

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Mariana Carvalho Ribeiro

ESTUDO DA FRAÇÃO NÃO VOLÁTIL, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ERVA-
MATE (*Ilex paraguariensis*) E SEUS EFEITOS SOBRE PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS DE PACIENTES VÍTIMAS DE TRAUMATISMO
CRANIOENCEFÁLICO

Rio de Janeiro

2016

Mariana Carvalho Ribeiro

ESTUDO DA FRAÇÃO NÃO VOLÁTIL, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ERVA-
MATE (*Ilex paraguariensis*) E SEUS EFEITOS SOBRE PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS DE PACIENTES VÍTIMAS DE TRAUMATISMO
CRANIOENCEFÁLICO

Dissertação de Mestrado – Programa de
Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição –
da Universidade Federal do Estado do Rio
de Janeiro, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciência
dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Bastos De Maria

Co-orientador: Geraldo Ceni Coelho

Rio de Janeiro

2016

Mariana Carvalho Ribeiro

ESTUDO DA FRAÇÃO NÃO VOLÁTIL, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) E SEUS EFEITOS SOBRE PACIENTES VÍTIMAS DE TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Alimentos e Nutrição da Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Alberto Bastos De Maria

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Profa. Dra. Cláudia Cardoso Netto

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Prof. Dr. Angelo Telesforo Malaquias

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Ribeiro, Mariana Carvalho.

R484 Estudo da fração não volátil, atividade antioxidante da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e seus efeitos sobre parâmetros bioquímicos de pacientes vítimas de traumatismo cranioencefálico / Mariana Carvalh Ribeiro, 2016.
64 f. : 30 cm

Orientador: Carlos Alberto Bastos de Maria

Coorientador: Geraldo Ceni Coelho.

Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

1. Erva-mate. 2. Traumatismo. 3. Rabdomiólise. 4. Antioxidantes.
I. Maria, Carlos Alberto Bastos de. II. Coelho, Geraldo Ceni. III.
Universidade Federal do Estado do Rio Janeiro. Centro de Ciências
Biológicas e de Saúde. Curso de Mestrado em Alimentos e Nutrição.
IV. Título.

CDD – 633.77

*A minha avó Carminha por
ensinar que devemos sempre
fazer planos e mesmo nos
momentos mais difíceis é
preciso ver o lado bom da vida!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me abençoado com minha família, meus pais, Oscar e Elizabeth; meus irmãos, Maria Fernanda, Luiz Fernando e Mayra e a nova família que surgiu, Felipe, Priscilla, Jorge e minha sobrinha Laís, que encheu meus dias de alegria quando a saudade apertou. Obrigada por entenderem esses dois anos de sacrifício e ausência!

Ao meu professor Dr. Carlos Alberto, que desde a graduação incentivou a continuidade do estudo, e mesmo tendo retornado após 7 anos ainda confiou um novo desafio a mim!

A Ândria, o incentivo para a mudança de emprego, a oportunidade e através da nova rotina a possibilidade de retornar aos estudos. Por toda a participação ao longo do trabalho, com mediação para autorização do hospital para a realização do trabalho.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Geraldo, pela mediação com os produtores Cláudio Kovaleski e Silvio Kovaleski da Ervateira Chiru – Chapecó, SC – responsáveis pelo envio de toda a erva-mate utilizada no estudo.

Aos companheiros de laboratório, Liza e Daniel, pela troca de informações, incentivo e ajuda na realização de atividades.

A equipe do HEGV, especialmente ao Antônio Carlos Babo Rodrigues, grande apoiador e participante ativo, desde a elaboração do projeto clínico, dúvidas durante a execução do trabalho e participação nas análises de resultados.

Aos médicos que apoiaram a conversa inicial com as famílias, o aviso de novos pacientes, pelo incentivo e debates ao longo do trabalho.

As famílias dos pacientes voluntários, que em um momento de dor e angústia aceitaram participar do estudo, muito obrigada! Sem vocês o trabalho não aconteceria.

Aos técnicos dos CTIs e enfermagem de neurocirurgia pela ajuda na infusão/ ingestão do chá mate, muito obrigada, a ajuda de vocês foi fundamental para o sucesso do trabalho!

A equipe de nutrição, colegas de trabalho, que também me avisaram sobre possíveis novos pacientes com o perfil desejado.

A equipe do laboratório CientificaLab, que me ajudou no armazenamento do material coletado.

A equipe do lactário por me ceder o espaço, o horário e ajudar na execução do projeto.

Aos professores Paulo Sérgio e Cléo, pela realização da análise estatística e análises das citocinas, sempre solícitos e contribuindo para a resolução do trabalho.

E um agradecimento especial as minhas amigas-irmãs, presentes no meu dia-a-dia, pela ajuda e incentivo ao longo dos dois anos: Carolina, Fernanda, Gabriela, Kenya, Laura, Thaline, Vanessa A. e Vanessa B.

RESUMO

A erva-mate é uma planta da família Aquifoliaceae, originária da América do Sul e muito consumida nos estados da região Sul do Brasil, além de Argentina, Paraguai e Uruguai. O consumo pode ser realizado com água quente (chimarrão) ou gelada (mate e tererê). As etapas de processamento ou as condições edafoclimáticas podem influenciar nas características da planta e da bebida. As etapas de processamento são: colheita, sapeco, cancheamento, secagem, moagem, envelhecimento (opcional) e empacotamento. Entre as substâncias presentes na erva-mate temos compostos fenólicos e metilxantinas que podem apresentar valores inferiores dependendo do tipo de processamento a que foi submetido a matéria-prima. Análises têm sido realizadas para caracterização da fração não volátil da erva-mate a fim de obter-se uma melhor padronização. A presença de metilxantinas, compostos fenólicos ácidos e flavonóides, foi confirmada em nosso trabalho através de CLAE, e o potencial antioxidante através de DPPH, *Foulin Ciocalteau* e peroxidação lipídica. A partir de estudos realizados com humanos e ingestão de erva-mate, avaliamos o efeito da erva-mate sobre parâmetros bioquímicos de pacientes vítimas de TCE. O estudo consistiu na ingestão/infusão de chá mate, duas vezes ao dia, sendo 7g de erva-mate em 300mL de água para pacientes internados no HEGV, vítimas de TCE, sem co-morbidade, idade entre 16 e 64 anos. Exames foram realizados para acompanhar os pacientes e foram comparados com o grupo controle, que apresentava a mesma patologia e não recebeu o chá mate. O resultado indicou uma diferença significativa em relação a CPK, sendo que os pacientes do grupo erva-mate tiveram diminuição dos valores. Entre os pacientes do grupo controle não foi observada diferença, sendo que um paciente evoluiu para o quadro de rabiomiólise, principal risco de CPK elevada, evoluindo a óbito. Foram avaliados ainda glicemia sanguínea, PCR, IL-1, IL-6 e TNF- α , não obtendo resultado significativamente diferente, porém com indicação que o chá mate possa ter contribuído para menores alterações glicêmicas nos pacientes do grupo analisado. O chá mate não teve influência sobre a mortalidade desses pacientes, porém a diminuição da CPK pode levar a uma sobrevida com menos sequelas, diminuindo o risco de rabiomiólise.

Palavras-chave: erva-mate, TCE, rabiomiólise, CPK, antioxidante.

ABSTRACT

The yerba mate is a plant in the family Aquifoliaceae, originally from South America and consumed in the States of southern Brazil, Argentina, Paraguay and Uruguay. Infusion can be obtained with hot water (*chimarrão*) or cold (*mate* and *tereré*). The processing steps or the edaphoclimatic conditions can influence the characteristics of the plant and infusion. The processing steps are: harvest, *cancheamento*, drying, *sapeco*, grinding, ageing (optional) and packaging. Among the substances present in the yerba mate have the phenolic compounds and methylxanthines that may show lower levels depending on the type of processing which raw material has been undergone. Analyses have been carried out for characterization of non-volatile fractions of yerba mate in order to obtain a better standardization. The presence of methylxanthines, phenolic compounds and flavonoids was confirmed in our work through HPLC, and the antioxidant potential by DPPH, Foulin Ciocalteau and lipid peroxidation. From human studies, we evaluated the effect of yerba mate on biochemical parameters of patients victims of TBI. The study consisted in intake/infusion of mate tea, twice a day, and 7 g of yerba mate in 300 ml of water to patients in HEGV, victims of TBI, without co-morbidities, aged 16 to 64 years. We did blood tests in the yerba mate group and were compared with the control group, which featured the same pathology and didn't drink tea mate. The results indicated a significant difference ($p < 0.05$) in respect to CPK, being that the patients of mate group had decreased levels. Among patients of the control group it was not observed significant difference, and one patient developed rhabdomyolysis, which is the main risk of high CPK, who evolved to death. Blood glucose, PCR, IL-1, IL-6 and TNF- α , also were assessed not showing significantly different result. However, tea mate ingestion may have contributed to lower glucose changes in patients of the mate group. The tea mate had no influence on the mortality of these patients, but the decrease of CPK can lead to lower risk of rhabdomyolysis and survive with fewer sequels.

Keywords: yerba mate, TBI, rhabdomyolysis, CPK, antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das metilxantinas	15
Figura 2. Síntese da cafeína	16
Figura 3. Formação do ácido clorogênico	17
Figura 4. Estrutura básica dos flavonóides	18
Figura 5. Estrutura química dos flavonóides	18
Figura 6. Cromatografia com identificação de compostos fenólicos	34
Figura 7. Cromatografia com identificação de metilxantinas	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores aplicados para amostra de DPPH	24
Tabela 2. Valores aplicados para branco de DPPH	24
Tabela 3. Valores aplicados para curva padrão de <i>Foulin Ciocalteau</i>	25
Tabela 4. Valores aplicados para amostra de <i>Foulin Ciocalteau</i>	26
Tabela 5. Valores aplicados para branco de <i>Foulin Ciocalteau</i>	26
Tabela 6: Resultados encontrados para atividade antioxidante, compostos fenólicos e metilxantinas	35
Tabela 7: Trabalhos realizados com infusão de erva-mate em humanos	39
Tabela 8: Resultados de r e p para valores de CPK	48
Tabela 9: Resultados de r e p para valores de glicemia	51
Tabela 10: Alterações de glicemia, HGT, uso de ATB, presença de febre e uso de aminas nos pacientes	52
Tabela 11: Resultados r e p para valores de PCR	53
Tabela 12: Resultados de IL-6 grupo erva-mate	54
Tabela 13: Resultados de IL-1 grupo erva-mate	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Absorbância do óleo de soja puro e óleo de soja com erva-mate	29
Gráfico 2. Absorbância do óleo de soja puro, óleo de soja com palmitato férrico, óleo de soja com erva-mate e óleo de soja com palmitato férrico e erva-mate	30
Gráfico 3: Valores de CPK para pacientes do grupo controle	48
Gráfico 4: Valores de CPK para grupo Erva-Mate	49

LISTAS DE ABREVIações

AGEs *Advanced Glycation End Products*

Apo A-I Apoproteína A-I

Apo B-100 Apoproteína B-100

APOs Apoproteína B – 100 e apoproteína A-I

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CPK Creatinofosfoquinase

Crea Creatinina

CTI Centro de Terapia Intensiva

FE Função endotelial

FIB Fibrinogênio

FRAP *Ferric Reducing Antioxidant Power*

GGT Gama Glutamil Transpeptidase

GPx Glutathiona peroxidase

GSH Glutathiona reduzida

HbA_{1c} Hemoglobina Glicada

HEGV Hospital Estadual Getúlio Vargas

IL-1 Interleucina1

IL-6 Interleucina6

IMC Índice de Massa Corporal

LOOH Hidroperóxidos Lipídicos

PA Pressão Arterial

PARO – I Paroxonase I

PCR Proteína C Reativa

SOD Superóxido Desmutase

SPE *Solyd Phase Extraction*

TAP Tempo de Protrombina

TAS *Total Antioxidant Status*

TBARS *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*

TBI *Traumatic Brain Injury*

TCE Traumatismo Cranioencefálico

TGO Transaminase Glutâmica Oxalacética

TGP Transaminase Glutâmica Pirúvica

TNF- α Fator de necrose tumoral alfa

UNIRIO Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Ur Uréia

SUMÁRIO

PARTE I. ESTUDO DA FRAÇÃO VOLÁTIL, NÃO VOLÁTIL E AÇÃO ANTIOXIDANTE DA ERVA-MATE.

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. FRAÇÃO NÃO VOLÁTIL DA ERVA-MATE	15
2.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	19
3. OBJETIVOS	22
3.1. OBJETIVO GERAL	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. MATERIAIS	23
4.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	23
4.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	23
4.3.1. DPPH	23
4.3.2. Foulín Ciocalteau	25
4.3.3. Peroxidação em óleo de soja	26
4.4. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE	27
4.4.1. Metilxantinas	27
4.4.2. Compostos Fenólicos e Flavonóides	27
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	36

PARTE II: EFEITOS DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE PACIENTES VÍTIMAS DE TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO

7. INTRODUÇÃO	37
8. TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO	40
9. OBJETIVOS	43
9.1. OBJETIVO GERAL	43
9.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
10. MATERIAIS E MÉTODOS	43
10.1. Desenho do estudo	44
10.2. Critérios de inclusão e exclusão	44
10.3. Dosagens bioquímicas e consumo	44
10.4. Análise Estatística	46
11. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
12. CONCLUSÃO	56
13. REFERÊNCIAS	57

PARTE I: ESTUDO DA FRAÇÃO NÃO VOLÁTIL E AÇÃO ANTIOXIDANTE DA ERVA-MATE

1. INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis*, nome científico da erva-mate, é uma planta da família Aquifoliaceae, originária da América do Sul, amplamente cultivada de forma comercial e consumida popularmente na Argentina, Paraguai, Uruguai e regiões Sul e Centro-Oeste do Brasil (Efing *et al.*, 2009). As folhas da erva-mate são utilizadas na fabricação de bebidas que podem ser consumidas com temperatura aquecida, como o chá mate e o chimarrão ou consumida como bebida fria, como o tererê. Nas regiões onde existe o cultivo e fabricação da erva-mate o consumo da bebida pode ser um substituto em relação ao chá (*Camelia sinensis*) ou ao café (*Coffea spp.*), principalmente devido ao sabor amargo e propriedades estimulantes dessas bebidas (Pedroso *et al.*, 2010).

