



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**NANDRESSA FELIPE NOBRE**

**DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS AO AMARGOR E**  
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE INFUSÕES DE *ILEX***  
***PARAGUARIENSIS***

**FORTALEZA**

**2022**

NANDRESSA FELIPE NOBRE

DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS AO AMARGOR E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE INFUSÕES DE *ILEX*  
*PARAGUARIENSIS*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Química do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Guilherme Julião Zocolo  
Coorientadora: Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

N672d Nobre, Nandressa Felipe.  
Determinação de biomarcadores associados ao amargor e avaliação das atividades citotóxica de infusões de *Ilex paraguariensis* / Nandressa Felipe Nobre. – 2022.  
97 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.

Coorientação: Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos .

1. *Ilex paraguariensis*. 2. Metabolômica. 3. Amargor. 4. Análise Multivariada. I. Título.

CDD 540

---

NANDRESSA FELIPE NOBRE

DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS AO AMARGOR E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE INFUSÕES DE *ILEX*  
*PARAGUARIENSIS*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Química do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Guilherme Julião Zocolo (Orientador)  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Davila Zampieri  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Dionísio  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

A Deus.

Aos meus pais, Narcélio e Lusinete.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Aos meus pais, Narcélio e Lusinete.

Ao meu irmão, Nanderson.

Ao meu marido, Enilton.

Aos meus amigos.

Aos colegas de curso.

Aos colegas do LEQA

Aos colegas do LMQPN.

Ao meu orientador, Dr. Guilherme Zocolo.

À minha coorientadora, Dra. Wladiana Matos.

Ao Dr. Jhonysson Guedes e à Dra. Gisele Silvestre, do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais.

À Msc. Cláudia do Ó Pessoa e à Dr. Maria Francilene Souza Silva, do Laboratório Oncologia Experimental - LOE

A todos os membros da banca.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química.

À Embrapa Agroindústria Tropical.

À Universidade Federal do Ceará.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), órgão de fomento.

## RESUMO

A *Ilex paraguariensis* (erva-mate) é uma planta amplamente consumida e possui uma diversidade interessante de metabólitos secundários, sendo esses, responsáveis por propriedades sensoriais e biológicas da planta. Nesse contexto, a prospecção de metabólitos secundários de interesse, tem na abordagem metabolômica uma ferramenta avançada, apresentando como vantagens a rapidez e a acurácia em relação ao mapeamento químico de um organismo ou sistema biológico. A planta possui três níveis de amargor que podem variar no intervalo de alto, médio e suave, entretanto, pouco se sabe sobre quais moléculas podem ser responsáveis por esse efeito. Quanto as atividades biológicas, estudos envolvendo o seu potencial citotóxico ainda não possuem correlações em relação aos respectivos perfis químicos da planta. Nesse estudo, as variações de amargor, associadas as infusões da mistura de folhas e ramos erva-mate, foram avaliadas por meio da determinação do perfil metabólico baseado na aplicação da técnica de UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>. Foram anotados 15 metabólitos, dentre os quais podemos destacar saponinas, metilxantinas, flavonóides, derivados de ácido caféico e clorogênico, destacando-se o composto sinalpadeído que foi anotado pela primeira vez na *Ilex paraguariensis*. As informações relativas aos perfis metabólicos foram submetidas a análises multivariadas (PCA, HCA, PLS-DA e OPLS-DA), através das quais foi possível estabelecer tentativamente a correlação entre os perfis químicos com as respectivas características sensoriais, determinado assim os biomarcadores responsáveis pelos diferentes níveis de amargor. A partir da junção dos dados de espectrometria de massas em alta resolução e das análises multivariadas, as matesaponinas foram consideradas os biomarcadores responsáveis pelo amargor da erva-mate. Adicionalmente, os metabólitos sinapaldeído e o ácido tricafeoilquínico caracterizaram as amostras de erva-mate de teor suave, sendo essa a primeira vez que esses compostos são tidos como marcadores da erva-mate suave. Os dados relacionados aos biomarcadores de amargor são de grande importância para os sistemas de melhoramento genético da planta, pois podem direcionar a obtenção de cultivares com grau de amargor adequado ao interesse do mercado. Com relação as atividades biológicas, as infusões das folhas e dos ramos da erva-mate foram estudadas separadamente para comparar qual parte da planta possuía a maior atividade citotóxica. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelo método do MTT e foram utilizadas seis linhagens de células tumorais e uma não tumoral. Os resultados dos testes mostraram que as infusões das folhas e dos ramos (separadamente) da *I. paraguariensis* não apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens estudadas, sendo assim não foi possível fazer uma correlação entre essa característica e os metabólitos anotados

no mate. Esses resultados podem ser consequência do uso de apenas água para o preparo do extrato ou dos tipos de células utilizada no trabalho, pois na literatura há relatos de atividade citotóxica para extratos hidroalcoólicos do mate e para linhagens de células diversas das utilizadas. Por fim, os resultados expostos nesse trabalho podem assistir para a implantação de metodologias de fenotipagem avançada que sejam utilizados como ferramentas modernas empregadas aos sistemas de melhoramento genético da erva-mate, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de cultivares como características sensoriais específicas exigidas pelo mercado.

**Palavras-chave:** *Ilex paraguariensis*; metabolômica; amargor; análise multivariada; citotoxicidade.



## ABSTRACT

*Ilex paraguariensis* (yerba mate) is a widely consumed plant and has an interesting diversity of secondary metabolites, which are responsible for the plant's sensory and biological properties. In this context, the prospection of secondary metabolites of interest has an advanced tool in the metabolomics approach, presenting the advantages of speed and accuracy in relation to the chemical mapping of an organism or biological system. The plant has three levels of bitterness that can vary in the range of high, medium and mild, however, little is known about which molecules may be responsible for this effect. As for the biological activities, studies involving its cytotoxic potential still do not have correlations in relation to the respective chemical profiles of the plant. In this study, the variations in bitterness, associated with the infusions of the mixture of leaves and yerba mate branches, were evaluated by determining the metabolic profile based on the application of the UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> technique. Fifteen metabolites were recorded, among which we can highlight saponins, methylxanthines, flavonoids, caffeic and chlorogenic acid derivatives, highlighting the signalpadehyde compound that was recorded for the first time in *Ilex paraguariensis*. The information related to the metabolic profiles were submitted to multivariate analyzes (PCA, HCA, PLS-DA and OPLS-DA), through which it was possible to tentatively establish a correlation between the chemical profiles and the respective sensory characteristics, thus determining the biomarkers responsible for the different levels of bitterness. From the combination of high resolution mass spectrometry data and multivariate analyses, matesaponins were considered the biomarkers responsible for the bitterness of yerba mate. Additionally, the metabolites sinapaldehyde and tricaffeoylquinic acid characterized the samples of yerba mate with mild content, which is the first time that these compounds are considered as markers of yerba mate. Data related to bitterness biomarkers are of great importance for plant genetic improvement systems, as they can guide the obtaining of cultivars with a degree of bitterness suitable for the interest of the market. Regarding the biological activities, the infusions of leaves and branches of yerba mate were studied separately to compare which part of the plant had the highest cytotoxic activity. Cytotoxicity assays were performed using the MTT method and six tumor cell lines and one non-tumor cell line were used. The test results showed that the infusions of leaves and branches (separately) of *I. paraguariensis* did not present cytotoxic activity against the studied strains, so it was not possible to make a correlation between this characteristic and the metabolites noted in mate. These results may be a consequence of the use of only water for the preparation of the extract or of the types of cells used in the work, as in the literature there are reports of cytotoxic activity

for hydroalcoholic extracts of mate and for cell lines different from those used. Finally, the results presented in this work can assist in the implementation of advanced phenotyping methodologies that are used as modern tools used in the genetic improvement systems of yerba mate, especially with regard to the development of cultivars with specific sensory characteristics required by the market.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*; metabolomics; bitterness; multivariate analysis; cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Erva- mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ): árvore da erva-mate (a); sementes de erva-mate (b); muda de erva-mate (c).....	24
Figura 2	– Estrutura química de alguns ácidos fenólicos presentes na erva-mate: a) ácido 3-cafeoilquínico, b) ácido 4-cafeoilquínico e c) ácido 5-cafeoilquínico....	32
Figura 3	– Estrutura química da rutina.....	34
Figura 4	– Estruturas químicas das metilxantinas: a) cafeína, b) teobromina e c) teofilina.....	35
Figura 5	– Saponinas majoritárias da <i>Ilex paraguariensis</i> : a) matesaponina 1, b) matesaponina 2, c) matesaponina 3, d) matesaponina 4, e) matesaponina 5...	37
Figura 6	– Cromatogramas em Base Peak Intensity (BPI) obtidos em modo positivo (ESI <sup>+</sup> ) das infusões de erva-mate nos diferentes níveis de amargor: amarga (a), média(b) e suave (c).....	54
Figura 7	– Estrutura do ácido cafeico, anotado como o pico <b>1</b> .....	55
Figura 8	– Estrutura do 3-O-cafeoilquínico, um dos isômeros do ácido clorogênico, anotado como pico <b>2</b> .....	58
Figura 9	– Estrutura do 5-O-cafeoilquínico, um dos isômeros do ácido clorogênico, anotado como pico <b>3</b> .....	59
Figura 10	– Estrutura do 4-O-cafeoilquínico, um dos isômeros do ácido clorogênico, anotado como pico <b>4</b> .....	59
Figura 11	– Estrutura da cafeína, anotada como pico <b>5</b> .....	60
Figura 12	– Estrutura do ácido 3,4- dicafeoilquínico, isômero do ácido dicafeoilquínico, anotado como pico <b>6</b> .....	61
Figura 13	– Estrutura do ácido 3,5- dicafeoilquínico, isômero do ácido dicafeoilquínico, anotado como pico <b>7</b> .....	61
Figura 14	– Estrutura do ácido 4,5- dicafeoilquínico, isômero do ácido dicafeoilquínico, anotado como pico <b>10</b> .....	61
Figura 15	– Estrutura da rutina, anotada como pico <b>8</b> .....	62
Figura 16	– Estrutura da quercetina 3-O-glucosídeo, anotada como pico <b>9</b> .....	63
Figura 17	– Estrutura do ácido tricafeoilquínico, anotado como pico <b>11</b> .....	63
Figura 18	– Estrutura do sinapaldeído, anotado como pico <b>12</b> .....	64
Figura 19	– Estrutura da matesaponina 3, anotada como pico <b>13</b> .....	65

Figura 20	– Estrutura da matesaponina 2, anotada como pico <b>14</b> .....	65
Figura 21	– Estrutura da matesaponina 1, anotada como pico <b>15</b> .....	66
Figura 22	– Variâncias explicadas individuais e acumuladas das PC's.....	67
Figura 23	– Análise de componentes principais: (a) scores de PC 1 x PC 2; (b) loadings de PC 1 x PC 2; (c) gráfico biplot de PC 1 x PC 2.....	68
Figura 24	– Análise de componentes principais: (a) scores de PC 1 x PC 3; (b) loadings de PC 1 x PC 3; (c) gráfico biplot de PC 1 x PC 3.....	69
Figura 25	– Representação da HCA através de um mapa de calor.....	70
Figura 26	– OPLS-DA: (a) scores da OPLS-DA de todos os metabólitos; (b) loadings da OPLS-DA; (c) gráfico dos valores de VIP.....	73
Figura 27	– Representação gráfica da média do percentual de inibição do crescimento (IC%) das amostras na concentração única de 100 µg/mL.....	74

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Participação do valor de produção dos produtos do grupo alimentícios.....	26
Gráfico 2 – Variação anual do valor de produção dos principais produtos não madeireiros do extrativismo.....	27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Espécies do gênero <i>Ilex</i> L. que ocorrem no Brasil.....	20
Tabela 2	– Descrição e identificação das amostras.....	51
Tabela 3	– Compostos anotados nas infusões das folhas e ramos da <i>Ilex paraguariensis</i> ..	56
Tabela 4	– Média do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras..	74

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
<b>2.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	19
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
<b>3.1</b>	<b>Ilex L</b> .....	20
<b>3.1.1</b>	<b><i>Ilex paraguariensis</i></b> .....	23
<b>3.1.1.1</b>	<b><i>Importância social e econômica</i></b> .....	25
<b>3.1.1.2</b>	<b><i>Erva-mate comercial</i></b> .....	27
<b>3.1.1.3</b>	<b><i>Fitoquímicos da erva-mate e suas propriedades biológica</i></b> .....	29
<b>3.1.1.3.1</b>	<b>Compostos fenólicos</b> .....	31
<b>3.1.1.3.2</b>	<b>Metilxantinas</b> .....	34
<b>3.1.1.3.3</b>	<b>Saponinas</b> .....	36
<b>3.1.1.3.4</b>	<b>Citotoxicidade</b> .....	39
<b>3.2</b>	<b>Metabolômica</b> .....	40
<b>3.2.1</b>	<b>Análise multivariada aplicada à metabolômica</b> .....	45
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	48
<b>4.1</b>	<b>Coleta das amostras</b> .....	48
<b>4.2</b>	<b>Reagentes</b> .....	48
<b>4.3</b>	<b>Preparo da amostra para análise por UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup></b> .....	49
<b>4.4</b>	<b>Análise por UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup></b> .....	49
<b>4.5</b>	<b>Anotação dos compostos</b> .....	50
<b>4.6</b>	<b>Análise multivariada</b> .....	50
<b>4.7</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i></b> .....	51
<b>4.7.1</b>	<b><i>Preparo da amostra</i></b> .....	51
<b>4.7.2</b>	<b><i>Método</i></b> .....	51
<b>4.7.3</b>	<b><i>Análise estatística</i></b> .....	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>5.1</b>	<b>Análise do perfil químico das infusões da <i>Ilex paraguariensis</i></b> .....	53
<b>5.2</b>	<b>Análise quimiométrica</b> .....	66
<b>5.3</b>	<b>Citotoxicidade</b> .....	73

<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>78</b>
	<b>ANEXO A – ESPECTROS DE MASSA EM MS E MS/MS DOS PICOS</b>	
	<b>ANOTADOS.....</b>	<b>93</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Cientificamente chamada de *Ilex paraguariensis*, a erva-mate é uma planta família Aquifoliaceae (HAO et al., 2013; YI et al., 2016a), sendo uma espécie nativa da América do Sul, ela ocorre em países como Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016; RIACHI; DE MARIA, 2017a; SILVANA et al., 2020) Suas folhas e ramos são utilizados no preparo de bebidas como chimarrão, chá mate e tereré (BRACESCO et al., 2011; RIACHI; DE MARIA, 2017a).

A erva-mate possui em sua composição diversas substâncias, sendo as principais: compostos fenólicos, flavonoides, saponinas; alcaloides; além de aminoácidos, minerais, vitaminas hidrossolúveis (ALKHATIB; ATCHESON, 2017; CARDOZO et al., 2021; CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016; GAN et al., 2018b; MATEOS et al., 2018; NEGRIN et al., 2019; RIACHI; DE MARIA, 2017a; TOPPEL et al., 2018; YI et al., 2016a). A literatura infere que esses compostos podem ser responsáveis por diversas propriedades biológicas da planta (BÖTTCHER; DRUSCH, 2017; COLPO et al., 2017; PEREIRA et al., 2017; POZEBON et al., 2015). Sendo assim, é importante o desenvolvimento de estudos que possibilitem a caracterização geral desses compostos, que permita avançar no conhecimento a respeito das características químicas, biológicas e sensoriais da erva-mate. Do ponto de vista sensorial, sabe-se que a erva-mate é comercializada com diferentes níveis de amargor (BIZZOTTO *et al.*, 2012; MAINHART *et al.*, 2010). Assim, é importante saber quais são as moléculas responsáveis por essa característica, ou seja, os biomarcadores relacionados aos diferentes níveis de amargor.

Nesse contexto, a metabolômica alia técnicas de separação a uma ou mais técnicas espectroscópicas/espectrométricas que fornecem informações sobre a estrutura química dos compostos, o que permite a identificação e/ou quantificação dos constituintes de uma amostra, se destacando no estabelecimento dos perfis químicos de um determinado material (JACOBS; VAN DEN BERG; HALL, 2021; KUMAR et al., 2021; PĂUCEAN et al., 2021; VILLATE et al., 2021). A combinação entre a metabolômica e ferramentas quimiométricas possibilita estabelecer a correlação entre os perfis metabolômicos com as respectivas atividades biológicas, determinando assim os biomarcadores responsáveis para uma dada atividade biológica (CANUTO *et al.*, 2018).

Em relação aos aspectos biológicos da erva-mate, estudos citotóxicos podem revelar a funcionalidade da planta frente a linhagens de células tumorais e não-tumorais. Como exemplo desse tipo de estudo, podemos destacar o trabalho de Souza et al. (2015) em que

comparou as atividades biológicas dos extratos das folhas, caule e da planta. Nesse caso, o extrato do caule da erva-mate se mostrou mais eficiente contra as linhagens tumorais do estudo.

Nesse contexto, o presente trabalho se propõe analisar o perfil metabolômico das infusões de erva-mate via UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> com três níveis de amargor (alto, médio e suave), determinar os biomarcadores responsáveis pelo amargor, executar ensaios citotóxicos na tentativa de também correlacioná-los aos biomarcadores presentes na planta.

## 2 OBJETIVOS

Realizar a caracterização química (perfil metabômico) das infusões da erva-mate nos três níveis de amargor (suave, médio e amargo), identificar os biomarcadores responsáveis pelo seu amargor e avaliar a sua citotoxicidade para correlacioná-la aos respectivos perfis químicos da planta.

### 2.1 Objetivos específicos

- Identificar o perfil metabólico das três infusões (suave, média e amarga) da mistura das folhas e ramos da erva-mate por meio da técnica UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>;
- Obter informações a respeito das diferenças e semelhanças entre os perfis químicos das amostras através da aplicação de estatística multivariada PCA, HCA OPLS-DA e S-Plot;
- Avaliar a relação entre os biomarcadores e os níveis de amargor por meio de ferramentas quimiométricas (PCA, OPLS-DA e S-Plot);
- Testar a atividade citotóxica das infusões de folhas e ramos (separadamente) da erva-mate dos diferentes níveis de amargor frente às linhagens tumorais HCT-116 (Carcinoma de cólon - humano), PC3 (Carcinoma de próstata), HL60 (Leucemia promielocítica), SNB-19 (Astrocitoma), B16F10 (Melanoma murinho) e MCF-7 (Carcinoma de mama) e uma não tumoral, L929 (Fibroblasto murinho) e relacionar essa atividade aos perfis químicos da erva-mate.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 *Ilex* L.

O gênero *Ilex* L. faz parte do grupo das plantas angiospermas e é pertencente da família Aquifoliaceae (*AQUIFOLIACEAE IN FLORA DO BRASIL* 2020, 2020; WFO, 2021), sendo o único representante dessa família no Brasil (CABRAL et al., 2018).

*Ilex* L. possui mais de 600 espécies, com 300 na América Tropical, em áreas tropicais e temperadas (*AQUIFOLIACEAE IN FLORA DO BRASIL* 2020, 2020; CABRAL et al., 2018; YAO et al., 2016). Sua distribuição engloba até regiões temperadas dos hemisférios Norte e Sul, com o leste Asiático e a América do Sul sendo seus centros globais de diversidade (LOIZEAU et al. 2016; YAO et al. 2016).

No Brasil, ocorrem 58 espécies do gênero *Ilex* L. (CABRAL et al., 2018), essas estão contidas na Tabela 1. Essas espécies podem ser encontradas em diversos tipos de ambientes nos domínios da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Floresta Atlântica Brasil (CABRAL et al., 2018).

Tabela 1 – Espécies do gênero *Ilex* L. que ocorrem no Brasil (Continua).

<i>Ilex affinis</i> Gardner	<i>Ilex lundii</i> Warm.
<i>Ilex aquifolium</i> L.	<i>Ilex martiniana</i> D.Don
<i>Ilex asperula</i> Reissek	<i>Ilex microdonta</i> Reissek
<i>Ilex auricula</i> S.Andrews	<i>Ilex microphylla</i> Hook.
<i>Ilex blanchetii</i> Loes.	<i>Ilex mucugensis</i> Groppo
<i>Ilex brasiliensis</i> (Spreng.) Loes.	<i>Ilex neblinensis</i> Edwin
<i>Ilex brevicuspis</i> Reissek	<i>Ilex nummularia</i> Reissek
<i>Ilex buxifolia</i> Gardner	<i>Ilex oligoneura</i> Loes.
<i>Ilex cerasifolia</i> Reissek	<i>Ilex organensis</i> Loes.
<i>Ilex chamaedryfolia</i> Reissek	<i>Ilex paltorioides</i> Reissek
<i>Ilex congesta</i> Reissek	<i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.
<i>Ilex conocarpa</i> Reissek	<i>Ilex petiolaris</i> Benth.
<i>Ilex costata</i> Edwin	<i>Ilex phillyreifolia</i> Reissek
<i>Ilex cuiabensis</i> Reissek	<i>Ilex pleurostachys</i> Turcz.
<i>Ilex daphnogenea</i> Reissek	<i>Ilex prostrata</i> Groppo
<i>Ilex daphnoides</i> Reissek	<i>Ilex psammophila</i> Mart. ex Reissek
<i>Ilex diospyroides</i> Reissek	<i>Ilex pseudobuxus</i> Reissek
<i>Ilex diuretica</i> Mart. ex Reissek	<i>Ilex retusa</i> Klotzsch

Tabela 1 – Espécies do gênero *Ilex* L. que ocorrem no Brasil (Conclusão).

<i>Ilex divaricata</i> Mart. ex Reissek	<i>Ilex sapiiformis</i> Reissek
<i>Ilex dumosa</i> Reissek	<i>Ilex sapotifolia</i> Reissek
<i>Ilex euryaeformis</i> Reissek	<i>Ilex schwackeana</i> Loes.
<i>Ilex floribunda</i> Reissek ex Maxim.	<i>Ilex scutiiformis</i> Reissek
<i>Ilex glazioviana</i> Loes.	<i>Ilex spruceana</i> Reissek
<i>Ilex guianensis</i> (Aubl.) Kuntze	<i>Ilex subcordata</i> Reissek
<i>Ilex integerrima</i> (Vell.) Reissek	<i>Ilex suber</i> Loes.
<i>Ilex inundata</i> Poepp. ex Reissek	<i>Ilex taubertiana</i> Loes.
<i>Ilex jenmanii</i> Loes.	<i>Ilex theezans</i> Mart. ex Reissek
<i>Ilex longipetiolata</i> Loes.	<i>Ilex thyrsiflora</i> Klotzsch
<i>Ilex loranthoides</i> Mart. ex Reissek	<i>Ilex trichothyrsa</i> Loes.

Fonte: Adaptado de Aquifoliaceae in flora do Brasil (2020)

O gênero *Ilex* L. consiste em árvores, arbustos ou subarbustos, eretos, raro prostrados (*Ilex prostrata*), dioicos. Folhas alternas, simples, geralmente estipuladas, margem não raro crenada, crenulada, serreada ou denticulada; nervação broquidódroma ou semi-craspedódroma. Inflorescências axilares ou extra-axilares, fascículos, dicásios, tirsos, racemos ou outros tipos, dimorfismo sexual comum. Flores unissexuadas por aborto, diclamídeas, heteroclamídeas, 4-6-meras, actinomorfas, gamossépalas, pétalas alvas, unidas na base, alternas aos lobos do cálice; flores estaminadas com pistilódio, androceu isostêmone, estames livres, alternipétalos, adnatos à base das pétalas; flores pistiladas com estaminódios, ovário globoso até cônico, súpero, sincárpico, carpelos 4-6, lóculos 4-6, óvulos 1 por lóculo, pendentes, placentação axial, estigma (sub)séssil, persistente no fruto. Fruto drupa, globosa a cônica, sulcada, rugosa ou lisa; sementes 4-6, envolvidas pelo endocarpo coriáceo, formando pirenos (AQUIFOLIACEAE IN FLORA DO BRASIL 2020, 2020).

As plantas do gênero *Ilex* possuem uma diversidade de compostos bioativos (GAN et al., 2018a). Segundo Yi et al., (2016), mais de 200 compostos foram selecionados e identificado a partir dessas plantas, incluindo triterpenóides, saponinas triterpenóides, flavonóides, esteróis, polifenóis, ácidos carboxílicos, e ésteres.

Os constituintes dominantes são triterpenoides e suas saponinas. No total, 180 triterpenoides e saponinas triterpenoides foram isolados e identificados das plantas de *Ilex* L. Os triterpenoides são classificados de acordo com a diversidade química dos carbocíclicos, que podem ocorrer comotriterpenoides acíclicos, triterpenoides tricíclicos, triterpenoide tetracíclico, e triterpenoides pentacíclicos. Sendo estes últimos os dominantes, e que incluem os triterpenoides pentacíclico lupaneoides, triterpenoides pentacíclico oleanano, e

triterpenoides ursano pentacíclico. Eles são principalmente presentes nas folhas, cascas e cascas de raízes de plantas em *Ilex L.* Esses compostos são responsáveis pelas atividades de modulação do metabolismo lipídico, anti-obesidade, anti-inflamatórias e bioatividades antimicrobianas (YI et al., 2016).

Em relação aos flavonoides, doze foram isolados das folhas ou raízes de cinco plantas pertencentes ao gênero *Ilex L.*, sendo o flavonóide eriodictiol isolado apenas no respectivo gênero. Em geral, os flavonoides são compostos solúveis em água, apresentam 15 átomos de carbono em seu núcleo principal, com arranjo estrutural de dois anéis benzênicos separados por três carbonos (GUEDES, 2018 SIMÕES et al., 2017). Os flavonoides naturais podem apresentar-se oxigenados ou conjugados com açúcares. Na forma conjugada, chamada de glicosídeos ou heterosídeo, eles são encontrados de duas maneiras: O-heterosídeos (quando a ligação ocorre por intermédio de uma hidroxila) e C-heterosídeos (quando a ligação ocorre através de um átomo de carbono). Em contrapartida, o flavonoide na forma não conjugada, ou seja, sem o açúcar, é chamado de aglicona ou genina, sendo muitas vezes denominado de forma livre (GUEDES, 2018). Nos vegetais, pode-se citar algumas funções das quais os flavonoides são responsáveis: ação antioxidante, inibição de enzimas, controle da ação de hormônios vegetais, proteção contra fungos, bactérias, vírus e insetos (GUEDES, 2018 SIMÕES et al., 2017).

Quanto aos outros compostos, há relatos de treze fenóis isolados das plantas do gênero *Ilex L.*, em que huazhongilexin foi isolada apenas deste gênero. Doze ácidos fenólicos e ácidos graxos, além de quatro esteroides também foram isolados (YI et al., 2016).

As plantas de *Ilex L.* foram amplamente estudadas para uso medicinal antes dos anos 2000, em particular *I. chinensis*, *I. cornuta*, *I. asprella*, *I. pubescens*, *I. pernyi* e *I. rotunda*. Adiante, os estudos foram mais focados em bebidas: *I. latifolia*, *I. kudingcha*, *I. hainanensis*, *I. paraguariensis*, *I. brevicuspis*, *I. vomitoria* e *I. glabra*. De toda a forma, devido à diversidade de compostos presentes em suas matrizes, essas espécies exibiram um amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas, como proteção do sistema cardiovascular e atividades do metabolismo lipídico, atividades antitumoral, antioxidante, antidiabética, antiobesidade, anti-inflamatória e antimicrobiana (YI et al., 2016).

As espécies do *Ilex L.* têm sido utilizadas como drogas hipolipidêmicas tradicionais por um longo tempo. O consumo dessas ervas melhora os parâmetros de lipídios séricos em níveis saudáveis de lipidemia e fornece redução do colesterol LDL, que pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares (YI et al., 2016). O extrato aquoso de *I. pubescens* pode melhorar a citotoxicidade da daunorrubicina na super expressão de células de leucemia P-170 *in vitro*

(DING et al, 2012). Os flavonóides da *I. centrochinensis* são capazes de eliminar radicais livres e possuem ação anti-inflamatória, pois seu grupo hidroxila na posição 4' do anel B desempenha um papel importante (Li et al, 2015).

A *Ilex Paraguariensis* se destaca dentre as espécies da *Ilex L.* que ocorrem no Brasil porque ela é a única considerada ideal para a exploração comercial (BALCH, 2006).

### 3.1.1 *Ilex paraguariensis*

*Ilex paraguariensis* St. Hil, comumente conhecida como erva-mate, é uma espécie nativa da América do Sul, que tem ocorrências nas regiões subtropicais do Uruguai, Argentina, Brasil e Paraguai (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016; RIACHI; DE MARIA, 2017a; SILVANA et al., 2020). No Brasil, a erva-mate se distribui principalmente nos estados de Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Em regiões de maior altitude, como Minas Gerais e São Paulo, também são encontrados, porém a maior parte está localizada na região sul do país (GELSLEICHTER, 2020).

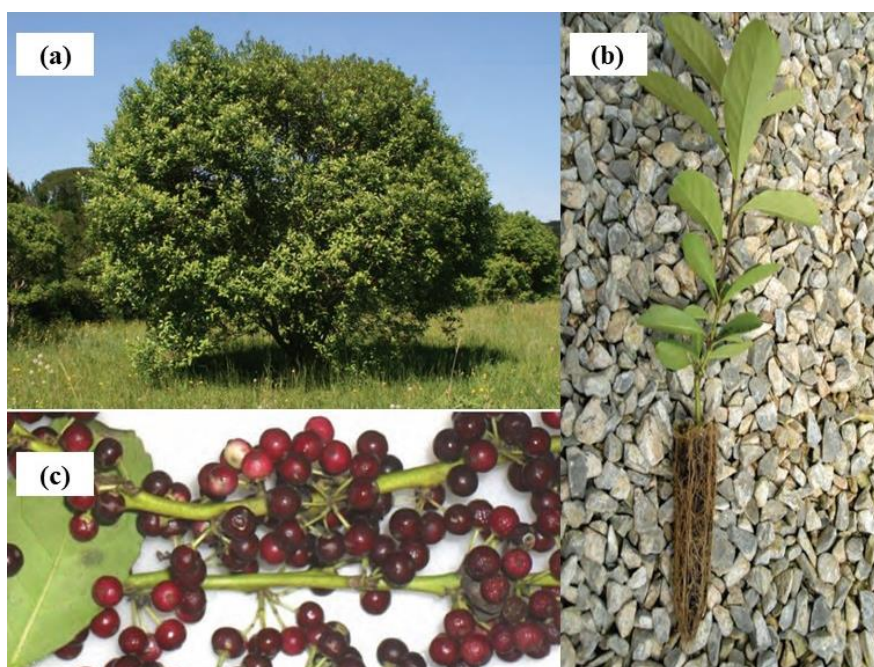
Historicamente, a erva-mate foi utilizada por diferentes tribos indígenas da América do Sul. As suas folhas foram encontradas em túmulos dos andinos e incas e esses povos também a utilizavam na forma de bebida. No Brasil, a planta também já era usada milenarmente. A tribo Guarani, principalmente, a usava em rituais religiosos, infusão em bebidas e com o hábito de mascar. Posteriormente, a erva-mate se tornou o principal produto de exportação em Missões Jesuítas e também foi incorporado pelos imigrantes europeus (MARQUES; DOS REIS; DENARDIN, 2019; STIEBLER et al., 2021).

