



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA

SILVIE ROSA BALZAN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO HIPOLIPIDÊMICO DO EXTRATO BRUTO  
E FRAÇÃO N-BUTANÓLICA DE *Ilex paraguariensis* St.-Hil.**

FLORIANÓPOLIS

2012

Silvie Rosa Balzan

**AVALIAÇÃO DO EFEITO HIPOLIPIDÊMICO DO EXTRATO BRUTO  
E FRAÇÃO N-BUTANÓLICA DE *Ilex paraguariensis* St.-Hil.**

Dissertação submetida ao Mestrado Profissional em  
Farmacologia da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do título de Mestre em  
Farmacologia  
Orientador: Prof. Dr. Euclides Lara Cardozo Junior

Florianópolis

2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Balzan, Silvie Rosa  
AVALIAÇÃO DO EFEITO HIPOLIPIDÊMICO DO EXTRATO BRUTO E  
FRAÇÃO N-BUTANÓLICA DE *Ilex paraguariensis* St.-Hil. /  
Silvie Rosa Balzan ; orientadora, Euclides Lara Cardozo  
Junior, 2012.  
62 p.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade  
Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis,  
2012.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. *Ilex paraguariensis*. 3. Atividade  
hipolipidêmica. 4. Atividade anticolesterolêmica . 5.  
Extrato n-butanólico. I. Cardozo Junior, Euclides Lara. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia. III. Título.

Silvie Rosa Balzan

**Avaliação do efeito hipolipidêmico do extrato bruto e fração n-butanólica de *Ilex paraguariensis* St. Hil.**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Euclides Lara Cardozo Junior, Dr.  
UNIPAR - Universidade Paranaense

Prof. Jamil Assreuy Filho, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Edson Luiz da Silva, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

---

Prof. Dr. Leandro J. Bertoglio  
Coordenador do Mestrado Profissional em Farmacologia

---

Prof. Dr.(a) Euclides Lara Cardozo Junior  
Orientador(a)

Florianópolis, 15 de Outubro de 2012.

Ao meu pai e à minha mãe, Idinir e Eunice, que sempre estiveram ao meu lado, me trouxeram ao mundo e me ensinaram ser uma pessoa de bem.

À minha irmã, por todo o carinho, companheirismo e zelo, mesmo distante. E que me proporcionou um sentimento inimaginável de ser tia, do meu Rhamon.

Ao meu namorado Alexandre, pelo amor, incentivo e apoio constantes.

## **AGRADECIMENTOS**

A elaboração de um trabalho de pesquisa desta natureza exigiu da autora muita dedicação. No entanto, o presente trabalho contou também com a ajuda de várias pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a sua elaboração. Assim, manifesto os meus sinceros agradecimentos:

a Deus pelo dom da vida, da sabedoria, da perseverança e do amor, pois sem ele não seria possível o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho;

ao Professor Euclides Lara Cardozo Junior, pela confiança, pelos ensinamentos, pela paciência e pela dedicação despendida em sua orientação permanente, sem sua confiança e incentivo, não conseguiria finalizar este trabalho;

aos professores, colaboradores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo profissionalismo e dedicação com que transmitiram seus conhecimentos e palavras de estímulo;

aos meus colegas Aline Maciel, Aline Hernandes, Gilmar Ferreira e Eduardo Miranda, que me auxiliaram na coleta dos dados. Sem sua dedicação, não chegaria ao meu objetivo final;

aos verdadeiros amigos, pelo incentivo constante no decorrer deste trabalho, e, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

BALZAN, Silvie Rosa. AVALIAÇÃO DO EFEITO HIPOLIPIDÊMICO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO N-BUTANÓLICA DE *Ilex paraguariensis* St.-Hil. 2012. 62f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, UFSC, Florianópolis. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade do extrato bruto e da fração n-butanol de *Ilex paraguariensis* padronizadas quanto ao teor de ativos, frente à indução do aumento dos índices de colesterol em ratos normais submetidos à dieta hiperlipidêmica. Os animais foram induzidos durante trinta dias a apresentar hiperlipidemia, através da alimentação e posteriormente tratados com três concentrações definidas do extrato e fração. Durante e após o período de tratamento, foram avaliados parâmetros bioquímicos, através de coleta e análise do sangue dos animais, frente aos parâmetros de colesterol total, frações HDL, LDL e VLDL e triglicerídeos. Além disso, houve a análise química do extrato, com a quantificação de cafeína, teobromina e ácido clorogénico, cuja propriedade anticolesterolêmica é relatada na literatura. Os resultados sugerem que o extrato e a fração possuem capacidade de diminuir os níveis de colesterol, e em especial triglicerídeos.

**Palavras-chave:** *Ilex paraguariensis*. Hipolipidêmico. Erva mate.

## ABSTRACT

BALZAN, Silvie Rosa. LIPID-LOWERING ACTIVITY OF CRUDE EXTRACT AND N-BUTANOL FRACTION OF *Ilex paraguariensis* St.-Hil. 2012. 62p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, UFSC, Florianópolis.

The aim of the study was to evaluate the activity of the crude extract and n-butanol fraction of *Ilex paraguariensis* standardized front to induction of increased levels of cholesterol in normal rats subjected to hyperlipidic diet. The animals were induced for thirty days to present cholesterol by diet and subsequently treated with three extract concentrations (200, 400 and 800 mg/Kg). During and after the treatment the biochemical effects were evaluated through sample collection and analysis of the blood of animals, compared to the parameters of total cholesterol, HDL, LDL and VLDL and triglycerides. In addition, there was a chemical analysis of the extract, tracking the concentration of substances caffeine, theobromine and chlorogenic acid. The results suggest that the extract has a great ability to fight cholesterol, and particularly triglycerides.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*. Mate herb. Lipid-lowering.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplar de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil., cultivada na localidade de Ivaí/PR....	15
Figura 2: Estrutura molecular das principais metilxantinas presentes em alimentos.....	17
Figura 3: Estrutura Química da Rutina.....	19
Figura 4: Estrutura química do ácido clorogênico.....	19
Figura 5: Estrutura química da quercetina.....	20
Figura 6: Estrutura química do ácido ursólico (A) e ácido oleanólico (B).....	21
Figura 7: Estrutura química das saponinas que apresentam atividade na lipase pancreática. ...	22
Figura 8: Estrutura química do colesterol. ....	23
Figura 9: Estrutura química das principais estatinas. ....	25
Figura 10: Esquema de divisão do grupo de animais de estudo para avaliação da atividade anticolesterolêmica do extrato bruto (EBR) de <i>Ilex paraguariensis</i> . ....	30
Figura 11: Cromatograma de identificação dos padrões teobromina (8.281) cafeína (10.846) e ácido clorogênico (10.326). Condições cromatográficas descritas em materiais e métodos. ...	39
Figura 12: Cromatograma do extrato bruto de erva-mate (EBR), demonstrando os compostos majoritários cafeína (10.849) e o ácido clorogênico (10.255). Condições cromatográficas descritas em materiais e métodos. ....	39
Figura 13: Cromatograma da fração n-butanol de erva-mate (FBU), demonstrando os compostos majoritários, principalmente os compostos fenólicos derivados do ácido clorogênico (10.321). Condições cromatográficas descritas em materiais e métodos. ....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Trabalhos que relatam atividade antioxidante e protetora celular da <i>Ilex paraguariensis</i> . .....	15
Tabela 2: Valores de colesterol total e triglicerídeos após o período de tratamento com o extrato bruto (EBR) e fração n-butanol (FBU) de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ). .....	33
Tabela 3: Análise da fração HDL, fração LDL e fração VLDL, entre os grupos experimentais no final do de tratamento com o extrato bruto (EBR) e fração n-butanol (FBU) de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ). .....	36
Tabela 4: Ganho de peso dos animais no final do tratamento com o extrato bruto (EBR) e fração n-butanol (FBU) de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ). .....	37
Tabela 5: Comparação da concentração de Compostos Fenólicos entre a infusão, o extrato bruto e a fração n-butanólica. ....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

## LISTA DE SÍMBOLOS



Yin Yang



Estrela de Davi em círculo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	<i>Ilex paraguariensis</i> .....	15
1.2	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA .....	16
1.3	ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	17
1.4	COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....	16
<b>1.4.1</b>	<b>Metilxantinas .....</b>	<b>17</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Compostos fenólicos .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4.3</b>	<b>Saponinas .....</b>	<b>20</b>
1.5	O COLESTEROL E AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	22
1.6	OBJETIVOS.....	25
<b>1.6.1</b>	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>26</b>
<b>1.6.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
2.1	ANIMAIS .....	27
2.2	DIETA DOS ANIMAIS .....	27
2.3	EXTRATOS VEGETAIS.....	28
<b>2.3.1</b>	<b>Extrato bruto .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Fração n-butanólica .....</b>	<b>28</b>
2.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	29
<b>2.4.1</b>	<b>Procedimento experimental – Extrato bruto .....</b>	<b>29</b>
2.5	COLETAS E ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	31
2.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	31
2.7	ANÁLISES QUÍMICAS .....	31
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
3.1	ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	33
3.2	ANÁLISE QUÍMICA DO EXTRATO .....	38

<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Ilex paraguariensis*

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) é uma planta originária da região subtropical da América do Sul e consumida principalmente na região sul do Brasil, na Argentina, Paraguai e Uruguai (MOSIMANN et al., 2006). Tem sido amplamente consumida como infusão, em produtos popularmente conhecidos como chimarrão, tererê e chá mate. Esta planta foi classificada como *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., em 1822, pelo francês August de Saint-Hilaire (EDWIN & REITZ, 1967), cuja classificação botânica é:

- Divisão: Angiosperma
- Classe: Dicotiledônea
- Subclasse: Archichlamideae
- Família: Aquifoliaceae
- Gênero: *Ilex*
- Espécie *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.

Figura 1: Exemplar de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., cultivada na localidade de Ivaí/PR.



Fonte: Cardozo Junior. E.L. (2006).

Esta espécie possui folha com margens irregulares serrado-crenadas, alternadas e simples, subcoriáceas até coriáceas, de 5 a 8 centímetros de comprimento, com 3 a 4 centímetros de largura. Geralmente possuem inflorescência fasciculada e axilar nas folhas. Florescem de setembro a dezembro e frutificam de dezembro a abril (CARVALHO, 1994; GIBERTI, 1994).

Na área farmacêutica, as plantas e os extratos vegetais são de grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas. Para a obtenção de fármacos (substâncias ativas isoladas), para a obtenção de adjuvantes (produtos e excipientes utilizados na formulação de medicamentos), ou ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais denominados de medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL et al., 2001). Recentemente, o extrato da erva-mate tem sido utilizado para o desenvolvimento de produtos alimentícios e cosméticos (HECK & DE MEJIA, 2007; BRACESCO et al., 2010).

Este *template* foi elaborado no Word 10. Para gerar o sumário automático de acordo com a norma NBR 6027/2012 utilize a sequência abaixo para diferenciação gráfica nas divisões de seção e subseção.

## 1.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A produção mundial de erva-mate é estimada em aproximadamente 500 mil toneladas a cada ano. Desta quantidade, 260, 180 e 30 mil toneladas são produzidas na Argentina, no Brasil e no Paraguai, respectivamente. A erva-mate destaca-se entre os produtos de extração vegetal no sul do Brasil, sendo o Paraná responsável por aproximadamente 70% da produção, relativos a 156.444 toneladas/ano (IBGE, 2009). No Brasil, o setor produtor de erva-mate compreende cerca de 600 municípios da região sul e centro-oeste, com aproximadamente 750 indústrias e 180 mil propriedades rurais produtoras de erva-mate, gerando mais de 710 mil empregos (RODIGHERI; DOSSA; VIELCAHUAMAN, 2009). Além de ser a principal atividade econômica de muitos municípios, rende diretamente aos produtores mais de R\$ 150 milhões, contribuindo muito com a agricultura familiar e, conseqüentemente, estimulando a permanência do agricultor no campo (BRASUR, 2009).

A comercialização de erva-mate em folhas verdes do Paraná atende empresas ervateiras tanto desse estado quanto do Rio Grande do Sul, além de fornecer matéria-prima suficiente para exportação, cuja participação está em torno de 25% (PASINATO, 2004; ALMEIDA, 2007). A exportação da erva-mate brasileira é destinada principalmente ao Uruguai



e a Síria. Além disso, pode ser exportada nas formas solúvel e em extrato, essência ou concentrado. Em 2005, houve uma receita de aproximadamente US\$ 25 milhões, oriundas da exportação de aproximadamente 31.000 toneladas de erva-mate, dos quais, 92% destinaram-se ao Uruguai (ALMEIDA, 2007; MUSEU PARANAENSE, 2009).

No mercado interno a folha verde da erva-mate destina-se às agroindústrias cancheadoras para produção de chimarrão, tererê, chá mate e compostos diversos. Os extratos, essências e concentrados de erva-mate são utilizados em indústrias de bebidas prontas, corantes naturais, cosméticos, higiene e limpeza (ALMEIDA, 2007).