A produção da erva-mate ocorre principalmente em pequenas e médias propriedades rurais dos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. O processamento, as condições edafoclimáticas e a região onde foi realizada a plantação determinarão a composição química da planta. O processamento divide-se nas seguintes etapas: colheita, sapeco, cancheamento, secagem, moagem, envelhecimento (opcional) e empacotamento. A colheita é realizada pelas famílias rurais e a erva-mate colhida é depositada sobre panos ou ponchos do momento da colheita até a chegada a fábrica, esse procedimento visa evitar o contato da erva-mate com a terra durante o processo. O primeiro processo ao qual a erva-mate é submetida ao chegar à fábrica é o sapeco, que consiste na exposição das folhas ao fogo durante 10 a 60 segundos, a uma temperatura que atinge 500°C. Após o sapeco a planta passará pelo processo de cancheamento, onde haverá a fragmentação das folhas e ramos para que a secagem seja realizada. A secagem ocorre até que a erva-mate atinja de 8 a 10% do seu teor de umidade. A planta passará, após a secagem, pelo processo de cancheamento, no qual serão retirados os fiapos e deverá restar somente a erva-mate. O envelhecimento é uma etapa opcional, pois ela dependerá do destino final da produção. A erva-mate consumida no Brasil não passa pelo processo de envelhecimento, ela é consumida quando a coloração é verde intensa, já a erva-mate que é exportada passa pelo

processo de envelhecimento durante 8 a 10 meses, ela ficará com uma coloração amarelada que é mais aceita no exterior. Caso a erva-mate não passe pelo processo de envelhecimento ela será empacotada após o cancheamento. Já a envelhecida será empacotada ao final do processo de envelhecimento; o empacotamento é realizado de forma automatizada com seladora de processos automáticos (Melo, 2010; Pedroso *et al.*, 2010). Esse processo descrito é o utilizado para a produção do tererê e chimarrão. Para a produção do chá mate, após o cancheamento a erva-mate passará pelo processo de torrefação a 120°C durante 15 minutos e seguirá para o empacotamento (Machado *et al.*, 2007).

As diferentes formas de processamento refletem na composição da erva-mate a ser consumida. Alguns estudos indicam que amostras comerciais apresentam teores menores de metilxantinas e compostos fenólicos em relação a amostras obtidas diretamente de produtores e submetidas ao processamento laboratorial, indicando uma perda durante o processo industrial ou mesmo em relação ao tempo de estocagem do material (Peres, 2007). É possível encontrar diferenças em relação a concentração de compostos fenólicos dependendo do local onde a planta é cultivada, o nível de exposição ao sol caracterizará a planta como iluminada ou não iluminada e seus teores podem ser diferentes. Esta alteração não foi relatada para os flavonóides como canferol e quercitina (Donaduzzi *et al.*, 2003).

A análise da erva-mate pode ser dividida em: fração não volátil, fração volátil e atividade antioxidante. A composição das frações distinguirá as espécies de acordo com a predominância de compostos, caracterizará as condições climáticas e de cultivo da planta. A fração não volátil é composta por metilxantinas, saponinas e compostos fenólicos e a presença desses compostos influenciará na capacidade antioxidante da amostra. Essa capacidade tem sido estudada tanto *in vitro* quanto *in vivo*, tendo relações com controle glicêmico, controle de perfil lipídico e perda de peso (Bravo, Goya e Lecumberri, 2007; Arçari, 2009). Entre as frações da erva-mate, as saponinas e a fração volátil não foram focos de estudo nesse trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FRAÇÃO NÃO VOLÁTIL DA ERVA MATE

A fração não volátil da erva-mate é composta por metilxantinas, saponinas, compostos fenólicos e flavonóides. Entre as metilxantinas temos a cafeína, teobromina e teofilina (essa última não foi encontrada em todos os trabalhos), entre os compostos fenólicos temos ácido clorogênico (misturas de isômeros do ácido cafeoilquínico), ácido cafeico, ácido 3,4 dicafeiolquínico, ácido 3,5 dicafeiolquínico e ácido 4,5 dicafeiolquínico (Filip *et al.*, 2001; Kilmartin e Hsu, 2003; De Souza *et al.*, 2011). Já os flavonóides encontrados destacam-se rutina, canferol e quercitina.

As metilxantinas ou alcalóides primários são metabólitos secundários derivados do nucleotídeo purina (Figura 1). Cafeína e teobromina estão em maiores quantidades nas plantas, enquanto a teofilina e outros compostos estão em menores quantidades podendo ser intermediários da biossíntese ou catabolismo da cafeína (Ashihara, Sano e Crozier, 2008). Cafeína e teobromina estão em quantidades maiores na erva-mate que foi submetida ao processo do sapeco em comparação com a quantidade na erva-mate verde, entretanto, é seguida por uma diminuição durante o processo de secagem e permanece constante durante o processo de envelhecimento (Isolabella *et al.*, 2010). O aumento do conteúdo de cafeína pode ser devido a reações de degradação envolvendo ácidos nucleicos durante o sapeco que são liberados e utilizados como purina na biossíntese da cafeína (Colombo e Nunez, 1983). Também seria possível esse aumento nos conteúdos de cafeína a partir da via xantosina, conforme ilustrado na Figura 2. Na última etapa da via, a teobromina é metilada a cafeína que pode ser o metabólito final (Ashihara e Takeo, 2004).

Figura 1: Estrutura química das metilxantinas: 1: cafeína; 2: teobromina e 3: teofilina.

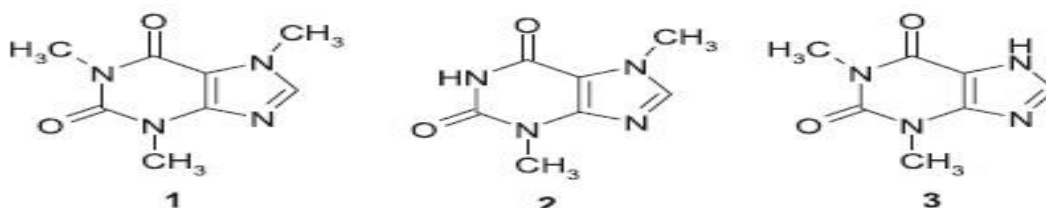
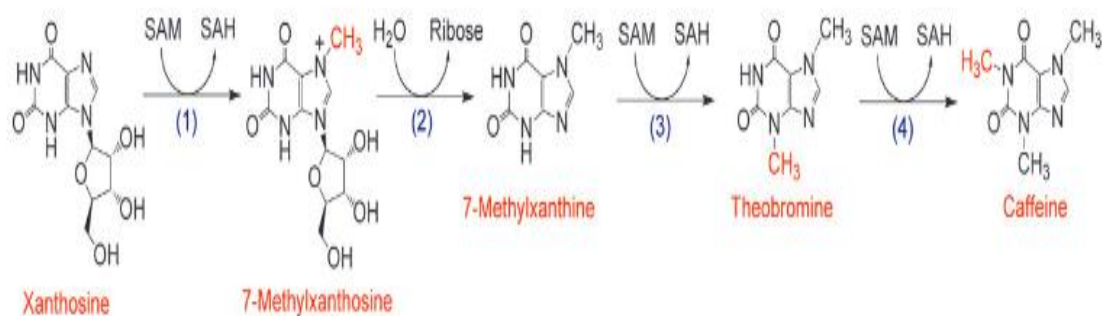


Figura 2: Síntese da cafeína. (Ashihara, Sano e Crozier, 2008)



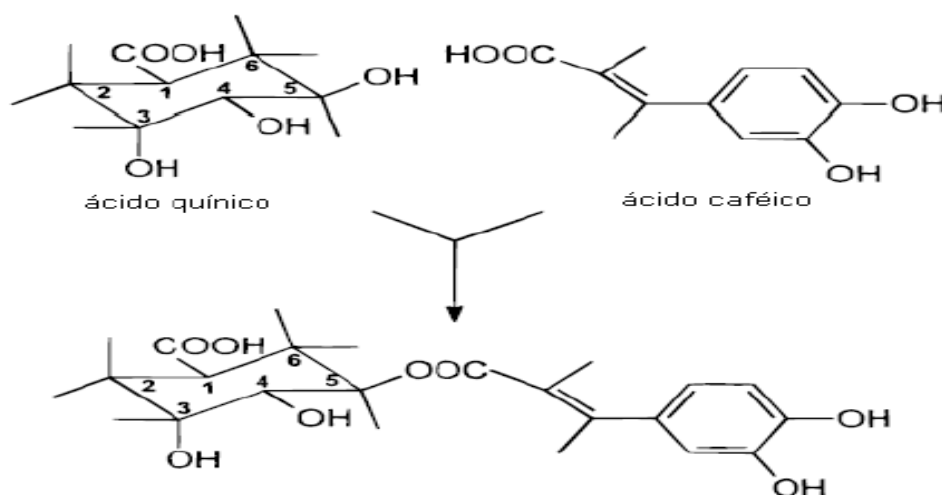
O percentual das metilxantinas nas diferentes matrizes alimentares ajuda a caracterizar o produto e sua pureza. Nas espécies de café os conteúdos de cafeína podem variar de 0,4% a 2,4%, no caso do *C. arabica* o percentual chega a 1% nos grãos (Frischknecht, Ulmer-Dufek e Baumann, 1986; Fujimori e Ashihara, 1994). Já na espécie de *Theobroma cacao* a teobromina corresponde, nos grãos maduros, de 2,2 a 2,7% com base no peso seco e a cafeína corresponde de 0,6 a 0,7% (Senanayake e Wijesekera, 1971). Na erva-mate essas substâncias estão presentes nas folhas jovens, sendo cafeína 0,8 a 0,9%, teobromina 0,08 a 0,16% e teofilina menor que 0,02%. Conteúdos maiores podem ser encontrados nas folhas maduras e traços de cafeína e teobromina podem ser encontrados na madeira e casca (Mazzafera, 1994). Entre as propriedades terapêuticas associadas à metilxantinas temos estimulação do sistema nervoso central, vasoconstrição periférica e relaxamento de músculos lisos (Dartora *et al.*, 2011).

O método de análise e quantificação das metilxantinas mais utilizado é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), sendo que a forma empregada na extração dos compostos pode influenciar nos resultados. Estudos mostraram que a água quente pode ser o melhor solvente para a matéria prima sem tratamento prévio, cujos resultados foram similares aos obtidos com solventes orgânicos que necessitam de maior tempo para obtenção dos extratos e tem custo elevado (Gnoatto *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos, como os do grupo do ácido clorogênico e derivados, são caracterizados pela presença de apenas um grupo fenólico na sua estrutura molecular, sendo chamados de fenóis simples e não polifenóis (Benincá, 2009). Esses compostos são conhecidos como metabólitos secundários e atuam na defesa

dos vegetais contra mudanças do ambiente (Naczki e Shahidi, 2004; Boudet, 2007). Também atuam na absorção de luz, promovendo uma reação simbiótica com os micro-organismos para a fixação do nitrogênio e contra o ataque de agentes patogênicos e herbívoros (Wildman, 2001). Entre os compostos fenólicos que são encontrados em plantas encontram-se: fenóis, flavonóides, tocoferóis, cumarinas, ácidos orgânicos multifuncionais e derivados de ácidos cinâmicos (Naczki e Shahidi, 2004). A combinação entre os ácidos cinâmicos e o quínico dão origem ao ácido clorogênico (Figura 3) (Rhodes, 1994).

Figura 3: Formação do ácido clorogênico através do ácido quínico e ácido cafeico (Clifford *et al.*, 2008)



O ácido clorogênico apresenta alta biodisponibilidade em produtos de origem vegetal e na erva-mate está presente variando de 2 a 13% de massa seca (Clifford e Ramirez-Martinez, 1990; Filip *et al.*, 2001; Negishi *et al.*, 2004; Bravo, Goya e Lecumberri, 2007). Estudos indicam que os ácidos cafeoilquínicos são os ácidos clorogênicos presentes em maior quantidade na erva-mate. A atividade antioxidante gerada pela presença dos ácidos clorogênicos está fortemente associada: a prevenção e combate de doenças coronarianas, inibição da formação de substâncias carcinogênicas e mutagênicas e estudos referentes a proteção das lipoproteínas de baixa densidade contra oxidação (Schinella, Fantinelli e Mosca, 2005; Porto, 2009).

Os flavonóides são polifenóis, sendo a estrutura básica um núcleo fundamental, constituído de 15 átomos de carbono arranjados em três anéis, sendo dois desses anéis fenólicos (A e B) e um pirano (C) acoplado ao anel A, como na figura 4.(Di Carlo *et al.*, 1999). Temos como exemplos de flavonóides presentes na erva-mate: a rutina, a quercitina e o canferol que fazem parte do grupo dos flavonóis, sendo os mais encontrados em vegetais (Figura 5)(Dornas *et al.*, 2007). Os flavonóides, assim como o ácido clorogênico, estão ligados a diversos mecanismos de defesa nas doenças crônico-degenerativas, entre elas: doença arterial coronariana (DAC), doenças cerebrovasculares, diabetes, câncer e doenças renais, sempre ligadas à ação antioxidante devido a sua estrutura, já que as hidroxilas ligadas ao C3 e C4 podem atuar no aumento do potencial antioxidante (Lien *et al.*, 1999). Assim como as metilxantinas, compostos fenólicos e flavonóides também são detectados através da CLAE.