A erva-mate teve um papel relevante no desenvolvimento de diversas regiões do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina, do Mato Grosso do Sul e, sobretudo, do Paraná. No presente, é o principal produto não madeireiro do agronegócio florestal na Região Sul, sendo uma cultura essencial para a economia de muitos municípios no Sul do Brasil. A produção de erva-mate ocorre em estabelecimentos agropecuários familiares, sendo 80% do total da produção de erva-mate oriunda de propriedades com até 20 hectares, com trabalho majoritariamente familiar (PENTEADO JUNIOR, GOURLART, 2019).

A *I. paraguariensis* é uma planta da divisão angiosperma, da classe dicotiledonae, ordem da Celastrales, da família Aquifoliaceae, gênero *Ilex* e espécie *paraguariensis* (BERTÉ, 2011; HAO et al., 2013a; PAGLIOSA, 2009; SCHIRIGATTI, 2014; YI et al., 2016a). A erva-mate é uma árvore sempre verde (Figura 1 (a)), dioica, tem um crescimento lento, mas pode chegar a possuir de 8 a 15 m de altura. Suas folhas verde-oliva, Figura 1 (b), possuem 8 cm de

comprimento com características perenes, alternadas, coriáceas, abobadas com margens um pouco crenadas e ápice obtuso, e uma base em forma de cunha (BRACESCO et al., 2011; HAO et al., 2013). Os talos da planta têm até 15 mm de comprimento. A *I. paraguariensis* apresenta produz pequenas flores unissexuais com 4 a 8 pétalas brancas esverdeadas que florescem todo o ano entre a primavera e o verão brasileiro, de outubro a dezembro em seu habitat de origem (BERTÉ, 2011; BRACESCO et al., 2011; SCHIRIGATTI, 2014). Os frutos possuem a coloração vermelho de bagas com tamanho de 4 a 6 mm e contém 4 a 5 sementes que podem gerar novas árvores (Figura 1 (c)) (BERTÉ, 2011; BRACESCO et al., 2011). A erva-mate ocorre naturalmente em solos de baixa fertilidade, pH baixo, e com altos teores de alumínio. O solo apto para o cultivo da planta é o da ordem dos latossolos, com coloração avermelhada, alta profundidade, elevado teor de argila, boa permeabilidade, mediana fertilidade com pH ácido em todo o perfil (GELSLEICHTER, 2020; PENTEADO JUNIOR, GOURLART, 2019).

Figura 1 – Erva- mate (*Ilex paraguariensis*): árvore da erva-mate (a); sementes de erva-mate (b); muda de erva-mate (c).



Fonte: Adaptado de Penteado Junior, Goullart (2019).

A região de distribuição natural da erva-mate está localizada entre as latitudes de 22° S e 30° S e longitudes 48 ° 30´ W e 56° 10´ W. No Brasil, a erva-mate ocorre naturalmente em uma área de aproximadamente 540.000 km<sup>2</sup>, o que compreende aos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, extremo Sul de São Paulo e do Mato Grosso do Sul. Nos países vizinhos, a planta é nativa na Província de Misiones, em parte das Províncias de Corrientes e



de Tucumã na Argentina e, no Paraguai, na área situada entre os rios Paraná e Paraguai. Nessas áreas de ocorrência natural da erva-mate ocorrem dois tipos climáticos: clima temperado e clima subtropical, caracterizados por chuvas regulares, bem distribuídas ao longo do ano e com médias de precipitação pluviométrica variando de 1.500 mm a 2.000 mm. A espécie ocorre em altitudes que variam de 500 m a 1.500 m de altitude, onde as temperaturas médias anuais variam de 15 °C a 18 °C e, as geadas variam de frequentes a pouco frequentes, dependendo da altitude (PENTEADO JUNIOR, GOURLART, 2019).

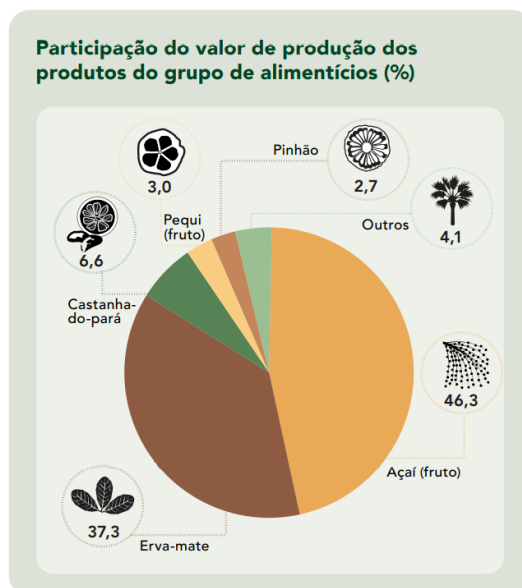
As folhas e os ramos da erva-mate são utilizados tradicionalmente no preparo de bebidas como chimarrão, tereré e chá mate (RIACHI; DE MARIA, 2017a; SILVA et al., 2021). Mas ela também é usada em refrigerante, bebidas energéticas, balas e ingredientes para produtos alimentícios. Na indústria química, é matéria prima na produção de tintas e resinas, medicamentos, desinfetantes, adstringentes, cosméticos e perfumaria (CARDOZO et al., 2021).

### *3.1.1.1 Importância social e econômica*

O Brasil é o maior produtor mundial de erva-mate, seguido da Argentina e do Paraguai (FAO, 2021). A erva-mate teve um papel importante no desenvolvimento de diversas regiões do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina, do Mato Grosso do Sul e, sobretudo, do Paraná (PENTEADO JUNIOR, GOURLART, 2019). O mate possui uma produção extrativista não madeireira e esse tipo de atividade tem grande importância para os povos e comunidades tradicionais, pois contribui para a ocupação da mão de obra e distribuição de renda nas comunidades locais (IBGE,2020). Isso é demonstrado pelo fato de que atualmente essa cultura é fundamental para a economia de muitos municípios no Sul do Brasil, na qual a produção de erva-mate ocorre em estabelecimentos agropecuários familiares, sendo 80% do total da produção de erva-mate proveniente de propriedades com até 20 hectares, com trabalho predominantemente familiar (PENTEADO JUNIOR, GOURLART, 2019).

Em 2020, os produtos extrativos não madeireiros obtiveram crescimento de 18,6% na soma do valor de produção, totalizando R\$ 1,9 bilhão (IBGE,2020). A erva-mate encontra-se especificamente dentro do grupo dos produtos alimentícios, que é o maior entre os não madeireiros da extração vegetal. Esse grupo registrou aumento do valor da produção de 22%, totalizando, R\$ 1,5 bilhão. O mate foi o segundo produto com maior participação de produção dentro do grupo de alimentícios, com 37,3% (Gráfico 1), sendo o açaí o primeiro, registrando 46,3% (IBGE,2020).

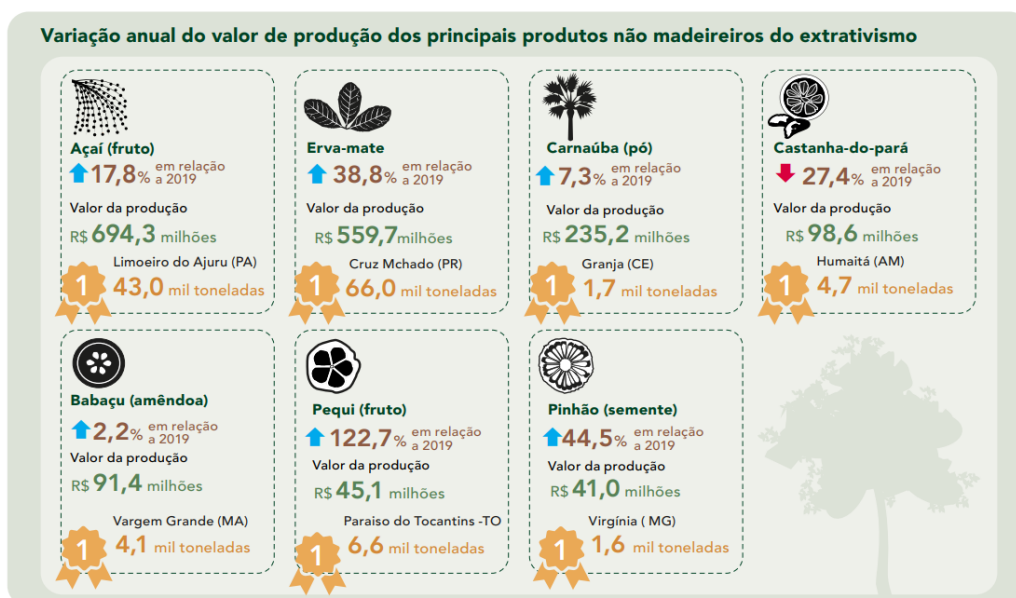
Gráfico 1 - Participação do valor de produção dos produtos do grupo alimentícios.



Fonte: IBGE, 2020.

No ano de 2020, a extração de erva-mate gerou o segundo maior valor da produção entre os não madeireiros, com R\$ 559,7 milhões, registrando um aumento de 38,8% em relação ao ano anterior (Gráfico 2). Esse resultado é reflexo do aumento do valor recebido pelo produtor e a maior quantidade extraída, que atingiu a marca de 426,0 mil toneladas, com crescimento de 14,6% na comparação com o ano anterior. A atividade ocorre majoritariamente na região sul do Brasil, com o estado do Paraná concentrando 87% da produção nacional com aproximadamente 345,9 mil toneladas, enquanto o Rio Grande do Sul comportou 24,8 mil toneladas e Santa Catarina com 23 mil toneladas. No Paraná, estão localizadas as 10 municipalidades que obtiveram a maior produção de erva-mate em 2020, destacando-se Cruz Machado como a de maior volume extraído, com 15,5% do total nacional e com um crescimento de 19,1% em relação ao divulgado anteriormente (IBGE,2020).

Gráfico 2 - Variação anual do valor de produção dos principais produtos não madeireiros do extrativismo.



Fonte: IBGE, 2020.

### 3.1.1.2 Erva-mate comercial

A erva-mate comercial possui uma cadeia produtiva cuja primeira etapa é a colheita. Em até 24h após a colheita as folhas e ramos passam pela etapa de sapeco (branqueamento) que é o estágio primário para a liberação de compostos voláteis (CARDOZO et al., 2021; MAZUR, 2016).

O sapeco é caracterizado como um tratamento térmico em que se tem o contato rápido das folhas da planta com chamas de fogo em fornos rotativos. Esse processo tem a finalidade de reduzir a umidade das folhas e inativar enzimas como a peroxidase e polifenoloxidase. Essas enzimas quando não tem sua atividade enzimática diminuída causam escurecimento das folhas e conferem amargor a bebidas obtidas com o produto desidratado. O prazo para se realizar o sapeco após a colheita é para evitar fermentação, que é favorecida pela umidade e temperatura, garantir características de cor, sabor e aroma no produto final (CARDOZO et al., 2021; MAZUR, 2016).

Após o sapeco é realizada a secagem ou desidratação, 100 °C por aproximadamente 3 horas, que visa reduzir o teor de umidade das folhas de erva-mate para aproximadamente 5% diminuindo, assim, a possibilidade de deterioração microbiana e degradação enzimática dos constituintes nutricionais e químicos (MAZUR, 2016). Segundo alguns estudos, no processo de

secagem do mate há uma diminuição relevante do teor de cafeína. Esse fato pode ser um problema, pois para a maioria das indústrias ervateiras é vantajoso conservar quantidades elevadas de compostos fenólicos e metilxantinas (MAZUR, 2016).

A erva-mate é então triturada, passando a ser chamada de erva-mate cancheada, chamada assim pelo fato de que essa operação inicialmente era realizada em local assoalhado denominado como cancha. Atualmente, é feita em trituradores ou cancheadores, que é a matéria prima para a fabricação da erva-mate para o chimarrão. A erva-mate cancheada é a matéria prima para a fabricação da erva para o chimarrão, do tererê e chá mate verde. Ela é peneirada e misturada em diferentes proporções de folhas e ramos, dependendo do produto esperado. Para a produção do mate para esses produtos, após a mistura, a planta é moída para reduzir a granulometria do material, utilizando moinho de facas ou soque. No caso do chá mate tostado, após a moagem, há a etapa de torrefação (CARDOZO et al., 2021; MAZUR, 2016; SCHIRIGATTI, 2014)

Após esses processos, as folhas secas e moídas e os ramos da erva-mate são usadas no preparo das bebidas chimarrão, chá mate e tereré. No chimarrão, forma mais comum de consumo, é feita infusão a quente das folhas e dos ramos processados. Sendo bebido em uma cuia de porongo (DARTORA, 2010; DORS, 2017). Enquanto no tereré, o mate é ligeiramente torrado e deixado em repouso por aproximadamente 8 meses em local seco para então ser consumido com água fria. Além disso, a partir da infusão das folhas secas e torradas com água fervente é obtido o chá mate (DARTORA, 2010; RIACHI; DE MARIA, 2017a).

Em termos de propriedades biológicas dessas bebidas, segundo o estudo de Mesquita et al. (2021), comparando o chimarrão, o chá mate e o tereré, o chimarrão tem uma composição mais rica em termos de compostos fenólicos e alcalóides purínicos, e melhor atividade antioxidante. Todos os produtos apresentaram propriedades anti-inflamatórias. Na avaliação ansiolítica, embora todos os extratos tenham apresentado algum efeito, o chimarrão e o tereré foram melhores que o chá mate em geral. No estudo de Pinto et al. (2021), para produzir extratos ricos em bioativos de erva-mate, os autores utilizaram folhas secas no forno a 35 ° C e três produtos comerciais diferentes. Os solventes usados foram águas destilada, etanol e água: etanol (1:1 v/v). Nos resultados, o solvente hidroetanólico apresentou os maiores teores de fenólicos totais e flavonóides totais. Adicionalmente, as amostras comerciais mostraram maior concentração de fitoquímicos do que as folhas secas em estufa, apontando que o processamento industrial da erva-mate auxilia na preservação dos teores de fenólicos totais e flavonóides totais, resultando em extratos com concentração superior de fitoquímicos quando comparados com a amostra seca em estufa.

A erva-mate é vendida nas formas moída grossa, tradicional e nativa. Esta última é composta quase unicamente de plantas nativa da erva-mate, colhida no seu habitat natural, e possui um sabor mais suave e menos amargo. A forma tradicional é caracterizada por uma mistura de folhas e ramos da erva-mate nativa e cultivada, o que lhe confere um menor nível de amargor. Enquanto a moída grossa possui um gosto amargo pronunciado, pois a mistura de plantas nativas e cultivadas não são moídas totalmente, permitindo uma maior permeabilidade da água quente entre as partículas de erva-mate (BIZZOTTO *et al.*, 2012; MAINHART *et al.*, 2010).

### 3.1.1.3 Fitoquímicos da erva-mate e suas propriedades biológicas

Os principais fitoquímicos relatados na erva-mate são os compostos fenólicos, tendo como principais representantes o ácido clorogênico e seus derivados; flavonoides, cujos mais comuns são quercetina e rutina; saponinas triterpênicas formadas pelas agliconas dos ácidos leanólicos e ursólicos; alcaloides (metilxantinas); além de aminoácidos, minerais (como cálcio, magnésio, potássio, fósforo), vitaminas hidrossolúveis (ALKHATIB; ATCHESON, 2017; CARDOZO *et al.*, 2021; CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016; GAN *et al.*, 2018b; MATEOS *et al.*, 2018; NEGRIN *et al.*, 2019; RIACHI; DE MARIA, 2017a; TOPPEL *et al.*, 2018; YI *et al.*, 2016a).

Esses compostos são responsáveis pelas propriedades estimulante, antioxidante (BECKER *et al.*, 2019; CEVERINO *et al.*, 2021; COLPO *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2017; POZEBON *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2021), tônica, diurética, anti-inflamatória (CARDOZO *et al.*, 2021; PANZA *et al.*, 2019; ZIEMLEWSKA *et al.*, 2021), ações lipolítica, hipolipidêmica, prevenção da oxidação das lipoproteínas (AVENA *et al.*, 2019; BALSAN *et al.*, 2019; DEROSA; D'ANGELO; MAFFIOLI, 2021), efeito neuroprotetor da *I. paraguariensis* (CITTADINI *et al.*, 2019b; MACHADO *et al.*, 2021).

O estudo conduzido por Machado *et al.* (2021) tinha o objetivo de investigar os efeitos neuroprotetores do extrato hidroalcoólico da erva-mate e avaliar se a cafeína presente nesse extrato exercia efeitos neuroprotetores na toxicidade induzida por um peptídeo beta-amiloide (A $\beta$ ) em *Caenorhabditis elegans*. Os vermes foram tratados com o extrato hidroalcoólico da *I. paraguariensis* ou com cafeína desde o estágio larval até atingirem idade necessária para os ensaios. Os resultados mostraram que tanto o extrato do mate como a cafeína aumentaram a expectativa de vida e pareceram agir diretamente pelo necrófago de espécies

reativas de oxigênio nos vermes e conferiram resistência contra o estresse oxidativo nos animais. Além disso, ambos os tratamentos atrasaram a paralisia induzida por A $\beta$ .

Em um estudo *in vivo* com ratos Wistar machos, foram observadas atividades antioxidantes maiores e redução da peroxidação lipídica no plasma e no cérebro de ratos, respectivamente, que receberam o extrato aquoso da erva-mate (VARGAS et al., 2021).

Calixto et al. (2021) investigaram o impacto do consumo do chimarrão no perfil clínico-patológico de mulheres com câncer de mama atendidas no Hospital do Câncer Francisco Beltrão, Paraná, Brasil por meio da avaliação dos antioxidantes sanguíneos e os perfis de cafeína. Os resultados do trabalho sugerem que o consumo do chimarrão afeta os antioxidantes sanguíneos de pacientes com câncer de mama, e que a cafeína presente nessa mistura pode favorecer o desenvolvimento de tumor de bom prognóstico.

Um nutracêutico contendo *I. paraguayensis*, amora branca e picolinato de cromo acarretou diminuição na glicose plasmática de jejum, glicose pós-prandial e hemoglobina glicada em indivíduos disglicêmicos. Além disso, os resultados também mostraram uma redução no colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos, o que mostra que esse nutracêutico pode ser útil para melhorar o estado glicêmico e o perfil lipídico desses indivíduos (DEROSA; D'ANGELO; MAFFIOLI, 2021)

Tate et al. (2020) demonstram o papel protetor da erva-mate e de seus polifenóis contra a lesão do epitélio pigmentar da retina induzida pelo estresse oxidativo. Os ácidos clorogênicos do mate mostraram uma potencial capacidade de melhorar alguns marcadores relacionados a doenças cardiometabólicas (GEBARA et al., 2021). Quando comparada a capacidade antioxidante de alguns polifenóis presentes na erva-mate (quercetina, rutina, ácidos clorogênico e caféico), a quercetina apresentou a maior atividade antioxidante, seguida da rutina, depois do ácido clorogênico e ácido caféico, que ficaram em um mesmo nível (TESELKIN et al., 2021).

A infusão da erva-mate inibiu significativamente a absorção de ferro em pacientes com hemocromatose hereditária, doença genética caracterizada pelo acúmulo excessivo de ferro que resulta em lesão tecidual, mostrando que a bebida deve ser considerada como um potencial ajudante para o controle da sobrecarga de ferro (PAGLIOSA et al., 2021). No estudo realizado por Camara et al., 2020, vinte e quatro camundongos swiss machos foram cronicamente expostos à fumaça do cigarro de palha de milho enrolado à mão. Essa exposição comprometeu a histoarquitetura pulmonar dos animais, promovendo mudanças estruturais e aumentando o estresse oxidativo nos tecidos. No entanto, o tratamento concomitante com o

extrato de erva-mate regulou o estado redox e reduziu os efeitos prejudiciais da exposição ao fumo nos pulmões.

Em um estudo que avaliou a atividade regenerativa de uma fração polissacarídica da erva-mate usando planária (*Girardia tigrina*) como modelo, na concentração de 10 mg/L a fração polissacarídica melhorou a regeneração da cabeça, faringe e cauda da *G. tigrina*. Adicionalmente, as planárias obtidas no final do experimento eram 22-72% mais altas do que o grupo controle. Esses resultados mostraram que a fração polissacarídica da *Ilex paraguariensis* apresenta grande potencial para melhorar a regeneração de segmentos planários, sugerindo seu potencial uso na regeneração de tecidos (ORSO et al., 2021).

A fração de matesaponina purificada dos frutos verdes do mate induziu a redução de peso, níveis de triglicerídeos e oxidação de glicose em ratos saudáveis alimentados com dieta padrão (RESENDE et al., 2012). As saponinas presentes no extrato hidroalcoólico da erva-mate também tiveram um papel protetor sobre o estado dos rins de ratos Wistar machos (KUROPKA et al., 2021).

A composição química da erva-mate está relacionada a diversos fatores como: estágio evolutivo da planta, época de colheita, características climáticas e do solo, tipo de cultivo, idade da planta, variabilidade genética, luminosidade, parte da planta, armazenamento (BLUM-SILVA et al., 2015; CARDOZO et al., 2021; COLPO et al., 2016; DA SILVEIRA et al., 2016; HOLOWATY et al., 2016; ROSSA et al., 2017; SOUZA et al., 2015). Souza et al. (2015) observaram diferenças no conteúdo de polifenóis dependendo da parte da planta utilizada (planta inteira, folha e caule). Nesse estudo o extrato de folhas apresentou maior quantidade de polifenóis (SOUZA et al., 2015). Ademais, esses fatores também afetam a capacidade oxidante da planta (BLUM-SILVA et al., 2015; CARDOZO et al., 2021; COLPO et al., 2016; DA SILVEIRA et al., 2016; HOLOWATY et al., 2016; ROSSA et al., 2017; SOUZA et al., 2015).

#### 3.1.1.4.1 Compostos Fenólicos

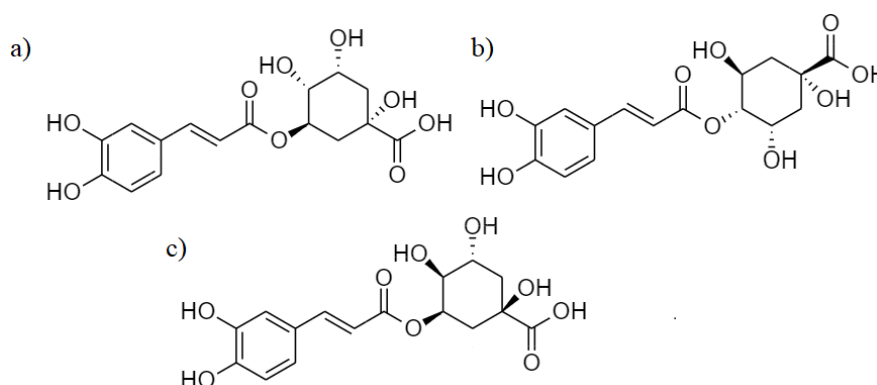
Os compostos fenólicos são os metabólitos secundários mais abundantes nas plantas, tendo com funções biológicas crescimento e desenvolvimento vegetativo; defesa contra herbívoros e patógenos; funções de atrativos de polinizadores ou dispersores de sementes; proteção contra a radiação ultravioleta (ROSSA et al., 2017; LI et al., 2020; TAIZ; ZEIGER, 2013). Além disso, possuem propriedades antioxidantes e efeitos relevantes na prevenção de

várias doenças associadas ao estresse oxidativo, como, por exemplo, o câncer (HAO et al., 2013).

Esses compostos constituem uma classe bastante diversa quimicamente. Estruturalmente, caracterizam-se por possuir pelo menos um anel aromático ligados a um ou mais grupos hidroxilas (GAN et al., 2018; GUEDES, 2018). Os compostos fenólicos podem ser formados por um ou mais anéis benzênicos, ligados a grupos hidroxilas, podendo ainda apresentar como substituintes grupamentos metil, metoxil, amino e monossacarídeos (GUEDES,2018). No grupo dos compostos fenólicos podem ser destacados os flavonoides e ácidos fenólicos (VALDUGA et al., 2019a).

A estrutura básica dos ácidos fenólicos é um anel afenólico e um grupo funcional de ácido carboxílico orgânico (esqueleto C6-C1). Com base na variação do esqueleto natural, os ácidos fenólicos são divididos em duas subclasses: ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico (LI et al., 2020). Segundo Mateos et al., 2018, os ácidos fenólicos representam 90% da composição fenólica total da erva-mate, nos quais os encontrados mais abundantemente foram ácido 3-cafeolquínico, ácido 4-cafeolquínico e ácido 5-cafeolquínico (Figura 2). Esses compostos citados fazem parte das classes de ácidos acilquínicos, também chamados de ácidos clorogênicos. Eles contêm um composto fenólico ligado por meio de uma ligação éster a uma porção de ácido quínico. A ligação é prontamente hidrolisada por esterases presentes na microbiota intestinal, levando à liberação de ácidos fenólicos e quínicos livres (CLIFFORD; KERIMI; WILLIAMSON, 2020).

Figura 2 - Estrutura química de alguns ácidos fenólicos presentes na erva-mate: a) ácido 3-cafeolquínico, b) ácido 4-cafeolquínico e c) ácido 5-cafeolquínico.



Fonte: AUTORA, 2021

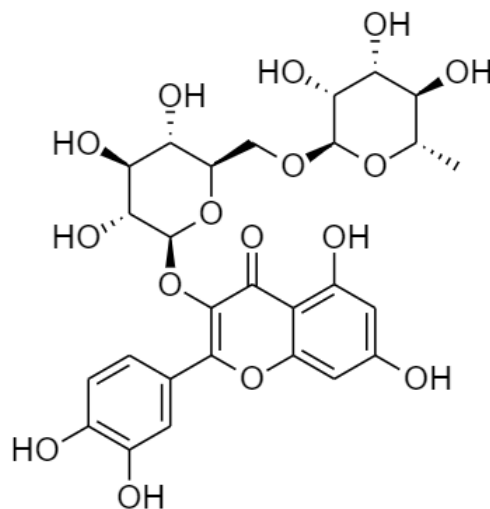
Sabe-se que os ácidos fenólicos têm potenciais antioxidantes, anti-inflamatório e antimicrobiano. Evidências epidemiológicas e estudos randomizados controlados mostram que



a ingestão desses compostos protege eficazmente contra doenças crônicas e relacionadas à idade, como diabetes tipo 2, obesidade, doença cardiovascular e câncer (LI et al., 2020). Estudos mostraram que o ácido clorogênico mitigou o dano cerebral induzido pela lesão de isquemia e reperfusão cerebral, causada pela recuperação do fluxo sanguíneo após acidente vascular cerebral isquêmico, e melhorou o aprendizado e a memória espacial de dos ratos utilizados no modelo. Além disso, o composto atenuou a lesão cerebral induzida pelo estresse oxidativo e a apoptose e inibiu a expressão de proteínas relacionadas à apoptose (LIU et al. 2020). Lodise et al. (2019) investigaram a eficácia dos ácidos dicafeoilquínicos do mate na inibição de células de câncer de próstata. O ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diCQA) foi a molécula mais ativa contra as células de câncer de próstata DU-145 com uma concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) de 5 µM. A molécula também exibiu atividade inibitória em células de câncer de próstata LNCaP e PC-3, sugerindo que tem potencial terapêutico em uma ampla gama de cânceres de próstata. O ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), um dos principais fenóis da erva-mate, mostrou efeito antioxidante nas células endoteliais (WANG et al., 2018).

Os flavonoides são uma importante e ampla classe dos compostos fenólicos. Eles são biossintetizados a partir da via do fenilpropanoides (GUEDES,2018). De forma geral. Os flavonoides apresentam 15 átomos de carbono em seu núcleo principal, com arranjo estrutural de dois anéis benzênicos separados por três carbonos (GUEDES, 2018; DIAS; BUSCARIOLI; LOPES, 2018; SIMÕES et al., 2017). Os flavonoides naturais podem estar oxigenados ou ligados com açúcares (forma conjugada). Na forma conjugada, chamada de glicosídeos ou heterosídeo, eles são encontrados de duas maneiras: *O*-heterosídeos (quando a ligação ocorre por intermédio de uma hidroxila) e *C*-heterosídeos (quando a ligação ocorre através de um átomo de carbono). Em contrapartida, o flavonoide na forma não conjugada, sem o açúcar, é chamado de aglicona ou genina, sendo muitas vezes denominado de forma livre (GUEDES,2018). Nos vegetais, os flavonoides são responsáveis por funções como: ação antioxidante, inibição de enzimas, controle da ação de hormônios vegetais, proteção contra fungos, bactérias, vírus e insetos (GUEDES, 2018 SIMÕES et al., 2017). Recentemente, foi constatado que o ácido clorogênico e a quercentina, um flavonoide, era biodisponíveis e bioativos no cérebro de camundongos de 2 meses de idade. Os compostos atenuaram a neuroinflamação e os danos relacionados ao câncer de pulmão nos animais (CITTADINI et al., 2019a). Na erva-mate, da classe dos flavonoides, a rutina (Figura 3) foi um dos compostos fenólicos predominantes encontrados na planta junto com os ácidos cafeoilquínicos (GAN et al., 2018b; MATEOS et al., 2018).

Figura 3 - Estrutura química da rutina.



