

ANA LUIZA PAMPLONA MOSIMANN

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO
AQUOSO DE *Ilex paraguariensis* (ERVA MATE) NA PEROXIDAÇÃO
LIPÍDICA E NA ATEROSCLEROSE EXPERIMENTAL EM
COELHOS**

**FLORIANÓPOLIS - SC
2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DE *Ilex
paraguariensis* (ERVA MATE) NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E NA
ATEROSCLEROSE EXPERIMENTAL EM COELHOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmácia como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Farmácia.
Orientador(a): Prof .Dr. Edson Luiz da Silva**

ANA LUIZA PAMPLONA MOSIMANN

FLORIANÓPOLIS

2002

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO
EXTRATO AQUOSO DE *Ilex paraguariensis* (ERVA MATE)
NA LIPOPEROXIDAÇÃO SÉRICA E NA
ATEROSCLEROSE EXPERIMENTAL EM COELHOS”**

POR

ANA LUIZA PAMPLONA MOSIMANN


**Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo Orientador e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores Doutores:**

Banca Examinadora:



Edson Luiz da Silva

(ACL/CCS/UFSC – Membro Titular)



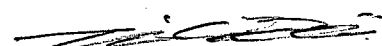
Dulcinéia Saes Parra Abdalla

(FCF/USP – Membro Titular)



Rozangela Curi Pedrosa

(CCB/BQA/UFSC – Membro Titular)


Prof.ª Dra. Tânia Silvia Fröde
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 20 de dezembro de 2002.

Dedico este trabalho a meus pais, Léa e João, que com sua fé incondicional no meu potencial sempre me apoiam e não medem esforços para que eu possa realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Aos professores e funcionários

Agradeço ao Professor Doutor Edson Luiz da Silva, por ter aceito me orientar, não desistindo do projeto frente aos obstáculos encontrados e envidando-se em sua viabilização. Aos professores da disciplina de Bioquímica Clínica I e II; Marcos José Machado, Maria de Lourdes Rovaris e Cirene Lesniowski Delgobo; pelas palavras amigas e por compreensivamente terem cedido seu espaço de trabalho para realização de grande parte dos experimentos desta dissertação. Ao Professor Doutor Danilo Wilhelm Filho (ECZ-CCB-UFSC), pelos conselhos, apoio e por nos ter viabilizado a realização da medida da atividade das enzimas antioxidantes em seu laboratório. À professora Doutora Marília Terezinha Sangoi Padilha (ZOT-CCA-UFSC), por ter cedido um espaço no Centro de Ciências Agrárias para os coelhos durante o período do tratamento. A todos os mestres que pela transmissão de seus conhecimentos e por seus exemplos, influenciaram minha formação. Aos funcionários do setor de bioquímica clínica do laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário (HU-UFSC) pela ajuda.

Aos amigos e familiares

Agradeço ao meu namorado, Juliano Bordignon, que esteve ao meu lado em todos os momentos sempre pronto para me escutar e apoiar, partilhando de minhas conquistas e decepções. Aos colegas Jardel Cristiano Bordignon, Crisne Leite Mantovani e Irene Cledes Kulkamp pela amizade e grande ajuda prestada como bolsistas de iniciação científica. À acadêmica de ciências biológicas Fabíola Sell que pacientemente me transmitiu seus conhecimentos, sem os quais o trabalho não poderia ser completo. Aos meus colegas de mestrado que compartilharam essa jornada comigo e me ouviram e incentivaram quando precisei. Aos meus familiares e amigos, que souberam compreender minha ausência.

“Hoje eu acordei mais cedo, tomei sozinho o chimarrão
Procurei a noite na memória... procurei em vão
Hoje eu acordei mais leve (nem li o jornal)
Tudo deve estar suspenso... nada deve pesar
Já vivi tanta coisa, tenho tantas a viver
Tô no meio da estrada e nenhuma derrota vai me vencer
Hoje eu acordei livre: não devo nada a ninguém
Não há nada que me prenda
Ainda era noite, esperei o dia amanhecer
Como quem aquece a água sem deixar ferver
Hoje eu acordei, agora eu sei viver no escuro
Até que a chama se acenda
Verde... quente... erva... ventre... dentro... entranhas
Mate amargo noite adentro estrada estranha
Nunca me deram mole, não (melhor assim)
Não sou a fim de pactuar (sai para lá)
Se pensam que eu tenho as mãos vazias e frias (melhor assim)
Se pensam que as minhas mãos estão presas (surpresa)
Mãos e coração, livres e quentes, chimarrão e leveza
Mãos e coração, livres e quentes, chimarrão e leveza
Ilex paraguariensis
Ilex paraguariensis”