Figura 4: Estrutura básica dos flavonóides (Di Carlo *et al.*, 1999)

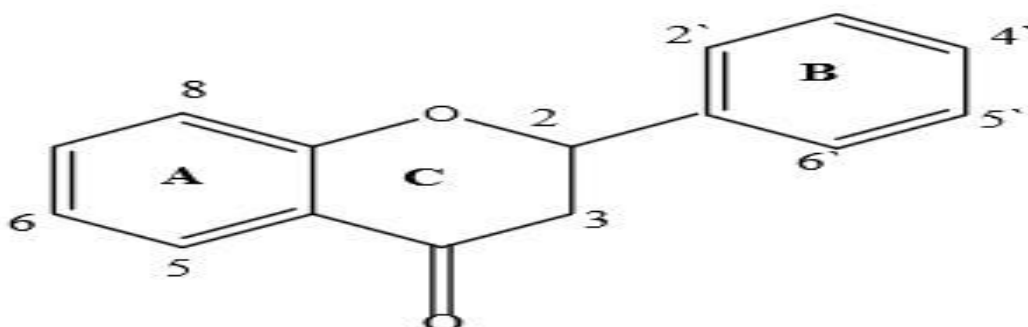
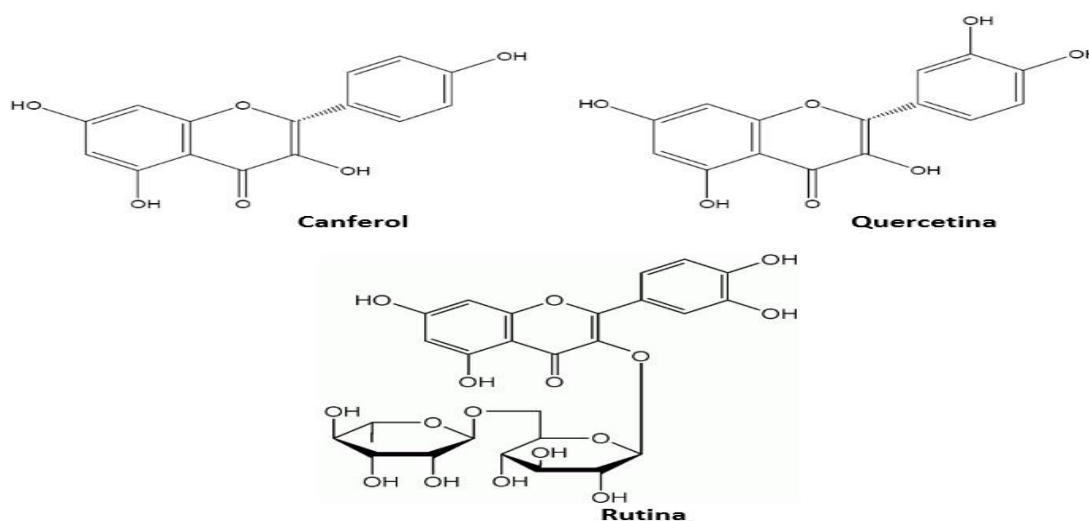


Figura 5: Estrutura química dos flavonóides canferol, quercitina e rutina (Toss, 2010)



2.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Nos últimos anos muitas matrizes alimentares têm sido avaliadas quanto a sua capacidade funcional, estimulando o consumo de determinados alimentos. A erva-mate tem sido estudada em relação a sua capacidade antioxidante pela presença de compostos fenólicos ácidos e flavonóides. Existem muitos estudos avaliando sua atividade antioxidante tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A atividade antioxidante tem como princípio, principalmente, a neutralização de radicais livres, através de reação de óxido-redução, da quelação do oxigênio singlete e através da decomposição de peróxidos (Saldanha e Bastos, 2006).

As análises da potência antioxidante *in vitro* podem ser realizadas através de diferentes métodos químicos como: peroxidação lipídica, ensaio com DPPH e dosagem pelo reagente de *Foulin Ciocalteau*. Os diferentes estudos sobre atividade antioxidante comparam dois ou mais métodos de análise ou o mesmo método de análise, porém com diferentes formas de extração dos compostos. A peroxidação lipídica foi baseada na oxidação de óleo de soja acrescido de extrato de erva-mate e leitura, com intervalo regular de dias, para avaliação do ganho de dienos conjugados. A ocorrência da peroxidação é normal e esperada em matrizes lipídicas, sabendo que os produtos são expostos a luz, a presença de oxigênio, a forma encontrada do lipídeo e a exposição ao calor durante seu período de consumo, porém sua ocorrência leva a deterioração do produto inicial, podendo diminuir sua validade e gerar novos produtos que são impróprios para consumo humano. Com o objetivo de diminuir essa ocorrência, entre outras técnicas passíveis de serem realizadas, iniciou-se o acréscimo de substâncias, sejam elas na forma de extrato ou óleo essencial de origem vegetal, que possam retardar esse processo, diminuindo a oxidação e aumentando o tempo de prateleira desse produto. Além da análise do número de dienos conjugados também pode ser avaliada a formação de compostos voláteis presentes na fração *headspace* através de cromatografia gasosa. O aquecimento do material estudado e o ponto baixo de fusão de alguns antioxidantes podem levar a perda e assim subestimar a sua atividade antioxidante dificultando a análise exata em relação ao poder antioxidante do material adicionado a matriz alimentar (Amorati, Foti e Valgimilgi, 2013).

O DPPH consiste no sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila por espécies antioxidantes em diferentes concentrações, causando a descoloração do DPPH. Essa modificação é acompanhada por leitura em espectrofotômetro a 515nm, enquanto a técnica de *Foulin Ciocalteau* consiste na determinação de fenólicos totais. Ambos os métodos são colorimétricos e realizados com leitura em espectrofotômetro na região do visível. Como a técnica de DPPH consiste no sequestro do radical o resultado obtido através dessa técnica é considerado um resultado indireto, e são necessárias condições iguais de extração de solvente e material utilizado para que a comparação entre resultados possa acontecer (Amorati, Foti e Valgimilgi, 2013).

A técnica de *Foulin Ciocalteau* é discutida, pois sua determinação trata-se dos fenólicos totais e em algumas matrizes alimentares a presença de ácido ascórbico ou açúcares poderia alterar o resultado, levando a considerar um maior potencial oxidante pela presença e reação dessas substâncias na fração estudada. A partir dessas discussões, estudos têm sido realizados utilizando-se diferentes formas de análise da amostra com o intuito de obter o resultado somente de fenólicos sem considerar interferentes. Em um dos estudos foram utilizadas três formas de análise utilizando o reagente de *Foulin Ciocalteau*. A primeira alteração no procedimento da reação foi a adição de H_2O_2 , com o objetivo de degradar os interferentes, entretanto, os resultados indicam que a adição de H_2O_2 pode aumentar a especificidade do reagente para determinar os fenólicos totais. Essa adição também pode levar ao aumento da sensibilidade do reagente em doar elétrons durante o processo. O segundo método foi a análise prévia de ácido ascórbico para que fosse descontado ao final do processo de cálculo para se ter como resultado a atividade antioxidante somente através do quantitativo de fenólicos totais. Esse método não apresentou diferença significativa entre as duas análises, seja a feita com a diferença da atividade antioxidante devido à presença de ácido ascórbico e a análise realizada sem desconsiderar a presença desse composto. Foi realizada também a purificação da amostra com o uso de extração em fase sólida (SPE) para análise somente dos compostos fenólicos. Porém, o resultado indica que esse método só deve ser utilizado quando os compostos fenólicos, que formam a amostra, forem de

flavonóides e não de ácidos fenólicos, pois o último grupo fica retido e não é analisado (Sánchez-Rangel *et al.*, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a fração não volátil da erva mate, caracterizando a amostra, e a atividade antioxidante.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação antioxidante da erva-mate através das técnicas DPPH, *Foulin Ciocalteau* e Peroxidação em óleo de soja.
- Analisar os teores de metilxantinas, compostos fenólicos e flavonóides através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

O trabalho foi realizado com amostra de erva-mate proveniente da cidade de Chapecó - Santa Catarina, com a localização 27° 09' 05" Sul, 52° 38' 14" Oeste, previamente sapecada. A amostra foi colhida entre os meses de novembro e dezembro por se tratar de período com maior quantidade de compostos da erva-mate. Para a confirmação da espécie foi depositado junto ao herbário material testemunho para a caracterização da amostra utilizada. O herbário utilizado para a comprovação foi o Herbário Professor Jorge Pedro Pereira Carauta, material com código HUNI 2344. A erva-mate recebida foi armazenada em sacos plásticos em freezer a -18°C até o momento da torrefação, a qual foi realizada em estufa controlada a 200°C durante 30 minutos e após o processo a amostra foi homogeneizada em processador. Durante todo o processo do trabalho a amostra ficou armazenada em sacos plásticos e em freezer.

O reagente de *Foulin Ciocalteau* utilizado foi da marca Vetec, metanol para cromatografia foi da Merck e DPPH e demais reagentes da marca Sigma-Aldrich.

4.2. PREPARO DA AMOSTRA

A amostra foi preparada a partir da pesagem de 2,33 grama de erva-mate adicionado a 100mL de água, previamente aquecida a 100°C e retirada do aquecimento. Em seguida a erva-mate foi dissolvida e mantida em infusão durante 15 minutos em recipiente tampado, filtrado em filtro de papel e utilizada para análise. Esse método de preparo é conhecido por tisana.

4.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.3.1. DPPH

A solução de DPPH foi preparada com 2,4mg de DPPH para 100mL de metanol. A amostra foi preparada com 1g da amostra para 25mL de metanol. O volume da solução de DPPH e da amostra é variado sendo sempre o valor total de 2000µL, sendo 1980/ 20µL, 1950/ 50µL, 1900/ 100µL, 1800/ 200µL, 1750/ 250µL.

Para o branco foram utilizados os mesmos volumes totais, porém foi utilizado metanol nas quantidades mencionadas para DPPH. Para a curva padrão foram preparadas quatro soluções de 25mL total, sendo a 1) 25mL de metanol, 2) 5mL de solução de DPPH + 20mL de metanol, 3) 12,5mL de solução de DPPH + 12,5mL de metanol e 4) 25mL de solução de DPPH (Tabelas 1 e 2). A amostra foi colocada em ambiente escuro durante 15 minutos antes da leitura, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 515nm, e realizada a cada 15 minutos até que a absorvância se estabilizasse.

Tabela 1: Volumes aplicados para a amostra de DPPH

Solução de DPPH (μL)	Solução da amostra (μL)
1980	20
1950	50
1900	100
1800	200
1750	250

Tabela 2: Volumes aplicados para o branco de DPPH

Metanol (μL)	Solução da amostra (μL)
1980	20
1950	50
1900	100
1800	200
1750	250

4.3.2. *Foulin Ciocalteau*

Para análise da atividade antioxidante através da técnica de *Foulin Ciocalteau* a solução foi preparada a 10%. Foi utilizado como padrão o ácido gálico, sendo 0,100g de ácido gálico por 100mL de água destilada. A amostra da tisana da erva-mate foi preparada com 1g de chá mate para 25mL de metanol. Para análise da curva padrão foi realizada comparação entre 2,5mL da solução de *Foulin Ciocalteau*, 2mL de solução de carbonato de sódio (4%) e volumes de ácido gálico nos volumes de 2,5; 5; 10; 25 e 50 μ L. Para análise da amostra teremos os mesmos valores da solução de *Foulin Ciocalteau* e carbonato de sódio, sendo que o volume da amostra foi de 20, 50, 100, 200 e 250 μ L. Para comparação com branco os valores de *Foulin Ciocalteau* e carbonato de sódio se repetem, sendo o volume de metanol o mesmo volume utilizado para comparação da amostra, 20, 50, 100, 200 e 250 μ L (Tabelas 3, 4 e 5). Antes de cada leitura o material foi deixado em lugar escuro durante duas horas, sendo a leitura realizada a 750nm em espectrofotômetro.

Tabela 3: Valores adicionados para elaboração da curva padrão de *Foulin Ciocalteau*

FC	Padrão de ácido gálico	Carbonato de sódio
2,5 mL	2,5 μ L	2mL
2,5 mL	5,0 μ L	2mL
2,5 mL	10 μ L	2mL
2,5 mL	25 μ L	2mL
2,5 mL	50 μ L	2mL

Tabela 4: Valores adicionados a amostra de *Foulin Ciocalteau*

FC	Amostra	Carbonato de sódio
2,5 mL	20 µL	2mL
2,5 mL	50 µL	2mL
2,5 mL	100 µL	2mL
2,5 mL	200 µL	2mL
2,5 mL	250 µL	2mL

Tabela 5: Valores adicionados para o branco de *Foulin Ciocalteau*

FC	Metanol	Carbonato de sódio
2,5 mL	20 µL	2mL
2,5 mL	50 µL	2mL
2,5 mL	100 µL	2mL
2,5 mL	200 µL	2mL
2,5 mL	250 µL	2mL

4.3.3. Peroxidação em óleo de soja

Para a peroxidação em óleo de soja foi utilizado óleo de soja, palmitato férrico etanol e extrato de erva-mate. O palmitato férrico foi adicionado na proporção de 32,3mg kg⁻¹ de óleo de soja, sendo a quantidade de 0,646mg para 20g de óleo de soja. Ao palmitato, foi adicionado 1mL de etanol. A tisana foi preparada na concentração de 2,33g em 100mL, sendo adicionado 100mg de chá com 4 mL de etanol, que manteve a solubilidade do chá no óleo de soja. Foram realizadas as seguintes combinações:

Óleo de soja + etanol (4mL)

Óleo de soja + palmitato férrico

Óleo de soja + palmitato férrico + tisana

Óleo de soja + tisana

Esse material foi agitado e 10 μ L da solução foi adicionada ao balão volumétrico de 10mL onde já havia isooctano. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro com luz UV e leitura a 233nm. A leitura foi realizada no D0, D5, D10 e D15. Após a leitura no D0 a solução foi mantida em estufa a 45°C até o momento da leitura seguinte. Para a leitura foram utilizadas cubetas de quartzo e o aparelho foi zerado utilizando-se isooctano.