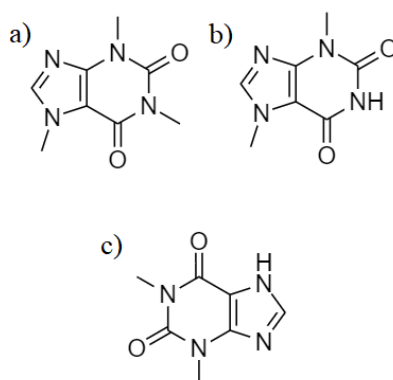
Fonte: AUTORA, 2021

#### 3.1.1.4.2 Metilxantinas

Oriundas da base purina, as metilxantinas (Figura 4) são consideradas pseudoalcalóides e dentro desse grupo estão presentes a cafeína, teobromina e a teofilina (MCLELLAN; CALDWELL; LIEBERMAN, 2016). Esses compostos possuem propriedades pesticidas e são tóxicos para insetos e outros patógenos que podem ser maléficos para as plantas (SCHUSTER; MITCHELL, 2019). Nos humanos, as metilxantinas possuem ações farmacológicas estimulantes do sistema nervoso central; agem sobre os rins, induzindo a diurese; estimulam o músculo cardíaco e relaxam o músculo liso, em particular a musculatura brônquica, diferindo em sua intensidade sobre os diferentes sistemas orgânicos. No entanto, certos cuidados devem ser tomados na ingestão de metilxantinas, pois a medida que a dose é elevada, observa-se um quadro de nervosismo, agitação, tremores e outros sinais de estimulação do sistema nervoso central, sendo possível até a formação de um quadro de intoxicação aguda (GAN et al., 2018b).

Nas espécies *Ilex*, a cafeína é a metilxantina encontrada em maior concentração, seguida pela teobromina. Algumas espécies *Ilex* apresentam traços da teofilina (GAN et al., 2018b). A concentração de metilxantinas totais em 25 amostras de erva-mate variou de 3,69 a 12,7 mg/g, sendo as quantidades de cafeínas e teobromina de 0,001 a 10, 1 mg/g e 0,02 a 55,03 mg/g, respectivamente (MAZUR et al., 2014). De forma geral, a concentração de metilxantinas totais na erva-mate varia de 8,2 a 10,2 mg/g (MATEOS et al., 2018).

Figura 4 - Estruturas químicas das metilxantinas: a) cafeína, b) teobromina e c) teofilina.



Fonte: AUTORA, 2021.

A estrutura da cafeína foi descoberta na última década do século XIX, e é classificada como 1,3,7-trimetilxantina (DIAS; BUSCARIOLI; LOPES, 2018). Está presente em bebidas como o café, chá, guaraná, erva-mate e também se consegue obter a partir da cola. Além disso, encontra-se presente no cacau e seus derivados, em suplementos alimentares e produtos de cuidados para a pele (DIAS; BUSCARIOLI; LOPES, 2018). A cafeína é considerada um composto estimulante, ela confere resistência física, reduz a fadiga e aumenta a atenção e concentração mental. No entanto, pode perder o seu efeito ou causar dor de cabeça quando seu consumo ultrapassa os 200 miligramas diários. A dose letal de cafeína para o ser humano é de cerca de 10 gramas, sendo que uma xícara de café contém cerca de 80 mg de cafeína (DIAS; BUSCARIOLI; LOPES, 2018; DUARTE 2020). Adicionalmente, o consumo de produtos cafeinados é contraindicado em casos de doenças cardiovasculares graves, úlceras, tensão nervosa e insônia (DUARTE,2020) As formas que a cafeína age ainda não são totalmente conhecidas, no entanto o principal mecanismo de ação ocorre através da inibição de receptores de adenosina (RIBEIRO,2013).

O papel das bebidas cefeinadas na eficiência das respostas inflamatórias agudas foi estudado por Alves et al. (2019). Os extratos utilizados foram café, chá preto/verde, erva-mate e guaraná. Todos os extratos diminuíram os níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumentaram os níveis da citocina anti-inflamatória, o que sugere que a bebidas com cafeína podem melhorar a eficiência de um organismo contra processos inflamatórios agudos (ALVES et al., 2019). A deficiência na atividade da enzima mitocondrial metilmalonil CoA mutase leva a uma condição denominada acidemia metilmalônica, que se caracteriza pelo acúmulo de ácidos metilmalônicos (MMA), malônicos (MA) ou outros ácidos orgânicos. A suplementação com ácido caféico e/ou cafeína ofereceram proteção contra alterações prejudiciais associadas à

exposição MMA ou MA em moscas (PORTELA et al., 2021). Algumas pesquisas têm mostrado que as bebidas cafeínadas derivadas de *Ilex paraguariensis* podem diminuir o peso do corpo e possuem grande potencial para o desenvolvimento de drogas anti-obesidade (CARDOZO et al., 2021; GAMBERO; RIBEIRO, 2015) Alguns dos efeitos observados em ratos obesos é a supressão do acúmulo de gordura, redução do tamanho e diferenciação dos adipócitos (CARDOZO et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2018; GAMBERO; RIBEIRO, 2015) .

A teobromina é um alcaloide de forma molecular  $C_7H_8N_4O_2$ . Como produto químico, é um pó branco, pouco solúvel em álcool e água à temperatura ambiente, sendo mais solúvel em água quente. Esse composto causa menos efeito no sistema nervoso central do que a cafeína. Ele afeta o nível de serotonina no organismo e pode ser utilizada como vasodilatador, auxiliando na liberação da urina e na estimulação do coração. Logo, a teobromina é considerada um composto diurético, relaxante muscular e vasodilatador (DIAS; BUSCARIOLI; LOPES, 2018). A teobromina foi apontada como um dos principais marcadores químicos da *I. paraguariensis* (FARIAS et al., 2021). Os resultados obtidos por Farias et al. (2021) sugerem que a erva-mate e os seus principais marcadores químicos possuem fortes propriedades de eliminação de radicais livres, bem como apresentaram importante atividade anti-inflamatória.

#### 3.1.1.4.3 Saponinas

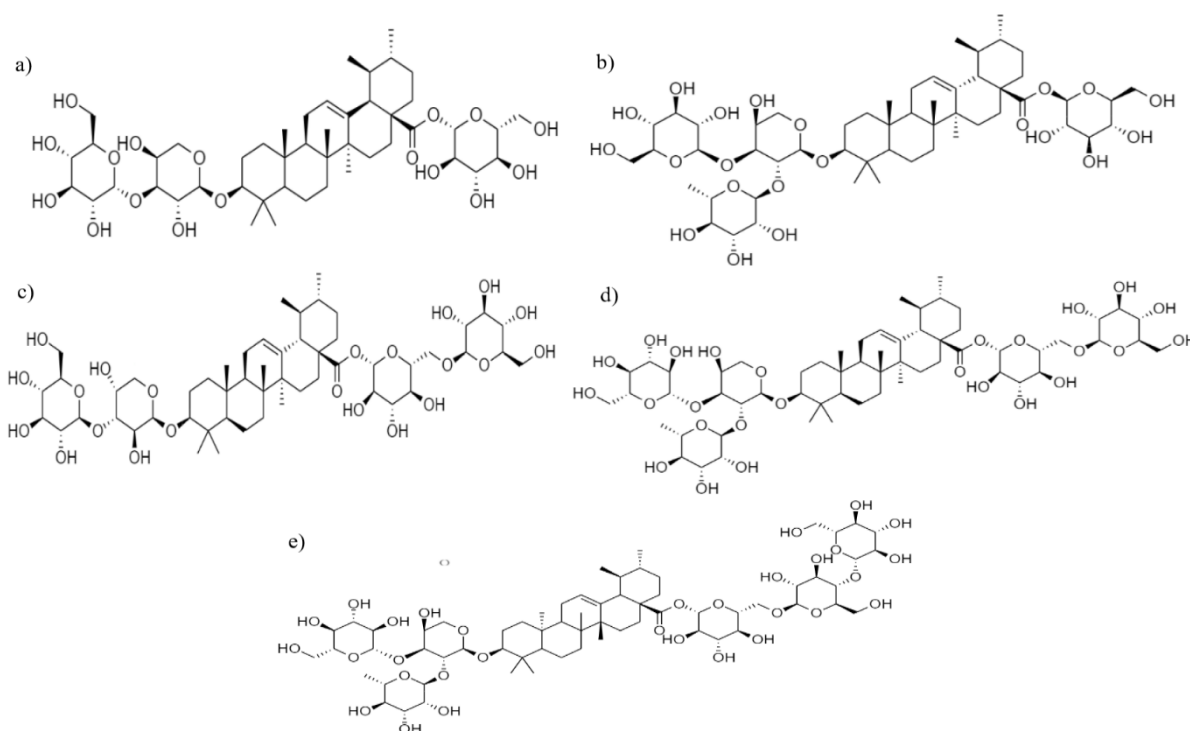
As saponinas são um grupo diverso de metabólitos secundários produzidos principalmente por plantas (BÖTTCHER; DRUSCH, 2017; ELEKOFEHINTI, 2015; VALDUGA et al., 2019b). Esses compostos são conhecidos como surfactantes naturais, usados devido às suas propriedades emulsionantes e farmacológicas (DA SILVA et al., 2018). Além disso, o sabor amargo das plantas é principalmente atribuído as saponinas, essa característica evita que as plantas sejam comidas por animais (BÖTTCHER; DRUSCH, 2017; RIACHI; DE MARIA, 2017b). Entretanto, esses compostos são tóxicos para mamíferos, peixes e insetos quando presentes em altas concentrações (GENG et al., 2021).

Quimicamente, as saponinas são moléculas de alto peso molecular (MATEOS et al., 2017). Sua estrutura é formada por uma aglicona ou sapogenina (triterpeno, esteróide ou alcalóide esteróide) ligada a uma ou mais cadeias de açúcar comumente contendo glicose, galactose, ácido glucurônico, xilose, ramnose ou metilpentose (ELEKOFEHINTI, 2015; MATEOS et al., 2017). Conforme o número de cadeias de açúcar anexadas, as saponinas são classificadas como: monodesmosídicas, com um único cadeia de açúcar ligada por ligação de éter em C-3; bi-desmosídica, com duas cadeias de açúcar ligadas por meio de uma ligação de

éter em C-3 e um éster ligação em C-28 (como saponinas de triterpeno) ou uma ligação de éter em C-26 (como saponinas de furastonol); tri-desmosídico, com três cadeias de açúcar, embora esses compostos sejam raramente encontrados (MATEOS et al., 2017).

Na erva-mate, as saponinas são compostos bidesmosídicos e monodesmosídicos com uma predominância de derivados triterpênicos não iônicos dos ácidos ursólico e oleanólico tendo uma ou duas cadeias de açúcar presas no C-3 e C-28 (MATEOS et al., 2017; VALDUGA et al., 2019b). As estruturas das principais saponinas contidas na *I. paraguariensis*, as matesaponinas, são mostradas na Figura 5. Além das matesaponinas, Souza et al. (2011) caracterizaram 27 novas saponinas na erva-mate, incluindo isômeros nas porções aglicona e /ou glicosila. O teor de saponina na erva-mate pode variar dependendo de fatores como origem genética, variação dentro das espécies, parte da planta que está sendo examinada, ambiente, fatores agrônômicos e tratamentos pós-colheita, como armazenamento e processamento (MATEOS et al., 2017).

Figura 5 - Saponinas majoritárias da *Ilex paraguariensis*: a) matesaponina 1, b) matesaponina 2, c) matesaponina 3, d) matesaponina 4, e) matesaponina 5.



Fonte: AUTORA, 2021.

As saponinas do mate foram consideradas o fitoquímico mais potente para prevenir a inflamação e o câncer de cólon ao inibir a proliferação celular *in vitro*, por meio da modulação

da sintase de óxido nítrico induzível (iNOS)/óxido nítrico (NO) e as vias do ciclo oxigenase 2. As saponinas também induziram à apoptose através da ativação de um caminho de apoptose intracelular (PUANGPRAPHANT; BERHOW; DE MEJIA, 2011). Segundo Gemedede e Ratta (2014), as saponinas reduzem a biodisponibilidade de nutrientes e diminuem atividade enzimática. Elas também afetam a digestibilidade da proteína por meio da inibição de várias enzimas digestivas, como tripsina e quimiotripsina. O extrato de erva-mate e suas frações concentradas de metilxantinas-polifenóis e matesaponinas exibiram um potencial efeito antiobesidade no metabolismo lipídico de ratos Wistar. Os extratos e as frações de erva-mate aumentaram a excreção fecal de lipídios e, ao mesmo tempo, estimularam a adipogênese em tecido adiposo, o que mostrou que as preparações do mate podem reverter totalmente a lipogênese hepática induzida pela dieta rica em gordura (DE RESENDE et al., 2015). Resultados similares foram encontrados por Resende et al (2012) na qual a fração purificada de saponinas da erva-mate induziu a redução de peso da gordura visceral, nos níveis de triglicérides no sangue e na oxidação da glicose do tecido hepático e adiposo em ratos saudáveis alimentados com dieta padrão.

#### 3.1.1.4.4 Citotoxicidade

Outra importante atividade biológica da erva-mate é sua citotoxicidade frente a linhagens tumorais e não tumorais. Segundo Pérez et al. (2014), as folhas da *Ilex paraguariensis* podem restringir a viabilidade de células SW620.

Amigo-Benavent et al., (2017) estudaram os efeitos dos extratos de grão de café verde e erva-mate, seus principais compostos fenólicos (ácido 5-cafeoilquinóico, 5-CQA; ácido 3,5-dicaffeoylquinic, 3,5-DCQA) e metabólitos (ácido ferúlico, ácido cafêico, ácido dihidrocafféico, e ácido dihidroferúlico) juntamente com cafeína na viabilidade e proliferação de diferentes linhagens de células humanas. As linhagens celulares usadas foram células de carcinoma humano do cólon (Caco-2), pulmão (A549), esofágico (OE-33), bexiga urinária (T24) e linhagem celular não cancerígena (CCD-18Co). Como resultados foram obtidos que extrato de erva-mate reduziu significativamente a viabilidade das células cancerígenas em todas as concentrações testadas, as doses mais altas também reduziram a proliferação celular. As doses mais altas de 5-CQA e 3,5-DCQA reduziram a viabilidade celular e a proliferação em todas as células, enquanto ácido ferúlico, ácido dihidrocafféico, e ácido dihidroferúlico tiveram efeitos mais baixos e variáveis. A cafeína não teve efeito. Além disso, baixas concentrações de todos os compostos testados não eram citotóxicos para as células CCD-18Co.

A erva-mate se mostrou um agente promissor par o tratamento do câncer de cólon por ter inibido a proliferação de células CT26 e COLO 205 com valores de IC<sub>50</sub> de 0,25 e 0,46 mg/mL, respectivamente. Os experimentos também mostraram que o mecanismo que o extrato aquoso da erva-mate diminuiu a proliferação celular é por indução de apoptose. Além disso, em um modelo singênico de tumor murino, a administração oral de extrato do mate em uma dose de 1,6 g/kg/dia inibiu significativamente a angiogênese e o crescimento do tumor sem afetar os parâmetros biológicos ou o peso corporal (GARCIA-LAZARO et al., 2020)

A infusão de ervas da *Ilex paraguariensis* se mostrou superior ao chá verde em conteúdo fenólico total, potencial antioxidante, potencial antidiabético e efeito citotóxico em linhagens de células cancerosas (HepG2) (RAMIREZ-MARES; CHANDRA; DE MEJIA, 2004).

Os extratos de erva-mate antes e depois de digeridos *in vitro* apresentaram citotoxicidade contra células câncigeras de fígado humano HepG2 (BOAVENTURA et al., 2015). Enquanto o extrato etanólico de erva-mate obtido por Cuelho et al., 2018, não exibiu citotoxicidade em células de fibroblasto HFF-1 do prepúcio humano recém-nascido.

Mejía et al. (2010) testou chá mate para inibição *in vitro* da proliferação de células de carcinoma do cólon humano (HT-29 e CaCo-2). O chá fresco das folhas de mate mostrou atividade citotóxica dependente da concentração nas células estudadas. Em outro trabalho de Mejia et al. (2005) o extrato aquoso da folha seca do mate também exibiu citotoxicidade dependente da dose contra as linhagens de células escamosas de carcinoma humano (SCC-61 e OSCC-3).

Correa et al., (2017) avaliaram a citotoxicidade de bebidas de erva-mate (chimarrão, tereré e chá mate) submetidas ou não à digestão *in vitro* e fermentação colônica frente a quatros linhagens celulares tumorais humana (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2) e célula não tumorais (PLP2). Anteriormente a digestão *in vitro* e fermentação colônica, todas as bebidas mostraram atividade citotóxica contra células HeLa. Após a digestão e fermentação essa atividade foi levemente afetada. Em relação a célula HepG2, nenhuma bebida, digerida ou não, apresentou citotoxicidade contra ela. A fermentação colônica potencializou a citotoxicidade da bebida do chá mate contra todas as linhas de células tumorais, salvo a HepG2.

Em uma comparação das atividades biológicas dos extratos das folhas, caules e planta inteira da *I. paraguariensis*, O extrato das folhas apresentou a maior atividade antioxidante. O extrato de caule apresentou maior potencial anti-inflamatório e foi o mais potente contra as linhas celulares MCF-7 e HepG2. Os extratos não possuíram citotoxicidade

nas células primárias do fígado suíno, confirmando a ausência de hepatotoxicidade (SOUZA et al., 2015).

Um chá otimizado contendo rooibos fermentados (*Aspalathus linearis*), chá branco (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) e mate torrado (*Ilex paraguariensis*) apresentou, no ensaio de viabilidade celular, um GI<sub>50</sub> para células epiteliais de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) de cerca de 547 µg/mL e 481 µg/mL para HepG2 (SANTOS et al., 2018). Gremski et al. (2019) também otimizaram um extrato aquoso rico em compostos fenólicos e potenciais propriedades funcionais da *Ilex paraguariensis*, *Melissa officinalis* e *Cymbopogon citratus*. O extrato otimizado das ervas não apresentou citotoxicidade para as células de linhagem não tumoral (IMR 90 e A549), mas apresentou na linhagem celular cancerígena (HCT8).

Em relação aos compostos presentes na erva-mate, segundo Puangraphant; Berhow; de Mejia (2011) as saponinas contidas nas folhas de mate inibem a proliferação de células cancerígenas do cólon (HT-29). Além disso, foi investigado as propriedades antioxidantes, antimicrobianas e citotóxicas de um polissacarídeo purificado da erva-mate. O polissacarídeo não apresentou citotoxicidade para quatro linhagens de células humanas tumorais (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2) (KUNDEL et al., 2018).

Apesar da citotoxicidade da erva-mate ser bastante estudada na literatura, ainda não há tentativa de correlação dessa atividade com os respectivos perfis químicos da planta.

### 3.2 Metabolômica

A metabolômica é um campo de pesquisa que cresceu nas duas últimas décadas. Ela estuda, caracteriza e quantifica os metabólitos de um sistema, permitindo uma visão abrangente dos sistemas biológicos ou outros sistemas materiais complexos (JACOBS; VAN DEN BERG; HALL, 2021; OLIVEIRA; SIMIONATO; CASS, 2021; PĂUCEAN et al., 2021; PAUL; DE BOVES HARRINGTON, 2021; PHAM; BEAUCHAMP, 2021). Segundo Păucean et al., 2021, o metaboloma representa todos os compostos de baixo peso molecular (<1500 Da) presentes em uma célula, tecido ou organismo em um momento específico. Dessa forma, a metabolômica propicia informações extensas sobre a composição de um *pool* de metabólitos, para a triagem funcional do estado de uma célula, tecido ou órgão, ou de seu ambiente (PĂUCEAN et al., 2021; SAIA et al., 2019).

A abordagem metabolômica tem uma ampla área de aplicações como pesquisa nas áreas de toxicologia (BONNEFOY et al., 2019; JADHAV et al., 2018; ORTIZ-VILLANUEVA et al., 2018), diagnóstico de doenças (BLAŽENOVIC et al., 2019; PAUL; DE BOVES



HARRINGTON, 2021), farmacêutica (BONNEFOY et al., 2019), ciências ambientais (BONNEFOY et al., 2019; JADHAV et al., 2018; ORTIZ-VILLANUEVA et al., 2018; PAUL; DE BOVES HARRINGTON, 2021), ciências forense (DENG et al., 2020; KUNZELMANN et al., 2018), alimentos e nutrição (WANG; JAYAPRAKASHA; PATIL, 2019), agrícolas, esportes, controle de qualidade de produtos naturais ou análise de organismos patológicos entre outras quimiotaxonomia e para a identificação de novos produtos naturais (BOUFRIDI; QUINN, 2016; CANUTO et al., 2018; FUNARI et al., 2013), por isso as publicações na área estão crescendo nos últimos anos (PAUL; DE BOVES HARRINGTON, 2021).

A metabolômica faz parte das chamadas ciências ômicas, que também tem como representantes a genômica, a transcriptômica e a proteômica (CANUTO et al., 2018; OLIVEIRA; SIMIONATO; CASS, 2021). A metabolômica é uma das mais recentes ciências ômicas, sendo introduzida no início do terceiro milênio (SAIA et al., 2019). Em comparação com as outras abordagens ômicas, os estudos metabolômicos são mais fáceis de relacionar aos fenótipos. O motivo é que as funções das regiões genômicas e das sequências e proteínas expressas podem sofrer regulação epigenética, modificações pós-traducionais e comprometimento da atividade, que dependem da disponibilidade de substrato e cofator. Além do mais, é relevante apontar que as informações genômicas específicas do organismo não são necessárias para as análises metabolômicas (JORGE et al., 2016; SAIA et al., 2019). Além disso, o metaboloma não é apenas o último produto abaixo do genoma, mas também a impressão digital de muitos estressores internos e externos e, portanto, pode explicar melhor do que outros "ômicos" a interação entre os sistemas biológicos e seu ambiente e todas as perturbações relacionadas (VILLATE et al., 2021). Em contrapartida, a metabolômica tem um grande obstáculo que é a diversidade química dos metabólitos, a relação entre cada metabólito com a matriz e as grandes diferenças em abundância de um determinado metabólito. Até hoje, não há uma única tecnologia capaz de abranger todo o metaboloma. Assim, é necessária uma combinação de diferentes técnicas analíticas para se obter uma “cobertura de metabólitos” adequada. (JACOBS; VAN DEN BERG; HALL, 2021; JOHNSON; IVANISEVIC; SIUZDAK, 2016; SAIA et al., 2019). Essas técnicas analíticas serão discutidas posteriormente ainda nesse tópico.

As análises metabolômicas se dividem em duas abordagens principais: metabolômica global (do inglês, *untargeted metabolomics*) e metabolômica alvo (do inglês, *targeted metabolomics*) (CANUTO et al., 2018; OLIVEIRA; SIMIONATO; CASS, 2021; PĂUCEAN et al., 2021). A primeira é baseada na análise abrangente do maior número de metabólitos possível, pertencentes a diversas classes químicas. Essa abordagem fornece o que

se pode-se chamar de dados semiquantitativos, o que significa que as áreas do pico ou a altura são relatadas para cada metabólito em vez de concentrações absolutas, o que possibilita a avaliação da abundância relativa dos metabólitos detectados entre os grupos experimentais e em diferentes condições ou em uma população (OLIVEIRA; SIMIONATO; CASS, 2021). Por outro lado, a metabolômica alvo pode ser definida como a análise quantitativa de um ou mais metabólitos pré-selecionados de determinada classe química, ou que estejam associados a rotas metabólicas específicas (CANUTO et al., 2018; OLIVEIRA; SIMIONATO; CASS, 2021; PĂUCEAN et al., 2021; YI et al., 2016b). Essa determinação quantitativa é feita por meio do uso de padrões analíticos e curvas de calibração (OLIVEIRA; SIMIONATO; CASS, 2021). Tipicamente, a metabolômica alvo é realizada quando os compostos alvo foram previamente estabelecidos como possíveis biomarcadores, por meio da abordagem metabolômica global (NAUSHAD; KHAN, 2014).

Outra classificação das abordagens metabolômica está relacionada ao objetivo definido do estudo. Nesse caso, a metabolômica se divide em discriminativa, informativa e/ou preditiva (PĂUCEAN et al., 2021). As análises discriminativas, juntamente com as análises multivariadas de dados, determinam as diferenças entre as amostras. As análises da metabolômica informativa são realizadas para fornecer informações particulares, como biomarcadores, vias, novos compostos bioativos, etc, sobre os metabólitos. Dessa forma, bancos de dados de metabólitos são desenvolvidos. Na abordagem da metabolômica preditiva, modelos estatísticos sobre os perfis metabólicos são criados para prever variáveis que são difíceis de determinar de outra forma (PĂUCEAN et al., 2021).

A respeito da anotação e identificação de compostos na metabolômica, a International Metabolomics Standards (MSI) reconhece quatro níveis de confiança que são: nível 4 (desconhecido), níveis 2 e 3 (compostos caracterizados/anotados putativamente,) nível 1 (metabólitos identificados) (PĂUCEAN et al., 2021). Com o objetivo de aumentar o nível de confiança na anotação de metabólitos, pesquisadores estão desenvolvendo uma rede de ferramentas molecular e plataformas web com softwares que possibilitam anotação e identificação de compostos. Entretanto, graças ao número extremamente grande de compostos, a anotação completa precisa de ferramentas complementares. Além disso, os esforços dos pesquisadores na bioinformática ajudaram a resolver problemas em alguns campos (por exemplo, proteômica), mas eles ainda estão juntando esforços no campo de pequenas moléculas que precisam de esclarecimento de estrutura (PĂUCEAN et al., 2021; VILLATE et al., 2021).

Nas análises metabolômicas, diversas etapas como preparo da amostra, extração do metabólito, derivatização, separação do metabólito, detecção e tratamento dos dados são

necessárias, mesmo que algumas delas sejam opcionais (PĂUCEAN et al., 2021). Porém, a separação e a detecção são consideradas os estágios mais relevantes e as técnicas mais utilizadas para separação são cromatografia líquida (LC), incluindo alto desempenho (HPLC) e ultra-desempenho (UHPLC), cromatografia gasosa (GC), eletroforese e eletroforese capilar (CE) acoplada com espectrometria de massa (MS), ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria no infravermelho próximo (NIR). Para detecção de metabólitos, frequentemente são usadas ultravioleta (UV), NIR, Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), MS ou técnicas de NMR (JACOBS; VAN DEN BERG; HALL, 2021; KUMAR et al., 2021; PĂUCEAN et al., 2021; VILLATE et al., 2021) .

A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) é a mais utilizada na metabolômica vegetal em razão das propriedades físico-químicas dos metabólitos esperados no metabolismo vegetal, como fitormônios, aminoácidos, oligossacarídeos, etc (GIKA et al., 2019; JORGE et al., 2016; VILLATE et al., 2021). A separação desses compostos é permitida devido à grande quantidade de colunas de separação disponíveis no mercado. Na abordagem da metabolômica global para plantas e na metabolômica alvo de metabólitos importantes, como fitormônios, as colunas de fase reversa são as mais utilizadas (CHU et al., 2017; GHOSSON et al., 2018; GIKA et al., 2019; JORGE et al., 2016; VILLATE et al., 2021).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) fornece maior reprodutibilidade e mais informações estruturais que a LC-MS (JORGE et al., 2016; VILLATE et al., 2021), porém GC-MS requer compostos volatilizáveis e termoestáveis a aproximadamente 350 °C. A maioria dos metabólitos que compõem o perfil metabólico precisam ser derivatizados para que se tornem voláteis a baixas temperaturas. Esse é um processo que pode introduzir erros por perdas por volatilização durante o processo e limita o número de amostras a serem trabalhadas em conjunto (CANUTO et al., 2018; JORGE; MATA; ANTÓNIO, 2016; VILLATE et al., 2021). Desse modo, a técnica GC-MS é usada para determinar fitormônios semivoláteis de baixa abundância ou diversos metabólitos primários após derivatização quando necessário (ALVAREZ-RIVERA et al., 2019; JORGE et al., 2016; VILLATE et al., 2021)

Para separar metabólitos de plantas muito polares e carregados de baixo peso molecular (por exemplo, enzimas, coenzimas, aminas, bases purinas, pequenos ácidos orgânicos e nucleotídeos), a eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS) surge como uma alternativa. Entretanto, a CE-MS quase não é usada na metabolômica (JORGE et al., 2016; JORGE; MATA; ANTÓNIO, 2016; VILLATE et al., 2021)

As técnicas baseadas em espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) são as mais adotadas no perfil metabólico de plantas (JORGE et al., 2016; JORGE; MATA; ANTÓNIO, 2016; PIASECKA; KACHLICKI; STOBIECKI, 2019; VILLATE et al., 2021) . Os principais detectores da HRMS são quadrupolo, tempo de voo (TOF), Transformada de Fourier - Ressonância de Ciclotron Ion (FT-ICR) e espectrômetros de massa Orbitrap. Esses detectores realizam medições de perfil isotópico, têm alta resolução, alta precisão de massa, o que possibilita deduzir a fórmula molecular inequívoca de compostos desconhecidos (ALVAREZ-RIVERA et al., 2019; GHASTE; MISTRICK; SHULAEV, 2016; PIASECKA; KACHLICKI; STOBIECKI, 2019; VILLATE et al., 2021). Os detectores FT-ICR são apontado como tendo o maior poder de resolução, porém possuem uma taxa de aquisição relativamente baixa (JORGE; MATA; ANTÓNIO, 2016; VILLATE et al., 2021)..Os analisadores TOF são os detectores mais comumente usados na área de metabolômica, principalmente quando eles são acoplados a quadrupolos simples (Q-TOF) e hifenados para LC, GC (ALVAREZ-RIVERA et al., 2019; VILLATE et al., 2021). Métodos baseados em LC-qTOF possuem aplicação na identificação de metabólitos primários (GHOSSON et al., 2018; VILLATE et al., 2021), para estudos metabólicos alvo e global de misturas complexas (ALVAREZ-RIVERA et al., 2019; GHOSSON et al., 2018), para a anotação de vários fitormônios (CHU et al., 2017) e identificação de uma grande quantidade de outros metabólitos secundários (ALVAREZ-RIVERA et al., 2019) . Adicionalmente, os equipamentos de GC-qTOF são frequentemente utilizados na análise de poliaminas (JORGE; MATA; ANTÓNIO, 2016) e outros metabólitos voláteis e semivoláteis (ALVAREZ-RIVERA et al., 2019).

A ressonância magnética nuclear é uma técnica robusta e abrangente. Nela a massa necessária de amostra é pequena, há pouca ou nenhuma manipulação da mesma (CANUTO et al., 2018; VILLATE et al., 2021). Além disso, a amostra não é destruída após a análise, mas é contaminada com solventes deuterados. Por outro lado, a NMR precisa de equipamentos de alta resolução e possui baixa sensibilidade e seletividade, com regiões espectrais apresentando sobreposições de sinais, o que compromete a interpretação dos resultados (CANUTO et al., 2018). Desse modo, o uso de NMR na metabolômica é usualmente limitado à impressão digital metabólica (VILLATE et al., 2021).