(Humberto Gessinger - Ilex Paraguariensis)

RESUMO

RESUMO

O estresse oxidativo está envolvido na etiologia e/ou progressão de várias patologias, inclusive a aterosclerose. O extrato aquoso de *I. paraguariensis* (erva-mate) é uma bebida rica em compostos antioxidantes amplamente consumida na América do Sul. Neste estudo foi verificado o efeito antioxidante do extrato aquoso de erva-mate contra a lipoperoxidação sérica induzida por CuCl_2 *in vitro* e questionado se o mate poderia reduzir a progressão da aterosclerose *in vivo* em coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica. Soro humano foi incubado com CuCl_2 na ausência ou presença de diferentes concentrações do extrato de erva-mate. A lipoperoxidação sérica, avaliada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), foi significativamente inibida pelo extrato aquoso de erva-mate. O potencial antiaterogênico do extrato de erva-mate foi avaliado em coelhos machos Nova Zelândia, com 8 semanas de idade, alimentados com dieta rica em colesterol (1%). Os animais foram divididos em quatro grupos: controle (grupo C), controle-*I. paraguariensis* (grupo CI), hipercolesterolêmico (grupo HC) e hipercolesterolêmico-*I. paraguariensis* (grupo HCI). O consumo diário do extrato de erva-mate (grupos CI e HCI) foi de 400 mL. Após 2 meses de tratamento, o colesterol total sérico dos animais hipercolesterolêmicos foi aproximadamente 11 vezes maior do que o dos controles ($p < 0,01$). A ingestão do extrato de erva-mate reduziu em 50% o colesterol sérico no grupo CI, porém esses valores não foram significativos ($p > 0,05$). O perfil lipídico dos animais dos grupos hipercolesterolêmicos não foi afetado ($p > 0,05$). O conteúdo de colesterol hepático foi aproximadamente 3 vezes maior nos grupos hipercolesterolêmicos em relação aos coelhos controles ($p < 0,05$), não sendo modificado pela ingestão da erva-mate. A área da lesão aterosclerótica na aorta dos coelhos hipercolesterolêmicos (HC) foi consideravelmente menor no grupo HCI (HC, 58,3% vs. HCI, 36,5%; $p < 0,05$). O conteúdo médio de colesterol arterial do grupo HCI foi 2 vezes menor que o do grupo HC (HCI, 41,3 vs HC, 76,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, $p < 0,05$). Apesar disso, o grau de lipoperoxidação (TBARS) na aorta aterosclerótica e soro, ou a atividade das enzimas antioxidantes arteriais e hepáticas, não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$). Em conclusão, os resultados mostraram que o extrato aquoso de erva-mate inibiu a lipoperoxidação sérica *in vitro* e pode atenuar a progressão da aterosclerose *in vivo* em coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica, sem contudo, diminuir os níveis séricos de colesterol. Aparentemente, o efeito antiaterosclerótico não esteve associado à inibição da lipoperoxidação. No momento, outras explicações não podem ser excluídas, tais como, o efeito do extrato sobre fatores imunológicos, agregação plaquetária ou adesão monocitária.