4.4. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE

4.4.1. Metilxantinas

A análise dos não voláteis será realizada utilizando a técnica de CLAE. O CLAE utilizado foi Perkin-Elmer. Todas as análises serão realizadas com 20 μ L, sob a temperatura de 24°C (\pm 2° C). As condições estão listadas abaixo: A separação de metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina) foi realizada em coluna C18 (250mm x 4,6mm id.; 5 μ m) e a fase móvel utilizada será de uma solução de 30% de metanol em água com sistema isocrático, e um fluxo constante de 1,2mL.min⁻¹.

4.4.2. Compostos Fenólicos e Flavonóides

A separação dos ácidos clorogênicos (subfamílias: cafeoilquínico e dicafeoilquínico) e flavonóides (rutina, quercetina e canferol) foram realizadas em coluna C18 (250mm x 4,6mm id.; 5 μ m) e a fase móvel utilizada foi de um gradiente combinando água e ácido acético 98:2 (solvente A) e metanol e ácido acético 98:2 (solvente B) nas seguintes condições: 0 a 30 minutos, gradiente de 15 a 40% B; 40 a 75% de solvente B, durante 10 minutos; 75 a 85% de solvente B, durante 5 minutos e fluxo constante de 1,2mL.min⁻¹. Os comprimentos de onda para detecção foram de 325nm para o ácido clorogênico, 260nm para a rutina, quercetina e canferol. O volume injetado foi de 20 μ L.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

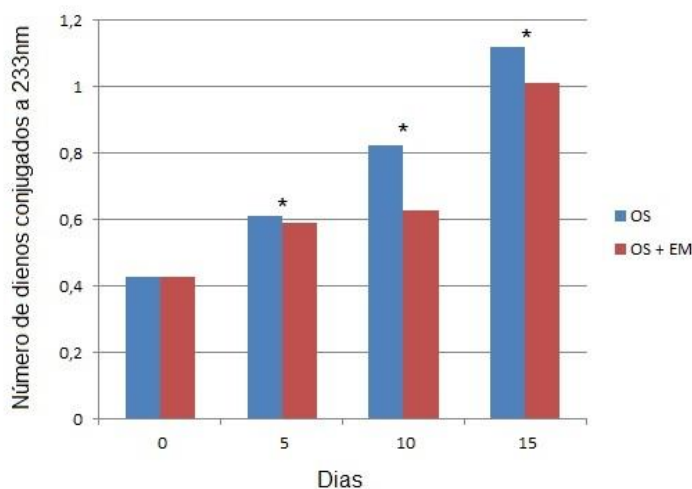
As análises foram realizadas em triplicata, O resultado de DPPH foi expresso em percentual de inibição do radical com desvio padrão e o resultado de *Foulin*

Ciocalteau em mg L GAE⁻¹ e mg de GAE g⁻¹ de erva-mate também com desvio padrão. Já o resultado da técnica de peroxidação em óleo de soja foi realizado através da análise de variância ANOVA com teste t de Tukey foi utilizado o programa Graphpad Prim 6 para a análise estatística.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudo de 2012 foi realizado teste de peroxidação lipídica com a adição de extrato de erva-mate em óleo de soja. O resultado apresentado coincide com o nosso resultado. No nosso trabalho, como indica o gráfico 1, podemos perceber que o extrato de erva-mate reduziu significativamente ($p < 0,05$) o número de dienos conjugados no óleo de soja aquecido sendo mais eficiente entre os dias 10 e 15. No dia 10 o valor médio da absorbância que indica o surgimento de dienos conjugados no óleo de soja puro foi de $0,82 \pm 0,0005$ enquanto no óleo de soja acrescido do extrato de erva-mate foi de $0,62 \pm 0,0005$. No trabalho de 2012 houve o uso de diferentes concentrações de erva-mate adicionadas ao óleo de soja, sendo uma concentração de $20\mu\text{mol.kg}^{-1}$ e outra de $60\mu\text{mol.kg}^{-1}$, as duas apresentaram diminuição em relação a oxidação do óleo de soja e o aumento da concentração levou a um aumento na estabilidade oxidativa em 35% em relação a amostra com $20\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Valerga, Reta e Lanari, 2012).

Gráfico 1: Valores de absorbância no óleo de soja puro e óleo de soja com extrato de erva-mate.

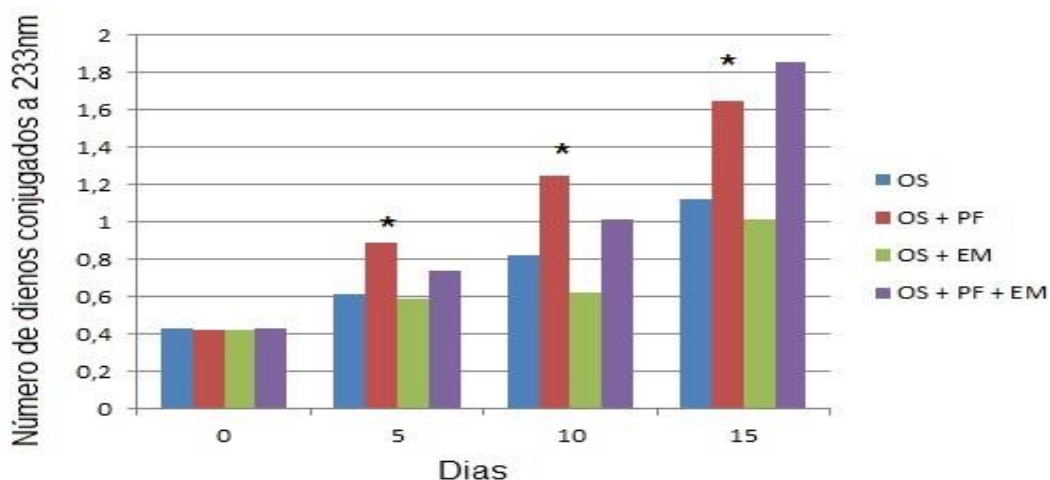


Legenda: OS: óleo de soja puro; OS + EM: óleo de soja + extrato de erva-mate. (*) Indicam diferença significativa $p < 0,05$.

No gráfico 2 é mostrado o experimento com óleo de soja adicionado de palmitato férrico, um pró-oxidante, cujo o objetivo foi observar o efeito da erva-mate sobre a peroxidação lipídica na presença de um metal de transição. Até o décimo

dia do estudo, o número de dienos conjugados na amostra com palmitato e erva-mate foi significativamente inferior ($p < 0,05$) ao número de dienos conjugados no óleo de soja acrescido somente de palmitato, indicando nesse período que houve um retardo na oxidação de óleo de soja com palmitato acrescido do extrato de erva-mate. Porém a partir do décimo dia do estudo, o extrato de erva-mate perde eficiência em reduzir a peroxidação lipídica em relação ao controle, como pode ser observado no gráfico no décimo quinto dia. É possível apresentar duas explicações para esse resultado: 1- A menor capacidade do ácido clorogênico, principal fenólico presente na erva-mate, em quelar metais de transição, o que facilitaria a ação pró-oxidante do metal de transição; 2- o ácido clorogênico teria mais afinidade com o núcleo aquoso ou com as membranas das micelas inversas, as quais acumulariam o metal de transição. Nesse caso, o ácido clorogênico funcionaria como pró-oxidante indireto.

Gráfico 2: Valores de absorbância em óleo de soja puro, óleo de soja com palmitato férrico, óleo de soja com extrato de erva-mate e óleo de soja com palmitato e extrato de erva-mate.



Legenda: OS: óleo de soja puro; OS + PF: óleo de soja + palmitato férrico; OS + EM: óleo de soja + extrato de erva-mate; OS + PF + EM: óleo de soja + palmitato férrico + extrato de erva-mate. (*) Indicam diferença significativa com $p < 0,05$.

A segunda opção seria a mais provável conforme previsto na hipótese de associação de coloides, como local de oxidação da matriz, segundo publicações anteriores (Porter, 1980; Porter, Black e Drolet, 1989). O palmitato férrico na forma Fe^{+3} juntamente com os antioxidantes fenólicos da erva-mate pode estar presente na

interface das micelas formadas entre o extrato aquoso e a fração lipídica, levando os antioxidantes presentes na fração aquosa a reduzirem o Fe^{3+} a Fe^{+2} e essa última forma é reconhecidamente pró-oxidante. A baixa velocidade da reação de óxido-redução poderia explicar o motivo de até o décimo dia o extrato de erva-mate ser eficiente como antioxidante. À medida que o consumo dele em relação ao ferro e a formação de uma quantidade maior de Fe^{+2} ocorre, o extrato deixa de ser eficiente para proteção do óleo de soja. A teoria do paradoxo polar e a hipótese da associação de colóides baseadas na atividade antioxidante em emulsões (Frankel *et al.*, 1994; Laguerre *et al.*, 2015) explicaria, em parte, essa diferença de comportamento do extrato de erva-mate adicionado ao óleo de soja com palmitato. A teoria do paradoxo polar consiste no estudo de diferentes matrizes lipídicas com antioxidantes de polaridades opostas. Se antes se acreditava que substâncias de mesma polaridade que o óleo poderiam ter efeito superior, essa teoria indica que em alguns casos um antioxidante polar em uma matriz apolar pode ter um efeito superior. Isso é explicado pela possível atividade entre a região de interface do ar com o óleo. Entretanto, alguns autores (Huang *et al.*, 1996a; Huang *et al.*, 1996b; Huang *et al.*, 1997) têm questionado essa teoria através de ensaios experimentais mostrando que a teoria do paradoxo polar não funciona em diferentes sistemas. Esses estudos têm proposto que a peroxidação começa na interface água e óleo. A água estaria presente em quantidade traço na forma de micelas formadas por moléculas anfifílicas (ex. fosfolipídios, monoacilgliceróis). Essas micelas favoreceriam o potencial antioxidante ou pró-oxidante dependendo de condições prévias, como quantidade de água, presença de metais de transição, hidrofobicidade do antioxidante etc. Em estudos realizados com diferentes óleos, o mesmo antioxidante teve efeito diferente, um exemplo é a ação do ácido ascórbico que foi mais efetivo do que o palmitato de ascorbila em grandes volumes de óleo de soja e menos efetivo do que o palmitato de ascorbila em um sistema de emulsão de óleo de cártamo/hemoglobina (Cort, 1974; 1982). Muito embora a hipótese de associação de colóides seja bastante instigante e promissora, no momento, o paradoxo polar é a única teoria existente que assume racionalmente, embora com limitações já mencionadas, a ação de antioxidantes em sistemas de óleo e emulsões. Entretanto, essa teoria peca por supor que a hidrofobicidade e a capacidade antioxidante

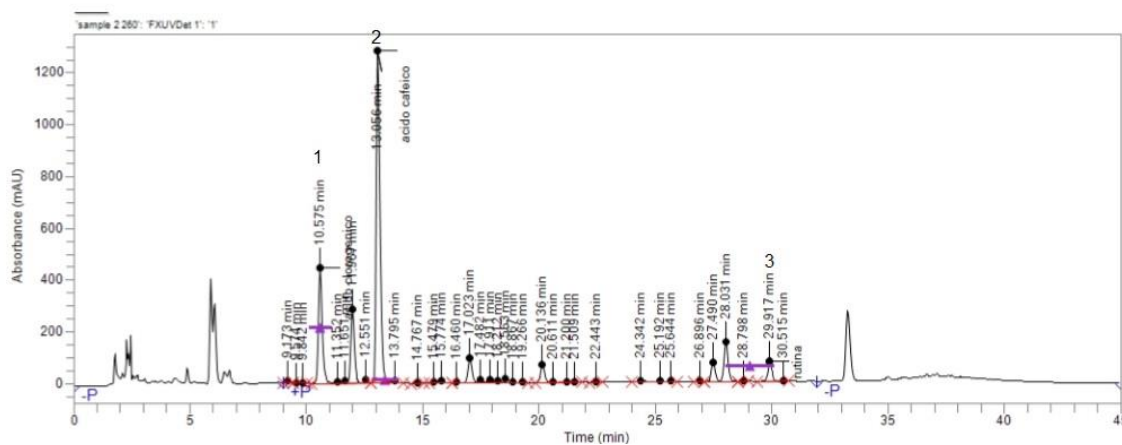
seguem uma tendência linear. Resultados recentes têm mostrado que o aumento da cadeia melhora atividade antioxidante até um determinado tamanho, a partir do qual há uma diminuição da atividade, ou seja, uma tendência parabólica (Laguerre *et al.*, 2015).

Os resultados de DPPH e *Foulin Ciocalteau* obtidos com a amostra utilizada indicam uma atividade antioxidante compatível e de acordo com estudos realizados por diferentes grupos. Em trabalho realizado em 2011, onde foi avaliada a atividade antioxidante por DPPH utilizando-se extrato aquoso comparando três marcas de chá mate foram encontrados valores que variaram de 84 a 88% (Moraes-De-Souza *et al.*, 2011), coincidindo com nosso resultado, sendo o nosso de $81,79\% \pm 5,17$. Em outro estudo realizado em 2006, utilizando-se diferentes solventes para a extração dos compostos durante as análises acima, e considerando a água como solvente no referido estudo, o valor para o DPPH foi de $61,2\% \pm 0,89$. Em relação a análise de *Foulin Ciocalteau* nosso resultado foi inferior ao encontrado no mesmo trabalho, com resultado de $112,01 \pm 7,72\text{mg L}^{-1}$ GAE e $4,8 \pm 0,33\text{mg GAE g}^{-1}$ de erva, enquanto no referido estudo foi encontrado o valor de $64,2 \pm 1,36\text{mg GAE g}^{-1}$ quando analisado o extrato aquoso (Turkmen, Sari e Velioglu, 2006). Nesse mesmo estudo o chá mate apresentou resultados superiores nas comparações entre diferentes solventes e diferentes métodos de análise quando comparado ao chá preto, as análises realizadas nesse estudo foram de DPPH, *Foulin Ciocalteau* e método de tartarato ferroso e os solventes utilizados foram água, metanol, etanol, acetona e dimetilformamida (DMF). Em outro trabalho realizado em 2012, foi avaliada a presença de polifenóis e a atividade antioxidante através de *Foulin Ciocalteau* em diferentes etapas do processamento da erva-mate considerando a amostra que passou pelo processo de torrefação o valor encontrado foi de $96,07 \pm 5,77\text{mg GAE g}^{-1}$ erva seca, nesse trabalho a extração foi realizada com acetona e água através de uma extração forçada (Valerga, Reta e Lanari, 2012). A variação entre os resultados da atividade antioxidante através da técnica de *Foulin Ciocalteau* é esperada devido as diferentes técnicas de extração, quantidade de amostra utilizada, amostras com diferenças edafoclimáticas e diferentes tratamentos pós-colheita. A maioria dos artigos não indica como a torrefação da amostra de erva-mate foi realizada e esse processo tem forte influência no conteúdo e na liberação

dos compostos fenólicos presentes na amostra. Em nosso estudo a redução nos valores de *Foulin Ciocalteau* reflete a reduzida quantidade encontrada de ácido clorogênico e elevada quantidade de cafeína, sendo este último encontrado em grande quantidade possivelmente devido a sua estabilidade a altas temperaturas. Essa presença da atividade antioxidante também pode ser justificada pela formação de melanoidinas, substâncias que são formadas a partir da reação de *Maillard*, que apresentam grande capacidade antioxidante atuando como captadores de metais pesados e são responsáveis por promover a decomposição de hidroperóxidos, mantendo a erva-mate como uma matriz com capacidade antioxidante apesar da degradação dos polifenóis causada pelo aquecimento durante o processo de torrefação (Arçari, 2009).