Além das dificuldades já citadas enfrentadas pela metabolômica, a produção de dados complexos e em grandes quantidades é outra adversidade associada às análises metabolômica. Para tornar possível extrair informações relevantes dos dados, é necessário o emprego de métodos de análises estatísticas como a quimiometria, que tem como objetivo maximizar as informações extraídas de experimentos de forma eficiente e eficaz (FERREIRA,

2015; PAUL; DE BOVES HARRINGTON, 2021; YI et al., 2016b). As análises quimiométricas mais usadas pela metabolômica serão discutidas no subtópico a seguir.

### **3.2.1 *Análise multivariada aplicada à metabolômica***

As análises do tipo univariadas avaliam as variáveis de estudo (entidades ou metabólitos) de forma separada e as relações entre elas são desconsideradas (CANUTO et al., 2018; SUGIMOTO et al., 2012). Em contrapartida, análises multivariadas permitem a classificação e discriminação de entidades ou metabólitos que causam a distinção entre os grupos de amostras e também são usadas para correlacionar um perfil metabólico a uma determinada atividade biológica (CANUTO et al., 2018; FERREIRA, 2015; FUNARI et al., 2013; GUEDES, 2018). As análises multivariadas são divididas em métodos não supervisionados e métodos supervisionados (FUNARI et al., 2013; THEODORIDIS et al., 2012).

São utilizados, inicialmente, os métodos não supervisionados ou exploratórios. Esses têm como objetivo diminuir a dimensão dos dados e proporcionar uma visão geral da separação, formação de conglomerados de dados, chamados *clusters*, e/ou *outliers* (FUNARI et al., 2013; THEODORIDIS et al., 2012). Nos métodos não supervisionados nenhuma informação com relação à identidade das amostras é levada em consideração e os mais utilizados são a análise de componentes principais (PCA, do inglês, principal component analysis) e a análise hierárquica de agrupamentos (HCA, do inglês, hierarchical cluster analysis) (CANUTO et al., 2018; FERREIRA, 2015; FUNARI et al., 2013; PAUL; DE BOVES HARRINGTON, 2021).

Através das análises de HCA e PCA é possível ter uma visualização gráfica de todo o conjunto de dados, mesmo quando o número de amostras e variáveis é alto. Esses algoritmos têm como finalidade aumentar a compreensão do conjunto de dados, examinando a formação ou não de grupos naturais entre as amostras (CORREIA; FERREIRA, 2007). A HCA é adequada para diminuir a dimensionalidade de um grande conjunto de dados, principalmente quando se tem muitos conjuntos de amostras e/ou variáveis (FERREIRA, 2015). Ela reuni as amostras em classes, baseando-se na similaridade dos participantes de uma mesma classe e nas diferenças entre os membros de classes diferentes. O gráfico obtido com a análise de HCA é chamado dendrograma, que é um gráfico bidimensional independentemente do número de variáveis do conjunto de dados (CORREIA; FERREIRA, 2007). A PCA, método não supervisionado mais empregado na metabolômica, consiste em uma manipulação da matriz de

dados com o objetivo de reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original, preservando a maior quantidade de informações (variância) possíveis. Essa redução é feita por meio da criação de um novo sistema de eixos, mais favorável à visualização dos dados, as chamadas componentes principais (PCs) (BOUFRIDI; QUINN, 2016; BRO; SMILDE, 2014; FERREIRA, 2015; PAUL; DE BOVES HARRINGTON, 2021). As PCs são construídas pela combinação linear das variáveis originais e são organizadas em ordem decrescente de importância. Nesse novo sistema de eixos, as coordenadas das amostras são denominadas de “scores” e os coeficientes da combinação linear são chamados de “loadings” (FERREIRA et al., 1999). A escolha adequada do número de componentes principais possibilita utilizar e visualizar toda a informação importante para a análise e eliminar as informações redundantes ou o ruído presente. Desse modo a visualização dos dados neste sistema de novos eixos permite a análise de todas as variáveis simultaneamente em um número menor de fatores (CORREIA; FERREIRA, 2007).

Após os métodos não supervisionados, geralmente, são aplicados os métodos supervisionados, os quais melhoram a separação entre os grupos obtida nas análises exploratórias e permitem entender quais variáveis são causam essa diferenciação (THEODORIDIS et al., 2012). Nesses métodos, uma série de amostras características de cada grupo é selecionada. Os dados experimentais dos grupos e o padrão de cada um dele é estabelecido. Nas análises supervisionadas, as informações sobre as amostras controlam o desenvolvimento dos critérios de diferenciação que serão usados para a constatação e distinção de novas amostras (CORREIA; FERREIRA, 2007). Como principais métodos supervisionados têm-se análise discriminante por mínimos quadrados parciais ou projeção para estruturas latentes (PLS-DA, do inglês, *projection to latent structures* ou *partial least squares discriminant analysis*) e mínimos quadrados parciais ortogonais ou projeções ortogonais para estruturas latentes (OPLS-DA, do inglês, *orthogonal projection to latent structures* ou *orthogonal partial least squares discriminant analysis*) (BOCCARD; RUTLEDGE, 2013; CANUTO et al., 2018; THEODORIDIS et al., 2012).

O método de classificação PLS-DA utiliza a técnica de regressão multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS). A PLS é um método de calibração multivariada que utiliza a técnica de PCA para a redução da dimensionalidade do conjunto de dados para posterior correlação entre os espectros (matriz X) e as propriedades de interesse (matriz Y) (DE SOUZA et al., 2013; PAUL; DE BOVES HARRINGTON, 2021).

Embora as análises de PCA e PLS sejam as mais usadas nas análises dos dados metabolômicos, nem sempre elas são informativas. Isso acontece porque essas ferramentas

usam combinações lineares de variáveis presentes em um conjunto de dados para auxiliar na representação visual da variância, porém normalmente não é possível determinar significado biológico dos resultados. Este empecilho é especialmente relativo ao PCA, que intrinsecamente pondera variáveis com maiores variâncias e gera fatores abstratos que podem não ter relevância biológica. Para lidar com as limitações do PCA e PLS, modificações nos modelos tradicionais foram feitas: as projeções ortogonais (PAUL; DE BOVES HARRINGTON, 2021).

OPLS-DA emprega um filtro de correção de sinal ortogonal a uma regressão PLS para distinguir as variações nos dados que são úteis para a previsão de uma resposta (GUEDES,2018; PAUL; DE BOVES HARRINGTON, 2021; THEODORIDIS et al., 2012). Isso torna o modelo mais fácil de interpretar e melhora sua capacidade preditiva, retirando variâncias não correlacionadas (ruído) (PAUL; DE BOVES HARRINGTON, 2021). Alguns exemplos de aplicações do modelo OPLS-DA são identificação de biomarcadores em misturas complexas (DOS SANTOS et al., 2018; PAUL; DE BOVES HARRINGTON, 2021), síntese de dados em diversos experimentos ômicos (BOCCARD; RUDAZ, 2016; PAUL; DE BOVES HARRINGTON, 2021), detecção precoce de toxinas (PAUL; DE BOVES HARRINGTON, 2021; RUBERT et al., 2017).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas com autorização do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, processo **A8652BE (Processos agroindustriais e produtos alimentícios a partir de recursos florestais nativos)**.

A coleta das amostras de erva-mate foi realizada no município de Barão do Cotegipe-RS (vide as coordenadas abaixo). Foram coletadas ao longo de toda a plantação (amostragem randomizada) um total de 100 folhas de erva-mate separadas de acordo com os respectivos níveis de amargor (suave, médio e amargo). Essas plantas foram selecionadas com base em informações sobre a intensidade de sabor relatadas pelo agricultor e confirmadas pela equipe da Embrapa através de análise sensorial.

As amostras de erva-mate do tipo média foram coletadas segundo as coordenadas 27°35'15.9"S 52°27'14.0"W, coletada em uma área em um remanescente florestal, manejado para cultivo de erva-mate. Amostras de erva-mate amarga: 27°33'50.7"S 52°24'00.3"W, coletada em cultivo de erva-mate. As amostras do tipo suave foram coletadas de acordo com as seguintes coordenadas: 27°34'42.8"S 52°22'47.3"W.

As amostras foram moídas em moinho de bolas e em seguida foram colocadas em estufa a 40 °C para etapa de secagem por um período de 3 dias. Após a secagem as mesmas foram colocadas em sacos plásticos transparentes, devidamente etiquetados e guardadas em local apropriado, protegidas da umidade e luz.

### 4.2 Reagentes

Água ultrapura (resistividade 18.2 MΩ cm) foi obtida a partir de Sistema de Purificação de Água Integral Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Ácido fórmico (pureza ~ 98%), dimetilsulfóxido (DMSO), genisteína, sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT), p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (pNPG), acarbose e glutatona foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Life Science). A acetonitrila (grau LC-MS) foi fornecida pela Tedia (Fairfield, Ohio, EUA). A encefalina leucina foi obtida da Waters (Milford, Massachusetts, EUA). O fosfato de potássio dibásico anidro (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e o carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) anidro foram adquiridos na Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil). O fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) foi obtido na Dinâmica (Indaiatuba, São Paulo, Brasil).



### 4.3 Preparo da amostra para análise por UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>

Após a realização das coletas, primeiramente, foi feita a separação manual das folhas e ramos das amostras secas e cada parte foi moída separadamente em um moedor de café di garno (Cadence). Tendo como objetivo simular o preparo do chimarrão, pesou-se 50 mg de amostra (25 mg de folhas e 25 mg de ramos) de erva-mate em tubos de ensaio com tampa. Nessa massa adicionou-se 4,0 mL de água deionizada por sistema Milli-Q a 80 °C, deixando-a extrair por 30 min (RESENDE et al., 2012). Após esse tempo, 900 µL das soluções foram filtradas em filtro 0,22 µm PTFE. A alíquota filtrada foi coletada em vials, onde também se adicionou 100 µL de padrão interno de genisteína 10 ppm, de modo que a concentração do padrão na solução final fosse 1 mg/L. As infusões foram feitas em quintuplicata e foram armazenadas a -80 °C até serem enviadas para análise no UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.

### 4.4 Análise por UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>

As infusões foram analisadas em um sistema cromatográfico Acquity UPLC (Waters), acoplado a um quadrupolo/tempo de voo (QTOF, Waters). Os ensaios cromatográficos foram realizados em um Water Acquity UPLC BEH (150 mm x 2,1 mm, 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C. O sistema de eluição de gradiente binário consistiu em 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrila (B). As condições de eluição do UPLC foram otimizadas da seguinte maneira: gradiente linear de 2 a 95% B (0-15 min), 100% B (15-17 min), 2% B (17,01 min), 2% B (17,02-19,01 min), fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de amostra de 5 µL.

O perfil químico das amostras foi analisado pelo acoplamento do sistema Waters ACQUITY UPLC ao espectrômetro de massa quadrupolo-tempo de vôo (Q-TOF) (Water, Milford, MA, EUA) com interface de ionização por eletropulverização em modo de ionização positiva (ESI<sup>+</sup>). O modo ESI<sup>+</sup> foi adquirido na faixa de 110-1180 Da temperatura da fonte fixa a 120°C, temperatura de dessolvatação de 350 °C, fluxo de gás de dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. Encefalina leucina foi usada como uma massa de bloqueio. O modo MS utilizou Xevo G2-XS QTOF. O espectrômetro operou com programação MS<sup>E</sup> centroide usando uma rampa de tensão de 20 a 40 V. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

#### 4.5 Anotação dos compostos

Os dados das análises foram processados pelo software MassLynx versão 4.1. Para a comparação dos picos no cromatograma de massa foi utilizada uma tolerância de  $\pm 0,05$  min para o tempo de retenção e  $\pm 0,05$  Da para a massa exata. A partir da ferramenta Elemental Composition do MassLynx, todas as formas moleculares possíveis foram deduzidas (elementos C, H, N, O e tolerância de 10 ppm). Os compostos identificados/annotados apresentam as fórmulas moleculares obtidas via espectros de MS com respectivos valores de erros em parte por milhão (ppm). Por sua vez o estágio MS<sup>2</sup> tornou possível a anotação tentativa das respectivas estruturas químicas em duas dimensões. Os espectros em estágio MS<sup>2</sup> possuem correlação com as rotas de fragmentação. Tais dados foram confrontados com a literatura (Sempre levando em consideração os aspectos quimiotaxômicos no momento da anotação dos picos via desreplicação).

#### 4.6 Análise Multivariada

A análise quimiométrica foi aplicada visando reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados sem perder as importantes informações que estão contidas nos mesmos. Além disso, tem como objetivo avaliar a variabilidade da composição química nos chás de erva-mate de três diferentes teores de amargor, denominados de suave, médio e amargo (GUEDES *et al.*, 2018). Desse modo, com as análises oriundas do UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> foram obtidos 15 cromatogramas (cinco replicatas biológicas de cada conjunto de amostra), os espectros de massas obtidos a partir dos picos cromatográficos foram alinhados e desconvoluidos através do software MarkerLynx XS 4.1 (Waters Corporation, Milford, USA). Em seguida, foram extraídas as alturas correspondentes aos picos cromatográficos e foi construída a matriz quimiométrica através do software Microsoft Office Excel 2016.

Uma vez que a matriz quimiométrica foi construída, ela foi submetida a plataforma online do MetaboAnalyst 5.0 e foi realizada a análise multivariada de acordo com os protocolos estabelecidos por Pang *et al.* (2021). As amostras foram normalizadas pela soma e conjunto de dados foram escalonados por Pareto. Posteriormente, através da plataforma foram concebidas análises quimiométricas não supervisionadas, HCA e PCA e supervisionadas, OPSL-DA.

## 4.7 Ensaios de citotoxicidade *in vitro*

### 4.7.1 Preparo da amostra

Nessa etapa, infusões das folhas e dos ramos da erva-mate foram estudados separadamente. Pesou-se 500 mg de amostra em tubo de ensaio com tampas, adicionou-se 4 mL de água ultrapura a 80°C, deixando extrair durante 1 h. Em seguida, as infusões foram centrifugadas e o sobrenadante foi separado do particulado, esse sendo descartado. O sobrenadante foi, então, seco no ‘speed vácuo’ e, após seco, foi medida a massa seca. Esse extrato seco foi posteriormente usado nos ensaios de citotoxicidade.

As amostras (Tabela 2) foram diluídas em DMSO puro para concentrações de estoque de 20 mg/mL.

Tabela 2 - Descrição e identificação das amostras.

Nº	Código Amostra*	Concentração deteste (µg/mL)
1	FA	
2	FM	
3	FS	
4	RA	100
5	RM	
6	RS	

\*Legenda: F – folha, R – ramo, A – amarga, M – média, S – suave.

Fonte: AUTORA, 2020.

### 4.7.2 Método

A análise de citotoxicidade foi realizada pelo método do MTT (MOSSMAN, 1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As células foram plaqueadas nas concentrações de  $0,7 \times 10^5$  céls/mL (HCT-116, e L929),  $0,1 \times 10^6$  céls/mL (PC3, MCF-7 e SNB-19) e  $0,3 \times 10^6$  céls/mL (HL60). As amostras foram testadas na concentração de 100 µg/mL. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Ao término deste, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante

foi removido. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 100  $\mu$ L de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

#### ***4.7.3 Análise Estatística***

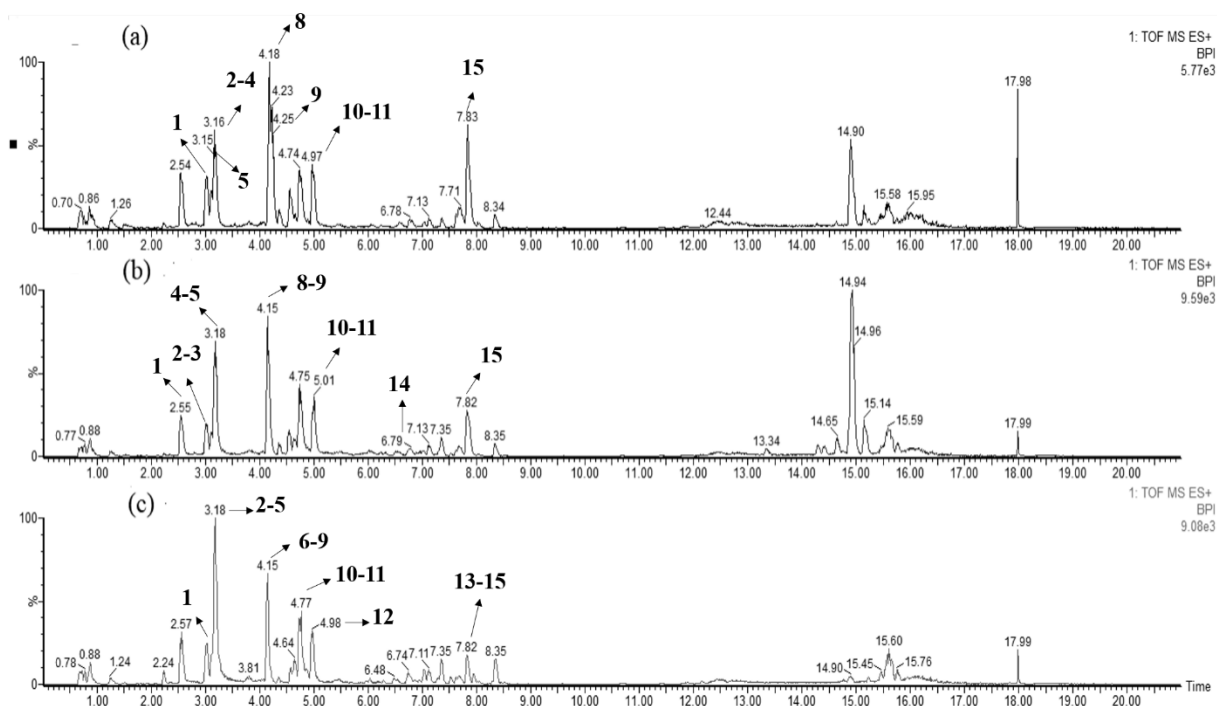
Os experimentos foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism 5.01*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise do perfil químico das infusões da *Ilex paraguariensis*

O perfil químico da mistura das folhas e ramos para as amostras de erva-mate foi estabelecido pela análise dos cromatogramas em modo positivo (ESI<sup>+</sup>) (Figura 6) e os espectros de massa, que se encontram no Anexo A (Figura A-1 – Figura A-15). Na etapa de desreplicação foram utilizados dados de uma extensa revisão bibliográfica no qual foram prospectadas as fórmulas moleculares que deram origem as fórmulas estruturais, onde foram anotados os principais metabólitos presentes na erva-mate em suas diferentes classes de amargor. Para a identificação química dos compostos, foram utilizadas referências bibliográficas de trabalhos que englobaram as características quimiotaxonômicas das amostras, ou seja, os dados foram comparados da mesma espécie, família e/ou gênero da *Ilex paraguariensis*. Ao todo foram identificados/anotados 15 compostos que estão contidos na Tabela 3. A fim de proporcionar uma melhor interpretação, os picos dos cromatogramas foram organizados na Tabela 3 em ordem crescente de eluição. Além disso, nessa está incluso os metabólitos identificados, seus íons protonados [M+H]<sup>+</sup>, os íons fragmentos para os respectivos íons, o erro em partes por milhão (ppm) e sua possível fórmula molecular.

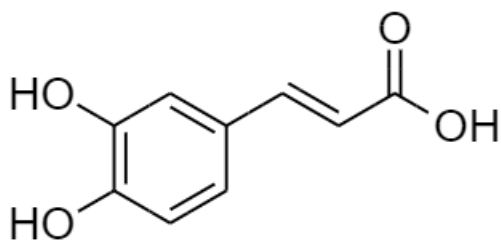
Figura 6 - Cromatogramas em Base Peak Intensity (BPI) obtidos em modo positivo (ESI<sup>+</sup>) das infusões de erva-mate nos diferentes níveis de amargor: amarga (a), média(b) e suave (c).



Fonte: AUTORA, 2020.

O pico **1** ( $t_R = 3,05$  min), Figura 6, apresentou no seu espectro de massa de primeira ordem (MS), Figura A-1, um íon protonado em  $m/z$  181,0501, correspondendo a fórmula molecular ( $C_9H_8O_4$ ), obtida com erro de -0,6 ppm, ressalta-se que a literatura aceita propostas de determinações de fórmulas moleculares em amostras complexas com valores de erros menores ou iguais a 5 ppm (VIJLDER *et al.*, 2017). No espectro de segunda ordem (MS/MS), Figura A-1, a perda de uma molécula de água originou o fragmento 163,0359 Da  $[M+H-H_2O]^+$  (COLPO *et al.*, 2018), as informações de ambos estágios de primeira e segunda ordem nos dão subsídio para a anotação do pico **1**, como sendo, a molécula do ácido caféico, Figura 7.

Figura 7 – Estrutura do ácido cafeíco, anotado como o pico 1.



Fonte: AUTORA, 2021.

Tabela 3 - Compostos anotados nas infusões das folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* (Continua).

Pico	t <sub>R</sub> (min)	[M+H] <sup>+</sup> observado	[M+H] <sup>+</sup> calculado	(MS/MS)	Fórmula molecular	Error (ppm)	Anotação de pico	A	M	S	Referência
1	3,05	181,0500	181,0501	163,0359	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	-06	Ácido caféico	✓	✓	✓	(COLPO et al., 2018)
2	3,20	355,1018	355,1029	135,0393; 145,0311; 163,0389	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-3,1	Ácido 3- <i>O</i> - cafeoilquínico	✓	✓	✓	(ZHU et al., 2009) (WILLEMS et al., 2016)
3	3,21	355,1018	355,1029	135,0447; 145,0286; 163,0390	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-3,1	Ácido 5- <i>O</i> - cafeoilquínico	✓	✓	✓	(ZHU et al., 2009) (WILLEMS et al., 2016)
4	3,31	355,1019	355,1029	135,0405; 145,0409; 163,0364	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-2,8	Ácido 4- <i>O</i> - cafeoilquínico	✓	✓	✓	(ZHU et al., 2009) (WILLEMS et al., 2016)
5	3,46	195,0889	195,0882	138,0663	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	3,6	Cafeína	✓	✓	✓	(RIBEIRO et al., 2019)
6	4,05	517,1357	517,1346	163,0376	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	2,1	Ácido 3,4- dicafeoilquínico			✓	(HECK; SCHMALKO; DE MEJIA, 2008)



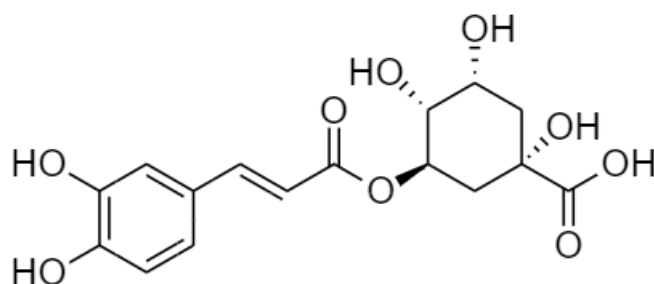
Tabela 3 - Compostos anotados nas infusões das folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* (conclusão)

Pico	t <sub>R</sub> (min)	[M+H] <sup>+</sup> observado	[M+H] <sup>+</sup> calculado	(MS/MS)	Fórmula molecular	Error (ppm)	Anotação de pico	A	M	S	Referência
7	4,08	517,1344	517,1346	163,0377	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	-0,4	Ácido 3,5- dicafeoilquínico			✓	(HECK; SCHMALKO; DE MEJIA, 2008)
8	4,14	611,1616	611,1612	303,0471; 465,1070	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	0,7	Rutina	✓	✓	✓	(ZHU et al., 2009)
9	4,22	465,1032	465,1033	303,0480	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	-0,2	Quercetina 3- <i>O</i> - glucosídeo	✓	✓	✓	(PERES et al., 2013)
10	4,77	517,1346	517,1346	163,0336; 499,1219	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	0,0	Ácido 4,5- dicafeoilquínico	✓	✓	✓	(ZHU et al., 2009)
11	4,78	679,1638	679,1663	163,0336; 517,1385	C <sub>34</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	-3,7	Ácido Tricafeoilquínico	✓	✓	✓	(PERES et al., 2013)
12	5,38	209,0817	209,0814	135,0779; 163,0400	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	1,4	Sinapaldeído			✓	(CHEN et al., 2019)
13	7,80	1075,5693	1075,5689	439,3585; 751,2217; 913,7741	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	0,4	Matesaponina 3			✓	(COLPO et al., 2018)
14	7,81	1059,5769	1059,5740	439,3528	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>21</sub>	2,7	Matesaponina 2		✓	✓	(COLPO et al., 2018)
15	7,88	913,5209	913,5161	439,3583; 589,1970; 751,4364	C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>17</sub>	5,3	Matesaponina 1	✓	✓	✓	(COLPO et al., 2018)

Fonte: AUTORA, 2020

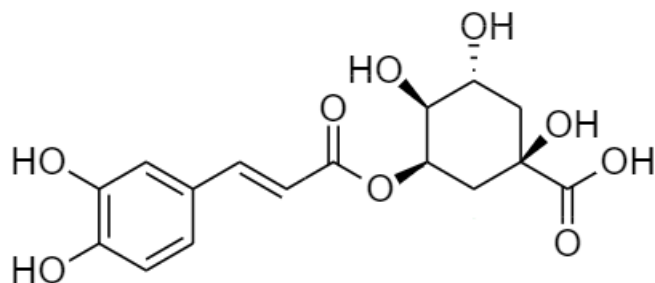
O pico **2** ( $t_R = 3,20$  min), **3** ( $t_R = 3,21$  min) e **4** ( $t_R = 3,31$  min), Figura 6, apresentam nos seus espectros de massas de primeira ordem MS (Figura A-2, A-3 e A-4, respectivamente) os íons protonados  $m/z$  355,1018, 355,1018 e 355,1019, respectivamente. Assim, foram obtidas fórmulas moleculares idênticas para essas massas monoisotópicas e inferiram-se esses compostos eram isômeros do ácido clorogênico, de fórmula molecular  $C_{16}H_{18}O_9$ , com erro de -3,1 ppm. Dado que os compostos possuem íons protonados comuns,  $m/z$  355. O pico **2** apresentou íons fragmentos MS/MS  $m/z$  135,0393, 145,0311, 163,0389 (Figura A-2). O pico **3** apresentou fragmentos MS/MS  $m/z$  135,0447, 145,0286, 163,0390 (Figura A-3). Enquanto o pico **4** apresentou fragmentos MS/MS  $m/z$  135,0405, 145,0409, 163,0364 (Figura A-4). Nesse caso, em se tratando de isômeros, a determinação dos tempos de retenção picos, foi determinada de acordo com a ordem de eluição atribuída pelas ordens de eluição encontradas na literatura. O pico **2** foi anotado como o ácido 3-*O*-cafeoilquínico, Figura 8, o pico **3** foi proposto como ácido 5-*O*-cafeoilquínico, Figura 9, e o pico **4** como ácido 4-*O*-cafeoilquínico, Figura 10, (WILLEMS *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2009). O fragmento  $m/z$  163 correspondeu a uma molécula de ácido caféico desidratada. Os fragmentos  $m/z$  145 e 135 advém do  $m/z$  163 e são consequências das perdas neutras de água e monóxido de carbono, respectivamente (WILLEMS *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2009).

Figura 8 - Estrutura do 3-*O*-cafeoilquínico, um dos isômeros do ácido clorogênico, anotado como pico **2**.



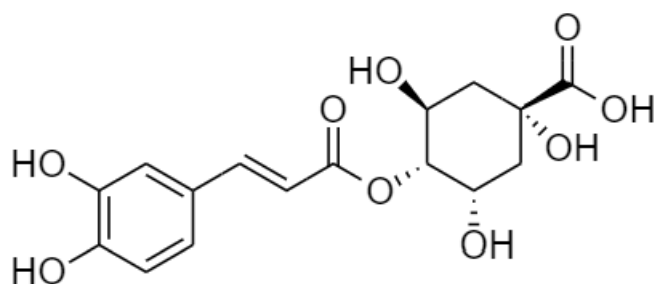
Fonte: AUTORA,2021.

Figura 9 - Estrutura do 5-*O*-cafeoilquínico, um dos isômeros do ácido clorogênico, anotado como pico **3**.



Fonte: AUTORA,2021.

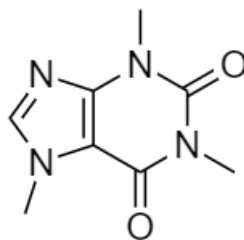
Figura 10 - Estrutura do 4-*O*-cafeoilquínico, um dos isômeros do ácido clorogênico, anotado como pico **4**.



Fonte: AUTORA,2021.

O pico **5** ( $t_R = 3,46$  min), Figura 6, apresentou no seu espectro de massa de primeira ordem (MS), Figura A-5, um íon protonado de  $m/z$  195,0885, os dados de MS forneceram a respectiva fórmula molecular  $C_8H_{10}N_4O_2$ , com erro de 3,6 ppm. Por sua vez o espectro de segunda ordem, Figura A-5, a presença de um íon fragmento MS/MS 138,0663 Da, esse íon produto principal correspondeu à perda de  $C_2H_3NO$ , esse fragmento característico da fragmentação causada pela dissociação em fase gasosa da cafeína, Figura 11, esse resultado é também corroborado pelo trabalho de Pellegrine e colaboradores (2007). A cafeína também foi identificada na espécie em estudo (RIBEIRO *et al.*, 2019).

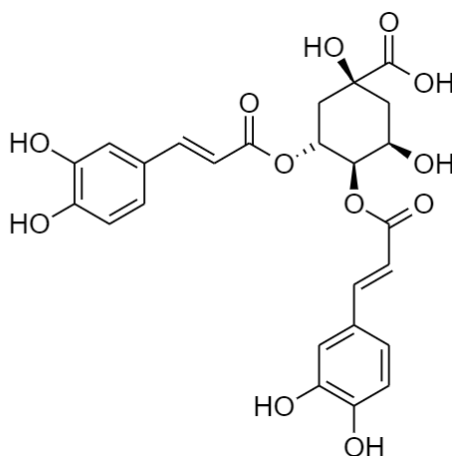
Figura 11 – Estrutura da cafeína, anotada como pico **5**.