ABSTRACT

ABSTRACT

Oxidative stress is involved in the etiology and/or progression of several pathologies, including atherosclerosis. *Ilex paraguariensis* aqueous extract (mate) is an antioxidant-rich beverage widely consumed in South America. In this study it was verified the antioxidant effect of *Ilex paraguariensis* aqueous extract against serum lipid peroxidation induced by copper ion *in vitro* and questioned whether *in vivo* mate could reduce the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Human serum was incubated with CuCl_2 in the absence or presence of increasing amounts of *Ilex paraguariensis* extract. The level of lipid peroxidation, evaluated by measuring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), was significantly inhibited by the *Ilex paraguariensis* aqueous extract. The antiatherogenic potential of mate extract was evaluated in eight-wk-old New Zealand White male rabbits, fed a cholesterol-rich diet (1%). The animals were divided in four groups: control (C group), control-*Ilex paraguariensis* (CI group), hypercholesterolemic (HC group) and hypercholesterolemic-*Ilex paraguariensis* (HCI group). The daily mate extract consumption (groups CI and HCI) was approx. 400 mL. After 2 months, the serum total cholesterol of the hypercholesterolemic rabbits was 11-fold increased in relation to control animals ($p < 0.01$). The mate extract ingestion caused a 50% reduction in rabbit serum total cholesterol from CI group, nevertheless these values were not significant ($p > 0.05$). The lipid profile of the hypercholesterolemic groups was not affected ($p > 0.05$). The hepatic cholesterol content was approx. 3-fold higher in the hypercholesterolemic groups in relation to controls ($p < 0.05$), and did not change by mate extract ingestion. Atherosclerotic lesion area of the hypercholesterolemic rabbit aorta was considerably smaller in the HCI group (HC, 58,3% vs. HCI, 36,5%; $p < 0.05$). The average arterial cholesterol content of the HCI group was 2-fold less than that of the HC group (HCI, 41,3 vs HC, 76,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein, $p < 0.05$). In spite of this, the lipid peroxidation level (TBARS) in the atherosclerotic aorta and serum, or the activity of the antioxidant enzymes in liver and artery, did not differ among groups ($p > 0.05$). In conclusion, the results showed that *Ilex paraguariensis* extract inhibited the serum lipid peroxidation *in vitro* and could attenuate the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits *in vivo*, although it did not decrease serum cholesterol concentration nor aortic TBARS. At this moment, other explanations cannot be excluded, such as, the effect of mate extract on immunologic factors, platelet aggregation or monocyte adhesion.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Aterosclerose.....	15
1.2. Patogênese.....	15
1.3. O Papel da LDL na Aterosclerose.....	17
1.4. As Defesas Antioxidantes.....	19
1.5. Aterosclerose em modelos animais.....	20
1.6. <i>Ilex paraguariensis</i> (Mate).....	22
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Materiais.....	28
3.2. Métodos.....	28
3.2.1. Preparação do Extrato.....	28
3.2.2. Medida de Fenóis Totais do Extrato.....	29
3.2.3. Ensaio de Lipoperoxidação <i>in vitro</i>	29
3.2.4. Ensaio de Lipoperoxidação <i>ex vivo</i>	29
3.2.5. Determinação de TBARS.....	30
3.2.6. Efeito do Extrato de <i>Ilex paraguariensis</i> na Aterosclerose Experimental.....	30
3.2.6.1. Animais e Protocolo Experimental.....	30
3.2.6.2. Preparação do Homogenato Arterial e Hepático.....	31
3.2.6.3. Preparação do Hemolisado.....	31
3.2.6.4. Determinação de Colesterol Total, Triglicerídios e HDL-C no soro.....	32
3.2.6.5. Determinação Tecidual de Colesterol Total.....	32
3.2.6.6. Determinação dos Níveis de Lipoperoxidação Arterial, Hepática e Sérica (TBARS).....	32
3.2.6.7. Glutathione S-transferase (GST).....	33

3.2.6.8. Catalase (CAT).....	33
3.2.6.9. Superóxido Dismutase (SOD).....	33
3.2.6.10. Glutaciona Peroxidase (GPx).....	33
3.2.6.11. Glutaciona Redutase (GR).....	34
3.2.6.12. Glutaciona Reduzida (GSH).....	34
3.2.6.13. Glutaciona Total (GT) e Glutaciona Oxidada (GSSG).....	34
3.2.6.14. Coloração de Sudan Red.....	34
3.3. Análise Estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Caracterização do Extrato Aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i>	37
4.2. Atividade Antioxidante da <i>Ilex paraguariensis in vitro</i>	37
4.3. Atividade Antioxidante <i>ex vivo</i> da <i>Ilex paraguariensis</i>	41
4.4. Efeito Antiaterogênico do Extrato Aquoso de <i>Ilex paraguariensis in vivo</i> ...	42
4.5. Lipoperoxidação Tecidual e Sérica.....	48
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8. ANEXOS	78
8.1. ANEXO A.....	79
8.2. ANEXO B.....	81