A atividade antioxidante da amostra obtida é justificada pela presença de compostos fenólicos e flavonóides que foram detectados a partir de CLAE. Foram identificados os seguintes compostos: ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina (Figura 6). Canferol e quercetina não foram encontrados, pois são compostos pouco polares e utilizamos água como solvente de extração dos compostos, já que se trata de tisana. As curvas de calibração de todos os compostos avaliados apresentaram boa relação linear entre área do pico e concentração com $r^2 > 0,97$. Para o ácido clorogênico encontramos $1,62 \pm 0,11$ mg $100g^{-1}$ de erva-mate, para o ácido cafeico o resultado encontrado foi de $0,02 \pm 0,017$ mg $100g^{-1}$ de erva-mate e para a rutina $0,12 \pm 0,013$ mg $100g^{-1}$ de erva-mate. Em trabalho realizado com sete espécies de erva-mate diferentes, com extrato aquoso, porém concentração do extrato superior a nossa, tivemos resultados próximos em relação a ácido clorogênico e ácido cafeico, sendo os valores encontrados nesse estudo de $2,8 \pm 0,3$ mg $100g^{-1}$ para o ácido clorogênico e $0,023 \pm 0,004$ mg $100g^{-1}$ para o ácido cafeico. Para a rutina o valor encontrado foi de $0,0600 \pm 0,0054$ mg $100g^{-1}$, sendo nesse caso valor inferior ao encontrado em nosso estudo. Nesse mesmo estudo foi detectada a quercetina e canferol, podendo-se justificar sua presença, apesar da baixa quantidade, a maior concentração em relação a nossa amostra analisada, uma vez que o extrato aquoso não é o melhor método de extração desses compostos. Os valores encontrados foram de $0,0031 \pm 0,0009$ mg $100g^{-1}$ para quercetina e $0,0012 \pm 0,003$ mg $100g^{-1}$ para o canferol (Filip *et al.*, 2001).

Figura 6: Cromatografia com identificação de compostos fenólicos: 1: ácido clorogênico, 2: ácido cafeico e 3: rutina.



Também foram detectadas as metilxantinas teobromina, cafeína e teofilina, sendo a última em baixa quantidade, porém encontrada na amostra, já que em muitos trabalhos sua identificação não acontece (Figura 7). Os valores encontrados para as metilxantinas foram: $25,52 \pm 1,01\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ de teobromina, $139,5 \pm 7,79\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ de cafeína e $1,23 \pm 0,08\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de teofilina. Em estudo de 2015 com análise de erva-mate em três estágios de maturação da planta, foram encontrados valores que variaram de $3,07 \pm 0,01$ a $30,88 \pm 0,13\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ de teobromina e $5,68 \pm 0,08$ a $133 \pm 0,41\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ de cafeína, sendo os nossos resultados próximos aos valores máximos encontrados, as amostras analisadas tinham de 1, 2 e 6 meses (Blum-Silva *et al.*, 2015). Valores de cafeína e teobromina variaram em artigos apresentando valores próximos ao nosso quando se analisou em xícara de chá preparado. No nosso trabalho os cálculos foram realizados em $7\text{g } 300\text{mL}^{-1}$, em trabalho de 2009 com análise de extrato aquoso de chá mate com concentração de $1,6\text{g}/182,5\text{mL}$ foram encontrados valores de cafeína e teobromina de $15,16\text{mg}$ e $2,74\text{mg}$ (Souza, 2009), respectivamente, sendo os nossos valores encontrados de $9,76\text{mg}$ para cafeína e $1,78\text{mg}$ para a teobromina. A diferença pode ser explicada pelo fato do trabalho de 2009 comparar marcas diferentes, com diferentes procedências e influências edafoclimáticas, enquanto a nossa amostra é de uma única região.

Figura 7: Cromatografia com identificação de metilxantinas: 1: teobromina, 2: teofilina e 3: cafeína.

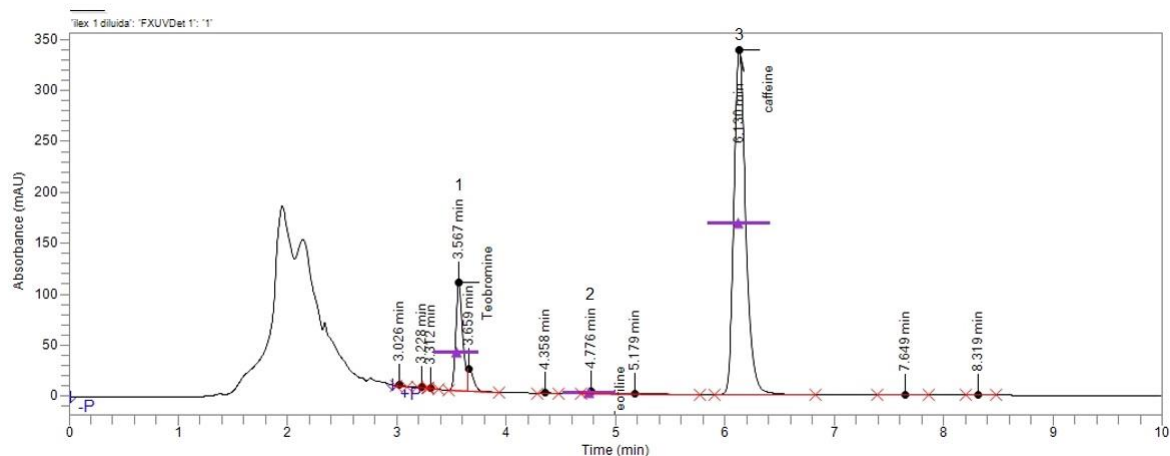


Tabela 6: Resultados encontrados para atividade antioxidante, compostos fenólicos e metilxantinas

		Resultado
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	DPPH	81,79% ± 5,17
	<i>Foulin Ciocalteu</i>	112,01 ± 7,72mg L ⁻¹ GAE
		4,8 ± 0,33mg GAE g ⁻¹
COMPOSTOS FENÓLICOS	ÁCIDO CLOROGÊNICO	1,62 ± 0,11mg 100g ⁻¹
	ÁCIDO CAFEICO	0,02 ± 0,017mg 100g ⁻¹
	RUTINA	0,12 ± 0,013mg 100g ⁻¹
METILXANTINAS	CAFEÍNA	139,5 ± 7,79mg 100g ⁻¹
	TEOBROMINA	25,52 ± 1,01mg 100g ⁻¹
	TEOFILINA	1,23 ± 0,08mg 100g ⁻¹

6. CONCLUSÃO

- Embora tenhamos um resultado baixo na análise de *Foulin Ciocalteau* e um baixo valor do ácido clorogênico, atribuídos provavelmente ao processo de torrefação, podemos comprovar a eficiência do extrato de erva-mate, como matriz antioxidante, quando analisamos o resultado da peroxidação lipídica. A formação de melanoidinas, a partir da reação do ácido clorogênico e polissacarídeos de parede celular poderiam ser responsáveis pela manutenção da capacidade antioxidante da erva-mate;
- Na presença de metais de transição, o potencial antioxidante da erva-mate foi reduzido, provavelmente, devido a conversão do Fe^{3+} a Fe^{2+} pelo ácido clorogênico;
- O resultado do DPPH está, de acordo com os resultados obtidos com o ensaio da peroxidação lipídica, corroborando a capacidade antioxidante da erva-mate.
- As metilxantinas se mantiveram com valores elevados devido a sua estabilidade química em relação a temperaturas elevadas e tivemos também a identificação da teofilina, que não é comumente achada em erva-mate;

PARTE II: PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE PACIENTES VÍTIMAS DE TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO

7. INTRODUÇÃO

Conhecendo o potencial antioxidante *in vitro* e os resultados obtidos pelo nosso grupo de estudo foram pesquisados trabalhos realizados *in vivo* com consumo de chá mate. Os estudos encontrados foram realizados em indivíduos adultos, de ambos os sexos, sem patologias renais e hepáticas associadas (Tabela 7). Outros critérios de exclusão para participar dos estudos foram obesidade mórbida, gravidez, idade inferior a 18 anos, pessoas com ingestão acima de quatro doses de bebidas alcoólicas por dia, com atividade física intensa, em uso de suplementos alimentares e com doenças gastrointestinais.

Entre os parâmetros avaliados, alterações no perfil lipídico estavam presentes em todos os trabalhos, isso mostra a influência dos compostos não voláteis, como compostos fenólicos ácidos e flavonóides, e sua ação antioxidante no organismo. Em estudo de 2013, 22 pacientes sofreram intervenção durante 60 dias com a ingestão diária de 1L de chá mate (20mg mL⁻¹), 11 pacientes eram diabéticos e 11 pré-diabéticos. A ingestão do chá mate gerou uma maior concentração de GSH e ao mesmo tempo diminuiu os valores de LOOH, indicando um resultado da ação antioxidante da amostra, prevenindo complicações do diabetes devido ao estresse oxidativo (Boaventura *et al.*, 2013). Os mesmos resultados foram encontrados em estudo anterior realizado em 2009. Nesse caso, foram avaliados pacientes com dislipidemia e normolipidêmicos, e em ambos os pacientes houve aumento do GSH após ingestão contínua de chá mate (Morais, 2009). Nesse mesmo estudo foi encontrado aumento do HDL em todos os grupos do estudo (normolipidêmicos com erva-mate tostada e erva-mate verde; dislipidêmicos com erva-mate tostada e erva-mate verde). Houve diminuição do LDL e diminuição da relação LDL/HDL, além da melhora no perfil dos marcadores de estresse oxidativo, elevação da capacidade antioxidante e diminuição de hidroperóxidos lipídicos. Sugeriu-se que a infusão de erva-mate seja benéfica na prevenção de fatores de risco associados às doenças cardiovasculares.

Alguns dos fatores de risco citados acima também estão presentes em pacientes diabéticos e pré-diabéticos e devem ser acompanhados, pois são algumas

das complicações surgidas quando a doença não é bem controlada e que podem surgir após alguns anos da descoberta do diabetes. Sendo assim, alguns estudos também têm sido realizados avaliando-se a ingestão da erva-mate em pacientes diabéticos e pré-diabéticos, como em estudo de 2011, realizado com 58 pacientes, sendo 29 diabéticos e 29 pré-diabéticos. O total dos pacientes foi dividido em três grupos, sendo que um grupo recebeu intervenção nutricional, um somente chá mate e o terceiro grupo recebeu as duas intervenções. O trabalho foi realizado durante 60 dias e houve ingestão de erva-mate três vezes ao dia, com 20mg mL⁻¹ por dose. Análises sanguíneas foram realizadas nos dias 20, 40 e 60 do tratamento. Os resultados indicaram melhora nos valores de glicose, HbA_{1c} e LDL nos pacientes com diabetes e esses pacientes não tiveram intervenção nutricional. Já os pacientes pré-diabéticos que faziam parte do grupo com ambas as intervenções apresentaram melhora nos valores de LDL, HDL e triglicérides. Esses padrões podem levar a redução no risco de doenças cardiovasculares no grupo estudado (Klein *et al.*, 2011).

Referência	N	Concentração	Dias	Parâmetros Analisados					
				Perfil lipídico	Glicemia	FRAP	GSH	LOOH	Outros
(Boaventura <i>et al.</i> , 2013)	22	20mg mL ⁻¹	60	X	X	X	X	X	AGE
(Morais, 2009)	80	5g 100mL ⁻¹ erva verde	2g	40	X		X	X	APO1
(Zaffari, 2012)	44	100mL ⁻¹ erva tostada		56					PARO-I
(Fernandes, 2011)	20	87,5g 500mL ⁻¹		56					FE
(Stefanuto, 2010)	107	25g folhas secas	07		X				
(Pontin, 2010)	224	10g erva tostada							
(Porto, 2009)	60	20mg mL ⁻¹	120		X				PCR TAP
(Klein <i>et al.</i> , 2011)	58	87,5g 500mL ⁻¹	56		X				PCR IMC FIB
		12,5mg mL ⁻¹	60		X	X			SOD TBARS TAS GPx TGO TGP Ur Crea
		20mg mL ⁻¹	60		X	X		X	IMC PA HbA _{1c}

Tabela 7: Trabalhos realizados com erva-mate em humanos

8. TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO

Avaliando os resultados obtidos nos estudos com erva mate, o nosso grupo desenhou um estudo para avaliar pacientes hospitalizados, vítimas de Traumatismo Cranioencefálico (TCE). O TCE é uma patologia que apresenta uma alta taxa de morbimortalidade, sendo responsável por 1% de todas as mortes em adultos e apresenta sequelas significativas como déficit motor e cognitivo, gerando um grande impacto socioeconômico e social aos pacientes e familiares (Helmy, Vizcaychipi e Gupta, 2007; Gentile *et al.*, 2011).

