN 1678-8281, 2010 (Versão Eletrônica).

MEINHART, A.D.; BIZZOTTO, C.S.; BALLUS, C.A.; POLONI RYBKA, A.C.; SOBRINHO, M.R.; CERRO-QUINTANA, R.S.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H.T. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v:24; 58(4), 2188-2193, 2010.

MENDES, R., M., O. **Caracterização e avaliação da erva-mate (*Ilex paraguariensis* ST. HIL) beneficiada no estado de Santa Catarina**. 2005,

119f. Dissertação Mestrado em Engenharia Química – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005

NYM, 2001, disponível em:

<http://www.inym.org.ar/inym> acessado em 31/07/12

MORÓN, E.B.; CALDERÓN-MONTAÑO, J.M.; ORTA, L.M.; PASTOR, N.; PÉREZ-GUERRERO, C.; AUSTIN, C.; MATEOS, S.; LÓPEZ-LÁZARO, M. The Coffee Constituent Chlorogenic Acid Induces Cellular DNA Damage and Formation of Topoisomerase I- and II-DNA Complexes in Cells. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v: 60: 7384–7391, 2012

NIETSCHKE, K. **Caracterização da qualidade da erva-mate cancheada**. 2002, 89 f. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002

PAGLIOSA, C.M. **Caracterização química do resíduo de ervais e folhas “in natura” de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. 2009, 446f. Dissertação de Mestrado em Ciências dos Alimentos - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009

PAGLIOSA, C.M.; VIEIRA, M.A.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A.L.B.; AMANTE, E.R.; DIAS, R.; AMBONI, R.D.M.C. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) **Food chemistry**, 122, 173-178, 2010

PEDROSO, G.L.; MENDES, R.H.; PERSCH, K.; JAHN, M.P.; KUCHARSKI, L.C. Efeito do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre o metabolismo de ratos machos. **Revista HCPA** v: 30(3):241-246, 2010

PEREIRA, D.F.; KAPPELA, V.D.; CAZAROLLI, L.H.; BOLIGONC, A.A.; ATHAYDE, M.C.; GUESSERA, S.M.; SILVA, E.L.; SILVA, F.R.M.B. Influence of

the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis.

Phytomedicine.v: 19: 868– 877, 2012

PREDIGER, R.D.S.; FERNANDES, M.S.; RIAL, D.; WOPEREIS, S.; PEREIRA, V.S.; BOSSEB, T.S.; SILVA, C.B.; CARRADORE, R.S.; MACHADO, M.S.; CECHINEL-FILHO, V.; COSTA-CAMPOS, V. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal of Ethnopharmacology**. v:120: 465–473; 2008

PRZYGODDA, F.; MARTINS, Z.N.; CASTALDELLI, A.P.A.; MINELLA, T.V.; VIEIRA, L.P.; CANTELLI, K.; FRONZA, J.; PADOIN, M.J.. Effect of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., *Aquifoliaceae*) on serum cholesterol, triacylglycerides and glucose in Wistar rats fed a diet supplemented with fat and sugar. **Brazilian Journal of Pharmacognosia**. v: 20, 956- 961; 2010

PUANGPRAPHANT, S., MEJIA E. G. Saponins in Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and Quercetin Synergistically Inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NF kappaB pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v: 57: 8873–8883, 2009

PUANGPRAPHANT, S., BERHOW M.A., MEJIA, E.G. Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) saponins induce caspase-3-dependent apoptosis in human colon cancer cells in vitro. **Food Chemistry**. v: 125: 1171–1178, 2011

RAU, V. La yerba mate en misiones (Argentina). Estructura y significados de una producción localizada. VI Congresso Internacional de La Red Sial, Argentina, 2008

REGINATTO, F. H.; ATHAYDE, M. L.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species caffeine and theobromine in

erva mate (*Ilex paraguariensis*) and other Ilex species. **J. Braz. Chem. Soc.**, 10, 443– 446, 1999

ROCHA JÚNIOR, W. F. **Análise do agronegócio da erva-mate com o enfoque da nova economia institucional e o uso da matriz estrutural prospectiva**. 2001. 133f. Tese (Doutorado Engenharia de Produção)– Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2001

ROVER, Jr.; HOER, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**. V: 24: 112-119; 2001

SAINT-HILAIRE, A. **Viagem pela comarca de Curitiba**. Tradução de Cassiana Lacerda Carollo. Curitiba: Fundação Cultural de Curitiba, 1995