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Conteúdo de extrato seco e fenóis totais em 3 ervas-mate comerciais...	37
Figura 1. Concentração de fenóis totais do extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i>	37
Figura 2. Efeito da diluição de soro humano nos níveis de lipoperoxidação.....	38
Figura 3. Efeito da concentração de cobre na lipoperoxidação sérica.....	39
Figura 4. Inibição da lipoperoxidação sérica pelo extrato aquoso de 3 ervas-mate comerciais.....	39
Figura 5. Cinética de inibição da lipoperoxidação sérica pelo extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i>	40
Figura 6. Correlação entre o grau de inibição da lipoperoxidação sérica pelo extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> e a concentração de fenóis totais.....	41
Figura 7. Efeito da administração intragástrica de extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> na cinética de lipoperoxidação sérica.....	42
Figura 8. Níveis de colesterol total sérico.....	43
Figura 9. Níveis de triglicerídeo sérico.....	44
Figura 10. Níveis de HDL-C.....	44
Figura 11. Concentração de colesterol hepático.....	45
Figura 12. Concentração de colesterol arterial.....	45
Figure 13. Arco aórtico e aorta torácica corados com Sudan IV e Hematoxilina de Harris.....	46
Figure 14. Aortas coradas com Sudan IV e Hematoxilina de Harris.....	47
Tabela 2. Área das lesões ateroscleróticas na artéria aorta.....	47
Figura 15. Grau de lipoperoxidação em fígado e artéria.....	49
Figura 16. Grau de lipoperoxidação sérica.....	49
Figura 17. Atividade enzimática da GPx em fígado e artéria.....	50
Figura 18. Atividade enzimática da CAT em fígado e artéria.....	50
Figura 19. Atividade enzimática da GR em fígado e artéria.....	51
Figura 20. Atividade enzimática da GST em fígado e artéria.....	51
Figura 21. Atividade enzimática da SOD em fígado e artéria.....	52
Figura 22. Concentração de GSH em fígado e artéria.....	52
Figura 23. Concentração de GSSG em fígado e artéria.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- bFGF - Fator de crescimento de fibroblasto básico
- BHT - Hidroxitolueno-butilado
- CAT - Catalase
- DPTA - Ácido dietilenotriaminopentaacético
- DTNB - Ácido 2-nitrobenzóico
- EDTA - Ácido etilenoaminotetracético
- GP_x - Glutaciona peroxidase
- GR - Glutaciona redutase
- GSH - Glutaciona reduzida
- GSSG - Glutaciona oxidada
- GST - Glutaciona-S-transferase
- HDL-C - Colesterol da lipoproteína de alta densidade
- LDL - Lipoproteína de baixa densidade
- LDL-ox - Lipoproteína de baixa densidade oxidada
- MCP-1 - Proteína 1 quimiotática de monócitos
- M-CSF - Fator estimulador da colônia de macrófagos
- MM-LDL - Lipoproteína de baixa densidade minimamente modificada
- NO - Óxido nítrico
- $\cdot\text{O}_2^-$ - Ânion radical superóxido
- $\cdot\text{OH}$ - Radical hidroxila
- PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas
- ROO \cdot /RO₂ \cdot - Radical peroxila
- SOD - Superóxido dismutase
- TBA - Ácido tiobarbitúrico
- TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- TGF α e β - Fator de crescimento transformador α e β
- TNF α - Fator de necrose tumoral
- VEGF - Fator de crescimento de endotélio vascular
- VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aterosclerose

A aterosclerose é considerada uma das principais causas de mortalidade na população com estilo de vida ocidental (ROSS, 1993; BERLINER E HEINECKE, 1996). Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil as doenças do aparelho circulatório são a principal causa de mortalidade no Brasil e a terceira causa de morbidade hospitalar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Sabe-se também que a aterosclerose desempenha papel determinante no desenvolvimento de infarto do miocárdio, derrame cerebral e gangrena, além de estar associada à perda de função nas extremidades (ROSS, 1993). Os primeiros indícios de placa aterosclerótica, no entanto, começam a surgir muitos anos antes de qualquer manifestação clínica, o que dificulta a compreensão da natureza múltipla desse processo que não pode ser atribuído a apenas uma causa e parece envolver fatores tão diversos quanto ambientais, como o estresse do cotidiano; alimentares, como uma dieta rica em gordura; genéticos, como as dislipidemias; e hemodinâmicos, como a ação do fluxo sanguíneo sobre a parede dos vasos (*shear stress*), principalmente nos pontos de ramificação (KADÁR e GLASZ, 2001).