O TCE pode ser do tipo penetrante, com pior prognóstico, ou sem lesão penetrante. A fisiopatologia do TCE pode ser dividida em dois estágios. O primeiro é caracterizado por lesão tecidual e desregulação do fluxo sanguíneo encefálico e do metabolismo (Werner e Engelhard, 2007). Alterações devido à isquemia tecidual levam ao acúmulo de ácido láctico, formado a partir da glicólise anaeróbia, aumentando a permeabilidade da membrana celular e gerando edema tecidual. A partir do início do metabolismo anaeróbio, o qual não é o mais adequado para a manutenção do gasto energético celular encefálico, o estoque do ATP é esgotado e ocorrem falhas das bombas iônicas. Já no segundo estágio da lesão ocorre a despolarização terminal da membrana e a liberação excessiva de neurotransmissores excitatórios (glutamina e aspartato), ativação de receptores N-metil-d-aspartato (NMDA) e a abertura dos canais de sódio e cálcio dependentes de voltagem. Quando os canais iônicos são abertos ocorre influxo de íons sódio e cálcio que desencadeiam o catabolismo intracelular. A entrada dos íons cálcio ativa as peroxidases lipídicas, proteases e fosfolipases as quais aumentam a concentração intracelular de ácidos graxos e radicais livres. Esses pacientes apresentam um estresse metabólico elevado, catabolismo acelerado e um perfil inflamatório elevado, aumentando o risco nutricional desses pacientes. O estresse causado pelo trauma gera o estado hipercatabólico que leva a quebra de proteína muscular, levando a um quadro de hiperglicemia nesse paciente, mesmo sem apresentar co-morbidades, como diabetes, no momento do trauma. Os pacientes que desenvolvem hiperglicemia acima de 200mg dL^{-1} nas primeiras 24h após o TCE apresentam aumento nas taxas de mortalidade e piora das complicações neurológicas após um ano do trauma (Gentile *et al.*, 2011). Nesses pacientes a glicemia deve ser mantida

entre 140 a 180mg dL⁻¹ visando a redução de 30% na mortalidade dos pacientes (Helmy, Vizcaychipi e Gupta, 2007). Devido ao quadro hipercatabólico é importante que assim que aconteça a estabilidade clínica e hemodinâmica desse paciente a nutrição seja iniciada, pois está relacionada a uma melhor sobrevida e melhores taxas de recuperação pós-lesão neuronal. Também tem associação a um aumento da função imunológica dos pacientes, com aumento dos valores de células T CD4, relação CD4-CD8 e linfócitos T mais responsivos (Werner e Engelhard, 2007).

Uma associação presente em pacientes com traumatismo cranioencefálico é o aumento da CPK total. A CPK está presente em vários tecidos como cérebro, coração e músculos, ela é a enzima responsável pela conversão de creatina em fosfocreatina com consumo de ATP na reação. Esta reação é reversível o que pode levar a formação de ATP e creatina a partir de ADP e fosfocreatina, porém em um momento que o consumo de energia é elevado, tal como no traumatismo, a fosfocreatina é utilizada como reserva de ATP com o objetivo de compensar os gastos de forma rápida. O aumento dos níveis séricos da CPK pode indicar lesão muscular e caso haja aumento da creatinina e uréia, isso poderia caracterizar o quadro de rabdomiólise. O aumento da CPK pode acontecer em até doze horas após a lesão, sendo que a meia-vida é de 1,5 dias (Gaw *et al.*, 2001).

Devido a resposta inflamatória sistêmica presente no paciente com TCE encontramos níveis aumentados de citocinas, principalmente IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . Essa resposta ocorre pela ativação do complemento e supra-regulação de moléculas de adesão no endotélio de vasos cerebrais que estão associadas com o acúmulo de neutrófilos e produção de citocinas. A IL-8 pode ser produzida por neutrófilos, células endoteliais, astrócitos e células da micróglia e sua liberação pode ser estimulada por citocinas, como a IL-1 e por hipóxia, reperfusão e isquemia, que são mecanismos presentes no estresse oxidativo pós-traumático. Os astrócitos e micróglia também estão ligados a liberação de IL-1 β e TNF- α , elevando a liberação de citocinas e induzindo a produção de mediadores do sistema imune periférico. A IL-6 também tem seus níveis aumentados no paciente com TCE e essa citocina pode apresentar ação pró e anti-inflamatória (Finfer e Cohen, 2001; Gopcevic *et al.*, 2007; Oliveira, Ikuta e Regner, 2008).

Os estudos encontrados até o momento com o consumo de erva-mate foram realizados com indivíduos que mantinham suas rotinas alimentares e atividade física padrão e não foram realizados em pacientes com essa patologia associada. Os padrões avaliados foram: glicemia sanguínea e capilar, PCR, TNF- α , IL-6, IL-1 e CPK. Para acompanhamento do quadro do paciente ainda foram realizados hemograma, TGO, TGP, uréia, creatinina, sódio, potássio, magnésio, fósforo e cálcio.

9. OBJETIVOS

9.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da erva mate sobre parâmetros bioquímicos de pacientes vítimas de traumatismo crânioencefálico.

9.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da erva mate sobre a glicemia de pacientes vítimas de traumatismo crânioencefálico
- Avaliar o efeito da erva mate sobre a atividade inflamatória em pacientes vítimas de traumatismo crânioencefálico através de análises de CPK, PCR, IL-1, IL-6 e TNF- α .

10. MATERIAIS E MÉTODOS

10.1 DESENHO DO ESTUDO

O ensaio clínico consistiu de um estudo randomizado, terapêutico e foi aplicado a 08 pacientes, sendo que 04 receberam a infusão do chá de erva-mate e 04 não receberam a infusão. O alvo do estudo foram adultos (16 a 64 anos), vítimas de TCE, sem co-morbidades internados no Hospital Estadual Getúlio Vargas. Em um primeiro momento esses pacientes estiveram no CTI, após encaminhamento para a enfermaria esse paciente foi acompanhado até completar 14 dias (tempo médio de internação).

10.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

A inclusão dos pacientes foi realizada após os mesmos ou familiares assinarem o TCLE autorizando a participação no estudo. O aceite dos familiares torna-se essencial uma vez que esse paciente, normalmente, quando internado está sedado no primeiro momento para estabilização do quadro hemodinâmico e controle do TCE. Os pacientes incluídos no estudo foram acompanhados diariamente a fim de se observar qualquer alteração no quadro após o início da infusão da erva-mate. A mesma foi iniciada no momento em que foi iniciada a alimentação do paciente, uma vez que deve ser precoce nesse tipo de paciente devido ao quadro catabólico elevado. A alimentação desse paciente no primeiro momento geralmente foi realizada por via enteral, havendo melhora clínica e de nível de consciência esses pacientes iniciaram alimentação por via oral, sendo o chá nesse momento sendo ingerido por via oral. A tolerância da dieta enteral e a aceitação da dieta via oral foram analisadas.

Seriam excluídos do estudo pacientes que apresentassem aminas em doses elevadas e parada cardiorrespiratória devido à instabilidade hemodinâmica e, conseqüentemente, má perfusão tecidual intestinal, não sendo possível a infusão do volume do chá de erva-mate.

10.3 DOSAGENS BIOQUÍMICAS E CONSUMO

Os parâmetros avaliados diariamente foram: balanço hídrico, glicemia horária (HGT), uso de insulina, pressão arterial, frequência cardíaca, frequência respiratória,

função intestinal, sedação e aminas vasoativas. Os exames foram: hemograma completo, glicemia, PCR, CPK, proteínas séricas, uréia, creatinina, sódio, potássio, magnésio, fósforo, cálcio, TGO, TGP, bilirrubina total, bilirrubina direta, bilirrubina indireta e GGT. Esses exames são realizados diariamente nos pacientes internados no CTI. Para complementação da avaliação do estudo também foram realizados exames em dias específicos (D0, D7 e D14) esses exames são: TNF- α , IL -6 e IL-1. Esses exames não são realizados no hospital, porém o sangue foi coletado juntamente com os exames diários, armazenados em freezer a -18°C e enviados para o laboratório responsável pelas análises. Toda a coleta seguiu normas de segurança e higiene para o paciente e o responsável pela coleta. O transporte foi realizado conforme as exigências do laboratório para garantir a qualidade do material a ser analisado.

A dosagem do chá foi de 7g de erva-mate para 300mL de água, duas vezes ao dia. A preparação foi realizada de acordo com normas de segurança e higiene, sendo que a erva-mate permaneceu em infusão por 15 minutos em recipiente tampado após a fervura da água. Para a infusão em sonda a bebida atingiu temperatura ambiente para evitar alterações gastrointestinais. A bebida não foi adoçada, seja com açúcar ou adoçantes artificiais e o consumo foi imediato no paciente com via oral estabelecida sendo a oferta em uma etapa pela manhã (colação) e uma etapa pela tarde (merenda).

O participante ou a família estavam cientes que poderiam decidir pela saída do estudo a qualquer momento sem prejuízo em relação ao cuidado do mesmo. Os dados foram armazenados sob a forma de números para não ter qualquer identificação do paciente sendo que pacientes de números pares receberam a infusão e pacientes de números ímpares não receberam a infusão. A equipe médica fez parte do trabalho e foi avaliada qualquer alteração que pudesse resultar na exclusão do paciente. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da UNIRIO, CAAE: 39378914.5.0000.5285.

10.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a obtenção dos resultados foi realizado teste de Kolmogorov para confirmar a distribuição normal dos dados, com regressão linear e cálculo de coeficiente de Person com $p < 0,05$ como significativo. Em seguida foi realizado teste de ANOVA.

11. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A idade dos pacientes variou de 17 a 64 anos, idade média de $35,8 \pm 18,9$ anos sendo todos os pacientes do sexo masculino. Foram avaliados oito pacientes, sendo quatro no grupo controle (C) e quatro pacientes no grupo intervenção com erva-mate (EM). Houve a exclusão de três pacientes do trabalho, um por diagnóstico durante o período de internação que o paciente apresentava diabetes mellitus não diagnosticada previamente (sexo feminino), um paciente por transferência hospitalar para término do tratamento clínico e o terceiro, pois, apesar do trauma na região da cabeça, não foi diagnosticado com lesão cerebral e liberado pela equipe de neurocirurgia. Duas famílias abordadas não autorizaram o estudo com seus familiares.

Em relação aos resultados da CPK tivemos diminuição no grupo erva-mate com diferença significativa, enquanto no grupo controle a diminuição não foi significativa (Tabela 8). Os valores normais de CPK variam de 39 a 308U L^{-1} para homens e de 26 a 192U L^{-1} para mulheres, considerando o método automação - UV enzimático, utilizado pelo laboratório do HEGV. Os pacientes do grupo controle apresentaram inicialmente valores abaixo de 1000U L^{-1} , enquanto os pacientes do grupo EM apresentaram valores superiores a 1000U L^{-1} , valores superiores podem indicar risco aumentado de rabdomiólise. Porém apesar dos valores aumentados na primeira coleta os pacientes que receberam a intervenção tiveram diminuição dos valores, enquanto os que não receberam tiveram valores aumentados chegando ao valor máximo de 18.761U L^{-1} , no paciente C1, com valores de uréia e creatinina elevados, anúrico nas últimas 24 horas, necessidade de realização de hemodiálise, utilização de aminas vasoativas para controle de pressão arterial evoluindo ao óbito. A descrição acima indica a presença de sepse e rabdomiólise no paciente. O paciente C2 também teve aumento da CPK com valor máximo de 13.564U L^{-1} , porém nesse caso sem aumento das escórias nitrogenadas, uréia e creatinina. O valor máximo atingido por um paciente do grupo EM (EM1) foi de 3.171U L^{-1} sem aumento de uréia e creatinina. Com exceção desse paciente, que foi a óbito ao final do acompanhamento, todos os outros pacientes do grupo tiveram diminuição até valores normais de CPK. Quando analisado o grupo controle somente o paciente C4 apresentou valores normais no último dia do acompanhamento.