### 1.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Embora consumida desde muito tempo, as pesquisas orientadas à comprovação das propriedades biológicas da erva são recentes, sendo as mesmas revisadas por Bastos et.al. (2007), Heck & de Mejia (2007) e Filip et al. (2010). Na Tabela 1 são apresentados os principais trabalhos publicados que evidenciam as ações biológicas, ressaltando a atividade antioxidante e protetora celular da erva-mate.

Estudos recentes têm demonstrado *in vitro* e *in vivo* que o extrato de erva-mate possui atividade hepatoprotetora, colerética, diurética, hipocolesterolêmica, antirreumática, antitrombótica, antiinflamatória, antiobesidade e propriedade antienvhecimento (BASTOS et.al., 2006). A literatura científica tem reportado que o chá da erva-mate é hipocolesterolêmico e hepatoprotetor (FILIP, & FERRARO, 2003) e estimulante do sistema nervoso central (MAZZAFERA, 1997). Alguns estudos têm sugerido um possível potencial no tratamento da obesidade (ANDERSEN & FOGH, 2001; OPALA et al., 2006), além dos benefícios no sistema cardiovascular.

Stein et al. (2005) verificaram que o extrato aquoso e a fração ácida do extrato n-butanólico de *I. paraguariensis* induz vasodilatação no leito vascular arterial mesentérico em ratos, de forma dose-dependente em relação à dieta-padrão, o que não foi observado numa dieta hipercolesterolêmica. Esses autores observaram que a administração oral crônica de erva-mate em ratos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica resultou em significativa redução dos níveis séricos de colesterol (30% de redução) e triglicérides (60,4% de redução) e sugerem ainda que a atividade antioxidante da infusão de erva-mate pode ser responsável, em parte, pela

diminuição da concentração plasmática de colesterol e triglicérides. A indução da vasodilatação observada para o extrato aquoso e a fração ácida n-butanólica de erva-mate, é mediada pela liberação de substâncias derivadas do endotélio.

Tabela 1. Trabalhos que relatam atividade antioxidante e protetora celular da *Ilex paraguariensis*.

<b>Material Biológico</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Resultados</b>	<b>Fonte</b>
<i>In vitro</i>	Produção de TBARs	Inibição da oxidação de LDL	Gugliucci e Stahl, 1995
<i>In vivo</i> – plasma humano	Produção de TBARs	Inibição da oxidação de LDL	Gugliucci, 1996
<i>In vitro</i> – lipossomos	Produção de TBARs	Inibição da oxidação de LDL	Filip et al., 2000
<i>In vivo</i> – fígado e glóbulos vermelhos de ratos	Peroxidação lipídica induzida; peroxidação de membrana de eritrócito e geração de radicais livres	Inibição da oxidação de LDL e propriedades anti-radicaais livres	Schinella et al., 2000
<i>In vivo</i> – plasma humano	Produção de TBARs, formação de dienos conjugados e polifenóis totais	Inibição da oxidação de LDL	Gugliucci e Menini, 2002
<i>In vivo</i> – <i>Saccharomyces cerevisia</i> e plasma humano	Taxa de ruptura da dupla cadeia de DNA, por eletroforese de campo alternado transverso (TAFE); produção de TBARs; formação de dienos conjugados e ensaio de DPPH	Redução da quebra de DNA e inibição da oxidação de LDL	Bracesco et al., 2003
<i>In vitro</i> - células HepG2 e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Atividades de ornitina decarboxilase induzidos por TPA, quinona redutase e topoisomerase	Atividade citotóxica; inibição da topoisomerase	Ramirez-Mares et al., 2004
<i>In vitro</i> – células de hepatoma murino	Ensaio de capacidade antioxidante total (ORAC) e quinona redutase.	Atividades antioxidantes e quimiopreventivas	Chandra e Mejia, 2004
<i>In vitro</i> – macrófagos RAW 264.7 murinos	Ensaio de DPPH, nitração de BSA e citotoxicidade por LDH	Inibição da nitração de proteínas e efeitos citoprotetores	Bixby et al., 2005
<i>In vivo</i> – coelhos	Perfil lipídico, produção de TBARs e de enzimas antioxidantes	Redução de lesão aterosclerótica	Mosimann et al., 2006

<i>Ex vivo</i> – glândulas submandibulares de ratos Wistar	Secreção de peroxidase.	Prevenção de patologias orais e potencial ação quimiopreventiva na cavidade oral.	Filip et al., 2007
<i>In vitro</i>	Ensaio de DPPH	Atividade antioxidante	Bastos et al., 2007
<i>In vivo</i> - ratos Wistar	Glicemia e insulinemia, atividade da glicose-6-fosfatase e expressão gênica de SGLT1.	Inibiu a expressão gênica de SGLT1	Oliveira et al., 2008
<i>In vivo</i> - indivíduos saudáveis	Oxidação da LDL e plasma, agregação plaquetária e coagulação sanguínea.	Inibição da oxidação de LDL, não inibição da agregação plaquetária ou coagulação sanguínea.	Silva et al., 2008
<i>In vivo</i> - camundongos	Dano ao DNA de células do fígado, rins e bexiga induzido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	Ausência de efeito genotóxico e aumentou da resistência e reparo do DNA	Miranda et al., 2008
<i>In vivo</i> - mulheres saudáveis	Produção de TBARs, formação de dienos conjugados, perfil antioxidante do plasma (TAS), expressão gênica de enzimas antioxidantes.	Inibição da oxidação de LDL, melhoria da capacidade antioxidante plasmática e aumento da expressão de genes de enzimas antioxidantes.	Matsumoto et al., 2009
<i>In vivo</i> - camundongos	Produção de TBARs nos rins e fígado, composição de ácidos graxos nos tecidos.	Aumento da concentração de MUFA e PUFA e inibição da produção de TBARs,	Martins et al., 2009

Fonte: Silvie Rosa Balzan (2012).

Gorgen et al. (2005) sugerem que *I. paraguariensis* é capaz de interferir no sistema circulatório, agindo como diurético e agente hipotensivo. A ingestão crônica de solução aquosa de extrato de *I. paraguariensis* promoveu uma redução de ATP, ADP e AMP em soro de ratos. Assim, parece que este tratamento pode alterar a rota da nucleotidase, modulando o equilíbrio dos níveis de purinas, que podem induzir efeitos relevantes, como por exemplo no sistema cardiovascular.

Mossiman et al. (2006) avaliaram se as infusões de erva-mate poderiam reduzir a progressão da aterosclerose em coelhos alimentados com 1% de colesterol. Após 2 meses de tratamento, o consumo de erva-mate não alterou o perfil lipídico e o conteúdo de colesterol hepático dos coelhos controle ou com dieta hipercolesterolêmica. No entanto, a área de lesão foi consideravelmente menor no grupo hipercolesterolêmico-mate e o teor de colesterol da aorta foi de cerca de metade do grupo hipercolesterolêmico. Apesar disso, as substâncias ateroscleróticas, reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), da aorta, fígado e soro, e a atividade das enzimas antioxidantes no fígado e aorta não diferiu entre os grupos. Os resultados mostraram que o extrato de *I. paraguariensis* pode inibir a progressão da aterosclerose em coelhos alimentados com colesterol.

De acordo com Przygodda et al. (2010), a ingestão de erva-mate influencia significativamente em vários parâmetros fisiológicos, reduzindo o peso corporal, a quantidade de gordura visceral e os níveis plasmáticos de glicose, colesterol e triglicérides em ratos Wistar. Os resultados obtidos foram observados após uma dieta específica durante 60 dias, sendo os animais divididos em grupos de acordo com a alimentação aplicada (dieta hiperlipídica e dieta hiperglicídica), com e sem o tratamento com a infusão da planta.

A atividade in vivo dos ativos obtidos a partir do extrato das folhas de *I. paraguariensis* foi demonstrada quando indivíduos saudáveis beberam a infusão e, uma hora mais tarde, o sangue foi coletado e o teor de LDL foi analisado em relação à peroxidação lipídica (GUGLIUCCI, 1996). O extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* inibiu a peroxidação lipídica induzida pelo sistema Fe<sup>2+</sup>/ascorbato e detectado pelo ensaio do ácido tiobarbitúrico (SCHINELLA et al., 2000).

Os radicais livres desempenham um papel biológico importantíssimo no desenvolvimento de danos aos tecidos e eventos patológicos em organismos vivos (SCHINELLA et al, 2000). Um radical livre é qualquer espécie química capaz de se ligar,

contendo um elétron ou mais não pareados (HALLIWEL, GUTTERIDGE, 1999). Propriedades antioxidantes têm sido encontradas em infusões de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em diferentes modelos biológicos (CHANDRA, MEJIA, 2004). O consumo da planta na alimentação está associado a um risco reduzido de doenças crônicas (câncer e cardiovascular), em parte devido às substâncias com capacidade antioxidante, e aqueles que modulam a atividade enzimática e a expressão dos genes (DAY et al., 2004). Filip et al. (2000) verificaram que a espécie *Ilex paraguariensis* A. St Hil apresentou maior atividade antioxidante quando comparada com outras espécies do gênero *Ilex*, como a *I. theezans* Mart. ex Reissek, *I. dumosa* Reissek, *I. argentina* Lilo, *I. breviscuspis* Reissek e *I. pseudobuxus* Reissek.

#### 1.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Algumas das propriedades farmacológicas do mate têm sido relacionadas ao alto teor de derivados cafeoilquínicos e outros fenólicos (CHANDRA, GONZALEZ, 2004). A atividade da planta é amplamente discutida, visto que numerosos princípios ativos têm sido identificados nas folhas de *Ilex paraguariensis* que podem ser responsáveis por suas propriedades biológicas. Dentre elas, os componentes encontrados em maior quantidade são os compostos fenólicos (ácidos clorogênicos), as xantinas (cafeína, teofilina e teobromina), flavonoides (quercetina, kaempferol e rutina), saponinas, aminoácidos, minerais (fosfato, ferro e cálcio) e vitaminas (C, B1 e B2) (POMILIO et al., 2002; HECK & MEIJA, 2007; PRZYGODDA et al., 2010).

Os primeiros trabalhos sobre a composição química desta espécie mostraram a presença de metilxantinas - cafeína e teobromina (ATHAYDE et al, 2000). Além disso, há a presença de numerosas saponinas triterpênicas derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico (SUGIMOTO et al, 2009). Nos últimos anos, o destaque nos estudos tem focalizado a atividade biológica dos compostos fenólicos presentes na erva-mate, sendo que os de maior importância são os derivados cafeoilquínicos (BRAVO et al, 2007). Análises fitoquímicas efetuadas por diferentes métodos demonstraram níveis médios de compostos fenólicos entre 7,9 a 9,6%. (FILIP et al., 2001; BASTOS et al., 2006; RIVELLI et al., 2007; CARDOZO JUNIOR et al., 2007; BRAVO, et al., 2007).

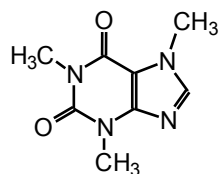
Metilxantinas e compostos fenólicos são os principais compostos químicos encontrados no mate. A principal metilxantina é a cafeína (0,89 a 1,73%), seguida da teobromina, e em menor quantidade a teofilina (CARDOZO JUNIOR et al., 2007). As metilxantinas são conhecidas pela ação estimulante (NEHLIG, 1999), efeitos lipolítico e

termogênico (ACHESON, 2005). Os compostos fenólicos têm sido estudados pela sua influência na qualidade de vida alimentar. Eles constituem uma ampla gama de substâncias com atividade antioxidante. O mate é considerado uma fonte de antioxidantes, por conter substâncias fenólicas muito ativas na saúde humana. A ação destes constituintes tem sido relatada na proteção do organismo contra radicais livres, gerados *in vivo*, que estão envolvidos no aparecimento de doenças degenerativas, tais como, a aterosclerose, doenças reumáticas, cardiovasculares e artrite (BASTOS et al., 2006a; BASTOS et al., 2006b; LUNCEFORD & GUGLIUCCI, 2005). Além da função antioxidante, há evidências de que a classe dos ácidos clorogênicos pode diminuir a produção hepática de glicose (HEMMERLE et al., 1997) e a sua absorção (JOHNSTON et al., 2003), resultando em menor índice glicêmico (CLIFORD, 2004). Enquanto isso, saponinas têm potencial hipocolesterolêmico, pois interferem no metabolismo do colesterol e retardam a absorção de gorduras inibindo a lipase pancreática (BASTOS et al., 2007).

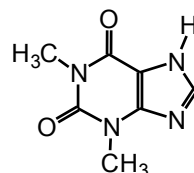
#### 1.4.1 Metilxantinas

metilxantinas são substâncias orgânicas de origem vegetal e que contêm função amina. Pertencem à classe de alcalóides purínicos e podem ser encontradas em diversas plantas, dentre elas a erva-mate. Possuem caráter anfótero, pois dependendo do pH comportam-se como ácidos ou bases (RATES et al., 2007). Acredita-se que as metilxantinas sejam os estimulantes mais antigos da história da humanidade, sendo a cafeína um dos mais potentes (BRENELLI, 2003). Dentre os efeitos físicos descritos durante o consumo da cafeína pode ser citada a insônia, irritabilidade, náuseas e ansiedade (ALTIMARI et al., 2001).