Fonte: AUTORA, 2021.

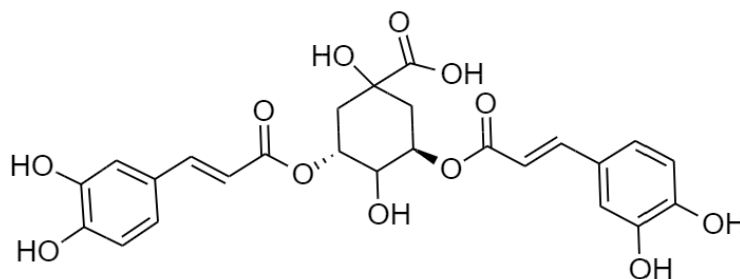
Os picos **6** ( $t_R = 4,05$  min), **7** ( $t_R = 4,08$  min) e **10** ( $t_R = 4,77$  min), Figura 6, apresentaram nos seus espectros de massas MS (Figuras A-6, A-7 e A-8, respectivamente) os íons protonados  $m/z$  517,1357, 517,1344 e 517,1346, respectivamente. Logo, foram obtidas fórmulas moleculares ( $C_{25}H_{24}O_{12}$ ) iguais para essas massas monoisotópicas, com erros de 2,1, 0,4 e 0,0 ppm, respectivamente. Deduziu-se que esses compostos eram isômeros do ácido dicafeoilquínico, pois os compostos possuem íon molecular comum,  $m/z$  517  $[M+H]^+$ . O pico **6** apresentou fragmento MS/MS  $m/z$  163,0376, Figura A-6. O pico **7** mostrou fragmento MS/MS  $m/z$  163,0377, Figura A-7, enquanto o pico **10** apresentou fragmentos 163,0336 Da e 499,1219 Da, Figura A-8. De acordo com a ordem de eluição da literatura, os picos **6**, **7** e **10** foram anotados, respectivamente, como: ácido 3,4- dicafeoilquínico, Figura 12, ácido 3,5- dicafeoilquínico, Figura 13, e ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico, Figura 14 (HECK;SCHMALKO; DE MEJIA, 2008; ZHU *et al.*, 2009). Assim como nos ácido cafeoilquínicos, os fragmentos  $m/z$  163 é relacionado ao grupo cafeoil (ácido caféico pelaperda de uma molécula de água). Já o fragmento  $m/z$  499 corresponde à perda de uma molécula de  $H_2O$  do ácido dicafeoilquínico (ZHU *et al.*, 2009). Os compostos **6** e **7**, foram anotados, apenas na erva-mate do tipo suave.

Figura 12 – Estrutura do ácido 3,4- dicafeoilquínico, isômero do ácido dicafeoilquínico, anotado como pico 6.



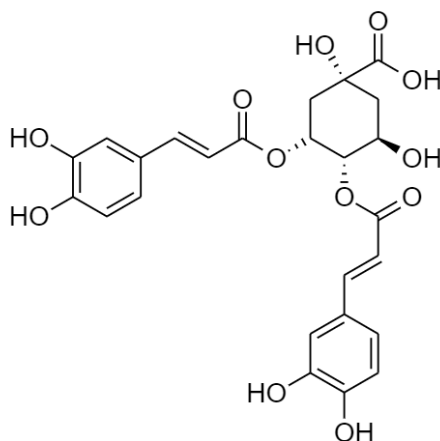
Fonte: AUTORA, 2021.

Figura 13 – Estrutura do ácido 3,5- dicafeoilquínico, isômero do ácido dicafeoilquínico, anotado como pico 7.



Fonte: AUTORA, 2021.

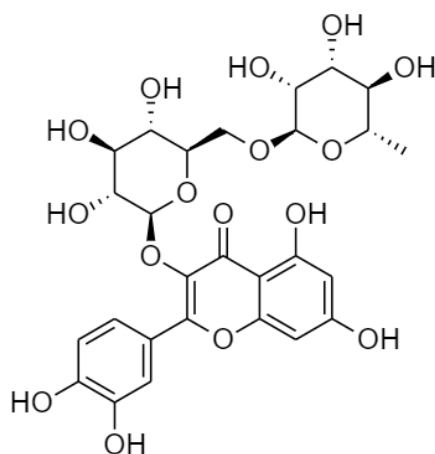
Figura 14 – Estrutura do ácido 4,5- dicafeoilquínico, isômero do ácido dicafeoilquínico, anotado como pico 10.



Fonte: AUTORA, 2021.

O pico **8** ( $t_R = 4,14$  min), Figura 6, apresentou íon protonado de  $m/z$  611,1616, Figura A-9, além disso, verificou-se a presença de fragmento MS/MS 303,0471 Da (Figura A-9)  $[M+H-146-162]^+$  (quercetina) a sucessivas perdas neutras de grupos ramnosídeo e de glicose. O íon fragmento  $m/z$  465,1070 corresponde a perda neutra do grupo ramnosídeo  $[M+H-146-162]^+$ . Todos esses dados permitem anotar o pico **8** como o composto rutina, Figura 15 (ZHU *et al.*, 2009).

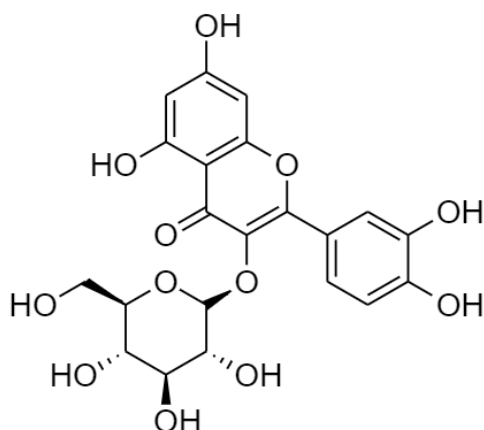
Figura 15 – Estrutura da rutina, anotada como pico **8**.



Fonte: AUTORA, 2021.

O pico **9** ( $t_R = 4,22$  min), Figura 6, apresentou no seu espectro de massa (Figura A-10) um íon protonado  $m/z$  465,1032, fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_{12}$  e erro de -0,2 ppm. Os espectros de massa de segunda ordem, Figura A-10, apresentaram fragmento MS/MS 303,0480 Da, indicando a perda neutra de uma unidade de glicose  $[M+H-162]^+$ , pela literatura, foi possível anotar o pico como sendo a molécula de quercetina 3-*O*-glucosídeo, Figura 16 (PERES *et al.*, 2013).

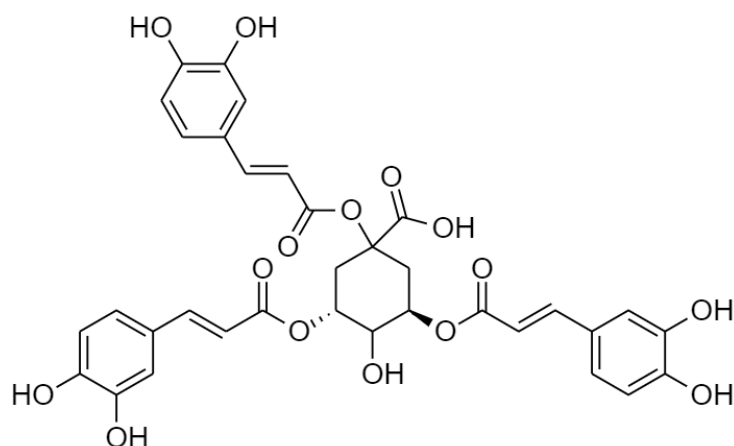
Figura 16 – Estrutura da quercetina 3-*O*-glucosídeo, anotada como pico **9**.



Fonte: AUTORA, 2021.

O pico **11** ( $t_R = 4,78$  min), Figura 6, apresentou no seu espectro de massa MS, Figura A-12, um íon protonado  $m/z$  679,1638, com respectiva fórmula molecular  $C_{34}H_{30}O_{15}$ , erro de -3,7 ppm. No estágio de segunda ordem (Figura A-12), observou-se fragmentos em MS/MS de 163,0336 Da, 517,1385 Da. De acordo com os dados apresentados, a anotação para o pico **11** foi o ácido tricafeoilquínico, Figura 17. O fragmento em  $m/z$  517,1385 pode ser atribuído a perda do ácido tricafeoilquínico com uma perda de uma molécula desidratada de ácido cafeíco  $[M+H-\text{ácido cafeíco}-H_2O]^+$ . Essa, por sua vez, corresponde ao fragmento em  $m/z$  163,0336 (PERES *et al.*, 2013).

Figura 17 – Estrutura do ácido tricafeoilquínico, anotado como pico **11**.

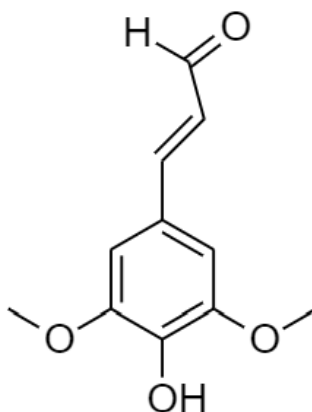


Fonte: AUTORA, 2021.

O pico **12** ( $t_R = 5,38$  min), Figura 6, apresentou íon protonado  $m/z$  209,0817, Figura A-13, na análise do espectro de massa em primeira ordem MS, obteve-se a fórmula molecular ( $C_{11}H_{12}O_4$ ) com erro de -3,7 ppm. Os íons fragmentos MS/MS, Figura A-13, obtidos em  $m/z$

135,0779, 163,0400 corroboram a proposta de anotação do composto como sinapaldeído, Figura 18. Esse composto foi anotado apenas na erva-mate suave, trata-se de um fenilpropanóide e não há relatos dele na *I. paraguariensis*, mas já foi identificado na *Ilex rotunda* Thunb. (CHEN *et al.*, 2019), portanto, anotado pela primeira vez na espécie em estudo.

Figura 18 – Estrutura do sinapaldeído, anotado como pico **12**.

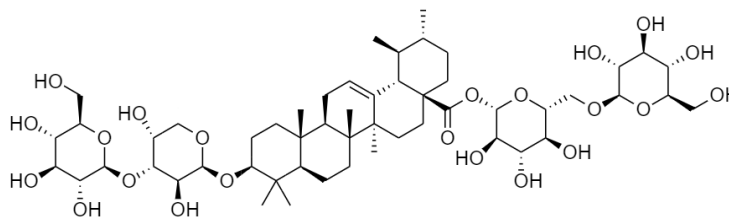


Fonte: AUTORA, 2021.

O pico **13** ( $t_R = 7,80$  min), Figura 6, apresentou no seu espectro de massa MS, Figura A-14, um íon protonado 1075,5693, fórmula molecular  $C_{53}H_{86}O_{21}$ , com erro de 0,4 ppm. Os espectros obtidos em MS/MS, Figura A-14, demonstraram fragmentos em 439,3585 Da, 751,2217 Da e 913,7741 Da. De acordo com os fragmentos e a ordem de eluição da literatura, o pico **13** foi proposto como matesaponina 3 (Figura 19), sendo anotado na erva-mate suave. De acordo com a literatura o fragmento  $m/z$  913,7741 é decorrente da perda de uma glicose  $[M+H-Glc]^+$ , o fragmento  $m/z$  751,2217 é proveniente da perda de duas glicose  $[M+H-2Glc]^+$  e o fragmento  $m/z$  439,3585 provém da perda de três glicoses e uma arabinose  $[M+H-3Glc-Ara]^+$  (COLPO *et al.*, 2018).



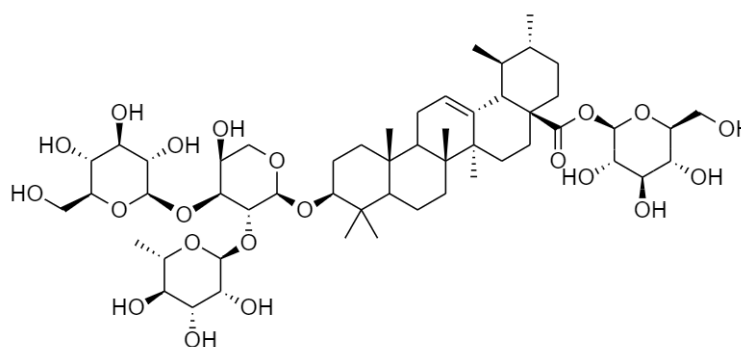
Figura 19 – Estrutura da matesaponina 3, anotada como pico **13**.



Fonte: AUTORA, 2021.

O pico **14** ( $t_R = 7,81$  min), Figura 6, apresentou no seu espectro de massa MS, Figura A-15, um íon protonado 1059,5769, fórmula molecular  $C_{53}H_{86}O_{21}$  com erro de 2,7 ppm. No estágio de segunda ordem, Figura A-15, obteve-se fragmento em MS/MS 439,3528 Da. De acordo com a literatura, o pico **14** também se trata da matesaponina 2, Figura 20, e foi anotada na erva-mate do tipo amarga e suave. O fragmento  $m/z$  439,3528 pode ser atribuído a perda de duas glicoses, uma ramnose e uma arabinose  $[M+H-2Glc-Rha-Ara]^+$  (COLPO *et al.*, 2018)

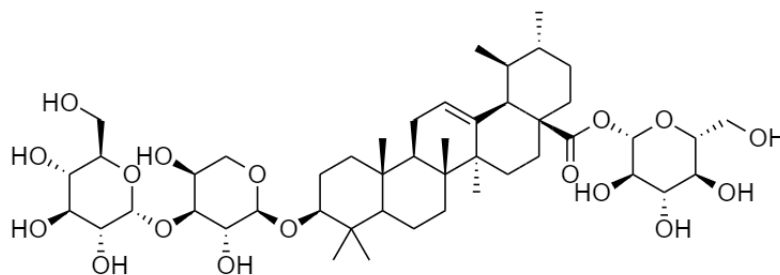
Figura 20 – Estrutura da matesaponina 2, anotada como pico **14**.



Fonte: AUTORA, 2021.

O pico **15** ( $t_R = 7,87$  min), Figura 6, apresentou no seu espectro de massa MS (Figura A-16) um íon protonado 913,5209 Da com a respectiva fórmula molecular  $C_{47}H_{76}O_{17}$  e erro associado de 5,3 ppm. Foram observados os fragmentos MS/MS, Figura A-16,  $m/z$  439,3583, 589,1970, 751,4364. Pela literatura, opico **15** pode ser anotado como matesaponina 1, Figura 21. Em que o referido fragmento pode ser imputado a perda de duas glicoses e uma arabinose  $[M+H-2Glc-Ara]^+$  (COLPO *et al.*, 2018).

Figura 21 – Estrutura da matesaponina 1, anotada como pico 15.



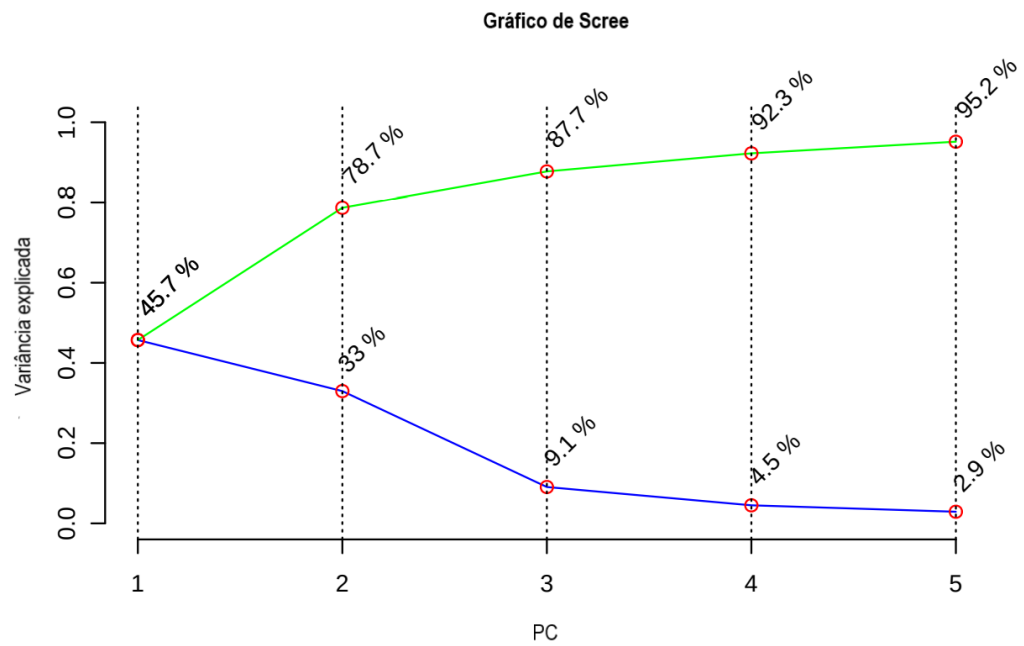
Fonte: AUTORA, 2021.

Como mostrado na Tabela 3, dos quinze compostos anotados, quatro foram constatados apenas na erva-mate suave: ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, sinalpadeído e matesaponina 3. Apenas a matesaponina 2 foi observada na erva-mate suave e média, mas não na amarga. Como comentado anteriormente, a composição química da erva-mate pode variar devido a vários fatores como o estágio evolutivo da planta, época de colheita, características climáticas e do solo, tipo de cultivo, idade da planta, dentre outros (BLUM-SILVA *et al.*, 2015; COLPO *et al.*, 2016; DA SILVEIRA *et al.*, 2016; HOLOWATY *et al.*, 2016; ROSSA *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2015). O fato de a planta ser nativa ou cultivada também influencia nos seus níveis de amargor (BIZZOTTO *et al.*, 2012; MAINHART *et al.*, 2010), logo essa diferença entre as amostras de erva-mate suave, média e amarga pode decorrer de algum desses aspectos.

## 5.2 Análise quimiométrica

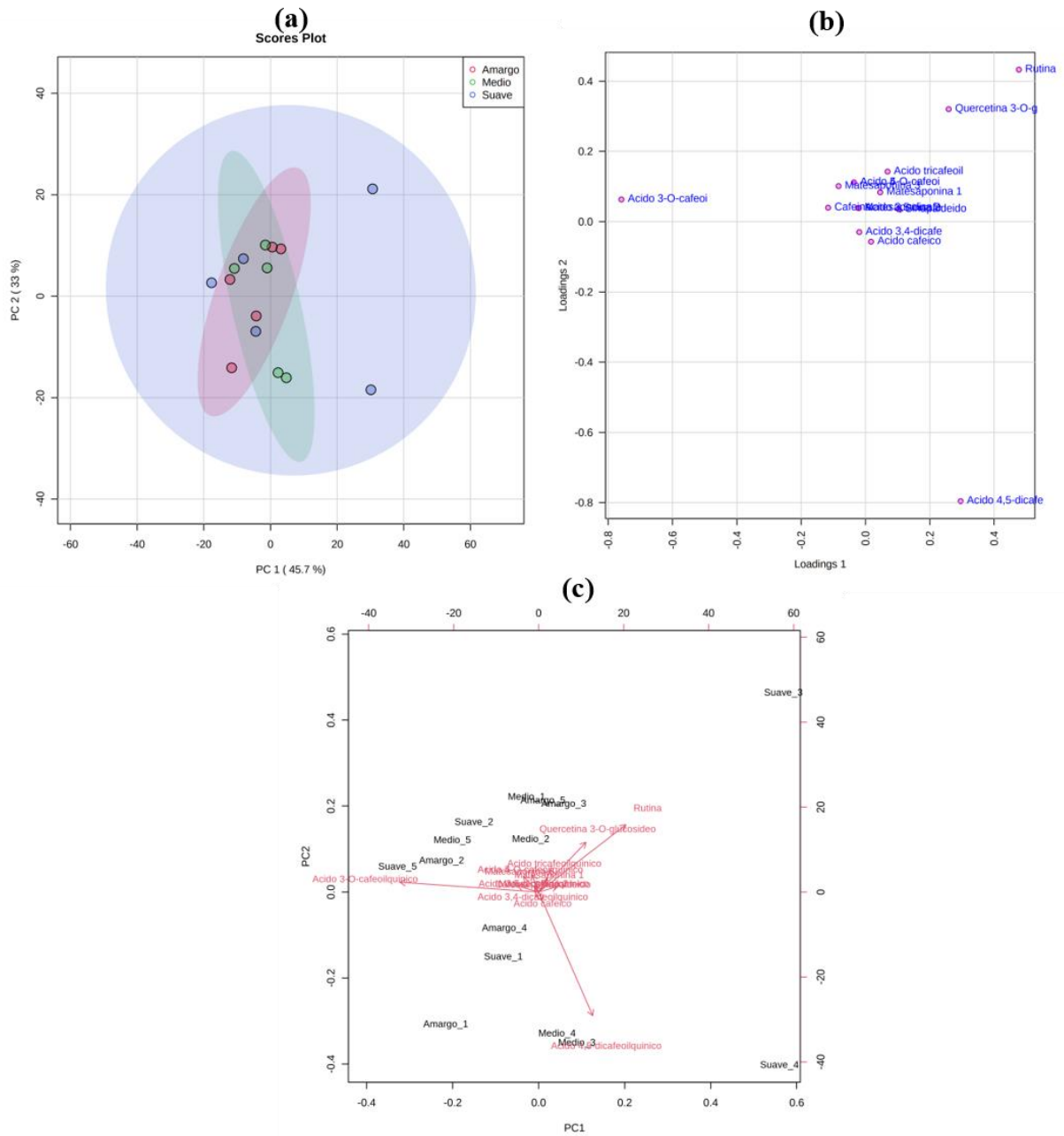
Em relação as análises multivariadas, a interpretação dos dados é iniciada com a aplicação da análise de componentes principais (PCA). Na Figura 22, pode-se observar que a soma das PC1, PC2 e PC3 apresentam uma variância explicada de 87,7%. Na Figura 23 e 24 é possível verificar a PCA oriunda das distintas amostras de erva-mate. Além disso, na Figura 23 (a) e (b) tem-se a representação gráfica dos scores e loadings, respectivamente, para a primeira e segunda componente principal. Entretanto, é perceptível que não houve uma boa separação nessas duas PC's e não é possível obter informações relevantes acerca das amostras. Por outro lado, avaliando os scores e loadings de PC1 e PC3, Figura 24, se verifica uma dispersão entre as amostras de teor de amargor suave e amarga e constata-se uma maior uniformidade no grupo de amostras denominada de erva-mate de teor médio. Também pode-se observar que praticamente ocorre a formação de dois grupos de amostras, um grupo formado pelas amostras referentes a erva-mate amarga, que pela análise do gráfico de loadings a separação é devida aos maiores teores de matesaponina, e outro formado pelas amostras média e suave.

Figura 22- Variâncias explicadas individuais e acumuladas das PC's.



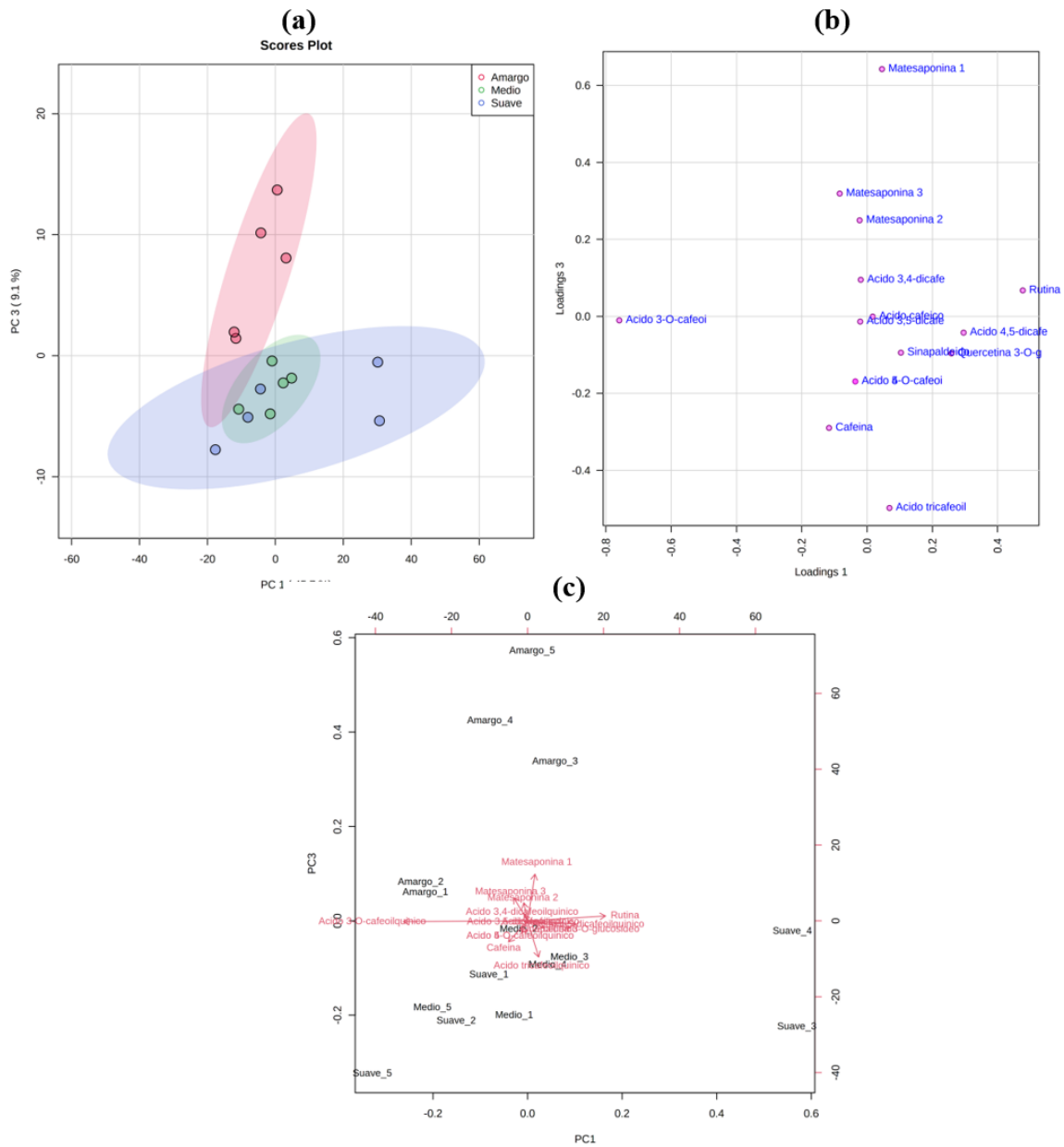
Fonte: AUTORA, 2021.

Figura 23 - Análise de componentes principais: (a) scores de PC 1 x PC 2; (b) loadings de PC 1 x PC 2; (c) gráfico biplot de PC 1 x PC 2.



Fonte: AUTORA, 2021.

Figura 24 - Análise de componentes principais: (a) scores de PC 1 x PC 3; (b) loadings de PC 1 x PC 3; (c) gráfico biplot de PC 1 x PC 3.



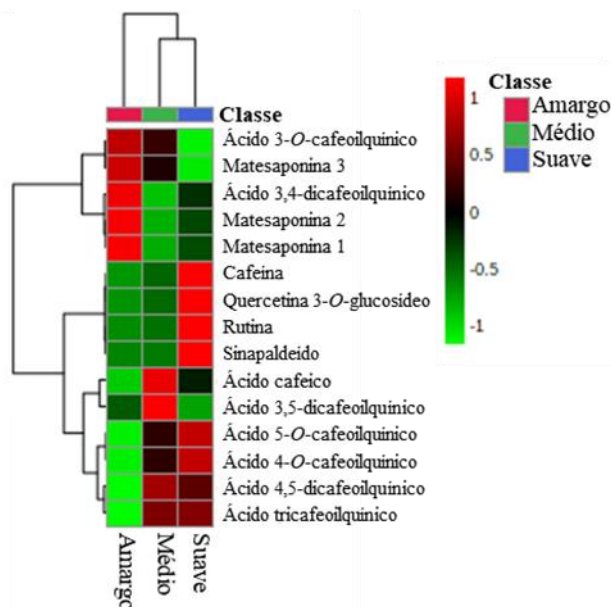
Fonte: AUTORA, 2021.

Apesar dessas informações iniciais obtidas, a PCA não resultou em uma separação satisfatória das amostras, por isso foi realizado outra análise não supervisionada, HCA e uma supervisionada, OPLS-DA.

A dispersão entre as amostras também foi observada na análise não supervisionada de agrupamentos hierárquicos (HCA). Na HCA cada amostra começa como um agrupamento separado e o algoritmo continua a combiná-los até que todas as amostras pertençam a um agrupamento. Nessa análise dois parâmetros precisam ser considerados visando o agrupamento hierárquico. O primeiro é a medida de similaridade, na qual usamos distância euclidiana, e o outro parâmetro são algoritmos de agrupamento, onde se utiliza a ligação do tipo Ward (FERREIRA, 2015).

A representação da HCA normalmente é concebida através de um dendrograma ou de um mapa de calor, tal como se apresenta na Figura 25. Nesse mapa de calor, consta a distribuição média dos metabólitos nos três grupos de amostras analisados, nesse contexto, é possível avaliar os possíveis metabólitos responsáveis pelas dissimilaridades entre os grupos de amostras analisados. Desse modo, os possíveis metabólitos associados ao teor amargo são: ácido 3-*O*-cafeoilquínico, matesaponina 3, ácido 3,4-dicafeoilquínico, matesaponina 2 e matesaponina 1. Por outro lado, de acordo com a HCA os metabólitos responsáveis pelo teor de amargor médio são: ácido cafeico e ácido 3,5-dicafeoilquínico. Para o teor suave são: cafeína, quercetina 3-*O*-glucosídeo, rutina e sinapaldeído.

Figura 25 - Representação da HCA através de um mapa de calor.



Fonte: AUTORA, 2021.

Além das análises não supervisionadas, foi aplicada a análise supervisionada de OPLS-DA para resolver o alto grau de complexidade e dimensionalidade das amostras. Na Figura 26, são apresentadas as representações gráficas da OPLS-DA, na qual se pode verificar

a separação total dos grupos de amostras que representam os diferentes teores de amargor da erva-mate: suave, média e amarga (Figura 26 (a)).