Tabela 8: Resultados de r e p para valores de CPK

Paciente	Valores de r	P
C1	0,4467	0,1093
EM1	-0,6358	0,0145
C2	-0,1077	0,7390
EM2	-0,7750	0,0018
C3	-0,5158	0,0711
EM3	-0,7799	0,0017
C4	-0,4367	0,1357
EM4	-0,8875	0,0003

Legenda: C: grupo controle; EM: grupo erva-mate

Gráfico 3: Valores de CPK para pacientes do grupo controle

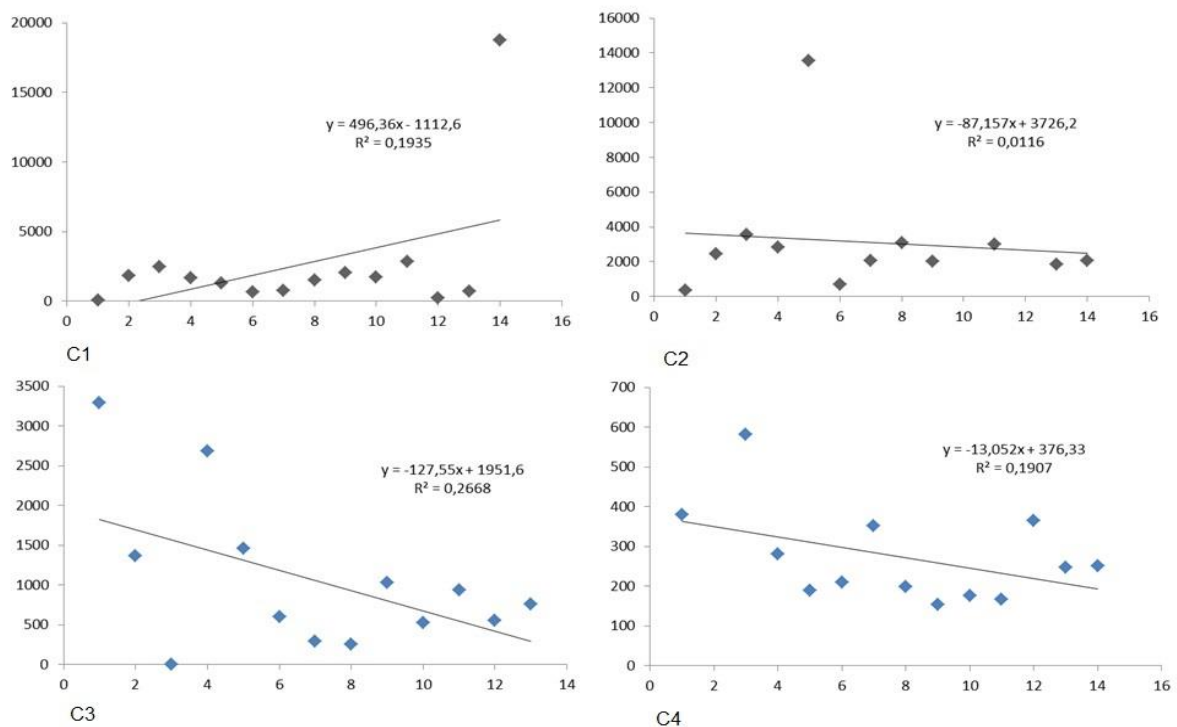
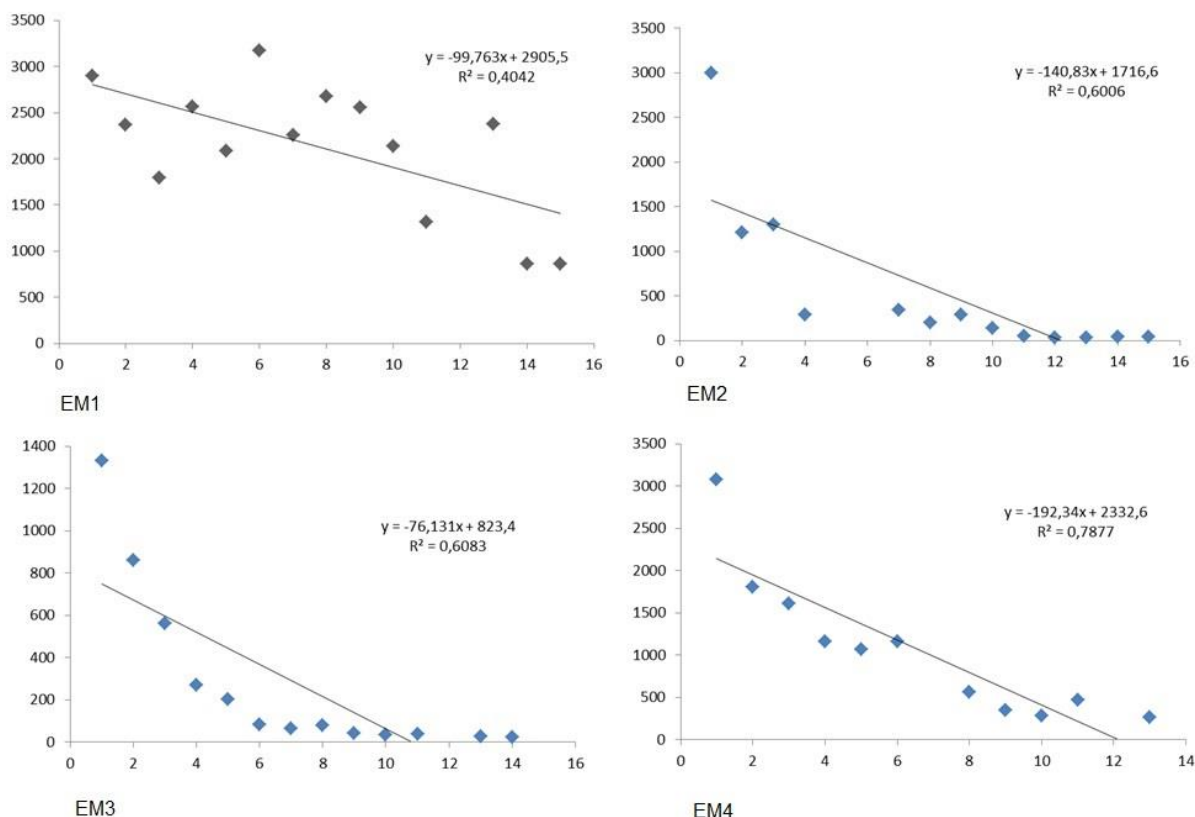


Gráfico 4: Valores de CPK para grupo Erva-Mate



Não foram encontrados estudos relacionados a ingestão de erva-mate em pacientes com traumatismo crânioencefálico e alterações nos níveis de CPK, entretanto em estudos com atletas, grupo que pode apresentar rbdomiólise pela lesão muscular proveniente de exercício extenuante e de grande intensidade, encontramos um estudo com atletas que receberam chá mate anteriormente a teste em esteira, com protocolo de rampa. Esses pacientes tiveram um leve aumento nos valores de CPK, porém sem diferença significativa, variando de $149 \pm 69,3U L^{-1}$ na análise basal a $195 \pm 94,3U L^{-1}$ pós-exercício e com consumo de chá mate, mantendo os valores dentro da faixa de normalidade. A dosagem utilizada nesse estudo foi de 5g de chá mate para 400mL de água (Kano, 2013). Uma justificativa para esse aumento é o tempo de utilização do chá, pois foi realizada uma única dose. Em estudo realizado com pequi, alimento também fonte de polifenóis e outros antioxidantes como vitamina C e E, foi observada a redução em valores de CPK com diferença significativa com $p < 0,0001$, sendo os valores para homens antes da ingestão de $373,56 \pm 47,37 U L^{-1}$ e depois da ingestão para $293,82 \pm 30,48 U L^{-1}$.

Esse estudo foi realizado com voluntários corredores de rua, na faixa etária de 15 a 67 anos, de ambos os sexos que receberam pílula com óleo de pequi, após a primeira corrida, e a ingeriram durante 14 dias até a corrida seguinte (Vilela, 2009). Esses resultados podem ser atribuídos à presença dos polifenóis nessas matrizes alimentares e sua atividade antioxidante. Existem poucos estudos relacionando a CPK e alimentos ricos em flavonóides em humanos, até o momento este tipo de trabalho foi realizado em atletas, pois sabemos que nesse tipo de voluntário a CPK pode estar aumentada pelo exercício extenuante. Em animais tem estudo relacionando a diminuição da CPK à presença de flavonóides na alimentação e considerando um marcador de proteção cardíaca. Em estudo com coelhos recebendo quatro tipos de dietas (1: dieta normal; 2: dieta normal + flavonóides (150mg kg⁻¹ peso corporal); 3: dieta normal + colesterol(400mg); dieta 4: dieta normal + flavonóides + colesterol) os valores de CPK estavam menores nos grupos que receberam flavonóides na alimentação e aumentou significativamente no grupo que recebeu a dieta 3. Nesse mesmo estudo a avaliação de enzimas antioxidantes estavam em valores baixos nos animais que receberam dieta com colesterol, já sendo conhecida a atividade inflamatória e pró-oxidante do colesterol. Nos animais que receberam suplementação com flavonóides houve um aumento das enzimas superóxido desmutase, catalase e glutathione peroxidase. Os flavonóides utilizados nesse trabalho foram extraídos de feijão fradinho (Janeesh e Abraham, 2013).

Apesar de não encontrarmos diferença significativa para os valores de glicemia sanguínea nos pacientes controle e erva-mate (Tabela 9), ao analisar os valores isoladamente, verificamos que eles foram superiores nos pacientes do grupo controle em relação ao grupo erva-mate. No grupo controle tivemos o paciente C1 e C4 com glicemia máxima de 197mg dL⁻¹; C2 com glicemia de 170mg dL⁻¹ e C3 com glicemia de 175mg dL⁻¹. Os pacientes do grupo erva-mate não apresentaram valores aumentados de glicemia sanguínea. No CTI valores acima de 180mg dL⁻¹ são considerados hiperglicemia com necessidade de uso de insulina, quando utilizado HGT horário. Dos quatro pacientes analisados no grupo controle todos fizeram uso de insulina durante o período de acompanhamento, sendo os pacientes C1 e C3 uso de insulina em um dia, sendo 4UI e 2UI, respectivamente. Os pacientes C2 e C4 fizeram uso de insulina de 5 a 8 dias, com valores de insulina variando de 2UI a

12UI. Nos pacientes do grupo erva-mate tivemos alteração de HGT horário somente no paciente EM4, em três dias, com uso de insulina variando de 2UI a 4UI. A glicemia no paciente internado é monitorada de quatro a seis vezes ao dia, dependendo da gravidade do caso, ou a cada hora, caso o paciente faça uso de *dripping* de insulina.

Tabela 9: Resultados de r e p para valores de glicemia

Paciente	Valores de r	p
C1	0,0616	0.84155
EM1	0,3463	0.24641
C2	0,2445	0.42078
EM2	-0,3511	0.23948
C3	-0,3187	0.28855
EM3	0,3472	0.24510
C4	-0,5714	0.04153
EM4	-0,2271	0.45557

Legenda: C: grupo controle; EM: grupo erva-mate

Os trabalhos encontrados com erva-mate e avaliação positiva em relação a glicemia, foram realizados em voluntários saudáveis ou com diabetes, porém esses voluntários não estavam institucionalizados, sendo que no nosso grupo de voluntários a elevação da glicemia está relacionada a alterações metabólicas e a infecção que pode acontecer durante o período de internação levando também a presença de febre. Somente o paciente C3 não apresentou febre durante o período de internação, sendo o paciente C1 com febre de D7 a D13, C2 com febre por cinco dias de febre e C4 com febre durante seis dias. Já nos pacientes do grupo erva-mate um paciente não apresentou febre durante o acompanhamento (EM3), um apresentou somente um dia (EM2), EM4 apresentou febre durante dois dias e EM1 durante seis dias ao longo do acompanhamento, sendo que nesse paciente a presença de febre foi constante do D10 ao D14, dia que o paciente evoluiu ao óbito. Os pacientes C3 e EM3 também não utilizaram antibiótico durante todo o período de

internação (Tabela 10). A utilização de aminas vasoativas (noradrenalina) é prevista quando a pressão arterial do paciente está muito baixa, ela é utilizada para controle, visando o aumento da pressão arterial. A dose utilizada está relacionada à gravidade e poderia excluir o paciente que participasse do grupo intervenção, devido à impossibilidade de alimentação desse paciente e a intolerância ao volume ofertado do chá mate. Tal conduta não foi necessária, pois no grupo erva-mate os pacientes EM1 e EM4 apresentaram baixas doses de utilização, sendo a dose máxima do EM1 de $0,18\text{mcg kg}^{-1}$ de peso ideal e o EM4 com dose máxima de $0,10\text{mcg kg}^{-1}$ de peso ideal. A suspensão do suporte nutricional é prevista em pacientes com valores acima de $0,8\text{mcg kg}^{-1}$ de peso ideal, sendo avaliados outros parâmetros de perfusão tecidual como lactato, pH e pressão arterial média.

Tabela 10: Alterações de glicemia, HGT, uso de ATB, presença de febre e uso de aminas nos pacientes

Paciente	Glicemia	HGT	ATB	Febre	Aminas
C1	X	X	X	X	X
EM1			X	X	X
C2	X	X	X	X	X
EM2			X	X	
C3	X	X			
EM3					
C4	X	X	X	X	X
EM4		X	X	X	X

Legenda: C: grupo controle; EM: grupo erva-mate

A presença da febre, utilização de antibióticos e alterações glicêmicas refletem nos valores alterados de PCR, IL-1 e IL-6, sem uma boa correlação positiva com a ingestão de erva-mate, por serem indicativos de inflamação e infecção. A PCR é uma proteína de fase aguda e tem sua formação estimulada pelas interleucinas 1 e 6, liberadas por macrófagos após a fagocitose do antígeno, o que poderia explicar o aumento desses três marcadores nos pacientes avaliados. Em

relação a PCR os pacientes EM2, C3, EM3 e EM4 apresentaram queda nos valores de PCR durante o trabalho, porém sem diferença significativa (Tabela 11). O valor de referência de PCR é inferior a 3mg dL^{-1} , sendo que entre os pacientes avaliados o paciente C1 apresentou no D0 PCR de $2,6\text{mg dL}^{-1}$ com valor máximo de $224,9\text{ mg dL}$ no D14 (óbito), e o paciente EM3 apresentou PCR máxima de $61,4\text{mg dL}^{-1}$ no D0, atingindo $3,9\text{mg dL}^{-1}$ no D14, valor ainda superior ao ideal, porém o mais próximo atingido pelos pacientes avaliados. Esse paciente também não teve febre, alterações glicêmicas ou fez uso de antibióticos.

Tabela 11: Resultados r e p para valores de PCR

Paciente	r	p
C1	0,5121	0.073595
EM1	0,2230	0.463971
C2	0,1741	0.569458
EM2	-0,5977	0.030977
C3	-0,6151	0.025254
EM3	-0,8840	0,000006
C4	0,7876	0.001391
EM4	-0,3575	0.23043

Legenda: C: grupo controle; EM: grupo erva-mate

Em relação a IL-6, os pacientes EM1 e EM2 tiveram um aumento nos valores no D7, seguido de diminuição para nível abaixo do inicial no paciente EM2 no D14. Apesar dos valores não apresentarem diferença significativa, o valor aumentado no paciente EM1 se manteve no D14, e o paciente evoluiu a óbito no D15, enquanto o paciente EM2 recebeu alta hospitalar (Tabela 12). O valor aumentado da IL-6 no paciente EM2 (D7) coincide com o período em que o paciente apresentou complicações clínicas, sendo re-entubado após uma convulsão e um episódio de broncoaspiração retornando ao CTI, sendo uma possível justificativa para seu aumento e posterior redução, ainda que acima do nível de referência. São

considerados valores normais de IL-6 até 10pg mL⁻¹. Em relação aos pacientes EM3 e EM4 não houve alteração significativa.