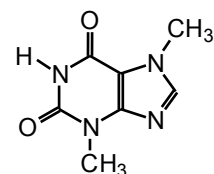
Figura 2: Estrutura molecular das principais metilxantinas presentes em alimentos.



Cafeína  
1,3,7-Trimetilxantina



Teofilina  
1,3-Dimetilxantina



Teobromina  
3,7-Dimetilxantina

Fonte: SIMÕES et al.. (2007).

Dentre as metilxantinas encontradas nos alimentos, pode-se citar a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), a teobromina (3,7-dimetilxantina) e a teofilina (1,3-dimetilxantina) (SIMÕES et al., 2007). Na erva-mate, a metilxantina que se apresenta em maior concentração é a cafeína, seguida pela teobromina, sendo que são as folhas que apresentam maior concentração destes compostos. A teofilina que é um isômero da teobromina aparece em pequenas quantidades (HECK & MEJIA, 2007).

Entre estes três compostos, a cafeína é a mais abundante no chá mate, café e erva-mate, enquanto que a teobromina é o mais abundante em sementes de cacau. Com a informação da concentração de cafeína presente na planta, podem ser identificadas adulterações em erva-mate, utilizando o teor de cafeína como auxiliar na caracterização (REGINATTO et al., 1999). A alta concentração de cafeína que se acumula em algumas plantas está relacionada ao seu efeito protetor sobre o tecido a partir de folhas jovens, frutos e flores, de predadores, como larvas de inseto e besouros, ou o efeito de inibição que a cafeína pode ter sobre a germinação de outras sementes, quando lançada no solo, como é o caso do feijão (HEWAVITHARANAGE et al., 2000; ASHIHARA & CROZIER, 2001).

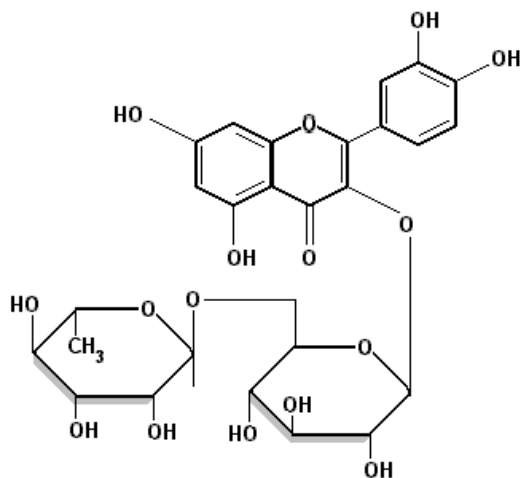
#### **1.4.2 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas superiores e são encontrados em grande quantidade de alimentos de origem vegetal, como frutas, legumes, cereais e leguminosas, e em bebidas de origem vegetal, tais como o chá, vinho e o café (CHEYNIER, 2005; MANACH et al., 2004).

Estes metabólitos secundários geralmente estão envolvidos na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por agentes patogênicos. A maioria destes compostos tem recebido uma atenção considerável como fatores potencialmente protetores de doenças crônico-degenerativas, dentre as quais a catarata, degeneração muscular, doenças neurodegenerativas e diabetes mellitus, câncer e doenças cardiovasculares (SCALBERT, et al., 2005).



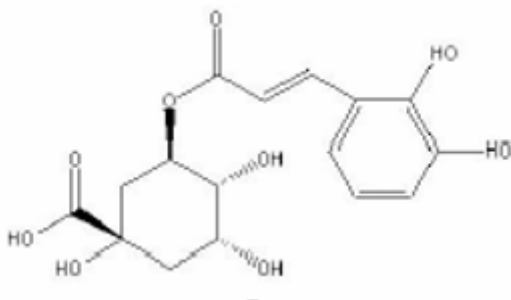
Figura 3: Estrutura Química da Rutina.



Fonte: BARLETTE (2011).

Na erva-mate são encontrados diversos polifenóis, como os flavonoides rutina e quercetina e os derivados cafeoilquínicos derivados do ácido clorogênico (FILIP et al., 2001). Quimicamente, o ácido clorogênico é um éster formado pelos ácidos caféico e quínico, este é hidrolizado na microflora intestinal em vários metabólitos do ácido aromático, incluindo o ácido caféico e o ácido quínico (GONTHIER et al., 2003).

Figura 4: Estrutura química do ácido clorogênico.

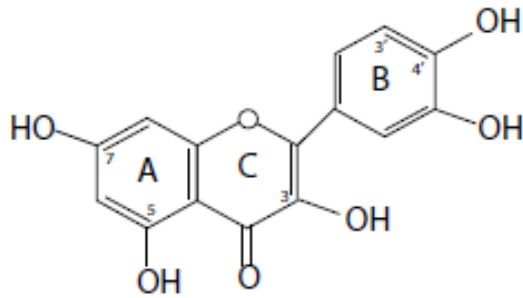


Fonte: BARLETTE (2011).

Diversos processos metabólicos essenciais à planta são influenciados pelos compostos fenólicos, dentre eles o crescimento vegetal e a germinação de sementes. Donaduzzi et al. (2003) avaliaram amostras de erva-mate cultivadas em diferentes localidades no Paraná, observando a diferença na quantidade de polifenóis totais presentes nas plantas de cada

localidade. Com isso, verifica-se que a variabilidade ambiental influencia diretamente na concentração destes compostos.

Figura 5: Estrutura química da quercetina.



Fonte: ALVES et al. (2010)

Os flavonóides estão entre os compostos naturais mais disseminados nas plantas e são os principais polifenóis da dieta humana. São considerados agentes antioxidantes, pela sua capacidade redutora, atuando como protetores contra o estresse oxidativo. Devido a esta atividade, os polifenóis estão associados à prevenção de doenças cardiovasculares e inflamatórias, a prevenção do câncer e a inibição da oxidação do colesterol proveniente da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (FILIP et al., 2000).

A extração de polifenóis de plantas pode ser efetuada a partir de soluções alcoólicas, tanto com o material seco quanto in natura e podem ser divididos em diferentes classes, como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, antocianinas, cumarinas e antraquinonas (CARVALHO et al., 2007).

### 1.4.3 Saponinas

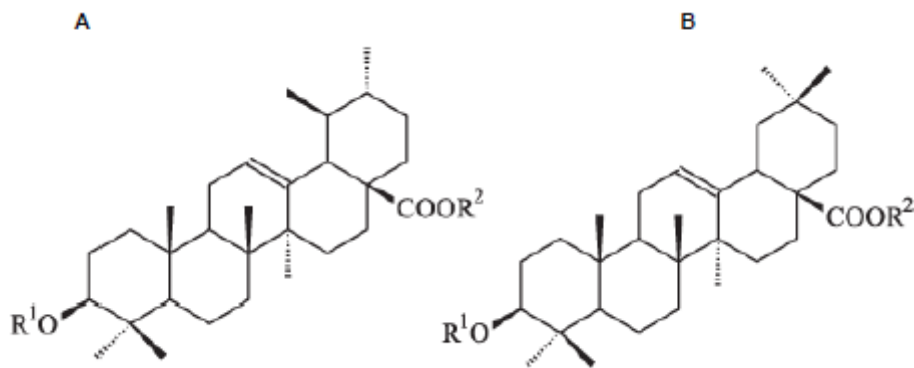
As saponinas são caracterizadas pela capacidade de formar espuma persistente e abundante, por apresentar um gosto amargo e pela sua alta solubilidade em água (SIMÕES et al., 2007). Baseadas em sua estrutura de aglicona, as saponinas podem ser classificadas em saponinas esteroidais e triterpênicas. As primeiras são encontradas principalmente em monocotiledôneas, enquanto que as triterpênicas são mais comuns em dicotiledôneas (SPARG et al., 2004).

A ação detergente, formadora de micelas e a capacidade de reduzir a tensão superficial de uma solução aquosa se devem às cadeias hidrofílicas-hidrofóbicas (anfipáticas) presentes

em sua estrutura (GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ & MAZZA, 2007). As saponinas possuem elevada massa molecular (600 a 2.000 g.mol<sup>-1</sup>), podendo ser de cadeia linear ou ramificada, e são consideradas estruturas complexas devido à presença concomitante de um número variável de açúcares (SCHENKEL et al., 2007).

A principal diferença das saponinas presentes na espécie *I. paraguariensis*, de outras espécies do gênero *Ilex*, é o fato de que as saponinas daquela apresentam somente derivados do ácido ursólico e oleanólico (Figura 6) (PIRES et al., 2007).

Figura 6: Estrutura química do ácido ursólico (A) e ácido oleanólico (B).

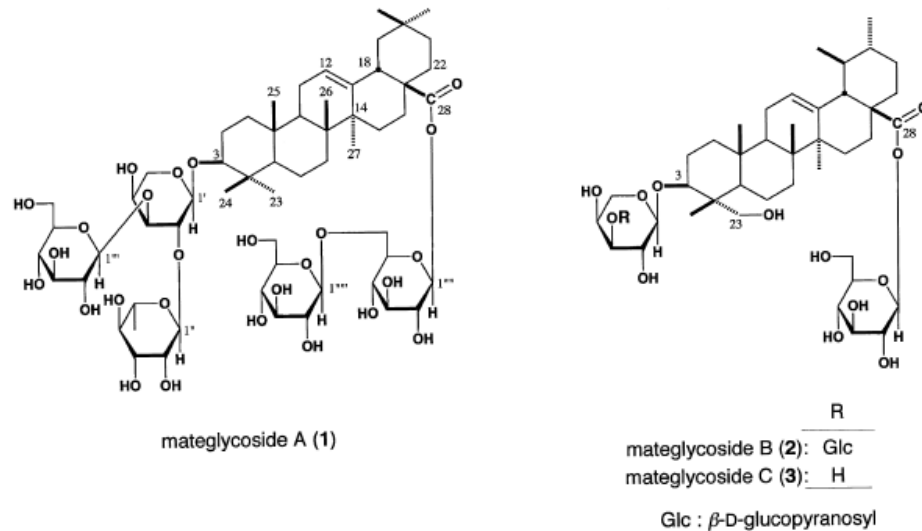


Fonte: PIRES et al. (2007)

A extração de saponinas de plantas pode ser obtida com a utilização de técnicas de maceração, percolação ou extração exaustiva por refluxo, utilizando soluções alcoólicas ou hidro alcólicas (SCHENKEL et al., 2007). Após a retirada de todo o álcool, pode-se purificar as saponinas submetendo o extrato aquoso obtido à partição com solventes poucos polares, como diclorometano e clorofórmio, com o objetivo de retirar os compostos apolares. Posteriormente, a partição com n-butanol visa a retirada de açúcares livres, aminoácidos e ácidos orgânicos, dentre outros compostos hidrofílicos que ficam presos à fase aquosa. Com isso, espera-se obter uma fração purificada de saponinas na fase butanólica (SIMÕES et al., 2007).

Foi verificado que o extrato metanólico produzido a partir das folhas de *I. paraguariensis*, exibe efeito inibitório contra a lipase pancreática. A partir do extrato metanólico, foram isoladas três saponinas novas, nomeadas de mateglicosídeos A, B e C (Figura 7) (SUGIMOTO, et al. 2009).

Figura 7: Estrutura química das saponinas que apresentam atividade na lipase pancreática.



Fonte: SUGIMOTO, et al. (2009)

Dentre as ações farmacológicas e biológicas das saponinas, podem ser citadas as atividades hemolítica, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, citotóxica, antitumoral e antiviral (SPARG et al., 2004).

### 1.5 O COLESTEROL E AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

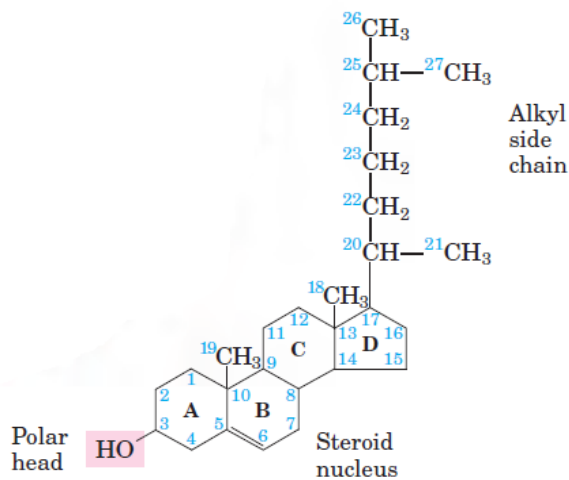
Diversos compostos distintos encontrados nos alimentos e no organismo são classificados como lipídios, sendo as principais classes as gorduras neutras, também conhecidas como triglicerídeos, os fosfolipídios e o colesterol, além de outras menos importantes. Os triglicerídeos são utilizados no organismo principalmente no fornecimento de energia, aos diferentes processos metabólicos; sendo a função quase igualmente partilhada com os carboidratos. Todavia, alguns lipídios, em particular o colesterol, os fosfolipídios e seus derivados são utilizados em todo o organismo no desempenho das funções celulares (GUYTON,1997).