O modelo de OPLS-DA apresentou variância explicada e variância prevista, respectivamente,  $R^2Y = 0,86$  e  $Q^2 = 0,73$ . Em resumo,  $R^2Y$  fornece uma medida de ajuste do modelo para os dados originais, enquanto  $Q^2$  fornece uma medida interna de consistência entre os dados originais e preditivos da validação cruzada (GUEDES *et al.*, 2020). Na Figura 26 (b) é possível observar o gráfico de *loadings* da OPLS-DA, onde se pode avaliar os possíveis metabólitos responsáveis pela distinção dos grupos de amostras. Semelhante aos metabólitos que foram observados pela HCA, tem-se como marcadores químicos responsáveis pelo alto teor amargo da erva-mate: ácido 3-*O*-cafeoilquínico, matesaponina 3, matesaponina 2 e matesaponina 1.

É importante salientar que na análise não supervisionada HCA foi verificado que o ácido 3,4-dicafeoilquínico é um marcador do amargor. Entretanto, através da OPLS-DA observou-se que o metabólito ácido 3,4-dicafeoilquínico não se trata efetivamente de um marcador químico associado ao amargor da erva-mate. Esse fato pode ser corroborado por meio da análise dos valores de importância da variável na projeção (VIP) para os metabólitos. A avaliação dos valores de VIP é uma forma de classificar os metabólitos discriminatórios dos grupos de amostras, os marcadores são estatisticamente significativos quando  $VIP > 1$  (GUEDES *et al.*, 2020; NI *et al.*, 2008).

Sendo assim, com base na análise dos valores de VIP dos metabólitos dispostos na Figura 26 (c) é possível constatar que de fato os metabólitos associados ao teor amargo da erva-mate são matesaponina 3, matesaponina 2 e matesaponina 1. Além disso, pode-se inferir a partir da Figura 26 (c) que os metabólitos sinapaldeído e o ácido tricafeoilquínico são os compostos responsáveis por caracterizar as amostras de erva-mate de teor suave. Os compostos que de acordo com o HCA caracterizam a erva-mate média não são classificados como marcadores estatisticamente significativos pelo VIP.

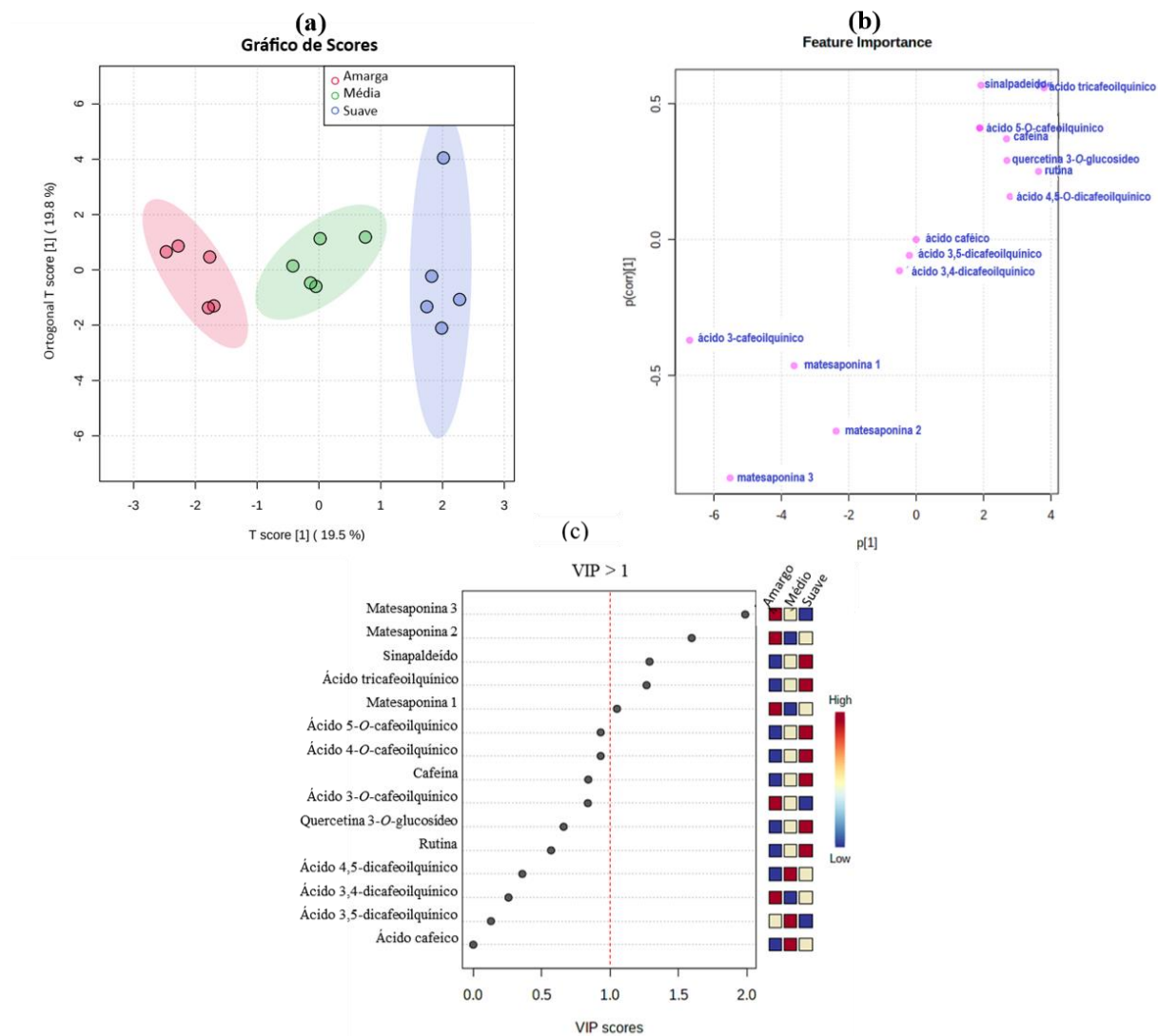
De acordo com a literatura, as saponinas são responsáveis pelo amargor de diversas plantas (BÖTTCHER; DRUSCH, 2017; HECK; DE MEJIA, 2007; MURAKAMI *et al.*, 2013; RIACHI; DE MARIA, 2017b). A erva-mate possui um teor de saponina relativamente alto, 5 a 10% do peso seco total (BURRIS *et al.*, 2012; PUANGPRAPHANT; BERHOW; DE MEJIA, 2011). Gawron-Gzella *et al.* (2021) afirma que o conteúdo de saponina no mate é de 11,7 mg/g. De acordo com os estudos, as saponinas predominantes na erva-mate são as saponinas primárias denominadas matesaponina 1, 2, 3, 4 e 5. Dessas, as matesaponina 1 e 2 são as que estão presentes em maior quantidade (GAWRON-GZELLA; CHANAJ-KACZMAREK;

CIELECKA-PIONTEK, 2021; HECK; DE MEJIA, 2007; TAKETA; BREITMAIER; SCHENKEL, 2004). Taketa e Breitmaier (2004) já haviam antecipadamente confirmado a importância dessas matesaponinas no sabor amargo do mate, o que corrobora com os resultados obtidos no trabalho. Em contrapartida, Scherer et al. (2006) afirma que a cafeína, a teobromina e os ácidos cafeoilquínicos, juntos com as saponinas, contribuem significativamente para o amargor da erva-mate. No entanto, como foi mostrado pela análise quimiométrica do trabalho, percebe-se que os marcadores relacionados ao sabor amargo são as saponinas.

Em relação aos compostos apontados como caracterizadores da erva-mate suave, o sinapaldeído é um fenilpropanóide e não há registros anteriores da sua identificação na *Ilex paraguariensis*, mas ele já foi identificado na *Ilex rotunda* Thunb. (CHEN et al., 2019). O ácido tricafeoilquínicos já foi relatado anteriormente em várias plantas Asteraceae (JAISWAL et al., 2010), em folhas de batata doce (YOSHIMOTO et al., 2002) e nas folhas da erva-mate (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007). Esse ácido variou de 125 a 156 µg/mL no chimarrão e 102 a 143 µg/mL no tereré (PERES et al., 2013). Esse trabalho é pioneiro em demonstrar esses compostos como marcadores da erva-mate suave.



Figura 26 - OPLS-DA: (a) scores da OPLS-DA de todos os metabólitos; (b) loadings da OPLS-DA; (c) gráfico dos valores de VIP.

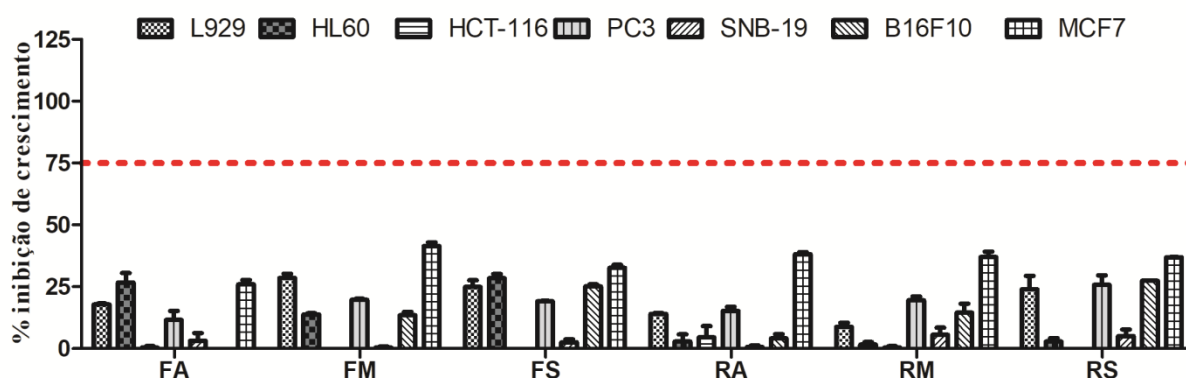


Fonte: AUTORA, 2021.

### 5.3 Citotoxicidade

Na Figura 27 e na Tabela 4 consta, detalhadamente, os dados da inibição de crescimento (IC%) das folhas e ramos da erva-mate do tipo amarga, média e suave frente as linhagens celulares tumorais HCT-116 (Carcinoma de cólon - humano), PC3 (Carcinoma de próstata), HL60 (Leucemia promielocítica), SNB-19 (Astrocitoma), B16F10 (Melanoma murinho), MCF-7 (Carcinoma de mama) e a não tumoral, L929 (Fibroblasto murinho).

Figura 27 - Representação gráfica da média do percentual de inibição do crescimento (IC%) das amostras na concentração única de 100 µg/mL.



Fonte: AUTORA, 2020.

Tabela 4 – Média do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras.

Amostras	HCT-116		PC3		HL60		SNB-19		B16F10		MCF-7		L929	
	IC%	DP	IC%	DP	IC%	DP	IC%	DP	IC%	DP	IC%	DP	IC%	DP
FA	0,5	0,9	11,6	5,3	26,8	5,5	3,2	5,3	0,0	0,0	26,0	2,6	17,9	0,6
FM	0,0	0,0	19,7	0,8	13,9	0,9	0,4	0,7	13,5	2,3	41,5	2,6	28,5	2,9
FS	0,0	0,0	19,1	0,3	28,5	2,9	2,5	2,2	25,1	1,4	32,7	2,1	25,0	4,6
RA	4,6	7,9	15,2	2,4	2,9	5,0	0,6	1,1	4,1	2,5	38,2	1,5	14,0	0,6
RM	0,3	1,1	19,6	2,1	1,6	1,8	5,6	5,1	14,5	5,2	37,1	3,1	8,8	2,3
RS	0,0	0,0	25,8	5,4	2,9	2,3	5,0	4,7	27,4	0,2	36,9	0,2	24,0	7,7

Fonte: AUTORA, 2020.

A porcentagem de inibição do crescimento (IC%) é considerada alta quando está entre 75% e 100% e é dita moderada quando está na faixa de 51% a 74% (GUEDES et al., 2018). Como mostrado na Tabela 4 e na Figura 23, todas as amostras de erva-mate apresentaram uma porcentagem de inibição de crescimento menor que 74%, portanto, as amostras apresentaram baixo potencial citotóxico contra as linhagens celulares testadas.

Como os resultados dos testes de citotoxicidade demonstraram que a erva-mate não apresenta efeitos tóxicos nas linhagens analisadas, não foi possível fazer a correlação entre a citotoxicidade e os perfis metabólicos obtidos da planta.

O baixo potencial citotóxico para as linhagens do estudo poderia ser consequência da massa de erva-mate utilizada nos testes. Entretanto, Correa et al. (2017) utilizaram cerca de 85 g de erva-mate para estudar os efeitos da digestão *in vitro* e da fermentação colônica nas

ações antiproliferativas e citotóxicas de bebidas de erva-mate (chimarrão, tereré e chá de mate). Foram utilizadas quatro linhagens de células humanas tumorais (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2) e uma célula de fígado suíno primário não tumoral (PLP2). No estudo, as bebidas só apresentaram citotoxicidade para a linhagem HeLa. Destacando-se que chimarrão e tereré, não apresentaram citotoxicidade ( $IC_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$ ) contra a linhagem MCF-7, uma das linhagens usada neste trabalho, enquanto o chá mate apresentou citotoxicidade contra a mesma linhagem celular apenas após a fermentação colônica ( $IC_{50} 247 \pm 18 \mu\text{g/mL}$ ).

Outro fator que poderia acarretar nesses resultados é o uso de apenas água como solvente. Souza et al. (2015) fizeram uma comparação entre a citotoxicidade do extrato metanol/água da planta da erva-mate, dos ramos e das folhas. Todos os extratos inibiram a linhagem MCF-7, sendo o do caule o que apresentou a maior atividade citotóxica para essa célula ( $IC_{50} 241 \pm 6 \mu\text{g/mL}$ ).

Além disso, deve ser considerado os tipos de linhagens celulares que foram utilizadas. Foi encontrado apenas a linhagem MCF-7 em comum entre esse trabalho e os que se encontram na literatura. Adicionalmente aos estudos anteriores, que não mostraram inibição da erva-mate para esse tipo de célula, Kungel et al. (2018) purificaram um polissacarídeo da erva-mate e esse também não apresentou citotoxicidade contra a linhagem MCF-7 citotoxicidade ( $IC_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$ ).

Por outro lado, a erva-mate mostrou atividade citotóxica contra outras linhagens de células. Em um estudo que avaliou a influência da digestão gastrointestinal *in vitro* do extrato de erva-mate na atividade antioxidante celular e na ação citotóxica e antiproliferativa das células HepG2, o extrato digerido e o não digerido apresentaram inibição da proliferação celular de HepG2 (BOAVENTURA et al., 2015). No estudo realizado por Ramirez-Mares et al. (2004), a infusão da erva-mate também apresentou efeito citotóxico contra as células HepG2. O extrato aquoso da *Ilex Paraguariensis* mostrou atividade citotóxica contra uma linhagem celular cancerígena (A549) com  $IC_{50} 346 \mu\text{g/mL}$  (SANTOS et al., 2020). O extrato aquoso da erva-mate também apresentou citotoxicidade contra as linhagens HaCaT, SCC-61, SQ-20B, OSCC-3 (RAMIREZ-MARES; KOBAYASHI; DE MEJIA, 2016). Adicionalmente, o extrato hidroalcolico do mate teve atividade citotóxica contra células de carcinomas de epitélio humano (HCT-8) (DABULICI; S RBU; VAMANU, 2020).

Assim, deve ser feito novos experimentos utilizando outro solvente além de água e outras linhagens celulares nos ensaios de citotoxicidade. Além disso, também pode-se estudar a mistura entre as folhas e os ramos da planta.

## 6 CONCLUSÃO

Nas amostras da mistura de ramos e folhas de erva-mate, de três níveis de amargor diferentes (alto, médio e suave), foram anotados um total de quinze compostos, pertencentes as classes saponinas, metilxantinas, flavonóides, derivados de ácido caféico e clorogênico. Adicionalmente, o composto sinalpadeído foi identificado pela primeira vez na *Ilex paraguariensis*, na amostra de amargor suave.

Em relação a determinação dos biomarcadores de amargor da erva-mate os possíveis metabólitos associados a essa característica sensorial, são: matesaponina 3, matesaponina 2 e matesaponina 1. Por sua vez, segundo o HCA, os metabólitos responsáveis por caracterizar a erva-mate média são: ácido cafeíco e ácido 3,5-dicafeoilquínico. Por fim, os metabólitos sinapaldeído e o ácido tricafeoilquínico são os que caracterizam a erva-mate suave.

Nos ensaios biológicos, as infusões de ramos e folhas (analisadas separadamente) de erva-mate não possuíram atividade citotóxica frente às linhagens estudadas. Recomenda-se a realização de novos testes utilizando outro solvente ou mistura de solvente e também o uso de outras linhagens de células.

Os dados apresentados nesse trabalho podem contribuir para o estabelecimento de perfis químicos, que podem ser aplicados a metodologias de controle de qualidade do produto e de determinação de origem do mesmo. Os resultados também abrem uma janela de oportunidade para o estabelecimento de procedimentos de fenotipagem avançada, baseada nos biomarcadores de intensidade de amargor. Portanto, houve o estabelecimento de uma ferramenta ampla que pode ser utilizada na agroindústria, e na pesquisa, por meio dos sistemas de melhoramento genético da erva-mate, principalmente no que tange ao desenvolvimento de cultivares com características sensoriais específicas requeridas pelo mercado.

## REFERÊNCIAS

- ALKHATIB, A.; ATCHESON, R. Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) metabolic, satiety, and mood state effects at rest and during prolonged exercise. **Nutrients**, [s.l.], v. 9, n. 8, p. 882, 2017.
- ALONSO, A.; MARSAL, S.; JULIÀ, A. Analytical methods in untargeted metabolomics: State of the art in 2015. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology Frontiers Media S.A.**, 2015.
- ALVAREZ-RIVERA, G. *et al.* Recent applications of high resolution mass spectrometry for the characterization of plant natural products. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry Elsevier B.V**, [s.l.], v. 112, p. 87-101, 2019.
- ALVES, A. DE O. *et al.* Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 134, p. 110809, 2019.
- AMIGO-BENAVENT, M. *et al.* Antiproliferative and cytotoxic effects of green coffee and yerba mate extracts, their main hydroxycinnamic acids, methylxanthine and metabolites in different human cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 106, p. 125–138, 2017.
- Aquifoliaceae* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB4878>. Acesso em: 20 nov. 2021
- AVENA, V. *et al.* Association between consumption of yerba mate and lipid profile in overweight women. **Nutricion Hospitalaria**, [s.l.], v. 36, n. 6, p. 1300–1306, 2019.
- BALCH, P. A. **Prescription for herbal healing**. 4 ed. New York: Penguin Books, 2006. 889 p.
- BALSAN, G. *et al.* Effect of yerba mate and green tea on paraoxonase and leptin levels in patients affected by overweight or obesity and dyslipidemia: **A randomized clinical trial. Nutrition Journal**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 1–10, 2019.
- BARG, M. *et al.* Evaluation of the protective effect of *Ilex paraguariensis* and *Camellia sinensis* extracts on the prevention of oxidative damage caused by ultraviolet radiation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s.l.], v. 37, n. 1, p. 195–201, 2014.
- 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**, [s.l.], v. 40, n. 3, p. 393–405, 2007.
- BECKER, A. M. *et al.* Spray-Dried Yerba Mate Extract Capsules: Clinical Evaluation and Antioxidant Potential in Healthy Individuals. **Plant Foods for Human Nutrition**, [s.l.], v. 74, n. 4, p. 495–500, 2019.

- BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, 4:14-19, 1996.
- BERTÉ, K. A. D. S. **Tecnologia da erva-mate solúvel**. 2011. 160 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- BIZZOTTO, C. S. *et al.* Quantification of phenolic compounds by capillary zone electrophoresis in extracts of four commercial types of mate herb before and after acid hydrolysis. **Food Research International**, [s.l.], v. 48, n. 2, p. 763-768, 2012.
- BLAŽENOVÍČ, I. *et al.* Effects of Gut Bacteria Depletion and High-Na + and Low-K + Intake on Circulating Levels of Biogenic Amines. **Molecular nutrition & food research**, [s.l.], v. 63, n. 42019.
- 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. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s.l.], v. 25, n. 1, 2015.
- BOAVENTURA, B. C. B. *et al.* Effect of in vitro digestion of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract on the cellular antioxidant activity, antiproliferative activity and cytotoxicity toward HepG2 cells. **Food Research International**, [s.l.], v. 77, p. 257–263, 2015.
- BOCCARD, J.; RUDAZ, S. Exploring Omics data from designed experiments using analysis of variance multiblock Orthogonal Partial Least Squares. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 920, p. 18–28, 2016.
- BOCCARD, J.; RUTLEDGE, D. N. A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 769, p. 30–39, 2013.
- BONNEFOY, C. *et al.* Untargeted analysis of nanoLC-HRMS data by ANOVA-PCA to highlight metabolites in *Gammarus fossarum* after in vivo exposure to pharmaceuticals. **Talanta**, [s.l.], v. 202, p. 221–229, 2019.
- BÖTTCHER, S.; DRUSCH, S. Saponins — Self-assembly and behavior at aqueous interfaces. **Advances in Colloid and Interface Science Elsevier B.V.**, [s.l.], v. 243, p. 105-113, 2017.
- BOUFRIDI, A.; QUINN, R. J. Turning Metabolomics into Drug Discovery. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 27, p. 1334–1338, 2016.
- BRACESCO, N. *et al.* Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 136, n. 3, p. 378-384, 2011.
- BRO, R.; SMILDE, A. K. Principal component analysis. **Analytical Methods**, [s.l.], v. 6, n. 9, p. 2812–2831, 2014.

- BURRIS, K. P. *et al.* Composition and bioactive properties of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): A review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, [s.l.], v. 72, n. 2, p. 268-274, 2012.
- CABRAL, A. *et al.* Aquifoliaceae in the Serra Negra, Minas Gerais, Brazil. **Rodriguesia**, [s.l.], v. 69, n. 2, p. 805–814, 2018.
- CALIXTO, M.R.P *et al.* Chimarrão consumption and prognostic factors in breast cancer: correlation with antioxidants and blood caffeine levels. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 35, n. 2, p. 888-897, 2020.
- CAMARA, Fernanda D.M. *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) extract inhibits hand-rolled cornhusk cigarette smoke-induced oxidative pulmonary damage. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 92, n. 2, p. 1-12, 2020.
- CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolomics: Definitions, state-of-the-art and representative applications. **Quimica Nova**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.
- CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review. **Journal of Functional FoodsElsevier Ltd**, [s.l.], v. 21, p. 440-454, 2016.
- CARDOZO, A. G. L. *et al.* Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. – hil.): uma revisão abrangente sobre composição química, benefícios à saúde e recentes avanços. **Research, Society and Development**, [s.l.], v. 10, n. 11, p. e590101120036, 2021.
- CEVERINO, G. C. *et al.* Preadministration of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) helps functional activity and morphology maintenance of MC3T3-E1 osteoblastic cells after in vitro exposition to hydrogen peroxide. **Molecular Biology Reports**, [s.l.], v. 48, n. 1, p. 13–20, 2021.
- CHEN, G. *et al.* Extract of *Ilex rotunda* Thunb alleviates experimental colitis-associated cancer via suppressing inflammation-induced miR-31-5p/YAP overexpression. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 62, n. April, 2019.
- CHU, J. *et al.* Quantitative analysis of plant hormones based on LC-MS/MS. **Hormone Metabolism and Signaling in Plants**, [s.l.], p. 471–537, 2017.
- CITTADINI, M. C. *et al.* Neuroprotective Effect of *Ilex Paraguariensis* Intake on Brain Myelin of Lung Adenocarcinoma-Bearing Male Balb/c Mice. **Nutrition and Cancer**, [s.l.], v. 71, n. 4, p. 629–633, 2019.
- CLIFFORD, M.N.; KERIMI, A; WILLIAMSON, G. Bioavailability and metabolism of chlorogenic acids (acyl-quinic acids) in humans. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [s.l.], v. 19, n. 4, p. 1299-1352, 2020.
- COLPO, A. C. *et al.* Compounds from *Ilex paraguariensis* extracts have antioxidant effects in the brains of rats subjected to chronic immobilization stress. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, [s.l.], v. 42, n. 11, p. 1172–1178, 2017.

COLPO, A. C. *et al.* *Ilex paraguariensis* extracts extend the lifespan of *Drosophila melanogaster* fed a high-fat diet. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s.l.], v. 51, n. 2, 2018.

COLPO, A. C. *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 209, 2016.

CORREA, V. G. *et al.* Effects of in vitro digestion and in vitro colonic fermentation on stability and functional properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) beverages. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 237, p. 453–460, 2017.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 481–487, 2007.

CUELHO, C. H. F. *et al.* Topical formulation containing *Ilex Paraguariensis* extract increases metalloproteinases and myeloperoxidase activities in mice exposed to UVB radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 189, p. 95–103, 2018.

DABULICI, C. M; SÂRBU, I.; VAMANU, E. The Bioactive Potential of Functional Products and Bioavailability of Phenolic Compounds. **Foods**, [s.l.], v. 9, n. 7, p. 953, 2020.

DA SILVA, C. G. F. *et al.* Selective extraction of saponins from *Ilex paraguariensis* St.-Hil. unripe fruits. **Food and Bioproducts Processing**, [s.l.], v. 111, p. 72–82, 2018.

DA SILVEIRA, T. F. F. *et al.* Phenolic compounds from yerba mate based beverages - A multivariate optimisation. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 190, p. 1159–1167, 2016.

DARTORA, N. **Avaliação dos polissacarídeos e metabólitos secundários das folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em diferentes estados fisiológicos e de processamento.** 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

DE MEJÍA, E. G. *et al.* Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 23–34, 2010.

DE OLIVEIRA, E. *et al.* Treatment with *Ilex paraguariensis* (Yerba mate) aqueous solution prevents hepatic redox imbalance, elevated triglycerides, and microsteatosis in overweight adult rats that were precociously weaned. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s.l.], v. 51, n. 6, 2018.

DE RESENDE, P. E. *et al.* Influence of crude extract and bioactive fractions of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on the Wistar rat lipid metabolism. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 15, p. 440–451, 2015.



- DE SOUZA, A. M. *et al.* Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: Um tutorial, parte II. **Química Nova**, [s.l.], v. 36, n. 7, p. 1057–1065, 2013.
- DENG, X. *et al.* Predictive geographical authentication of green tea with protected designation of origin using a random forest model. **Food Control**, [s.l.], v. 107, p. 106807, 2020.
- DEROSA, G.; D'ANGELO, A.; MAFFIOLI, P. Metabolic Actions of a Supplement of *Ilex paraguariensis* (An Extract of the Leaf Standardized to 2% I-Deoxinojirimicina), White Mulberry and Chromium Picolinate in Nondiabetic Subjects with Dysglycemia: A Randomized Trial. **Life** 2021, [s.l.], v. 11, n. 7, p. 709, 2021.
- DIAS, M. R.; BUSCARIOLI, A. C. L.; LOPES, B.E.R. Importância Farmacológica da Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*). **Revista Saberes da Faculdade São Paulo – Fsp.**, [s.l.], p.1-14. out. 2018.
- DING, Y.C. *et al.* Inhibiting effects of ilexgenin A from *Ilex hainanensis* Merr. on tumor cell HepG2. **Med Plant**, [s.l.], v.3, n.11, p. 91-94, 2012.
- DORS, P. **Teor de elementos em infusão de erva-mate em diferentes temperaturas.** 2017. 89 f. Dissertação (Mestrado em Manejo do Solo) – Pós-Graduação em Ciências do Solo, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2017.
- DOS SANTOS, F. A. *et al.* Combined OPLS-DA and decision tree as a strategy to identify antimicrobial biomarkers of volatile oils analyzed by gas chromatography–mass spectrometry. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 28, n. 6, p. 647–653, 2018.
- DUARTE, M. M. ***Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.: CARACTERIZAÇÃO DE MORFOTIPOS E GENÓTIPOS PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E PROPAGAÇÃO.** 2020. 149 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020.
- ELEKOFEHINTI, O. O. Saponins: Anti-diabetic principles from medicinal plants - A review. **Pathophysiology Elsevier**, [s.l.], v. 22, n. 2, p. 95-103, 2015.
- EL-SAWALHI, S. *et al.* The antibacterial activity of Libanstin from *Ilex paraguariensis* (Yerba Mate). **Fitoterapia**, [s.l.], v. 153, p. 104962, 2021.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Crop statistics.** Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em 22 de nov. de 2021.
- FARIAS, I. V. *et al.* In Vitro Free Radical Scavenging Properties and Anti-Inflammatory Activity of *Ilex paraguariensis* (Maté) and the Ability of Its Major Chemical Markers to Inhibit the Production of Proinflammatory Mediators. **Mediators of Inflammation**, [s.l.], v. 2021, p. 1–13., 2021.
- FAYAD, E. *et al.* Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) a potential food antibacterial agent and combination assays with different classes of antibiotics. **Lwt**, [s.l.], v. 125, p. 109267, 2020.

FERREIRA, M. M. C. *et al.* Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, [s.l.], v. 22, n. 5, p. 724–731, 1999.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Editora da Unicamp, 2015.

FUNARI, C. S. *et al.* Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Quim. Nova**, [s.l.], v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

GAMBERO, A; RIBEIRO, M. The Positive Effects of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) in Obesity. **Nutrients**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 730-750, 2015.

GAN, R.-Y. *et al.* Health Benefits of Bioactive Compounds from the Genus *Ilex*, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. **Nutrients**, [s.l.], v. 10, n. 11, p. 1682, 2018.

GARCIA-LAZARO, R. S. *et al.* In vitro and in vivo antitumor activity of Yerba Mate extract in colon cancer models. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 85, n. 7, p. 2186–2197, 2020.

GAWRON-GZELLA, A.; CHANAJ-KACZMAREK, J.; CIELECKA-PIONTEK, J. Yerba mate—a long but current history, **Nutrients**, [s.l.], v. 13, n.11, 2021.

GEBARA, K. S. *et al.* A randomized crossover intervention study on the effect a standardized maté extract (*Ilex paraguariensis* a. st.-hil.) in men predisposed to cardiovascular risk. **Nutrients**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 1–14, 2021.

GELSLEICHTER, S. D. Absorção de zinco pela erva-mate (*Ilex paraguariensis*). 2020. 36 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2020.

GEMEDE, H.F; RATTA, N. Antinutritional Factors in Plant Foods: potential health benefits and adverse effects. **International Journal Of Nutrition And Food Sciences**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 284, 2014.

GENG, P. *et al.* Classification of structural characteristics facilitate identifying steroidal saponins in *Alliums* using ultra-high performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v. 102, n. January, p. 103994, 2021.