Tabela 12: Resultados de IL6 grupo erva-mate

Paciente	D0	D7	D14
EM1	38,99018	326,5334	313,4277
EM2	39,08825	607,8549	38,9776
EM3	39,00849	38,96036	38,9764
EM4	39,00397	38,9999	39,01775
MÉDIA	39,02272	253,0871	107,5999
DESVIO PADRÃO	0,044374	272,6036	137,2185

Legenda: EM: grupo erva-mate; D0: dia 0, antes da intervenção; D7: dia 7, 7 dias após a intervenção e D14: dia 14, 14 dias após a intervenção.

Em relação a IL-1 não tivemos alterações significativas nos pacientes nas três coletas realizadas, sendo os valores encontrados acima do valor normal de referência que é de até 15pg dL⁻¹ (Tabela 13). Não tivemos resultados para TNF- α , a amostra não reagiu, o que pode ser explicado pela baixa expressão da IL-1, apesar dos valores acima do ideal, pois a TNF- α tem sua expressão estimulada pela IL-1 (Varella e Forte, 2001).

Tabela 13: Resultados de IL1 grupo erva-mate

Paciente	D0	D7	D14
EM1	16,20625	16,20833	16,20794
EM2	16,21556	16,21169	16,21466
EM3	16,21239	16,20991	16,2115
EM4	16,221	16,2114	16,21249
MÉDIA	16,2138	16,21033	16,21165
DESVIO PADRÃO	0,006162	0,001546	0,002802

Legenda: EM: grupo erva-mate; D0: dia 0, antes da intervenção; D7: dia 7, 7 dias após a intervenção e D14: dia 14, 14 dias após a intervenção.

Para IL-1 e IL-6 não foram realizados os cálculos de média e desvio-padrão com o paciente do grupo controle, pois o resultado com o paciente que recebeu intervenção já indicou que não houve diferença significativa não sendo necessário o cálculo.

12. CONCLUSÃO

- A ingestão do chá mate foi responsável pela diminuição da CPK nos pacientes avaliados, sendo um importante indicador de lesão muscular e comprometimento do paciente, uma vez que seu aumento está relacionado à manifestação do quadro de rabdomiólise.
- Apesar de não apresentar diferenças significativas em relação à glicemia, os pacientes do grupo erva-mate apresentaram menos alterações glicêmicas, levando a um menor uso de insulina, sendo sugestiva a influência da erva-mate, porém necessitamos de um número maior de pacientes avaliados.
- A erva-mate não teve papel em diminuição na mortalidade dos pacientes, sendo de 50% em cada grupo, C3 e EM4 após o fim do acompanhamento, porém é preciso realçar que o TCE é uma patologia grave, com alto índice de mortalidade e a diminuição da CPK pode levar a uma melhor sobrevida dos pacientes que tiveram alta hospitalar.
- O estudo foi pioneiro ao avaliar a relação entre chá mate, marcadores inflamatórios e TCE, não tendo estudos para comparação com esse tipo de paciente, sugerindo a continuidade e o início de novos trabalhos.

13. REFERÊNCIAS

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMILGI, L. **Antioxidant activity of essential oils**: Journal of Agricultural and food chemistry. 61: 10835 - 10847 p. 2013.

ARÇARI, D. P. **Efeitos biológicos do consumo de chá-mate (*Ilex paraguariensis*) frente à obesidade em camundongos**. 2009. 74 (Mestre). Nutrição em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. **Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering**: Phytochemistry. 69: 841 - 856 p. 2008.

ASHIHARA, H.; TAKEO, S. **Distribution and biosynthesis of caffeine in plants**: Frontiers in Bioscience. 9: 1864 - 1876 p. 2004.

BENINCÁ, C. **Estabilidade do ácido 5-O-Cafeoilquínico: relação entre a cinética química e o processamento da erva-mate**. 2009. 79 (Mestrado). Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BLUM-SILVA, C. H. et al. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 1, p. 1-6, 1// 2015. ISSN 0102-695X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X15000332> >. Acesso em: 2015/2//.

BOAVENTURA, B. C. B. et al. **Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals**: Journal of Functional Foods. 5: 1057 - 1064 p. 2013.

BOUDET, A.-M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2722-2735, 11// 2007. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942207004049> >. Acesso em: 2007/12//.

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**, v. 40, n. 3, p. 393-405, 4// 2007. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996906001864> >.

CLIFFORD, M. N. et al. **LC-MSⁿ analysis of the cis isomers of chlorogenic acids**: Food Chemistry. 106: 379-385 p. 2008.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. **Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate leaf and beverage**: Food Chemistry. 1: 13-21 p. 1990.

COLOMBO, V.; NUNEZ, R. **Cafeína y pigmentos vegetales. Observaciones experimentales de importância para los procesos de la yerba mate**. Buenos Aires: Contribución a la Bibliografía de la Yerba Mate: 114 p. 1983.

CORT, W. M. **Hemoglobin peroxidation test screens antioxidants**: Food and Technology. 28: 60-66 p. 1974.

_____. Antioxidant properties of ascorbic acid in foods. In: (Ed.). **Ascorbic Acids: Chemistry, Metabolism and Uses**. Washington, DC: American Chemical Society, 1982. p.533.

DARTORA, N. et al. UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1453-1461, 12/15/ 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611008156> >.

DE SOUZA, L. M. et al. Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: Development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 41, p. 7307-7315, 10/14/ 2011. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967311012349> >.

DI CARLO, G. et al. **Flavonoids old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs**: Life Science. 65: 337-353 p. 1999.

DONADUZZI, C. M. et al. **Variação nos teores de polifenóis e taninos em dezesseis progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) cultivadas em três municípios do Paraná**. Toledo: Arquivos Ciências Saúde. 7: 129-133 p. 2003.

DORNAS, W. C. et al. **Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo**: Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 28: 241-249 p. 2007.

EFING, L. C. et al. **Caracterização química e capacidade antioxidante da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill)**. Curitiba: Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos. 27: 241-246 p. 2009.

FERNANDES, E. S. **Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hill) na modulação gênica e na atividade da enzima paroxonase: estudos *in vitro* e *in vivo***. 2011. 115 (Mestrado). Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FILIP, R. et al. **Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species**: Fitoterapia. 72: 774-778 p. 2001.

FINFER, S. R.; COHEN, J. **Severe traumatic brain injury**. 48: 77-90 p. 2001.

FRANKEL, E. N. et al. Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1054-1059, 1994/05/01 1994. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf00041a001> >.

FRISCHKNECHT, P. M.; ULMER-DUFEK, J.; BAUMANN, T. W. **Purine alkaloid formation in buds and developing leaflets of *Coffea arabica*: expression. of na optimal defence strategy?**: Phytochemistry. 25: 613-616 p. 1986.

FUJIMORI, N.; ASHIHARA, H. **Biosynthesis of theobromine and caffeine in developing leaves of *Coffea arabica***: Phytochemistry. 36: 1359 - 1361 p. 1994.

GAW, A. et al. **Bioquímica Clínica - um texto ilustrado em cores**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A, 2001.

GENTILE, J. K. D. A. et al. **Condutas no paciente com trauma crânioencefálico**. São Paulo: Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica. 9: 74 - 82 p. 2011.

GNOATTO, S. C. B. et al. **Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. St.-Hil., aquifoliaceae)**: Química Nova. 30: 304 - 307 p. 2007.

GOPCEVIC, A. et al. **Plasma interleukin-8 as a potential predictor of mortality in adult patients with severe traumatic brain injury**: Tokohu J. Exp. Med. 211: 387-393 p. 2007.

HELMY, A.; VIZCAYCHIPI, M.; GUPTA, A. K. **Traumatic brain injury: intensive care management**: British Journal of Anaesthesia. 99: 32-42 p. 2007.

HUANG, S. W. et al. **Partition of selected antioxidants in corn oil-water model systems**: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 1991-1994 p. 1997.

_____. **Effect of pH on antioxidant activity of alpha-tocoferol and Trolox in oil-in-water emulsions**: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44: 2496-2502 p. 1996a.

_____. **Antioxidant activity of alpha-tocopherol and Trolox in different lipid substrates: Bulk oils vs oil-in-water emulsions**: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44: 444-452 p. 1996b.

ISOLABELLA, S. et al. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 695-699, 10/1/ 2010. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610003134> >.

JANEESH, P. A.; ABRAHAM, A. ***Vigna unguiculata* modulates cholesterol induced cardiac markers, genotoxicity and gene expressions profile in an experimental rabbit model**: Food & Function. 4: 568-574 p. 2013.

KANO, H. T. **Efeito da suplementação de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a capacidade antioxidante total em atletas futebolistas em teste exaustivo em esteira**. 2013. 27 (Bacharelado em Ciências Biomédicas). Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

KILMARTIN, P. A.; HSU, C. F. **Characterization of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry**: Food Chemistry. 82: 501-512 p. 2003.

KLEIN, G. A. et al. **Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetic individuals: a pilot study**: Journal of the American College of Nutrition. 30: 320 - 332 p. 2011.

LAGUERRE, M. et al. **What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox.**: Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 55: 183-201 p. 2015.

LIEN, E. J. et al. **Quantitative structure- activity relationship analysis of phenolic antioxidants**: Free Radic Biol Med. 26: 285-294 p. 1999.

MACHADO, C. C. B. et al. **Determinação do perfil de compostos voláteis e avaliação do sabor e aroma de bebidas produzidas a partir da erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**: Química Nova. 30: 513-518 p. 2007.

MAZZAFERA, P. **Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis***: Rev. Brasil Fisiol. Veg. 6: 149 - 151 p. 1994.

MELO, I. B. D. **Mapeamento da cadeia produtiva da erva-mate no município de Machadinho: Desafios e Propostas**. 2010. 48 (MBA). Gestão de Agronegócio, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo.

MORAES-DE-SOUZA, R. A. et al. **Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de chás comercializados no Brasil**. Curitiba: Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos. 29: 229-236 p. 2011.

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

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95-111, 10/29/ 2004. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967304014098> >.

NEGISHI, O. et al. **Deodorization with Ku-ding-cha containing a large amount of caffeoyl quinic acid derivatives:** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52: 5513-5518

p. 2004.

OLIVEIRA, C. O. D.; IKUTA, N.; REGNER, A. **Biomarcadores prognósticos no traumatismo crânio-encefálico grave:** Revista Brasileira de Terapia Intensiva. 20: 411-421 p. 2008.

PEDROSO, G. L. et al. **Efeito do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre metabolismo de ratos machos.** *Rev HCPA*. 30: 241-246 p. 2010.

PERES, R. G. **Aplicações de CE-DAD e HPLC-DAD-ES/MS na determinação de compostos fenólicos, metilxantinas e ácidos orgânicos em bebidas.** 2007. 179 (Doutorado em Ciência de Alimentos). Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PONTIN, B. **Efeitos da ingestão de chimarrão e chá verde no perfil lipídico e inflamatório de indivíduos com dislipidemia e excesso de peso.** 2010. 106 (Mestrado). Ciências da Saúde, Fundação Universitária de Cardiologia/ Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PORTER, W. L. Recent trends in food applications of antioxidants. In: SIMIC, M. G. e KAREL, M. (Ed.). **Autoxidation in Food and Biological Systems.** New York: Plenum Press, 1980. p.295-365.

PORTER, W. L.; BLACK, E. D.; DROLET, A. M. **Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems:** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 37: 615-624 p. 1989.

PORTO, V. B. **Efeitos da suplementação de chá mate solúvel (*Ilex paraguariensis*) nos biomarcadores de oxidação lipídica, na defesa antioxidante e nos parâmetros bioquímicos de voluntários normo e hiperlipidêmicos.** 2009. 76 (Mestrado). Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista.

RHODES, M. J. C. **Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems.** 1994.

SALDANHA, L. A.; BASTOS, D. H. M. Extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada: sólidos solúveis, fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro*. Congresso Sudamericano de la Yerba Mate, 4. Reunión técnica de la yerba mate, 4., 2006, Posadas. p.95-100.

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

SENANAYAKE, U. M.; WIJESEKERA, R. O. B. **Theobromine and caffeine content of cocoa bean during growth**: J. Sci. Food Agric. 22: 262 - 263 p. 1971.

SOUZA, M. F. F. D. **Chá mate (*Ilex paraguariensis*): compostos bioativos e relação com atividade biológica**. 2009. 147 (Mestrado). Nutrição em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

STEFANUTO, A. **Efeito hipocolesterolêmico da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), associada ou não ao aconselhamento nutricional, em indivíduos dislipidêmicos em uso ou não de estatinas**. 2010. 116 (Mestrado). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SÁNCHEZ-RANGEL, J. C. et al. **The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenol content determination**: Analytical Methods. 5: 5990-5999 p. 2013.

TOSS, D. **Extração de compostos fenólicos de *Butia capitata* utilizando dióxido de carbono supercrítico**. 2010. 90 (Mestrado). Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v. 99, n. 4, p. 835-841, // 2006. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605007296> >.

VALERGA, J.; RETA, M.; LANARI, M. C. Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 28-35, // 2012. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643811002234> >.

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. **Citocinas: revisão**: Revista brasileira de alergia e imunopatologia. 24: 146-154 p. 2001.

VILELA, A. L. M. **Avaliação dos efeitos antígenotóxicos, antioxidantes e farmacológicos de extratos da polpa do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* CAMB)**. 2009. 188 (Doutorado). Genética e Morfologia, Universidade de Brasília, Brasília.

WERNER, C.; ENGELHARD, K. **Pathophysiology of traumatic brain injury**: Br J Anaesth. 99: 04 - 09 p. 2007.

WILDMAN, R. E. **Nutraceuticals and Functional Foods**. Boca Raton, FL.: CRC Press, 2001. 542.

ZAFFARI, D. **Efeitos da ingestão de erva-mate e chá verde na função endotelial**. 2012. 126 (Doutorado). Ciências da Saúde, Fundação Universitária de Cardiologia/ Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.