Mais de 95% de todos os lipídios do plasma encontram-se sob a forma de lipoproteínas, que consistem em pequenas partículas contendo triglicerídeos, colesterol, fosfolipídios e proteínas (GUYTON,1997), desta forma, os lipídeos circulam no organismo. Quase todas as lipoproteínas são formadas no fígado, onde ocorre a síntese da maior parte do colesterol, dos fosfolipídios e dos triglicerídeos plasmáticos. A principal função das lipoproteínas consiste em transportar seus componentes lipídicos no sangue, como é o caso dos

triglicerídeos produzidos no fígado para serem armazenados no tecido adiposo e também no transporte do colesterol do fígado para a periferia e vice-versa.

O colesterol consiste em uma estrutura básica com núcleo esterol, inteiramente sintetizado a partir de múltiplas moléculas de acetil-CoA (LEHNINGER, 2005), como pode ser observado na Figura 8.

Figura 8: Estrutura química do colesterol.



Fonte: LEHNINGER (2005)

O núcleo esterol pode ser modificado por várias cadeias laterais para formar colesterol; ácido cólico, que é a base dos ácidos biliares formados no fígado; e muitos hormônios esteróides importantes secretados pelo córtex supra-renal, pelos ovários e testículos (GUYTON, 1997).

Desta forma, verifica-se a importância deste composto, para a formação de diversas substâncias secretadas no organismo. Além do colesterol absorvido diariamente, pelo fornecimento da alimentação, do tubo gastrintestinal, denominado colesterol exógeno, uma quantidade ainda maior também é sintetizada nas células do organismo, sendo conhecido como colesterol endógeno (GUYTON, 1997).

As doenças cardiovasculares ocorrem pela obstrução dos vasos sanguíneos, e representam uma das maiores causas de morte no mundo e uma importante causa de incapacidade (WHO, 2010). O AVC (Acidente Vascular Cerebral) também pode ser causado pelo rompimento de algum vaso sanguíneo responsável pela irrigação do cérebro ou coração ou

coágulos sanguíneos (WHO, 2010). Estas obstruções podem causar ataques cardíacos e derrames que são eventos agudos, causados principalmente por um bloqueio que evita o transporte do sangue ao coração ou ao cérebro. A razão mais comum para isso é o acúmulo de colesterol nas paredes internas dos vasos que irrigam estes órgãos.

A causa mais frequente de diminuição do fluxo sanguíneo coronário é a aterosclerose, como causa de cardiopatia isquêmica. Pessoas que ingerem uma quantidade excessiva de colesterol e de outros lipídios possuem uma deposição gradual de gordura em muitos pontos sob a íntima das artérias. Os primeiros centímetros das artérias coronárias são locais em que comumente há desenvolvimento de placas ateroscleróticas ou também chamadas de placas ateromatosas (GUYTON, 1996).

Posteriormente, as áreas de depósito são invadidas por tecido fibroso e, muitas vezes, tornam-se também calcificadas. O resultado final é o desenvolvimento de placas ateroscleróticas que fazem projeção para o lúmen dos vasos e bloqueiam total ou parcialmente o fluxo sanguíneo (GUYTON, 1996). Estudos epidemiológicos sugerem que, mesmo na ausência de outros fatores de risco, a idade avançada em si aumenta significativamente a morbidade cardiovascular, desempenhando um papel central na patogênese da aterosclerose e suas complicações (WHO, 2010).

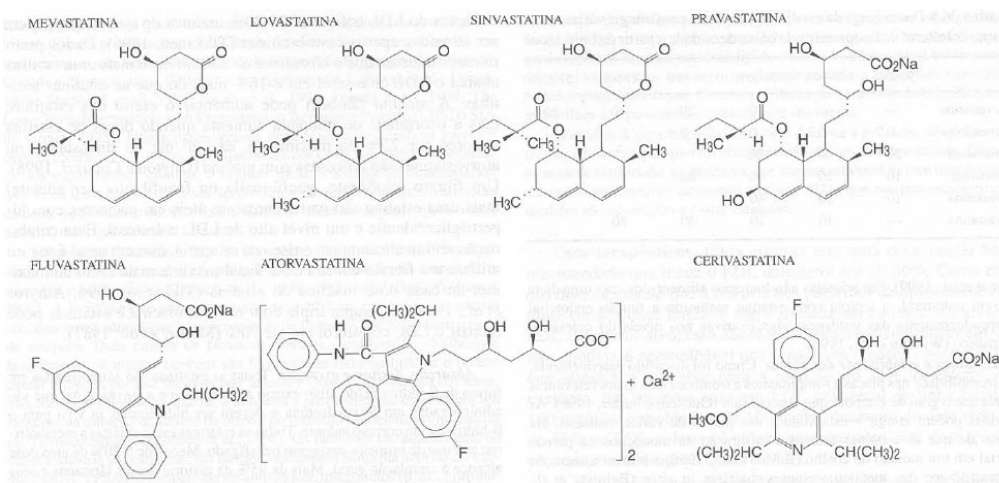
A incidência de doenças cardiovasculares em adultos dobra aproximadamente a cada década de vida e, apesar do aumento com a idade, grande parte dessas doenças poderia ser evitada, desde as mais frequentes como o câncer, as doenças cardiovasculares crônicas e diabetes. A Organização Mundial da Saúde (OMS) preza que a prevenção e o controle integrados devem ocorrer para os indivíduos de todas as idades, baseada na redução dos seguintes fatores: hipertensão arterial sistêmica, tabagismo, consumo de álcool, falta de atividade física, dieta inadequada, obesidade e hipercolesterolemia (PEREIRA, BARRETO & PASSOS, 2008).

A hipercolesterolemia manifesta-se quando os níveis de colesterol no sangue estão superiores aos níveis máximos recomendados, baseados no risco cardiovascular dos indivíduos. Há dois tipos de colesterol, a forma livre (CL) e a esterificada (CE), da forma livre, podem ser produzidas as lipoproteínas HDL (High Density Lipoproteins), que é transportada até o fígado para ser eliminada, e a LDL (Low Density Lipoproteins), que deposita-se na parede dos vasos sanguíneos, quando disponível em excesso no organismo (WHO, 2010). Tanto a diminuição de colesterol HDL quanto o excesso de LDL podem aumentar o risco de doenças cardiovasculares, citadas anteriormente.

A terapia disponível para o tratamento das dislipidemias são as estatinas, as resinas quelantes de ácidos biliares, o ácido nicotínico (niacina) e os derivados do ácido fíbrico. Os inibidores da HMG CoA redutase – estatinas (Figura 9), são os fármacos mais eficazes e mais bem tolerados atualmente em uso (GOODMAN, 2005). O mecanismo de ação das estatinas envolve a redução dos níveis de LDL, através de uma porção parecida com o ácido mevalônico, que inibe de maneira competitiva a HMG-CoA redutase (GOODMAN, 2005).

A redução dos níveis de triglicerídeos também pode ser alcançada com a utilização das estatinas, na mesma proporção que a redução obtida nos níveis de LDL. Porém, esta proporção só é alcançada quando os níveis de triglicerídeos encontram-se superiores a 250 mg/dL. Quando os níveis estiverem abaixo desta concentração, o máximo de redução alcançada é de 25% em relação ao LDL diminuído (GOODMAN, 2005).

Figura 9: Estrutura química das principais estatinas.



Fonte: GOODMAN, 2005.

A cerivastatina é a estatina que possui maior atividade, em comparação com as demais, levando-se em consideração a concentração necessária para se obter o mesmo nível de redução de LDL, porém a simvastatina é a droga mais difundida no mercado atualmente.

## 1.6 OBJETIVOS

### 1.6.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar, a atividade do extrato bruto e da fração n-butanol de *Ilex paraguariensis* frente ao aumento da concentração sérica de colesterol em ratos submetidos à dieta hiperlipêmica.

### 1.6.2Objetivos Específicos

Os objetivos específicos presentes neste trabalho foram:

- Obter o extrato bruto e a fração n-butanólica de *Ilex paraguariensis*.
- Avaliar a eficácia do método de aumento dos níveis de colesterol sanguíneo, a partir da incorporação de colesterol puro e ácido cólico, nas concentrações de 1% e 0,1%, respectivamente;
- Avaliar a eficácia do método de aumento dos níveis de colesterol sanguíneo, a partir da incorporação de gordura animal pura (de origem suína).
- Avaliar os níveis de Colesterol Total, fração HDL, triglicerídeos, Frações VLDL e LDL, após a administração do extrato de *Ilex paraguariensis*, em três concentrações.
- Observar o perfil químico dos extratos utilizados no estudo, utilizando técnicas de HPLC, verificando a concentração dos compostos químicos relacionados à atividade antiolesterolêmica.



## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS

Dois experimentos foram realizados utilizando ratos Wistar macho (n=80), com peso entre 250 e 450 g, separados quanto ao tipo de dieta a que foram submetidos, induzindo o aumento dos níveis de colesterol sanguíneo (n=40). Todos os 80 animais foram obtidos no biotério da Universidade Paranaense (UNIPAR), mantidos em caixas padrão e distribuídos em grupos de no máximo seis animais por caixa. As condições do ambiente disponível para os animais foram padronizadas em  $22\pm 2$  °C de temperatura e 12 horas de luz e 12 horas de escuro e água ad libitum. Após o nascimento, os animais foram alimentados com ração para cobaias entre o desmame e o início do experimento.

Durante o experimento, a quantidade de ração ingerida pelos animais não foi considerada relevante, pois o interesse principal foi em atingir altos níveis séricos de colesterol sanguíneo e/ou seus derivados. Optou-se por animais machos, para evitar a influência hormonal sob o ganho de peso e deposição de gordura. Em ambos os grupos, foram mantidos animais controle negativo, os quais não receberam a alimentação enriquecida, e também animais controle positivo, os quais foram tratados com alimentação enriquecida, porém sem tratamento experimental. Os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal da Universidade Paranaense e aprovado sob o n ° 18620/2010.

### 2.2 DIETA DOS ANIMAIS

No Experimento 1, foi utilizado modelo de nutrição relatado por LIMA et al., 2010, LOPES et al., 2000 e MACHADO et al., 2003, ambos com sucesso na elevação dos níveis séricos de colesterol e seus derivados. Trata-se de uma preparação enriquecida com colesterol e ácido cólico, utilizando-se de ração de cobaias triturada como base, 1 % de colesterol em pó e 0,1% de ácido cólico em pó. O preparo da ração utilizada no Experimento 1 foi realizado via úmida, para incorporação uniforme dos ingredientes. Após obter uma massa firme e

homogênea, eram formados, com as próprias mãos, pellets (granulados) de tamanho regular, para que a secagem fosse uniforme em toda a bandeja.

Para o preparo da ração utilizada no Experimento 2 foi utilizada como base, a ração para cobaias triturada. A ração foi incorporada com gordura animal pura, em uma proporção de 50% (REIS, 2008). A gordura animal utilizada foi a banha de porco, sendo necessário acrescentar uma quantidade de polvilho, com o objetivo de facilitar a secagem da mistura em estufa.

## 2.3 EXTRATOS VEGETAIS

Em ambas as preparações, foram utilizados 20 Kg de folhas desidratadas de erva-mate, obtida de cultivos experimentais localizados no município de Ivaí / PR, Brasil (lat. 25° 01' S, Long. 50° 47' W, Alt. 650-750 m).

### 2.3.1 Extrato bruto

Para a obtenção do extrato bruto, foi utilizado como solvente extrator, uma solução de metanol e água, na proporção de 70:30. As folhas trituradas foram tamisadas e adicionou-se o líquido extrator, na proporção de 1:4 (4 litros de metanol para cada Kg da planta). O frasco foi agitado diariamente, durante um minuto, pelo período de sete dias. O produto obtido foi filtrado, com auxílio de bomba a vácuo e posteriormente concentrado o extrato no rotaevaporador, obtendo o extrato bruto. O resíduo de solvente foi evaporado naturalmente em capela de fluxo.

### 2.3.2 Fração n-butanólica

Para a obtenção da fração, utilizou-se o extrato anteriormente obtido. O extrato metanólico foi solubilizado em água quente e transferido para um balão de separação. A solução contida no balão foi particionada com n-hexano, repetindo-se este procedimento por três vezes. Foi realizada a separação da fração n-hexano do extrato bruto.

O extrato bruto restante foi depositado em balão de separação, e particionado com clorofórmio. Este procedimento foi repetido três vezes obtendo-se a fração clorofórmio. O extrato bruto resultante foi colocado em outro balão de separação, adicionado com acetato de etila. A extração foi repetida por três vezes, sendo que a fração acetato de etila foi obtida.

Finalmente utilizou-se o n-butanol, e o procedimento foi repetido três vezes. A fração n-butanol (FBU) foi finalizada por filtração, com auxílio de bomba a vácuo, e posteriormente concentrada em rotaevaporador. O resíduo de solvente foi evaporado naturalmente em capela de fluxo.