GHASTE, M.; MISTRİK, R.; SHULAEV, V. Applications of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) and Orbitrap Based High Resolution Mass Spectrometry in Metabolomics and Lipidomics. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 17, n. 6, p. 816, 2016.

GHOSSON, H. *et al.* Simultaneous untargeted and targeted metabolomics profiling of underivatized primary metabolites in sulfur-deficient barley by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry. **Plant Methods**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 1–17, 2018.

GREMSKI, L. A. *et al.* Antioxidants-rich ice cream containing herbal extracts and fructooligosaccharides: manufacture, functional and sensory properties. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 298, p. 125098, 2019.

GIKA, H. *et al.* Untargeted LC/MS-based metabolic phenotyping (metabonomics/metabolomics): The state of the art. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, [s.l.], v. 1117, p. 136–147, 2019.

GUEDES, J. A. C. **Estudo do perfil metabolômico de folhas de cajazeira, umbuzeiro e abacaxizeiro e sua correlação com potencial atividade anticâncer por meio de análise multivariada**. 2018. 156 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

GUEDES, J. A. C. *et al.* Comparative analyses of metabolic fingerprint integrated with cytotoxic activity and *in silico* approaches of the leaves extract of *Spondias mombin* L. and *Spondias tuberosa* Arr. Cam. from Northeast, Brazil. **Phytochemistry Letters**, [s.l.], v. 40, n. September, p. 26–36, dez. 2020.

GUEDES, J. A. C. *et al.* Metabolic profile and cytotoxicity of non-polar extracts of pineapple leaves and chemometric analysis of different pineapple cultivars. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 124, p. 466–474, 2018.

HAO, D. *et al.* Research progress in the phytochemistry and biology of *Ilex* pharmaceutical resources. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 8–19, 2013.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science John Wiley & Sons**, [s.l.], v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; DE MEJIA, E. G. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of Mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 56, n. 18, p. 8394–8403, 2008.

HOLOWATY, S. A. *et al.* Yerba Maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Chemical and Physical Changes under Different Aging Conditions. **Journal of Food Process Engineering**, [s.l.], v. 39, n. 1, 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 1-8, 2020.

JACOBS, D. M.; VAN DEN BERG, M. A.; HALL, R. D. Towards superior plant-based foods using metabolomics. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.], v. 70, p. 23–28, 2021.

JADHAV, S. R. *et al.* Detection of foodborne pathogens using proteomics and metabolomics-based approaches. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 9, p. 3132, 2018.

- JAISWAL, R. *et al.* Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 58, n. 9, p. 5471–5484, 2010.
- JOHNSON, C. H.; IVANISEVIC, J.; SIUZDAK, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [s.l.], v. 17, n. 7, p. 451–459, 2016.
- JORGE, T. F. *et al.* Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. **Mass spectrometry reviews**, [s.l.], v. 35, n. 5, p. 620–649, 2016.
- JORGE, T. F.; MATA, A. T.; ANTÓNIO, C. Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, [s.l.], v. 374, n. 2079, 2016.
- KUMAR, M. *et al.* Metabolomics and Molecular Approaches Reveal Drought Stress Tolerance in Plants. **International Journal of Molecular Sciences** 2021, [s.l.], v. 22, n. 17, p. 9108, 2021.
- KUNGEL, P. T. A. N. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 114, p. 1161–1167, 2018.
- KUNZELMANN, M. *et al.* Non-targeted analysis of unexpected food contaminants using LC-HRMS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 410, n. 22, p. 5593–5602, 2018.
- KUROPKA, P. *et al.* The Effect of *Ilex × meserveae* S. Y. Hu Extract and Its Fractions on Renal Morphology in Rats Fed with Normal and High-Cholesterol Diet. **Foods** 2021, [s.l.], v. 10, n. 4, p. 818, 2021.
- LI, L. *et al.* Chlorogenic Acids in Cardiovascular Disease: a review of dietary consumption, pharmacology, and pharmacokinetics. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 68, n. 24, p. 6464-6484, 2020.
- LI, Y. *et al.* In vitro antiviral, anti-inflammatory, and antioxidant activities of the ethanol extract of *Mentha piperita* L. **Food Science and Biotechnology**, [s.l.], v. 26, n. 6, p. 1675-1683, 2017
- LIU, D *et al.* Protective Effects of Chlorogenic Acid on Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury Rats by Regulating Oxidative Stress-Related Nrf2 Pathway. **Drug Design, Development and Therapy**, [s.l.], v. 14, p. 51-60, 2020.
- LOIZEAU, P.A. *et al.*, **Aquifoliaceae. In: Kadereit JW & Bittrich V (eds.): The families and genera of vascular plants- flowering plants Eudicots.** v. 14. Springer, New York, 2016.
- LOPES, D. R *et al.* Antioxidant and antibacterial activity of a beverage obtained by fermentation of yerba-maté (*Ilex paraguariensis* ) with symbiotic kombucha culture. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s.l.], v. 45, n. 2, p. e15101, 2020.

MACHADO, M. L. *et al.* *Ilex paraguariensis* extract provides increased resistance against oxidative stress and protection against Amyloid beta-induced toxicity compared to caffeine in *Caenorhabditis elegans*. **Nutritional Neuroscience**, [s.l.], v. 24, n. 9, p. 697–709, 2021.

MARQUES, A. DA C.; DOS REIS, M. S.; DENARDIN, V. F. Yerba mate landscapes: forest use and socio-environmental conservation\*. **Ambiente & Sociedade**, [s.l.], v. 22, p. 2822, 2019.

MATEOS, R. *et al.* Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 241, n. August 2017, p. 232–241, 2018.

MATEOS, R. *et al.* LC–MSn characterization of saponins in mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil) and their quantification by HPLC-DAD. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v. 63, n. August, p. 164–170, 2017.

MAZUR, L. *et al.* Application of multivariate calibration and NIR spectroscopy for the quantification of methylxanthines in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v. 35, n. 2, p. 55–60, 2014.

MAZUR, L. **Aplicação de metodologia por NIR para determinação de metilxantinas presentes na erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

MAZUR, Larize. **Espectroscopia para determinação de compostos fenólicos e avaliação de amido de milho comum e ceroso após incorporação de extratos de erva-mate**. 2016. 159 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

MCLELLAN, T. M.; CALDWELL, J. A.; LIEBERMAN, H. R. A review of caffeine's effects on cognitive, physical and occupational performance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews Elsevier Ltd**, [s.l.], v. 71, p. 294-312, 2016.

MEINHART, A. D. *et al.* Methylxanthines and Phenolics Content Extracted during the Consumption of Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 58, n. 4, p. 2188-2193, 2010.

MEJIA, E. G de *et al.* Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea on Topoisomerase Inhibition and Oral Carcinoma Cell Proliferation. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 53, n. 6, p. 1966-1973, 2005.

MEJÍA, E. G de *et al.* Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

MESQUITA, M. *et al.* Chimarrão, terere and mate-tea in legitimate technology modes of preparation and consume: A comparative study of chemical composition, antioxidant,

anti-inflammatory and anti-anxiety properties of the mostly consumed beverages of *Ilex paraguariensis* St. H. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 279, p. 114401, 2021.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, [s.l.], v. 65, p. 55-63, 1983.

MURAKAMI, A. N. N. *et al.* Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 141, n. 1, p. 60–65, 2013.

NAUSHAD, M.; KHAN, M. R. **Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2014.

NEGRIN, A. *et al.* LC-MS Metabolomics and Chemotaxonomy of Caffeine-Containing Holly (*Ilex*) Species and Related Taxa in the Aquifoliaceae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 67, n. 19, p. 5687–5699, 2019.

NI, Y. *et al.* Metabolic profiling reveals disorder of amino acid metabolism in four brain regions from a rat model of chronic unpredictable mild stress. **FEBS Letters**, [s.l.], v. 582, n. 17, p. 2627–2636, 2008.

OLIVEIRA, R. V; SIMIONATO, A. V. C.; CASS, Q. B. Enantioselectivity effects in clinical metabolomics and lipidomics. **Molecules Multidisciplinary Digital Publishing Institute**, [s.l.], v. 26, n. 17, p. 5231, 2021.

ORSO, R. *et al.* Analysis of Polysaccharide Fraction from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on Regeneration of Planarian (*Girardia tigrina*). **Starch/Staerke**, [s.l.], v. 73, n. 3–4, p. 2000091, 2021.

ORTIZ-VILLANUEVA, E. *et al.* Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. **The Science of the total environment**, [s.l.], v. 635, p. 156–166, 2018.

PAGLIOSA, C. **Caracterização química do resíduo de ervais e folhas “in natura” de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. 2009. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

PAGLIOSA, C. M. *et al.* *Ilex paraguariensis* (A. St.-Hil.) leaf infusion decreases iron absorption in patients with hereditary hemochromatosis: A randomized controlled crossover study. **Food and Function**, [s.l.], v. 12, n. 16, p. 7321–7328, 2021.

PANG, Z. *et al.* MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 49, n. W1, p. W388–W396, 2021

PANZA, V. P. *et al.* Effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on the expression of the leukocyte NADPH oxidase subunit p47 phox and on circulating inflammatory cytokines in healthy men: a pilot study. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [s.l.], v. 70, n. 2, p. 212–221, 2019.

PĂUCEAN, A. *et al.* Metabolomics as a Tool to Elucidate the Sensory, Nutritional and Safety Quality of Wheat Bread—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 22, n. 16, p. 8945, 2021.

PAUL, A.; DE BOVES HARRINGTON, P. Chemometric applications in metabolomic studies using chromatography-mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 135, p. 116165, 2021.

PENTEADO JUNIOR, J. F; GOULART, I.C.G.R. **Erva 20**: Sistema de produção para erva-mate. Embrapa, 2019

PEREIRA, C. S. *et al.* *Ilex paraguariensis* decreases oxidative stress in bone and mitigates the damage in rats during perimenopause. **Experimental Gerontology**, [s.l.], v. 98, p. 148–152, 2017.

PERES, R. *et al.* HPLC-DAD-ESI/MS Identification and quantification of phenolic compounds in *Ilex paraguariensis* beverages and on-line evaluation of individual antioxidant activity. **Molecules**, [s.l.], v. 18, n. 4, p. 3859–3871, 2013.

PÉREZ, J. M *et al.* Comparative Antioxidant, Antiproliferative and Apoptotic Effects of *Ilex laurina* and *Ilex paraguariensis* on Colon Cancer Cells. **Tropical Journal Of Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 13, n. 8, p. 1279, 2014.

PHAM, Y. L.; BEAUCHAMP, J. Breath Biomarkers in Diagnostic Applications. **Molecules**, [s.l.], v. 26, n. 18, p. 5514, 2021.

PIASECKA, A.; KACHLICKI, P.; STOBIECKI, M. Analytical Methods for Detection of Plant Metabolomes Changes in Response to Biotic and Abiotic Stresses. **International Journal of Molecular Sciences.**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 379, 2019.

PINTO, V.Z *et al.* Phytochemical composition of extracts from yerba mate chimarrão. **Sn Applied Sciences**, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 1-5, 2021.

PORTELA, J. L. *et al.* Caffeic acid and caffeine attenuate toxicity associated with malonic or methylmalonic acid exposure in *Drosophila melanogaster*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s.l.], v. 394, n. 2, p. 227–240, 2021.

POZEBON, D. *et al.* Toxic and nutrient elements in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Additives & Contaminants: Part B**, [s.l.], v. 8, n. 3, p. 215–220, 2015.

PUANGPRAPHANT, S.; BERHOW, M. A.; DE MEJIA, E. G. Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) saponins induce caspase-3-dependent apoptosis in human colon cancer cells in vitro. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 125, n. 4, p. 1171–1178, 2011.

RAMIREZ-MARES, M. V; CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. de. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, [s.l.], v. 554, n. 1-2, p. 53-65, 2004.

RAMIREZ-MARES, M. V KOBAYASHI, H.; MEJIA, E. G de. Inhibitory effect of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts on the

proliferation of human head and neck squamous carcinoma cells. **Toxicology Reports**, [s.l.], v. 3, p. 269-278, 2016.

RESENDE, P. E. DE *et al.* The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 144, n. 3, p. 735–740, 2012.

RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, 2017.

RIBEIRO, C. P. **Benefícios da cafeína na terapêutica**. 2013. 85p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada - Portugal, 2013.

RIBEIRO, V. R. *et al.* Improvement of phenolic compound bioaccessibility from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts after biosorption on *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, [s.l.], v. 126, p. 108623, 2019.

ROCHA, D. S. *et al.* Adipose tissue of female Wistar rats respond to *Ilex paraguariensis* treatment after ovariectomy surgery. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 238–248, 2021.

ROSSA, Ü. B. *et al.* Influência da luminosidade e fertilizantes nos teores de metilxantinas e compostos fenólicos em folhas de erva-mate. **Ciência Florestal**, [s.l.], v. 27, n. 4, p. 1365–1374, 2017.

RUBERT, J. *et al.* Untargeted metabolomics based on ultra-high-performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry merged with chemometrics: A new predictable tool for an early detection of mycotoxins. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 224, p. 423–431, 2017.

SAIA, S. *et al.* Metabolomics Provides Valuable Insight for the Study of Durum Wheat: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 67, n. 11, p. 3069–3085, 2019.

SANTOS, J. S. *et al.* Optimized *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis*, and *Aspalathus linearis* blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 254, p. 348-358, 2018.

SANTOS, J. S. *et al.* A new analytical concept based on chemistry and toxicology for herbal extracts analysis: From phenolic composition to bioactivity. **Food Research International**, [s.l.], v. 132, p. 109090, 2020.

SCHERER, R. *et al.* Saponin content and quality-related traits of mass-selected yerba maté (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) trees. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, [s.l.], v. 12, n. 1–2, p. 73–85, 8 dez. 2006.

SCHUSTER, J.; MITCHELL, E. S. More than just caffeine: psychopharmacology of methylxanthine interactions with plant-derived phytochemicals. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry Elsevier Inc.**, 2019.



- SILVA, R. P. *et al.* Caracterização fitoquímica e análise da atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos de *Ilex paraguariensis*, st. hill.: uma revisão de literatura / Phytochemical characterization and analysis of antimicrobial and antioxidant activity of extracts of *Ilex paraguariensis*, st. Hill: a review of the literature. **Brazilian Journal of Development**, [s.l.], v. 7, n. 4, p. 38806–38830, 2021.
- SILVANA, V. M. *et al.* Colonization dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Ilex paraguariensis* crops: Seasonality and influence of management practices. **Journal of King Saud University - Science**, [s.l.], v. 32, n. 1, p. 183–188, 2020.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- SOUZA, A. H. P. *et al.* Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, [s.l.], v. 78, p. 286–294, 2015.
- SOUZA, L. M. de *et al.* Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1218, n. 41, p. 7307-7315, 2011.
- STIEBLER, L. P. P. DE M. *et al.* Desenvolvimento inicial e produtividade de *Ilex paraguariensis* em sistema agroflorestral / Initial growth and productivity of *Ilex paraguariensis* in agroforestry system. **Brazilian Journal of Development**, [s.l.], v.7, n. 10, p. 97923–97937, 2021.
- SUGIMOTO, M. *et al.* Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis. **Current Bioinformatics**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 96–108, 10 fev. 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2013. 820p.
- TAKETA, A. T. C.; BREITMAIER, E.; SCHENKEL, E. P. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Maté). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 205–211, 2004.
- TATE, P.S. *et al.* *Ilex paraguariensis* extracts and its polyphenols prevent oxidative damage and senescence of human retinal pigment epithelium cells. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 67, p. 103833, 2020.
- TESELKIN, Y. O. *et al.* The Antioxidant Capacity of Aqueous Extracts from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*). **Biophysics** 2021 66:1, [s.l.], v. 66, n. 1, p. 125–132, 2021.
- THEODORIDIS, G. A. *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 711, p. 7–16, 2012.
- TOPPEL, F. V. *et al.* Soil chemical attributes and their influence on elemental composition of Yerba mate leaves. **Floresta**, [s.l.], v. 48, n. 3, p. 425–433, 2018.
- VALDUGA, A. T. *et al.* Chemistry, pharmacology and new trends in traditional functional and medicinal beverages. **Food Research International Elsevier Ltd**, [s.l.], v. 120, p. 478-503 2019.

VARGAS, B. K. *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) microparticles modulate antioxidant markers in the plasma and brains of rats. **Food Bioscience**, [s.l.], v. 41, p. 100999, 2021.

VIJLDER, T. *et al.* A tutorial in small molecule identification via electrospray ionization-mass spectrometry: the practical art of structural elucidation. **Mass Spectrometry Reviews**, [s.l.], v. 37, n. 5, p. 607-629, 2017.

VILLATE, A. *et al.* Review: Metabolomics as a prediction tool for plants performance under environmental stress. **Plant Science**, [s.l.], v. 303, p. 110789, 2021.

WANG, J.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. Chemometric characterization of 30 commercial thermal and cold processed juices using UPLC-QTOF-HR-MS fingerprints. **LWT**, [s.l.], v. 114, 2019.

WANG, S. *et al.* TNF- $\alpha$ -induced oxidative stress and endothelial dysfunction in EA.hy926 cells is prevented by mate and green coffee extracts, 5-caffeoylquinic acid and its microbial metabolite, dihydrocaffeic acid. **International Journal Of Food Sciences And Nutrition**, [s.l.], v. 70, n. 3, p. 267-284, 2018.

WFO (2021): *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000729719>. Accessed on: 20 Nov 2021

WILLEMS, J. L. *et al.* Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion mobility and tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 933, p. 164–174, 2016.

YAO, X. *et al.* Chloroplast genome structure in *Ilex* (Aquifoliaceae). **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

YI, F. *et al.* Genus *Ilex* L.: Phytochemistry, Ethnopharmacology, and Pharmacology. **Chinese Herbal Medicines**, [s.l.], v. 8, n. 3, p. 209–230, 2016a.

YI, L. *et al.* Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 914, p. 17–34, 2016b.

YOSHIMOTO, M. *et al.* Antimutagenicity of Mono-, Di-, and Tricaffeoylquinic Acid Derivatives Isolated from Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) Leaf. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s.l.], v. 66, n. 11, p. 2336–2341, 2002.

ZAPPI, D. C. *et al.* Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, [s.l.], v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

ZHANG, A. J. *et al.*  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect of resveratrol and piceatannol. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [s.l.], v. 47, p. 86-93, 2017.

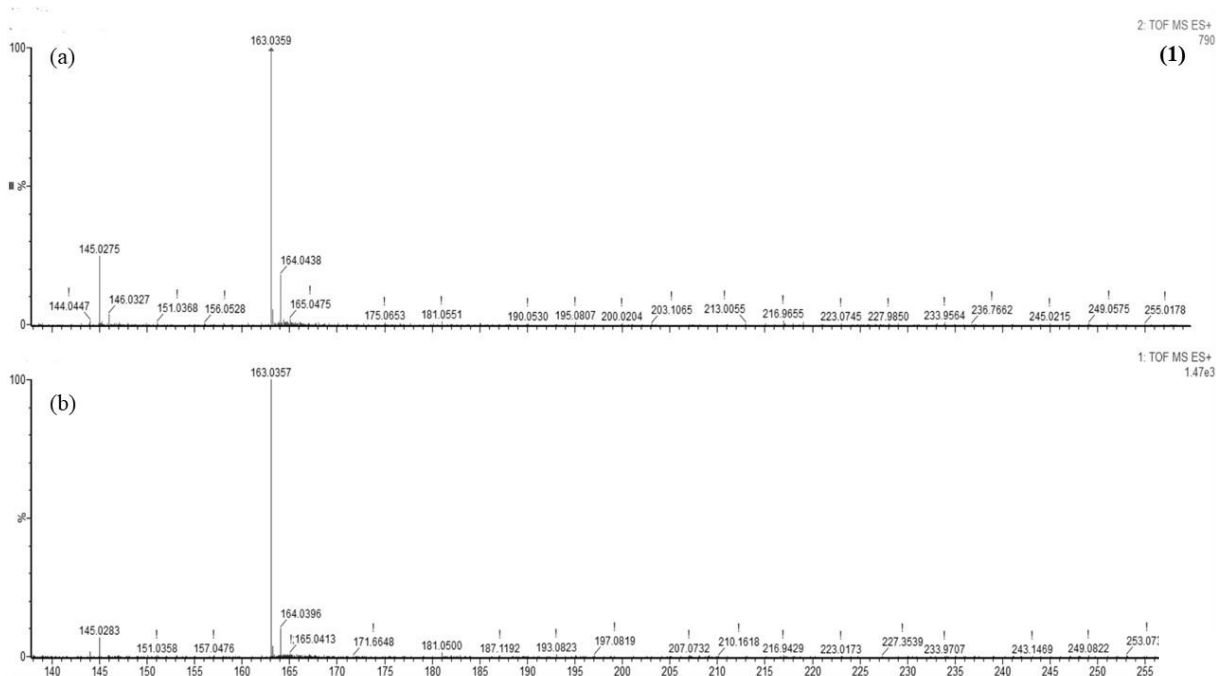
ZHU, F. *et al.* Comparison of major phenolic constituents and in vitro antioxidant activity of diverse kudingcha genotypes from *Ilex kudingcha*, *Ilex cornuta*, and *Ligustrum*

robustum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 57, n. 14, p. 6082–6089, 2009.

ZIEMLEWSKA, A. et al. Effect of fermentation time on the content of bioactive compounds with cosmetic and dermatological properties in Kombucha Yerba Mate extracts. **Scientific Reports 2021 11:1**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1–15, 2021.

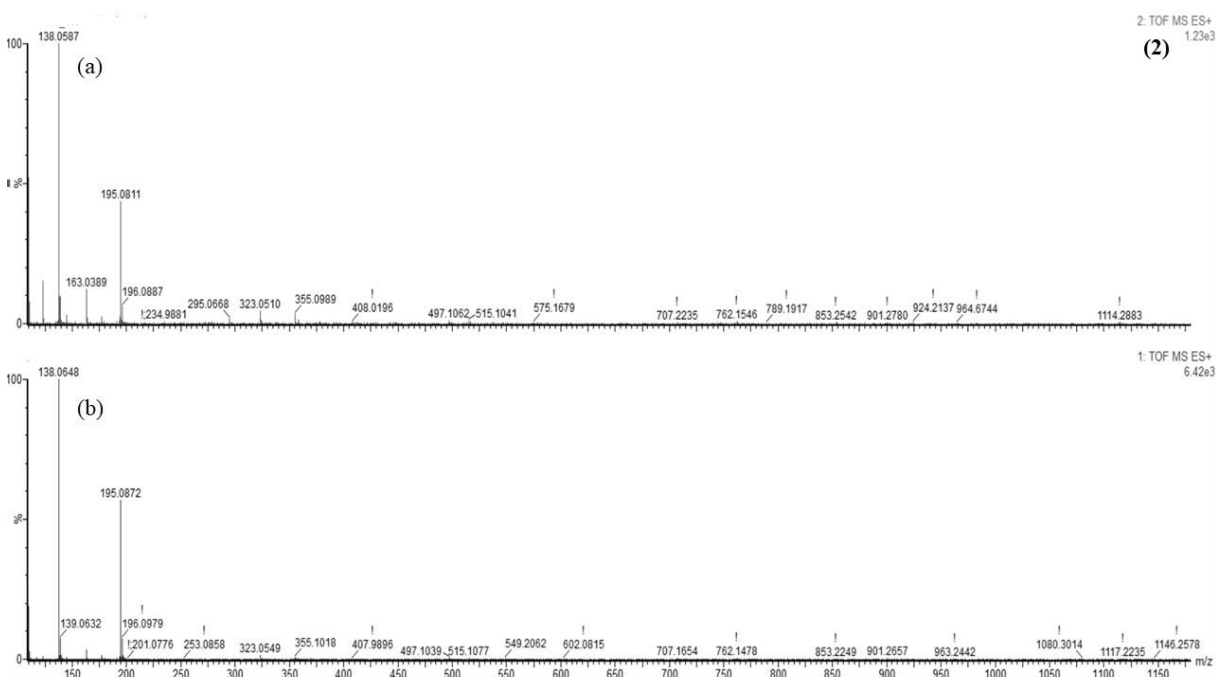
## ANEXO A – ESPECTROS DE MASSA EM MS E MS/MS DOS PICOS ANOTADOS

Figura A-1 – Espectros de massas em modo positivo do pico 1, anotado como ácido cafêico: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



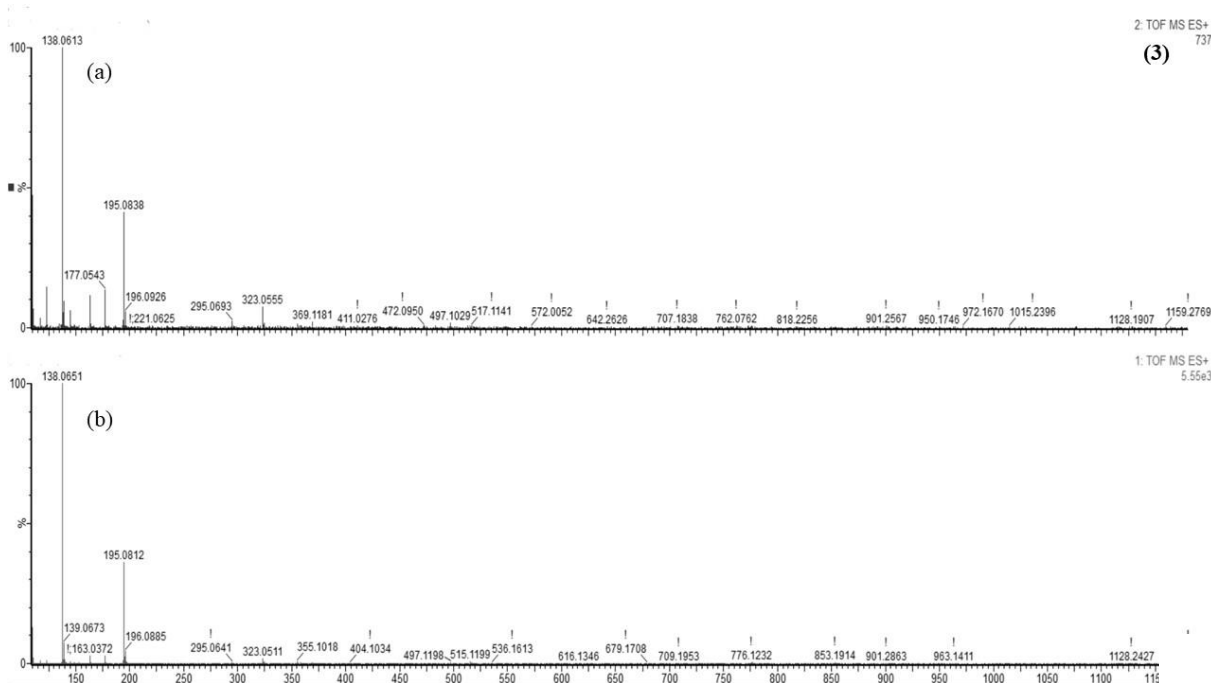
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura A-2 – Espectros de massas em modo positivo do pico 2, ácido 3-O-cafeoilquínico, anotado como um dos isômeros do ácido clorogênico: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



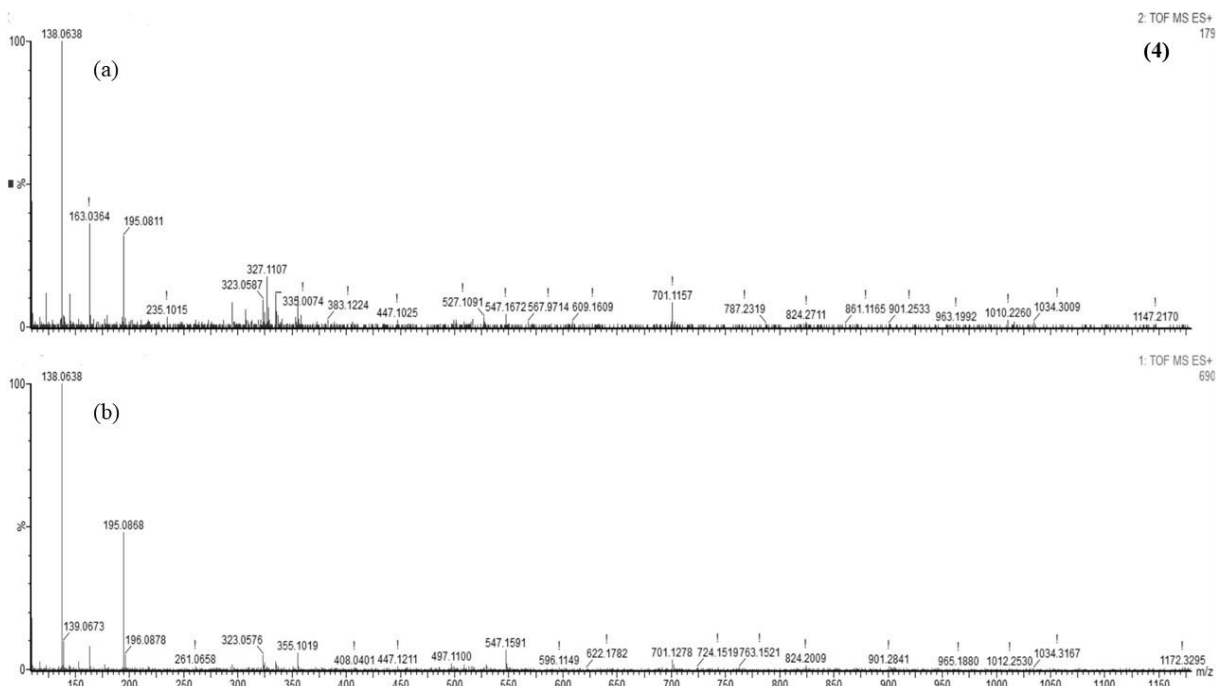
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura A-3 – Espectros de massas em modo positivo do pico **3**, ácido 4-*O*-cafeoilquínico, anotado como um dos isômeros do ácido clorogênico: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