SALVADOR, M. & HENRIQUES, J.A.P. **Radicais livres e resposta celular ao estresse oxidativo**. Ed.ULBRA, 2004

SANTOS, T.B.; MITCHELL D.A.; KRIEGER, N.; MOURE, V.R.; ZANOELO, E.F. Experimental and modeling study of enzymatic oxidation of 5-o-caffeoylquinic acid by polyphenol oxidases. **Food Technology and Biotechnology**. v. 48, p. 548-553, 2010

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

SCHINELLA, A. G.; FANTINELLI, B. J. C.; MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clinical Nutrition**, v.24, p. 360–366, 2005

SCHUBERT, A.; ZANIN, F.F.; PEREIRA, D.F.; ATHAYDE, M.L. Annual variations of Mehtylxanthines in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) samples in Ijui and Santa Maria, State of Rio Grande Do Sul. **Quimica Nova**, 29,1233-1236, 2006

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. – **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2^a ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora Universidade / UFRGS / Editora da UFSC, 2000, pág. 433- 449/ 723-738

SOTO-VACA, A.; GUTIERREZ, A.; LOSSO, J.N.; XU, Z.; FINLEY, J.W. Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v: 60: 6658–6677, 2012

STEVENSON, D.E.E.; HURST R.D. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? **Cellular and Molecular Life Sciences**. v: 64: 2900 – 2916, 2007

SUGIMOTO, S.; NAKAMURA, S.; YAMAMOTO, S.; YAMASHITA, C.; ODA, Y.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Brazilian natural medicines.III. structures of triterpene oligoglycosides and lipase inhibitors from mate leaves of *Ilex paraguariensis*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v: 57: 257–261; 2009

VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* Saint Hilarie e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate**. 1995, 119f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1995

VIEIRA, M.A.; MARASCHIN, M.; PAGLIOSA, C.M.; PODESTÁ, R.; DE SIMAS, K.N.; ROCKENBACH, I.I.; AMBONI, R.D.; AMANTE E.R. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) Residue. **Journal of food science**. v: 75: 283- 285, 2010

YERBA MATE CAFÉ ,2008 disponível em:

<http://www.yerbamatecafe.com/stylesofyerbamate.html>, consultado em 1/08/12

ZANON, A. **Produção de sementes de erva-mate**. Embrapa, circular técnica N° 16, ISSN 0101-1847, 1988 (Séries documentos).

Anexo 1- Carta de submissão do artigo à revista Journal of Agricultural and Food Chemistry

Journal of Agricultural and Food Chemistry - Manuscript ID jf-2012-05507n

> -----Mensagem original-----
> De: onbehalfof+support+services.acs.org@manuscriptcentral.com
[mailto:onbehalfof+support+services.acs.org@manuscriptcentral.com] Em nome de support@services.acs.org
> Enviada em: terça-feira, 25 de dezembro de 2012 19:10
> Para: vandfolmer@gmail.com
> Cc: jafc@jafc.acs.org
> Assunto: Journal of Agricultural and Food Chemistry - Manuscript ID jf-2012-05507n
>
> 25-Dec-2012
>
> RE: Manuscript Submission Successfully Submitted Journal:Journal of Agricultural and Food Chemistry
Manuscript ID: jf-2012-05507n
> Title: "Yerba- mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) based beverages: how the successive extraction
influences the composition and the capacity of the extracts chelate iron and scavenger nitric oxide"
> Authors: Colpo, Ana; Rosa, Hemerson; Camargo, Vanessa; Bassante, Felipa; Lima, Maria; Puntel,
Robson; Avila, Daiana; Folmer, Vanderlei Food and Beverage Chemistry/Biochemistry

> Dear Dr. Folmer:
>
> Your manuscript has been successfully submitted to Journal of Agricultural and Food Chemistry.
>
> You will be receiving an email shortly informing you of the Assigned Editor for this manuscript, along
with contact information for that editor.
>
> Please reference the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for
questions. If there are any changes in your contact information, please log in to ACS Paragon Plus at
<https://acs.manuscriptcentral.com/acs> and select "Edit Your Account" to update that information.
>
> You can view the status of your manuscript by checking your "Authoring Activity" tab on ACS Paragon
Plus after logging in to <https://acs.manuscriptcentral.com/acs>.
>
> Thank you for submitting your manuscript to Journal of Agricultural and Food Chemistry.
>
>
> Sincerely,
>
> Journal of Agricultural and Food Chemistry Editorial Office