## 2.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

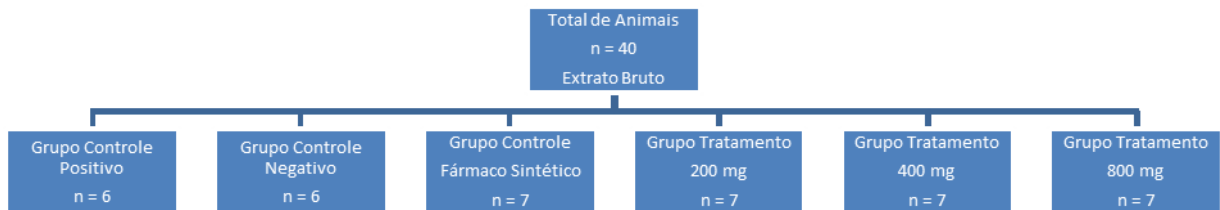
Dois experimentos foram conduzidos individualmente e com protocolos experimentais distintos, para avaliar dois extratos diferentes da mesma planta, o extrato bruto (EBR) e a fração n-butanol (FBU). Ambos os estudos foram acompanhados por grupos controle (positivo e negativo) e tratamento com fármaco sintético. O controle negativo foi tratado com ração normal para cobaias, sendo que o objetivo de manter o controle negativo foi de verificar a possibilidade de induzir níveis séricos de colesterol, sem uma alteração e-/ou complementação na alimentação normalmente administrada em animais de laboratório, excluindo a possibilidade de interferência nos resultados encontrados.

O controle positivo teve sua alimentação acrescida de colesterol e ácido cólico (Experimento 1) e gordura animal suína (Experimento 2), de acordo com o experimento adotado, não havendo tratamento com extrato. O grupo controle positivo foi mantido com o objetivo de indicar que, sem o tratamento farmacológico ou com o extrato da planta, os níveis de colesterol tendem a aumentar ou permanecerem altos. Além destes, pode-se considerar um controle também, os grupos tratados com medicamento sintético sinvastatina, padrão e referência no tratamento de colesterol.

### 2.4.1 Procedimento experimental – Extrato bruto

Para avaliar o efeito do Extrato Bruto (EBR), os 40 animais foram divididos em grupos de cinco a sete animais, de acordo com o tipo de tratamento a ser administrado após a alimentação hipercolesterolêmica, segundo a Figura 10.

Figura 10: Esquema de divisão do grupo de animais de estudo para avaliação da atividade antiolesterolêmica do extrato bruto (EBR) de *Ilex paraguariensis*.



Fonte: BALZAN, Silvie R. (2012).

Os tratamentos com o extrato bruto e fração n-butanólica foram realizados em três concentrações diárias de 200, 400 e 800 mg/Kg. A quantidade de líquido administrado por animal foi de 1 mL por dia. A administração do extrato aos animais foi realizada via oral, com auxílio de uma agulha de gavagem, para evitar que houvesse diferença na quantidade de extrato administrada.

Para os animais controle, os quais não foram submetidos ao tratamento com a planta, foi realizada a administração de água, com auxílio da agulha de gavagem, para que os mesmos fossem submetidos ao mesmo estresse dos animais tratados. O medicamento referência foi administrado aos animais na forma de suspensão, na quantidade padrão a ser administrada por peso corporal, conforme indicado na literatura farmacológica. Os tratamentos, farmacológico e com o extrato, foram realizados pelo período de 30 dias, até que fossem efetuadas as coletas sanguíneas finais.

A dieta hiperlipidêmica constituiu-se de dieta rica em gordura animal (Experimento 2), a qual fornece substrato suficiente para o desenvolvimento de colesterol sanguíneo. A ração foi incorporada com gordura animal pura, em uma proporção de 50% (REIS, 2008) no tratamento com Extrato Bruto (EBR). No experimento com a Fração n-Butanol (FBU) os animais foram submetidos a uma dieta enriquecida com 1% de colesterol e 0,1% de ácido cólico (Experimento 1), os quais foram acrescentados diretamente na ração dos animais em tratamento (LIMA et al., 2010; LOPES et al., 2000 e MACHADO et al., 2003). O preparo da ração utilizada nos experimentos foi realizado via úmida, para incorporação uniforme dos ingredientes. Após obter uma massa firme e homogênea, eram formados, com as próprias mãos, pellets (granulados) de tamanho regular, para que a secagem fosse uniforme em toda a bandeja.

Os animais foram tratados com a ração preparada por um período de 30 dias, tempo baseado em trabalhos publicados anteriormente (LIMA et al., 2012; LOPES et al., 2000; MACHADO et al. 2003 e REIS, 2008). Ao iniciar a administração de ração enriquecida, foi

dado início ao experimento, os animais foram avaliados em relação ao ganho de peso. A água e alimento foram administrados ad libitum, sendo trocada e complementada diariamente. Após este período os animais foram tratados concomitantemente com os extratos.

## 2.5 COLETAS E ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A coleta sanguínea nos animais foi realizada via punção da veia caudal. A quantidade de sangue coletada foi de 1 ml, sendo necessária esta quantidade para efetuar todas as análises bioquímicas. Após 30 dias, período previsto para o aumento do nível sérico de colesterol, foi efetuado a primeira coleta sanguínea nos grupos controle, para avaliação dos níveis de colesterol. A segunda coleta sanguínea foi realizada 45 dias após o início do experimento, isto é, 15 dias após o início da administração do extrato e a última coleta nos 60 dias de experimento, após 30 dias de administração do extrato.

Após coletado, o sangue foi misturado a um anticoagulante e posteriormente centrifugado. As análises realizadas em laboratório foram: Colesterol total, a fração HDL e os triglicerídeos. Além destes, foi efetuado o cálculo de conversão para os valores das frações VLDL e LDL. Para obter os valores da fração VLDL, foi realizada a divisão da concentração de triglicerídeos por cinco. E, para obter a concentração de LDL no sangue, subtraí o valor de HDL + VLDL obtidos, do resultado de colesterol total.

Resumindo as fórmulas:

- Fração VLDL: TRIGLICERÍDEOS / 5
- Fração LDL: Colesterol total - (Colesterol HDL + Colesterol VLDL)

## 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  DP dos grupos de tratamento. A análise estatística foi realizada usando-se análise da variância de uma via (ANOVA), seguido por teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 2.7 ANÁLISES QUÍMICAS

A análise química foi realizada por cromatografia líquida (CLAE), em equipamento Shimadzu (Mod. SCL-10A), sendo o sistema constituído de um injetor SIL-20AHT, uma bomba de LC-20AT, um misturador de FCV-10AL, um degaseificador DGU-20A5 e um injetor válvula, com sistema de amostragem de até 20 uL. Acoplados ao cromatógrafo, um detector de DAD SPD-M20A e um módulo de interface Shimadzu CBM-20A. A coluna analítica utilizada na análise foi uma Coluna Phenomenex C-18, (4,6 x 250 mm), sendo mantida a 30 °C, utilizando o forno integrado CTO-20A. Os extratos foram filtrados com filtros de nylon de 0,45 uM e o sistema de solvente consistiu em:

(A) Água purificada pelo sistema de Milli-Q (Milipore Milford, MA) e acidulada com 0,3% de ácido acético (Vetec);

(B) Metanol (JT Backer, EUA).

(C) Os solventes foram injetados a uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min, utilizando o seguinte gradiente:

- B 15% para B 20% durante 20 min;
- B 20% para B 40% durante 25 min;
- B 40% para B 85% durante 50 min;
- B 85% para B 15% durante 10 min.

Todas as amostras foram processadas em duplicata e a detecção foi monitorada no comprimento de onda de 265 nm para a cafeína e a teobromina, e em 325 nm para ácidos clorogênicos. Picos cromatográficos foram identificados por comparação ao tempo de retenção das amostras preparadas com os padrões de cafeína, teobromina e ácido clorogênico (Sigma Chemical Co., EUA), injetadas nas mesmas condições.

Todos os reagentes utilizados foram de grau cromatográfico e as curvas de calibração foram obtidas com as normas mencionadas, após a diluição na fase móvel. A linearidade foi determinada por regressão; a precisão e a exatidão foram determinadas utilizando o coeficiente de variação (CV% <3). Os coeficientes de correlação obtidos foram de  $r^2 = 0,9999$  para a cafeína,  $r^2 = 0,9942$  para teobromina,  $r^2 = 0,9999$  para o ácido clorogênico.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Com base nos resultados bioquímicos avaliados no experimento, verificou-se que houve aumento dos níveis séricos de colesterol nos animais, no período de tratamento dos mesmos, bem como no nível de triglicerídeos, tornando o experimento válido para avaliação e conclusão da influência do extrato da planta sobre os animais tratados, sempre relacionando o tratamento aplicado (extrato bruto e fração) a um tratamento com medicamento sintético, referência no tratamento de dislipidemias. Estudos semelhantes foram relatados em experimentos publicados por Przygodda et al.(2010).

Na Tabela 2 podem ser visualizados os resultados bioquímicos obtidos nos grupos controle e nos grupos tratamento, aplicando as concentrações 200, 400 e 800 mg. Pode ser visualizada uma diferença significativa em relação à administração da concentração de 800 mg de extrato em comparação com o controle positivo para o colesterol total.

Tabela 2: Valores de colesterol total e triglicerídeos após o período de tratamento com o extrato bruto (EBR) e fração n-butanol (FBU) de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

GRUPO	COLESTEROL TOTAL (mg/dl)	TRIGLICERÍDEOS (mg/dl)
CONTROLE POSITIVO	101,17 ± 30,62	81,17 ± 17,02
CONTROLE NEGATIVO	80,67 ± 11,93	67,50 ± 9,67
GRUPO SINVASTATINA	97,86 ± 24,99 **	45,40 ± 16,80 **
GRUPO EBR 200 mg	104,86 ± 24,98	70,29 ± 13,00
GRUPO EBR 400 mg	103,71 ± 21,23	57,57 ± 14,57 **
GRUPO EBR 800 mg	97,20 ± 17,30 **	56,67 ± 19,37 **
GRUPO FBU 200 mg	70,00 ± 6,10 **	56,00 ± 4,80 **
GRUPO FBU 400 mg	75,00 ± 3,60 **	58,00 ± 6,60 **
GRUPO FBU 800 mg	104,00 ± 7,00	51,00 ± 4,50 **

Valores expressos em média ± desvio padrão (n= 5-7/grupo). \*\* Valores significativos em comparação com o controle positivo usando-se ANOVA e teste de Bonferroni (p<0,05).

Os animais foram tratados com três concentrações aquosas de ambos os extratos (bruto e n-butanólico), sendo observados resultados proporcionais ao aumento crescente da concentração do extrato, para a avaliação de triglicérides do sangue. Além disso, durante todo o experimento, não foram observados efeitos tóxicos aparentes, que poderiam ser relatados por um ganho ou perda de peso anormal entre os grupos ou alterações de comportamento. O ganho de peso relatado foi proporcional ao pré-tratamento, aplicado durante a fase de aumento dos níveis de colesterol, o qual teve continuidade durante o tratamento químico.

Resultados semelhantes também puderam ser observados em outros trabalhos, como o apresentado por Przygodda et al. (2009), onde além dos resultados de colesterol e triglicérides, foram apresentados resultados de glicose e acúmulo de gordura. Neste estudo, foram trabalhados dois tipos de alimentação, uma rica em gordura e outra rica em açúcar. Em ambas as dietas, observam-se resultados satisfatórios na redução dos níveis de colesterol e triglicérides séricos. Com estes dados, pode-se verificar que houve uma boa adaptação dos animais à ração preparada, com enriquecimento de gordura e colesterol que, mesmo com o tratamento farmacológico padrão (sinvastatina), houve um aumento nos níveis séricos destes parâmetros nos animais, quando comparados os resultados com o controle negativo.

Ao final do experimento, avaliando o resultado de colesterol total obtido, verificou-se que no grupo EBR 800 mg apresentou um controle do nível de colesterol, semelhante ao resultado obtido no grupo controle de tratamento medicamentoso, utilizando o medicamento sintético sinvastatina.

O consumo da fração n-butanólica nas concentrações de 200 mg e 400 mg, remeteram a resultados satisfatórios no controle do colesterol total, além daquele obtido no tratamento farmacológico (grupo controle sinvastatina) e no grupo controle negativo. A utilização da fração n-butanólica proporcionou a utilização de concentrações mais elevadas e padronizadas de compostos fenólicos, em comparação com processos tradicionais de extração de *Ilex paraguariensis* (CLIFFORD, 1990). Mais à frente, apresentaremos os resultados analíticos dos extratos, comprovando que o método de extração proporciona um aumento da concentração de compostos químicos favoráveis ao controle de colesterol e triglicérides, foco deste estudo.

Extraíndo os resultados de triglicérides obtidos no experimento, pode-se verificar que houve resultado semelhante entre os animais tratados com sinvastatina, em relação aos animais tratados com o extrato bruto da planta (EBR) e com a fração n-butanol (FBU), conforme Tabela 2. No grupo tratado com o medicamento padrão, houve um controle dos níveis de triglicérides ainda acima do esperado e observado no grupo controle negativo. O consumo do extrato bruto



proporcionou uma redução menor que a obtida no grupo sinvastatina, porém, ainda acima do obtido nos animais controle negativo, o que considera válido o consumo do extrato no controle do colesterol. No estudo realizado por Przygodda et al. (2010), a concentração de triglicerídeos no sangue dos animais tratados com o chá de erva-mate, concomitantemente a uma dieta hiperlipídica foi de em média 48 mg/dL a menos do que a concentração encontrada nos animais que foram submetidos ao tratamento.