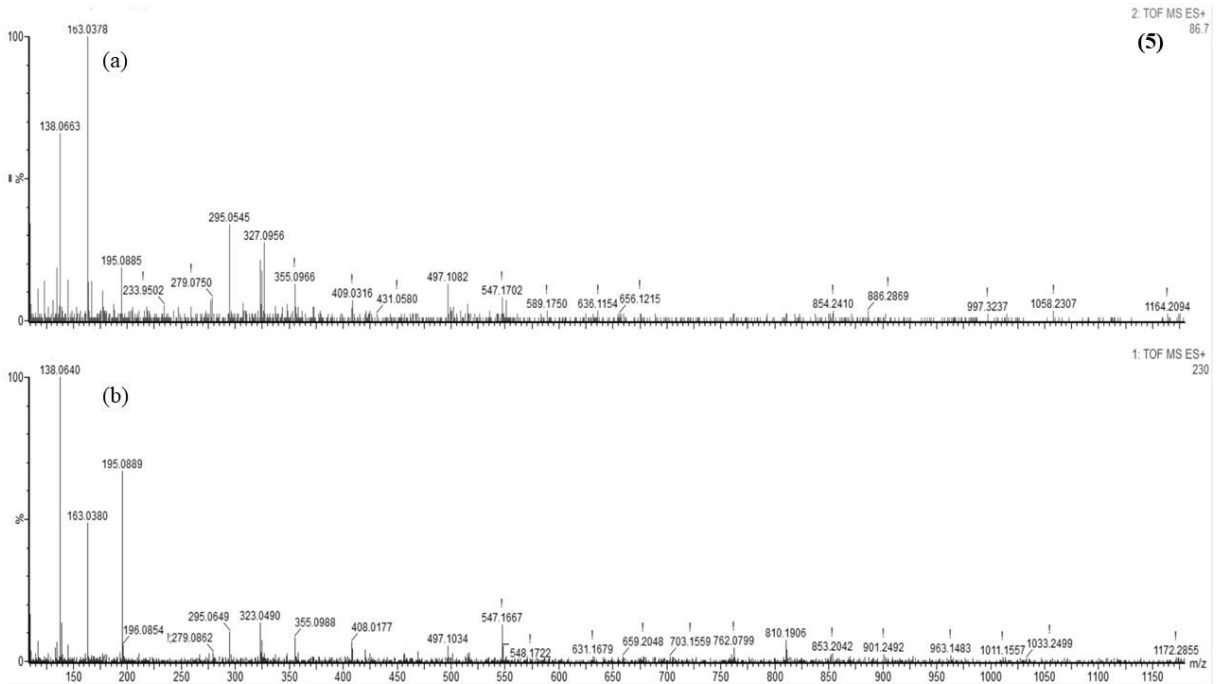
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura A-4 – Espectros de massas em modo positivo do pico **4**, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, anotado como um dos isômeros do ácido clorogênico: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



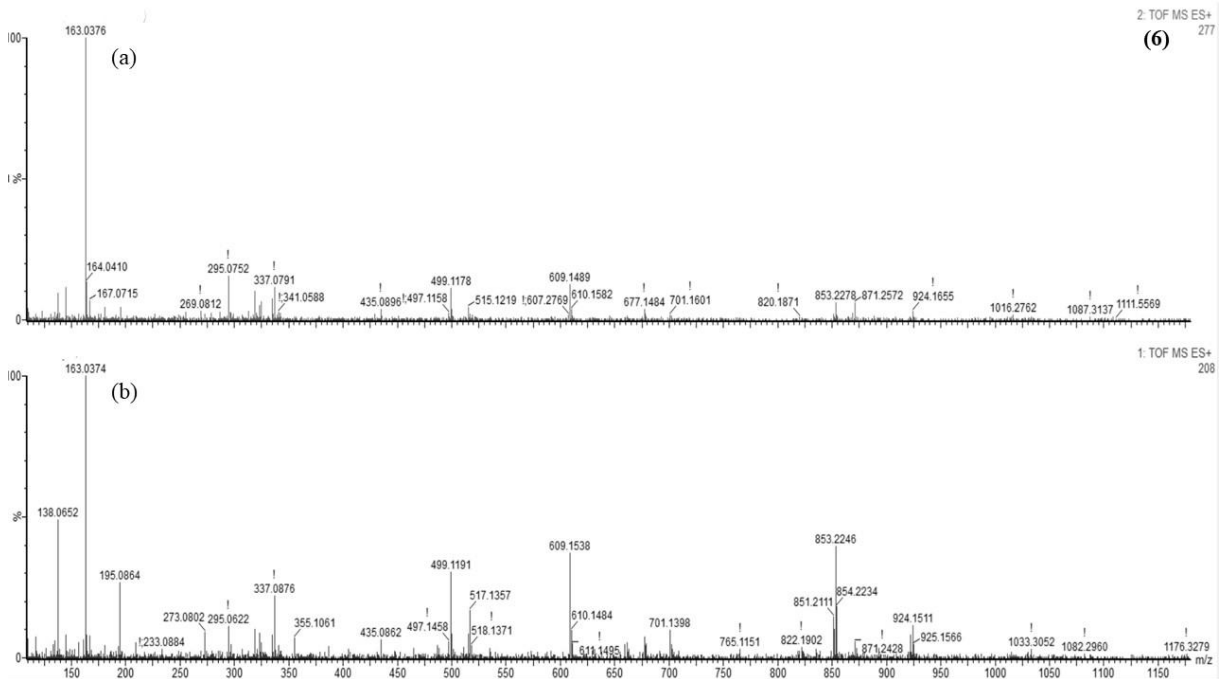
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura A-5 – Espectros de massas em modo positivo do pico 5, anotado como cafeína: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



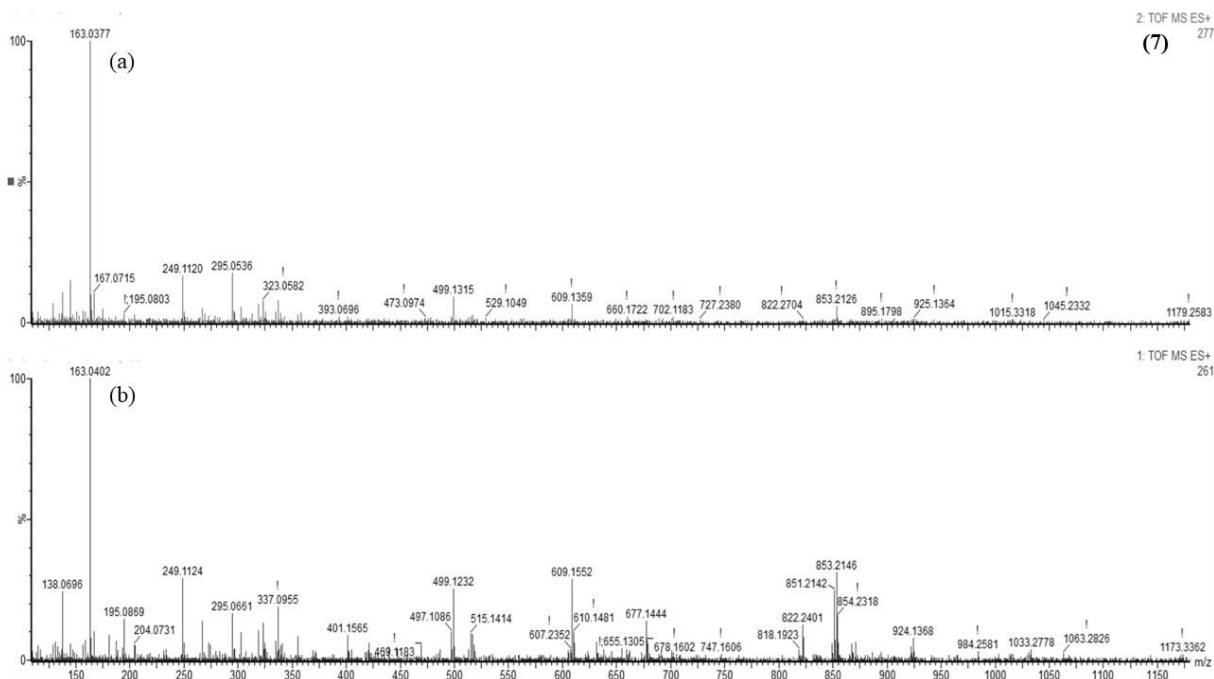
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura A-6 – Espectros de massas em modo positivo do pico 6, anotado como ácido 3,4-dicafeoilquínico, um dos isômeros do ácido dicafeoilquínico: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



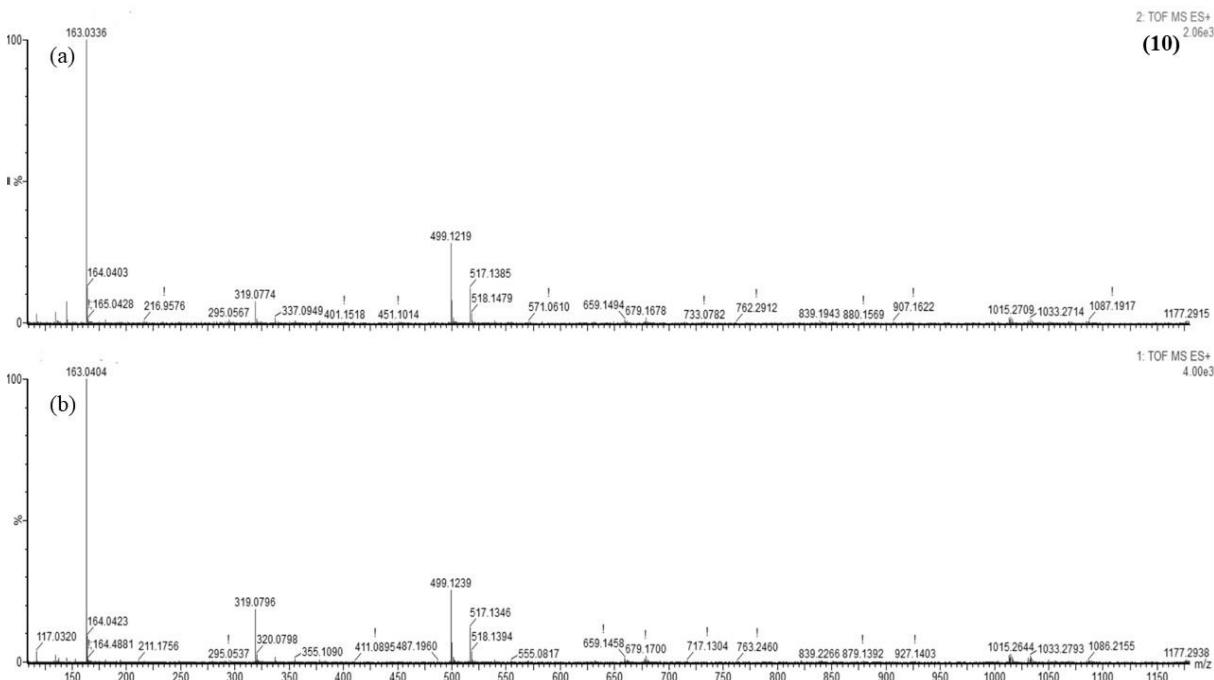
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura A-7 – Espectros de massas em modo positivo do pico 7, anotado como ácido 3,5-dicafeoilquínico, um dos isômeros do ácido dicafeoilquínico: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



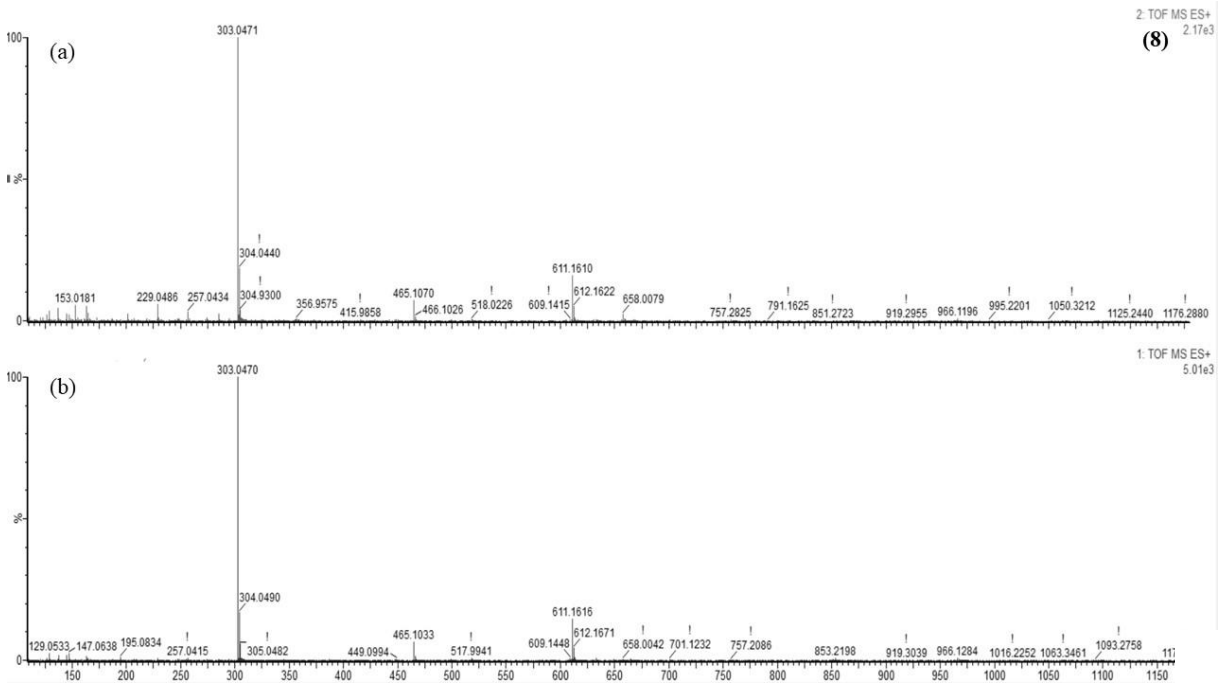
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura A-8 – Espectros de massas em modo positivo do pico 10, anotado como ácido 4,5-dicafeoilquínico, um dos isômeros do ácido dicafeoilquínico: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



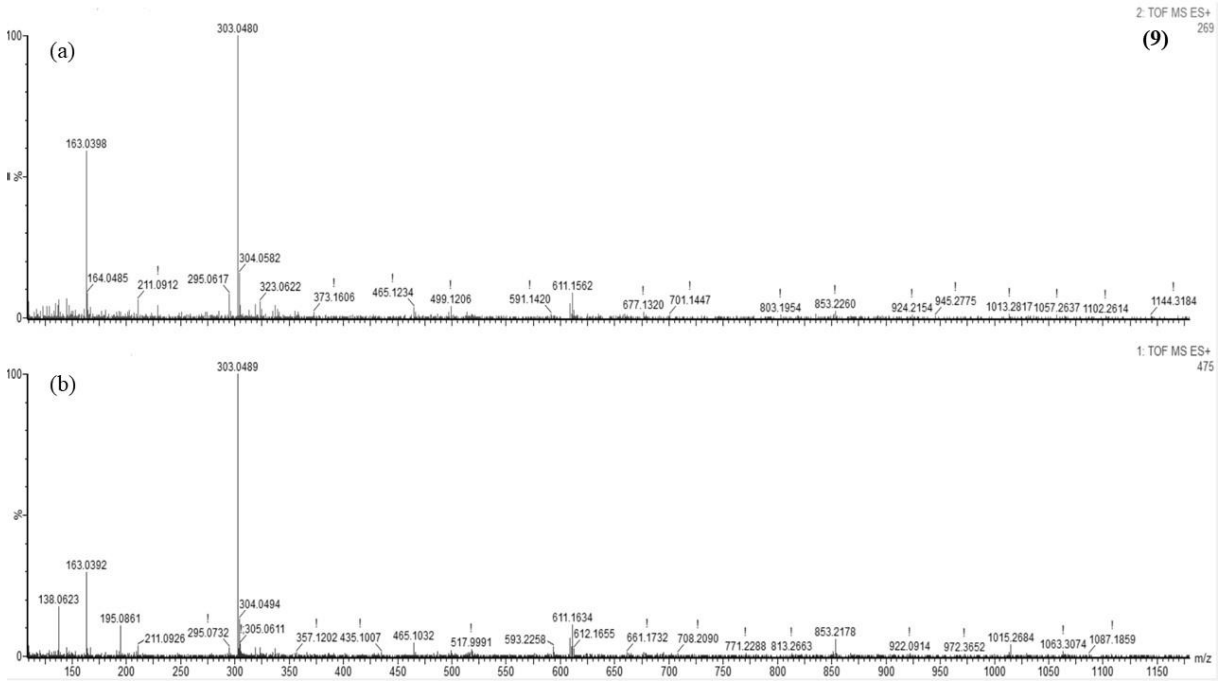
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura A-9 – Espectros de massas em modo positivo do pico **8**, anotado como rotina: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



Fonte: AUTORA, 2020.

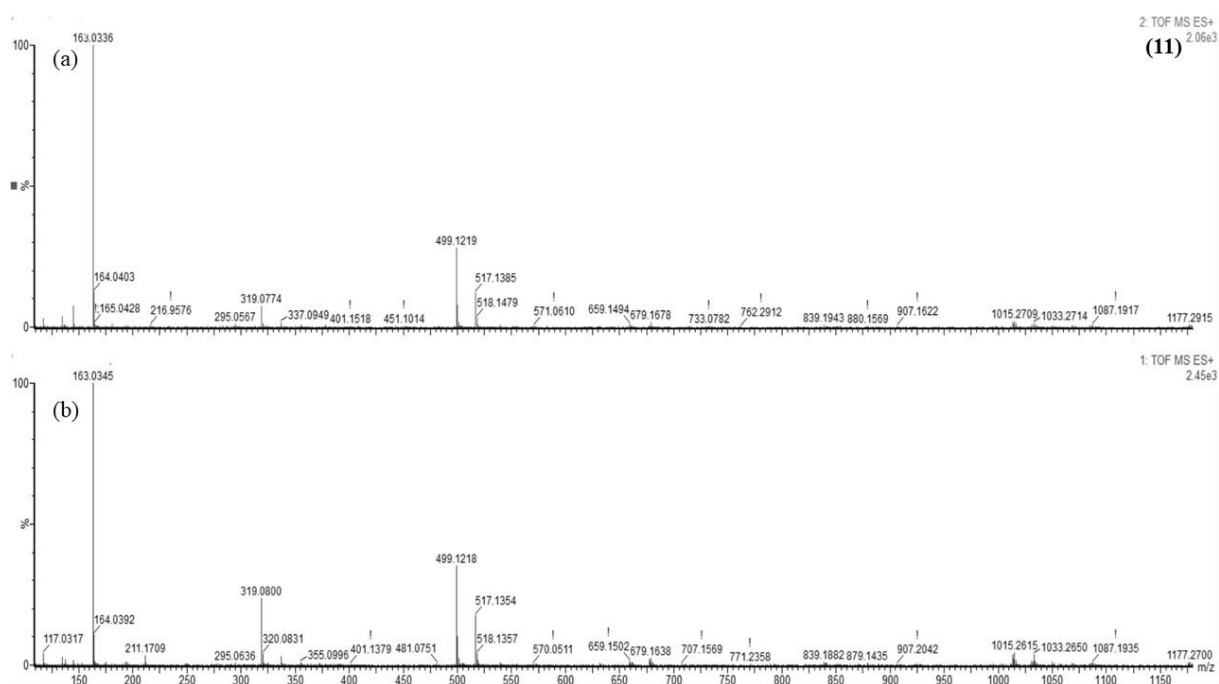
Figura A-10 – Espectros de massas em modo positivo do pico **9**: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



Fonte: AUTORA, 2020.

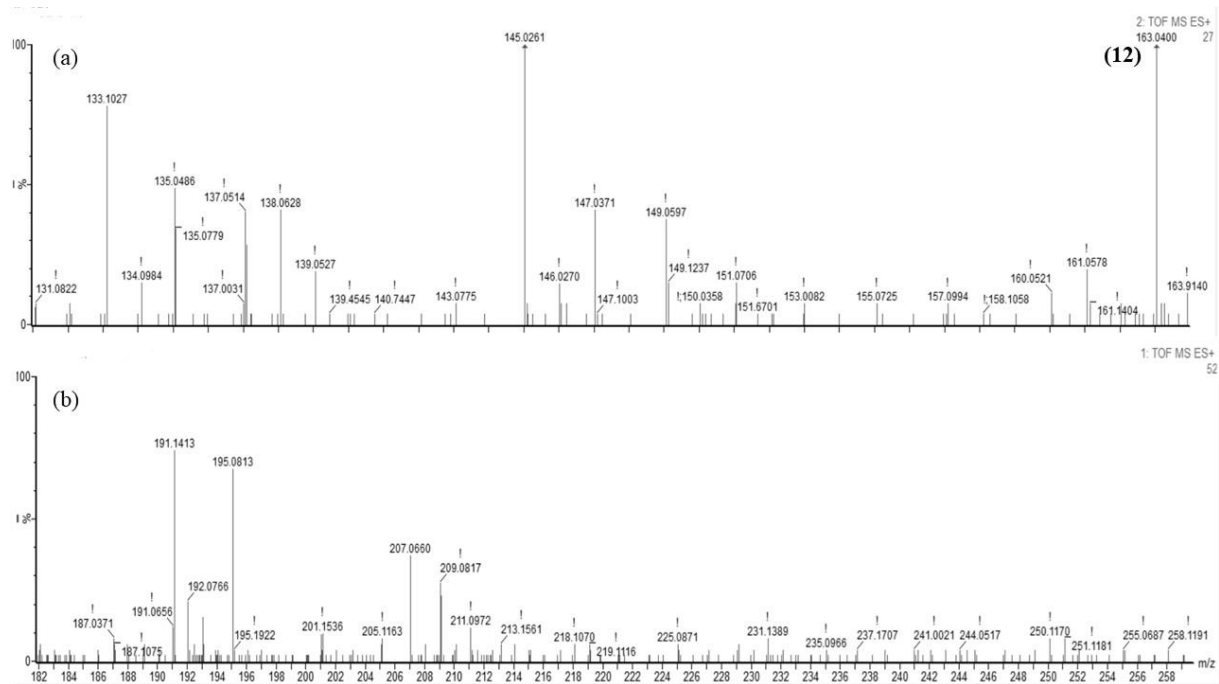


Figura A-11 – Espectros de massas em modo positivo do pico **11**: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



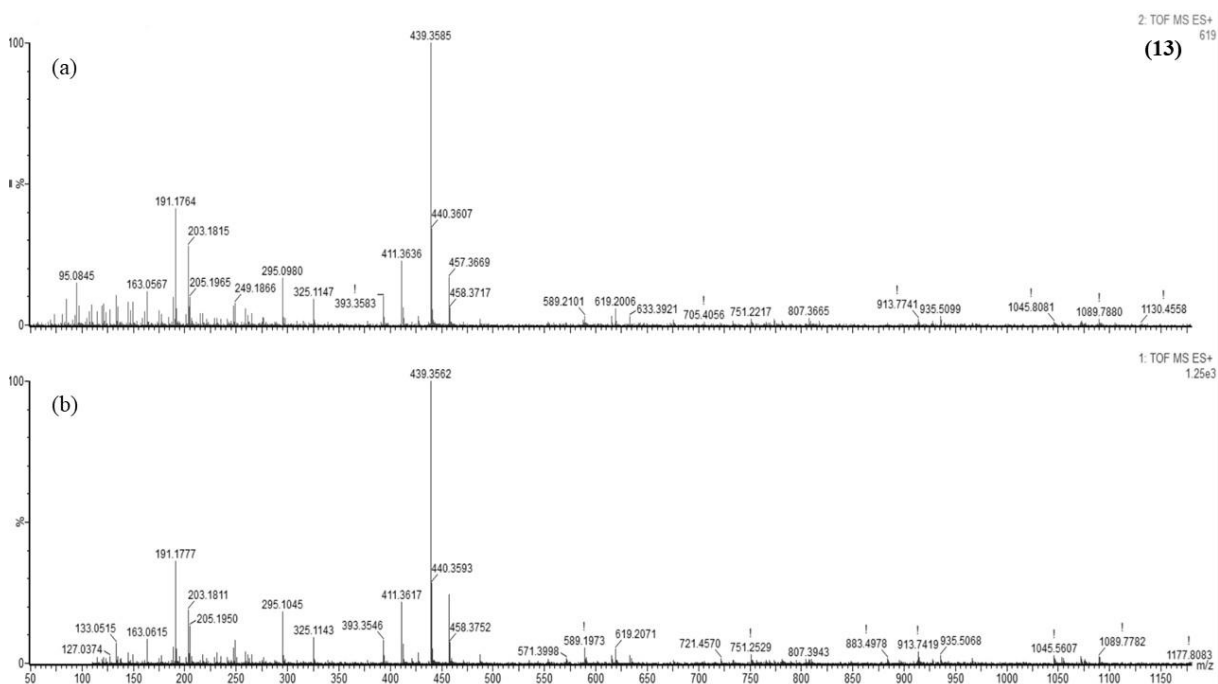
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura A-12 – Espectros de massas em modo positivo do pico **12**: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



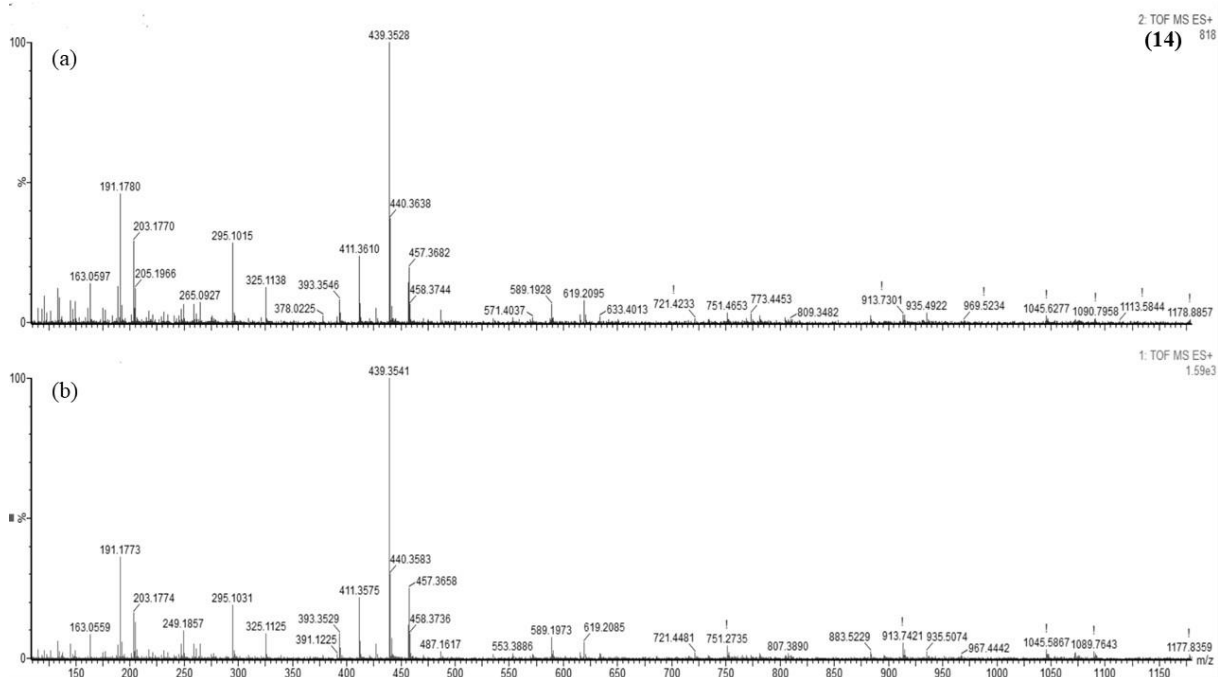
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura A-13 – Espectros de massas em modo positivo do pico **13**, anotado como matesaponina 3: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



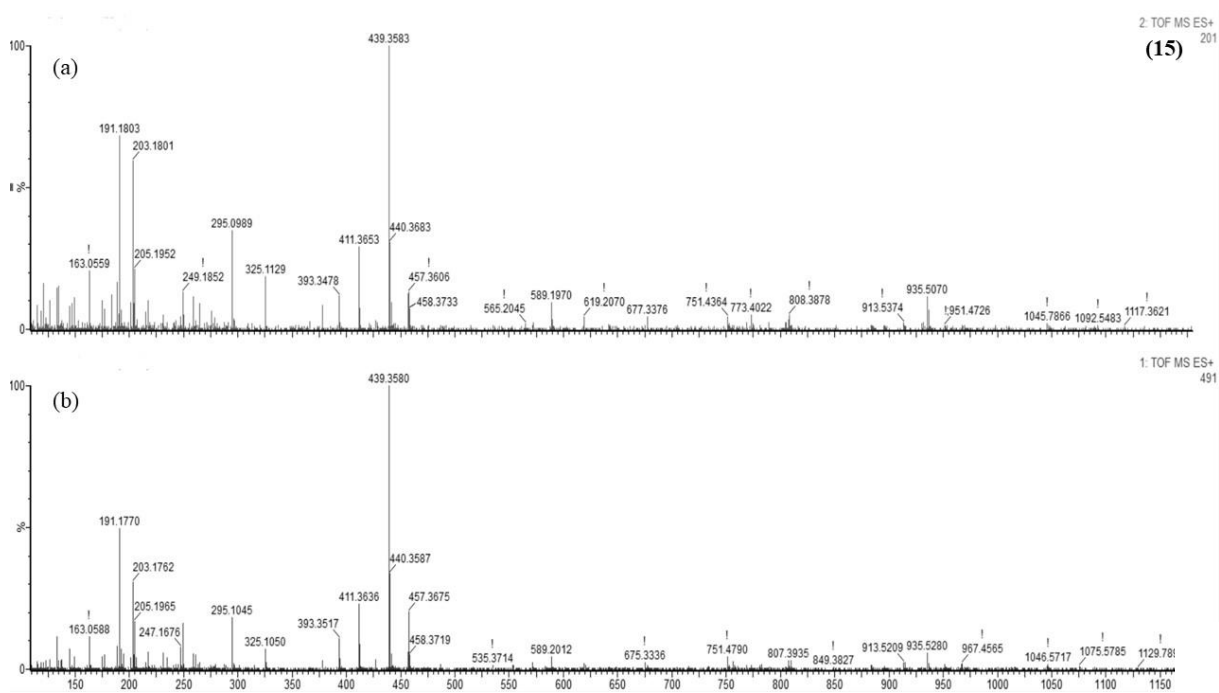
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura A-14 – Espectros de massas em modo positivo do pico **14**: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



Fonte: AUTORA, 2020.

Figura A-15 – Espectros de massas em modo positivo do pico **15**, anotado como matesaponina  
1: (a) espectro de ESI (+) – MS/MS; (b) espectro de ESI (+) – MS.



Fonte: AUTORA, 2020.