Diversos estudos publicados demonstram as atividades benéficas dos extratos obtidos a partir de *Ilex paraguariensis*, como por exemplo, sobre o estresse oxidativo, as dislipidemias e a obesidade (BRACESCO et al., 2010). Em outros estudos, como em Itagaki et al. (2011), demonstram a atividade antioxidante in vitro e in vivo dos compostos fenólicos.

A fração HDL do sangue refere-se à proporção do colesterol com atividade benéfica ao organismo, conforme demonstrado na introdução deste estudo. Porém, observando os dados abaixo, não há diferença significativa entre o resultado dos grupos do experimento, conforme segue na Tabela 3. A diferença observada entre os grupos do experimento pode ser atribuída à variabilidade populacional normal em grupo de animais, em um experimento in vivo, visto que cada organismo reage de forma diferente às condições ambientais. A inobservância de resultados relevantes do extrato bruto sobre o HDL, não elimina a possibilidade de ação benéfica do extrato no organismo, visto que, a redução dos níveis de colesterol total e triglicerídeos foi observada.

Como é chamado de “fração de colesterol”, o nível de LDL no sangue é sempre proporcional aos níveis de colesterol séricos, mas é diretamente influenciado por outras proporções lipídicas, como os triglicerídeos e a fração HDL. O cálculo da proporção de LDL do colesterol no sangue é diretamente reduzido pela quinta parte da concentração de triglicerídeos presentes no plasma. Além disso, este indicador sanguíneo é reduzido também quando o nível da fração HDL está aumentado. Já a fração VLDL do colesterol é igual à quinta parte da concentração de triglicerídeos no sangue, sendo influenciada apenas sobre este fator. Com base nos resultados bioquímicos avaliados no experimento, verificou-se que houve aumento dos níveis séricos de colesterol nos animais, no período de preparação para o tratamento e que, conseqüentemente houve alteração na concentração de suas frações.

Tabela 3: Análise da fração HDL, fração LDL e fração VLDL, entre os grupos experimentais no final do de tratamento com o extrato bruto (EBR) e fração n-butanol (FBU) de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

GRUPOS	FRAÇÃO HDL (mg/dl)	FRAÇÃO LDL (mg/dl)	FRAÇÃO VLDL (mg/dl)
CONTROLE POSITIVO	35,40 ± 3,29	57,88 ± 22,08	16,12 ± 3,79
CONTROLE NEGATIVO	31,00 ± 3,10	36,17 ± 14,74	13,50 ± 1,93
GRUPO SINVASTATINA	30,29 ± 4,61	49,54 ± 22,55	9,08 ± 3,36
GRUPO EBR 200 mg	30,00 ± 1,7	53,00 ± 6,30	13,00 ± 0,90
GRUPO EBR 400 mg	36,00 ± 1,2	53,00 ± 8,10	11,00 ± 0,90 **
GRUPO EBR 800 mg	34,20 ± 3,35	51,52 ± 13,98	11,48 ± 4,31
GRUPO FBU 200 mg	26,00 ± 1,9 **	31,00 ± 3,10 **	11,00 ± 0,90 **
GRUPO FBU 400 mg	28,00 ± 2,0 **	30,00 ± 3,70 **	10,00 ± 2,00 **
GRUPO FBU 800 mg	32,00 ± 2,6	40,00 ± 3,20	10,00 ± 0,90 **

Valores expressos em média ± desvio padrão (n= 5-7/grupo). \*\* Valores significativos em comparação com o controle positivo usando-se ANOVA e teste de Bonferroni (p<0,05).

A redução dos valores séricos de LDL, nos grupos de tratamento com a fração n-butanólica, nas concentrações de 200 e 400 mg, segue a mesma linha de raciocínio, ligada à redução da concentração de colesterol total no sangue. E, mesmo que não de forma significativa, pelos testes estatísticos, pode-se observar a redução desta fração nos demais grupos de tratamento, relacionando-os ao grupo controle positivo.

Da mesma forma, durante a análise dos dados de VLDL sanguíneos, observou-se uma significativa redução destes valores nos grupos tratamento 200, 400 e 800 mg (fração n-butanol) e no grupo 400 mg (extrato bruto). Esta redução vem de encontro com os dados analisados em relação ao nível de triglicerídeos, apresentados acima, visto que a concentração desta fração, VLDL, é inversamente proporcional à quinta parte do nível de triglicerídeos séricos.

O ganho de peso nos animais dos grupos de tratamento e controles ao final dos 60 dias de experimento pode ser observado na Tabela 4. Comparando-se os resultados obtidos entre os controles, pode-se concluir que houve um ganho de peso, relacionado à alimentação diferenciada, administrada no estudo. Observando os resultados experimentais relacionados ao ganho de peso, pode-se perceber que, mesmo havendo o consumo concomitante de uma alimentação rica em lipídios, a utilização da fração n-butanólica demonstrou-se um controle de

peso significativo e gradativamente relacionado à concentração de extrato administrada, sendo que o mesmo não foi observado no controle positivo.

Tabela 4: Ganho de peso dos animais no final do tratamento com o extrato bruto (EBR) e fração n-butanol (FBU) de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

GRUPOS DE TRATAMENTO	MONITORAMENTO DE PESO (g)
CONTROLE POSITIVO	127,04 ± 50,95
CONTROLE NEGATIVO	57,00 ± 26,11
GRUPO SINVASTATINA	85,13± 34,63
GRUPO EBR 200 mg	96,73 ± 18,23
GRUPO EBR 400 mg	133,11 ± 20,67
GRUPO EBR 800 mg	120,24 ± 35,41
GRUPO FBU 200 mg	59,00 ± 3,30 **
GRUPO FBU 400 mg	69,00 ± 4,20 **
GRUPO FBU 800 mg	88,00 ± 9,00

Valores expressos em média ± desvio padrão (n= 5-7/grupo). \*\* Valores significativos em comparação com o controle positivo usando-se ANOVA e teste de Bonferroni (p<0,05).

Em comparativo, verificando o ganho de peso dos animais mantidos com alimentação normal de cobaia, controle negativo (57,0 g), os grupos tratamento não apresentaram resultados compatíveis, porém, melhores que os obtidos pelo grupo controle medicamentoso (85,13 g), nas concentrações 200 e 400 mg (59,0 g e 69,0 g, respectivamente). Como citado anteriormente, em outros estudos houve a indicação da atividade do extrato de *Ilex paraguariensis*, no controle de obesidade, como em Bracesco et al. (2010).

A mesma proporcionalidade de controle não foi verificada no tratamento com o extrato bruto, que pode estar relacionada à menor concentração de compostos fenólicos, comprovado pela análise química dos extratos, pelo método de HPLC e calculado pela utilização de uma curva de calibração, obtida por concentrações conhecidas de padrão.

Os resultados do estudo apresentado estão de acordo com os resultados reportados por MELLO et al. (2007) e ARCARI (2009), onde o tratamento com *Ilex paraguariensis* em ratos mantidos com dieta rica em gordura, apresentou melhoria nos parâmetros de peso do corpo,

colesterol, triglicerídeos, LDL-colesterol e HDL-colesterol, portanto, exercendo influência positiva em vários marcadores bioquímicos relacionados à obesidade.

Foi observado no estudo de Przygodda et.al (2010) que os animais que consumiram o chá de erva mate apresentaram resultados favoráveis nas análises de ganho de peso, colesterol total e triglicerídeos. O mecanismo pelo qual estes marcadores foram influenciados foi relacionado com a ação de saponinas, que interferem no metabolismo do colesterol e reduzem a absorção de gorduras derivadas da dieta, atuando principalmente através da inibição da lipase pancreática (HAN, et.al., 2002; BASTOS et.al., 2007).

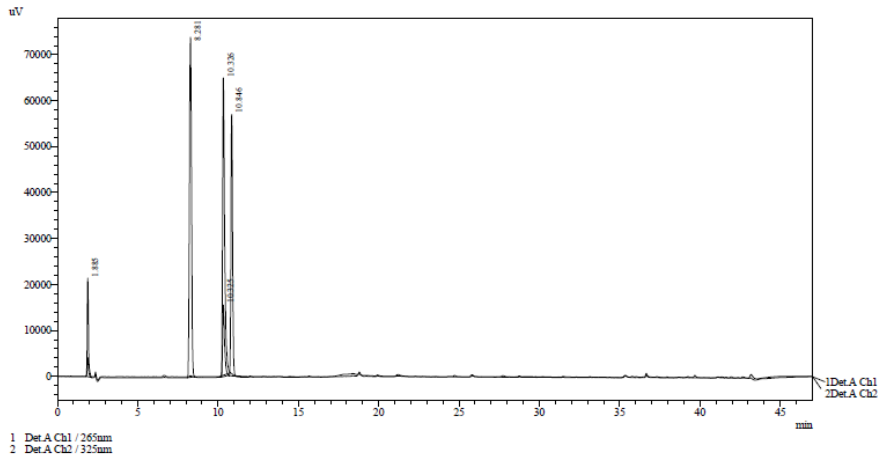
Estudos epidemiológicos indicam que o consumo de cafeína pode reduzir o peso corporal e adiposidade, por termogênese crescente, a oxidação lipídica e lipólise. Um estudo sugere que o mecanismo para a termogênese e os efeitos lipolíticos da cafeína causa um aumento na concentração de adrenalina na circulação sanguínea, que acelera o metabolismo e estimula a mobilização de ácidos graxos livres. Outro mecanismo proposto para a ação lipolítica envolve a inibição da fosfodiesterase, causada pela cafeína, que reduz a repartição intracelular de AMP cíclico (AMPC), resultando num aumento na concentração de AMPC e consequente, aumentado a quebra da gordura (lipólise) (ACHESON, 2005).

### 3.2 ANÁLISE QUÍMICA DO EXTRATO

Os extratos utilizados no tratamento dos animais foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência LC-DAD, obtendo cromatogramas que possibilitaram a identificação dos compostos presentes no extrato, e a quantificação dos mesmos foi possível pela utilização de padrões químicos de comparação. Na Figura 11 pode ser visualizado o cromatograma base, de identificação dos padrões. Foi realizada a identificação dos padrões de cafeína, teobromina e ácido clorogênico, sendo que a faixa de detecção usada foi de 265 para as metilxantinas e 325 nm para o ácido clorogênico.

Dos compostos químicos presentes no extrato, o ácido clorogênico, pode ser observado no tempo de retenção de 10.326, enquanto que para a cafeína, o tempo de retenção observado foi de 10.846 e a teobromina em 8.281, segundo as condições cromatográficas utilizadas e apresentadas na Figura 11.

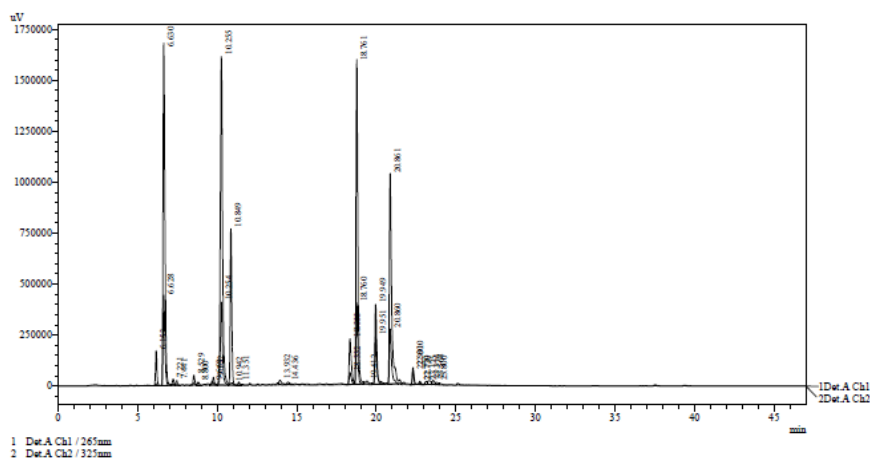
Figura 11: Cromatograma de identificação dos padrões teobromina (8.281) cafeína (10.846) e ácido clorogênico (10.326). Condições cromatográficas descritas em materiais e métodos.



Fonte: BALZAN, Silvie R. (2012).

Ambos os extratos foram avaliados quimicamente, o extrato bruto e a fração n-butanol, na mesma faixa de detecção de 265 a 325 nm, sendo que os dois extratos foram preparados na ocasião do tratamento. Para o extrato bruto (EBR), obteve-se o cromatograma de análise apresentado na Figura 12.

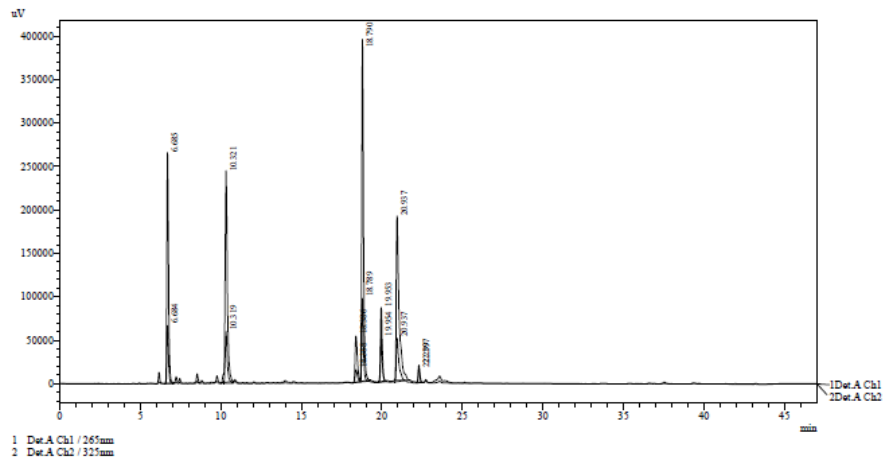
Figura 12: Cromatograma do extrato bruto de erva-mate (EBR), demonstrando os compostos majoritários cafeína (10.849) e o ácido clorogênico (10.255). Condições cromatográficas descritas em materiais e métodos.



Fonte: BALZAN, Silvie R. (2012).

Na Figura 12 pode-se observar a formação dos picos para as substâncias cafeína (10.849) e ácido clorogênico (10.255) no extrato bruto. Para os demais compostos majoritários, é possível afirmar que são derivados do ácido clorogênico. A fração n-butanol também foi analisada e o resultado da corrida cromatográfica pode ser visualizado no cromatograma abaixo (Figura 13). O ácido clorogênico pode ser visualizado no tempo de retenção de 10.321 enquanto que a cafeína não foi observada. Observa-se a predominância dos compostos derivados do ácido clorogênico presentes na fração n-butanol.

Figura 13: Cromatograma da fração n-butanol de erva-mate (FBU), demonstrando os compostos majoritários, principalmente os compostos fenólicos derivados do ácido clorogênico (10.321). Condições cromatográficas descritas em materiais e métodos.



Fonte: BALZAN, Silvie R. (2012).

Observa-se no fracionamento do extrato um aumento na concentração dos compostos fenólicos, especialmente aqueles derivados de ácidos dicafeoilquínicos (ácido 3,4-dicafeoilquínico e ácido 3,5-dicafeoilquínico) e a completa ausência das metilxantinas. Como pode ser observada na Tabela 5 a concentração de compostos fenólicos na fração n-butanol é cerca de três vezes a concentração encontrada em infusões e ainda próximo do dobro do encontrado no extrato bruto. A concentração em infusões foi extraída da publicação de Filip et al. (2001), enquanto que a concentração nos extratos brutos, do trabalho publicado por Cardozo et al. (2010).

Tabela 5: Comparação da concentração de Compostos Fenólicos entre a infusão, o extrato bruto e a fração n-butanólica.

TIPO DE EXTRATO	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (%)
Infusão*	8,03
Extrato bruto**	18,05
Fração n-butanólica	25,06

\* Fonte: FILIP et al. (2001). \*\* CARDOZO JUNIOR et al (2010).

O perfil dos compostos fenólicos é semelhante ao relatado em outros estudos com a erva-mate, como citado no trabalho de Cardozo et al. (2007). Vários estudos relatam na literatura os benefícios da infusão de erva mate no metabolismo e composição lipídica, bem como na obesidade (BRACESCO et al., 2011, PERALTTA, 2012). Este efeito pode ser causado pela ação protetora quanto à oxidação das moléculas das frações HDL de colesterol e redução da oxidação de macrófagos.

Em estudos recentes (GUGLIUCCI, et al., 2009), foi demonstrado que o ácido clorogênico evita a oxidação das partículas de HDL, pela inativação da paraoxonase (PON1), causada por concentrações fisiológicas de hipoclorito. Da mesma forma, o consumo do extrato de *Ilex paraguariensis* diminui a oxidação de gorduras insaturadas no fígado de ratos (BOAVENTURA et al., 2012), e o ácido clorogênico está envolvido neste processo.

## 4 CONCLUSÃO

As dislipidemias levam a doenças arteriais coronarianas e é uma das principais causas da morbidade no mundo desenvolvido, bem como em países em desenvolvimento. Estudos epidemiológicos demonstram uma significativa relação entre as concentrações de colesterol plasmático e as doenças arteriais coronárias, cuja principal manifestação clínica é a formação de placas na parede das artérias (TALAYERO et al., 2011). Em muitos casos, as placas migram para dentro do lúmen da artéria, podendo comprometer o fluxo sanguíneo. Um dos principais passos no desenvolvimento da aterosclerose é a modificação oxidativa da LDL, pertencentes às alterações precoces que iniciam a formação de placa aterosclerótica, a qual é captada por macrófagos que conduzem à formação de células de espuma na parede do vaso (TSIMIKAS et al., 2011).

Drogas sintéticas com atividade antilipidêmica, como estatinas, são amplamente utilizadas para o tratamento de hipercolesterolemia e prevenção da aterosclerose, no entanto, efeitos secundários, tais como a toxicidade muscular e hepática têm sido associados com o uso clínico de estatinas (GILLETT et al., 2011). Este fato levou os pesquisadores a procurar novas moléculas ou drogas à base de plantas com menores efeitos adversos. Neste contexto, muitos extratos de planta com atividade hipolipemiante podem produzir menores índices de toxicidade aguda (HO, et al., 2012; SAGHIR et al., 2012, SIDDIGI et al., 2012).

Assim, em nosso estudo, usando ratos Wistar jovens normais, verificamos que os grupos animais alimentados por uma dieta rica em lipídios apresentaram aumento do peso corporal significativo, e revelou que nos grupos tratados com extrato hidroetanólico (bruto) e fração n-butanólica da erva-mate, obtiveram significativas reduções nos níveis de colesterol total, fração LDL e triglicérides, o que sugere que extratos obtidos a partir de *Ilex paraguariensis*, podem ser muito eficazes no modelo experimental de dislipidemia.

Trabalhos promissores têm sido publicados, sugerindo efeitos significantes de *Ilex paraguariensis* na redução do peso corporal, tanto em camungongos como em modelos de ratos. Recentemente, dados mostram que a infusão do mate possui atividade potente na redução de peso em ratos obesos (ARÇARI et al., 2009) e pode mostrar um efeito modulador sobre a expressão de vários genes relacionados com a obesidade (OLIVEIRA et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2009).

Colaborando com os dados acima, os nossos resultados mostraram também que, além dos efeitos lipídicos, que o extrato bruto e a fração n-butanólica podem ser eficazes na redução



do peso corporal de ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica, e mostrou, pela primeira vez, que a administração prolongada do extrato bruto e sua fração n-butanólica podem reduzir o colesterol total, fração LDL, fração VLDL e níveis de triglicérides de forma muito eficaz, sugerindo que extratos de *Ilex paraguariensis* ou o seu composto ativo (s) podem ser úteis como um adjuvante para medicamentos convencionais.

Além disso, estudos mostram que a infusão de *Ilex paraguariensis* proporciona uma redução maior da fração de colesterol LDL, em indivíduos tratados com estatina, o que sugere que os extratos podem ser usados para reduzir as doses de estatinas e, por conseguinte, os efeitos colaterais (BOAVENTURA et al., 2012). No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação hipolipidêmica desta preparação.

Em conclusão, estes resultados suportam o potencial do extrato bruto e da fração n-butanólica de *Ilex paraguariensis*, como candidatos a serem utilizados na composição de medicamentos fitoterápicos, em doenças cardiovasculares que necessitam de efeitos de redução de colesterol sanguíneo.

## REFERÊNCIAS

ACHESON K.J.. Caffeine and insulin sensitivity. *Metab Syndr Relat Disord*, v. 3, p. 19-25, 2005.

ALMEIDA, N. G. Erva-mate: tendência de mercado – safra 2006. Disponível em: [http://celepar7cta.pr.gov.br/SEAB/deral.nsf/fe9bc43c12d0fe8032566c1006ce9e5/34e4791728ece2be8325717000708913/\\$FILE/ERVA%20tendencia%20mercado%202006.pdf](http://celepar7cta.pr.gov.br/SEAB/deral.nsf/fe9bc43c12d0fe8032566c1006ce9e5/34e4791728ece2be8325717000708913/$FILE/ERVA%20tendencia%20mercado%202006.pdf). Acesso em 06/07/2007.

ALVES, A. M. P., ALVES E. P. B., BUTTOW, N. C., PERLES, J. V. C. M., ZANONI, J. N., STABILLE, S. R.. Aspectos gerais e abordagem terapêutica da quercetina sobre as complicações do diabetes causadas pelo estresse oxidativo. *Arquivo da Área de Ciências da Saúde*. v. 14, n. 2, p. 179-186, 2010.

ALTIMARI, L. R., CYRINO, E. S., ZUCAS, S. M., OKANO, A. H.. Caféina: ergogênico nutricional no esporte. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*. Brasília, n. 9, p. 57-64, 2001.

ANDERSEN, T., FOGH, J.. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* n. 14, p. 243–250, 2001.

ARÇARI, D.P.. Efeitos biológicos do consumo de chá mate (*Ilex paraguariensis*) frente a obesidade em camundongos. Master's degree dissertation, Postgraduate Programme in Nutrition in Health, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 74, 2009.

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

ASHIHARA, H., CROZIER, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *Trends in Plant Science*, 6, p. 407 - 413, 2001.

ATHAYDE, M.L.; COELHO, G.C.; SCHENKEL, E.P.. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. *Phytochemistry* 55, 853-857, 2000.

BARLETTE, A. G.. Dissertação para obtenção de grau mestre em Ciências Farmacêuticas: Avaliação Química e Biológica do extrato hidroetanólico de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

BASTOS, D.H.M., ISHIMOTO, E.Y., MARQUES, M.O.M., FERRI, A.F., TORRES, E.A.F.S.. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *J.Food Compos, Anal.* 19, p. 538–543, 2006.

BASTOS, D.H.M., FORNARI, A.C., QUEIROZ, Y.S., SOARES, R.A.M., TORRES, E.A.F.S.. The chlorogenic acid and caffeine content of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) beverages. *Act a Farm. Bonaerense*, 24 (1), p. 91–95, 2005.

BASTOS, D.H.M., ISHIMOTO, E.Y., MARQUES, M.O., FERRI, A.F.I, TORRES, E.A.F., J. *Food Comp. Anal.*, 19, p. 538, 2006.

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

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

BOAVENTURA, B. C., DI PIETRO, P. F., STEFANUTO, A., KLEIN, G. A., DE MORAIS, E. C., DE ANDRADE, F., WAZLAWIK, E., DA SILVA, E. L., Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. *Nutrition*, 28, p. 657-664, 2012.

BRACESCO N., DELL M., ROCHA A., BEHTASH S., MENINI T., GUGLIUCCI A., NUNES E.. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *J Altern Complement Med* 9, p. 379 - 387, 2003.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T., GUGLIUCCI, A.. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 378-384, 2010.

BRASUR. Erva-mate/Chá-mate. Disponível em:  
[http://www.brasur.com.br/portugues/produtos\\_ervamate.html](http://www.brasur.com.br/portugues/produtos_ervamate.html). Acesso em 02/01/2009.

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* 40, 393 - 405, 2007.

BRENELLI, E. C. S.. A extração de cafeína em bebidas estimulantes: uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. *Química Nova*, 26: p. 136-138, 2003.

CARDOZO JUNIOR, E.L.; FERRARESE-FILHO, O.; CARDOZO FILHO, L.; FERRARESE, M.L.L.; DONADUZZI, C.M.; STURION, J.A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.20, p.553-558, 2007.

CARDOZO JUNIOR, E. L., DONADUZZI, C. M., FERRARESE FILHO, O., FRIEDRICH, J. C., GONELA, A., STURION, J. A.. Quantitative genetic analysis of methylxanthines and phenolic compounds in mate progenies. *Pesq. Agrop. Bras.* 45, p. 171-177, 2010.

CARVALHO, P. E. R.. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Curitiba. Embrapa/CNP Florestas, 1994.

CARVALHO, J. C. T., GOSMANN, G., SCHENKEL, E. P.. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. A. M., SCHENKEL, E. P., GOSMAN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R.. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 6. Ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p. 1102, 2007.

CHANDRA, S.; MEJIA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. J. Agric. Food Chem., v.52, p.3583-3589, 2004.

CHEYNIER, V.. Polyphenols in foods are more complex than often thought. Am. J. Clin. Nutr., 81 (suppl.), p. 223S-229S, 2005.

CLIFORD, N.M.. Diet-derived phenols in plasma and tissue and their applications for health. Plant Med, 70, p. 1103-1114, 2004.

CLIFFORD, M. N., RAMIREZ-MARTINEZ, J. R.. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage,. Food Chemistry. Vol. 35, p. 13-21, 1990.

DAY, A.J.; ROTHWELL, A.J.; MORGAN, M.R.A. Characterization of polyphenol metabolites. In: BAO, Y.; FENWICK, R., (Ed.). Phytochemicals in health and disease. 1ª.ed. New York: Marcel Dekker, Inc.. cap. 3, p.57-76, 2004.

DONADUZZI, C. M., CARDOZO JUNIOR, E. L., DONADUZZI, E. E., DA SILVA, M. M., STURION, J. A., CORREA, G.. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênies de Erva mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) cultivadas em três municípios do Paraná. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR. 7(2): p. 129-134, 2003.

DUGO, P., CACCIOLA, F., DONATO, P., JACQUES, R. A., CAMARÃO, E. B., MONDELLO, L.. High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. *Journal of Chromatography A*, Volume 1216, P. 7213–7221, 2009.

EDWIN, G., REITZ, P. R.. Aquifoliaceae In: REITZ, P. R.. Ed. *Flora Ilustrada Catarinense*, Parte I. Fasc. *Herbário Barbosa Rodrigues/ CNPq*, Itajaí, p. 27-34, 1967.

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

FILIP, R.; LOTITO, S. B.; FERRARO, G.; FRAGA, C. G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*, USA, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.

FILIP, R., LÓPEZ, P., GIBERTI, G., COUSSIO, J., FERRARO, G.. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 72: p. 774-778, 2001.

FILIP, R., FERRARO, G.E.. Researching on new species of “Mate”: *Ilex brevicuspis*: phytochemical and pharmacology study. *European Journal of Nutrition* 42, p. 50–54, 2003.

FILIP R., SEBASTIAN T., FERRARO G., ANESINI C.. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. *Food and Chemical Toxicology* 45, p. 649-655, 2007.

GIBERTI, G. C.. Aquifoliaceae. In: Spichinger & L. Ramella (eds.). *Flora del Paraguay*. V. 24, Saint-Louis, Editions des la Ville de Genève, Chambèsy, Missouri Botanical Garden. P. 1-34, 1994.

GILLET, R. C., NORRELL, A.. Considerations for safe use of statins: liver enzyme abnormalities and muscle toxicity, *Am. Fam. Physician*. 83, p. 711-716, 2011.

GONTHIER, M.P., VERNY, M.A., BESSON, C., RÉMÉSY, C., SCALBERT, A..

Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J. Nutr.*, p. 1853–1859, 2003.

GOODMAN & GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10ª edição, Rio de Janeiro, p.730-752, 2005.

GORGEN, M., TURATTI, K., MEDEIROS, A.R., BUFFON, A., BONAN, C.D., SARKIS, J.J., PEREIRA, G.S.. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* decreases nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, p.73-77, 2005.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö., MAZZA, G.. Saponins: properties, applications and processing. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 47 (3), 2007.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A.J.C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, v.35, p. 47-56, 1995.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex Paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 224, p.338 - 344, 1996.

GUGLIUCCI, A., MENINI, T.. Three different path ways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureoides*. *Life Sciences* 71, p. 693 - 705., 2002.

GUGLIUCCI, A., BASTOS, D. H. M.. Chlorogenic acid protects paraoxonase activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite, *Fitoter.* 80, p. 138-142, 2009.

GUYTON, A.C.. *Tratado de Fisiologia Médica*. 9ª.edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 1997, p. 254,.

HAN, S., ZHENG, Z., REN, D.. Effect of *Salvia miltiorrhiza* on left ventricular hypertrophy and cardiac aldosterone in spontaneously hypertensive rats. J of Huazhong Univ of Sci and Tech n° 22, p. 302-304, 2005.

HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E.. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10ª edição, Editora McGraw Hill, Rio de Janeiro, 2005, p. 657.

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 Sciences, 72, p. 138–151, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: Oxford University Press. p.23, 1999.

HEMMERLE, H., BURGER, H.J., BELOW, P., SCHUBER, G., RIPPEL, R., SCHINDLER, P.W., PAULUS, E., HERLING, A.W.. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. J Med Chem, 40, p. 137-145, 1997.

HEWAVITHARANAGE, H.. Effect of caffeine on short-hole borer beetle (*Xyeloborus fornicatus*) of tea (*Camellia sinensis*). Phytochemistry, 51, p. 35-41, 2000.

HO, F. M., LIAO, Y. H., YANG, A. J., CHAO, P. D. L., HOU, Y. C., HUANG, C. T., LIN, S. R., LEE, K. R., HUANG, K. C., LIN, W. W.. Anti-atherosclerotic action of Ger-Gen-Chyn-Lian-Tang and AMPK-dependent lipidlowering effect in hepatocytes. J. Ethnopharmacol. 142, p; 175-187, 2012.

IBGE. SIDRA - Sistema IBGE de Recuperação Automática. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp>. Acesso em: 02/01/2009.



IBGE-BRASIL, 2005. Produção da extração vegetal e da silvicultura. Available online: <Http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2005/default.shtm>. Acesso em 23/11/2011.

IBANEZ, E., CIFUENTES, A., CREGO, A.L., SENORANS, F.J., CAVERO, S., REGLERO, G., J. Agric. Food Chem., 48, p. 4060, 2000.

JOHNSTON, K., CLIFFORD, M., MORGAN, L.M.. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. Am J Clin Nutr., 78, p. 728-733, 2003.

KOS, M., DORMAN, H.J.D., HUSNU, K., HILTUNER, CAN BAS, R., J. Agric. Food Chem., 52, 5004, 2004.

LEHNINGER, A. L.. Principles of Biochemistry. 4ª edição, cap. 10, p. 343-368, 2005.

LIMA, L.R.P., OLIVEIRA, T.T., NAGEN, T.J., PACHECO, S..Flavonoids and natural urucum dyes on induced hyperlipidemic rabbits. RBAC, vol. 42(1), p. 69-74, 2010.

LOPES, R.M., OLIVEIRA, T.T., NEGEN, T.J., PINTO, A.S.. Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento vol 17, p.18-22, 2000.

LUNCEFORT, N., GUGLIUCCI, A.. *Ilex paraguariensis* extracts in hibitage formation more efficiently than green tea. Fitoterapia 76 (5), p. 419–427, 2005.

MACHADO, D.F., FERREIRA, C.L.L.F., COSTA, N.M.B., OLIVEIRA, T.T., Evaluation of the probiotic effect in the modulation of the levels of seric cholesterol and in the weight of the liver of mices fed with rich diet in cholesterol and colic acid. Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.23 n°.2, 2003.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L.. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 79, p. 727-747.

MARTINS, F., et. al.. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acid sin mouse liver. *British Journal of Nutrition*, 101, p. 527 - 532, 2009.

MATSUMOTO, R. L., et. al.. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009.

MAZZAFERA, P.. Mate drinking: caffeine and phenolic acid in take. *Food Chem.* 60, p. 67–71, 1997.

MELO, S.S., NUNES, N.S.I., BAUMGARTEN, C., TRESSOLDI, C., FACCIN, G., ZANUZO, K., MICHELS, M.K., DA CUNHA, N., SPECHT, S., DA SILVA, M.W.. Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St. Hil) sobre o perfil metabólico em ratos alimentados com dietas hiperlipídicas. *Alim Nutr* n° 18, p. 439-447, 2007.

MIRANDA, D. D., et. al.. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - induced DNA damage and DNA repairin mice. *Mutagenesis*, p. 261 - 265, 2008.

MOSIMANN, A.L., WILHELM-FILHO, D., SILVA, E.L.. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Biofactors*, 26, p. 59-70, 2006.

MUSEU PARANAENSE. Consumo e exportação da erva-mate. Disponível em: <http://www.museuparanaense.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=59>. Acesso em 02/01/2009.

NEHLING, A. Does caffeine lead to psychological dependence? *Chem Tech.* 2, p. 30-35, 1999.

OLIVEIRA, D. M., FREITAS, H. S., SOUZA, M. F.. YerbaMate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other

biochemical parameter sinalloxan-diabetic Wistar rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, p. 10527 - 10532, 2008.

OPALA, T., RZYMSKI, P., PISCHEL, I., WILCZAK, M., WOZNIAK, J.. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects - a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. *European Journal of Medical Research* 11, p. 343–350, 2006.

PASINATO, R. Aspectos etnoentomológicos, sócioeconômicos e ecológicos relacionados à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no município de Salto do Lontra, Paraná, Brasil. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agrossistemas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2003.

PERALTA, I. N., COGOI, L., FILIP R., ANESINI, C.. Prevention of hydrogen peroxide induced red blood cells lysis by *Ilex paraguariensis* aqueous extract: Participation of phenolic and xanthine compounds. *Phytother. Res.* 18, doi: 10.1002/ptr.4700, 2012.

PEREIRA, J.C., BARRETO, S.M., PASSOS, V.M.A.. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. Vol. 91, nº1. São Paulo, 2008.

PIRES, V. S., GUILLAUME, D., GOSMANN, G., SCHENKEL, E.P.. Saponins from *Ilex dumosa*, an Erva-maté (*Ilex paraguariensis*) adulterating plant. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: p. 1027-1031, 1997.

POMILIO, A.B., TRAJTEMBERG, S., VITALE, A.A.. High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. *Phytochemical Analysis*, 13, 235–241, 2002.

PRZYGODDA, F., MARTINS, Z.N., CASTALDELLI, A.P.A., MINELLA, T.V., VIEIRA, L.P., CANTELLI, K., FRONZA, J., PADOIN, M.J.. Effect of erva-mate (*Ilex paraguariensis*

A. St.-Hil., Aquifoliaceae) on serum cholesterol, triacylglycerides and glucose in Wistar rats fed a diet supplemented with fat and sugar. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, p. 956-961, 2010.

RAMIREZ-MARES, M. V., CHANDRA, S., de MEJIA, E. G.. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutat Res* 554, p. 53 - 65, 2004.

RATES, S. M. K.. Metilxantinas in: SIMÕES, C. A. M., SCHENKEL, E. P., GOSMAN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R.. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 6. Ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p. 1102, 2007.

REIS, C.S.. Efeito da Ingestão de Suco de Beringela (*Solanum melongena*) associado à Sinvastatina como regulador do colesterol sérico em ratos wistar machos hipercolesterolêmicos, 2008.

RESENDE, M.D.V, STURION, J.A., CARVALHO, A.P., 2000. Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones. Colombo: Embrapa-CNPQ. Circular Técnica, p. 43, 65

RIVELLI, D.P.; SILVA, V.V.; ROPKE, C.D.; MIRANDA, D.V.; ALMEIDA, R.L.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S.B. DE M.. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH reduction. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 43, p. 215-222, 2007.

RODIGHERI, H. R.; DOSSA, D.; VIELCAHUAMAN, L. J. M. Cultivo da erva-mate.

Disponível em:

[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ervamate/CultivodaErvaMate/01\\_importancia\\_socioec.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ervamate/CultivodaErvaMate/01_importancia_socioec.htm). Acesso em: 02/01/2009.

- SAGHIR, M. R., SADIQ, S., NAYAK, S., TAHIR, M. U.. Tahir, Hypolipidemic effect of aqueous extract of *Carum carvi* (black Zeera) seeds in diet induced hyperlipidemic rats, Pak. J. Pharm. Sci. 25, p. 333-337, 2012.
- SATO, Y., ITAGAKI, S., KUROKAWA, T., OGURA, J., KOBAYASHI, M., HIRANO, T., SAHUWARA, M., ISEKI, K.. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. International Journal of Pharmaceutics 403, p. 136–138, 2011.
- SCALBERT, A.; JOHNSON, I.T.; SALTMARSH, M.. Polyphenols: antioxidants and beyond. Am. J. Clin. Nutr., 81(suppl), p. 215S-217S, 2005.
- SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., ATHAIDE, M. L.. Saponinas. In: SIMÕES, C. A. M., SCHENKEL, E. P., GOSMAN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R.. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 6. Ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p. 1102, 2007.
- SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P.M. de; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. Biochem. Biophys. Res. Commun., v.269, p.357-360, 2000.
- SCHUBERT, A., ZANNIN F.F., PEREIRA, D.F., ATHAYDE, M.L.. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* St. Hill. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. Química Nova, 29, p. 1233- 1236, 2006.
- SIDDIGI, H. S., MEHMOOD, M. H., REHMAN, N. U., GILANI, A. H.. Studies on the antihypertensive and antidiyslipidemic activities of *Viola odorata* leaves extract. Lipids Health Dis. 10, p. 11-16, 2012.
- SILVA E.L. da, NEIVA T.J.C., SHIRAI M., TERAJO J., ABDALLA D.S.P.. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation). Food Research International, 41 (10), p. 973 - 979, 2008.

SIMÕES, C. A. M., SCHENKEL, E. P., GOSMAN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R.. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 6. Ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p. 1102, 2007.

SPARG, S. G., LIGHAT, M. E., VAN STADEN, J.. Biological Activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. 94 (2-3), p. 219-243, 2004.

STEIN, F.L.P., SCHIMIDT, B., FURLONG, E.B.. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biological Research for Nursing*, 7, p. 146-156, 2005.

SUGIMOTO, S., NAKAMURA, S., YAMAMOTO, S., YAMASHITA, C., ODA, Y., MATSUDA, H., YOSHIKAWA, M.. Structures of Triterpene Oligoglycosides and Lipase Inhibitors from Mate, Leaves of *Ilex paraguariensis*. *Chem. Pharm. Bull*, 2009, 57(3), p. 257-261.

TALAYERO, B. G., SNACKS, F. M.. The role of triglycerides in atherosclerosis. *Curr. Cardiol. Rep.* 13, p. 544-552, 2011.

TSIMIKAS, S., MILLER, Y. I.. Oxidative modification of lipoproteins: mechanisms, role in inflammation and potential clinical applications in cardiovascular disease. *Curr. Pharmac. Des.* 17, p. 27-37, 2011.

WHO (World Health Organization). DCV prevenção e controle: oportunidades perdidas. Disponível em [HTTP://www.who.int](http://www.who.int). Acesso em 28 de Nov de 2010