Segundo as III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, "aterosclerose é um processo dinâmico, evolutivo, a partir de dano endotelial de origem multifatorial, com características de reparação tecidual" (SANTOS, 2001).

Dentre os fatores de risco relacionados à doença aterosclerótica podemos citar níveis séricos de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) maiores que 160 mg/dL, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica (PA > 140/90 mmHg), níveis séricos de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) menores que 40 mg/dL, diabetes melito, idade acima de 45 anos para homens e 55 para mulheres e história familiar precoce de aterosclerose (SANTOS, 2001).

1.2. Patogênese

A hipótese de "reação do endotélio à lesão" propõe que fatores, como características genéticas inerentes ao próprio indivíduo, constituintes sanguíneos e hemodinâmica, atuam como desencadeadores da aterosclerose (ROSS, 1993). Além disso, existem outras hipóteses sugerindo o envolvimento de fatores trombogênicos, crescimento monoclonal de células musculares lisas ou ainda uma resposta inflamatória a uma infecção no tecido endotelial (KADÁR e GLASZ, 2001). Essas várias hipóteses reforçam o que já havia sido mencionado anteriormente a respeito dos numerosos fatores patogênicos que podem estar implicados na origem do processo aterosclerótico.

Para a formação da placa aterosclerótica, inicialmente, o que se observa é uma ativação das células endoteliais, desencadeada pela alta concentração plasmática de LDL-C, acompanhada de uma mudança na reatividade e metabolismo dessas células. Isso, por sua vez, leva a um aumento do número de moléculas de adesão glicoprotéicas nas células endoteliais, como as moléculas de adesão das células vasculares (VCAM), às quais se aderem monócitos, plaquetas e linfócitos. Num passo subsequente, essas células migram para a camada subendotelial do vaso sob a influência de fatores de crescimento e citocinas liberadas por células endoteliais, leucócitos e células musculares lisas. Uma vez na camada íntima do vaso, os monócitos diferenciam-se em macrófagos que por sua vez passam a acumular lipídios em seu interior, principalmente provenientes da LDL oxidada (LDL-ox), levando à formação das células espumosas (*foam cells*). É o acúmulo dessas células que forma a estria gordurosa (*fatty streak*), o primeiro estágio da lesão aterosclerótica. A contínua proliferação e migração celular promovida pelas moléculas quimiotáticas, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), o fator de crescimento transformador α e β (TGF α e β), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF α), associada à deposição de colágeno, proteínas fibrosas e proteoglicanos pelas células musculares lisas que passaram de seu fenótipo contrátil para o sintético, leva ao segundo estágio, a placa fibrosa (*fibrous plaque*). Por último, com a conseqüente morte celular, devido ao acúmulo descontrolado de colesterol, ulceração e calcificação do tecido lesionado, ocorre o estágio final conhecido como lesão complicada. Dependendo da estabilidade da lesão, a mesma pode sofrer rompimento levando à formação de trombos, que ao se desprenderem podem resultar em oclusão total ou parcial de vasos sanguíneos tendo como possíveis conseqüências clínicas o infarto do miocárdio e o derrame cerebral (ROSS, 1993; KADÁR e GLASZ, 2001).

A atual classificação das lesões ateroscleróticas datada de 1992 é da Associação Americana do Coração (*The American Heart Association*) e divide as lesões em seis

categorias de acordo com suas características morfológicas. As lesões de tipo I e II são consideradas lesões precoces, a de tipo III é uma lesão intermediária e as de tipo IV, V e VI são lesões avançadas (KADÁR e GLASZ, 2001).

1.3. O Papel da LDL na Aterosclerose

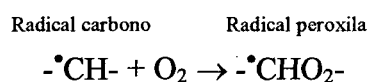
Sabe-se há alguns anos que altas concentrações séricas de LDL estão diretamente relacionadas à doença cardiovascular. O que tem sido explorado e sugerido em muitos estudos, mais recentemente, é que isso se deve a uma ação aterogênica da LDL-ox (BERLINER e HEINECKE, 1996). Um substancial número de evidências aponta para a LDL-ox como partícula responsável por estimular a migração e proliferação celular observadas na lesão inicial, levando assim ao dano endotelial (BERLINER e HEINECKE, 1996; STEINBERG, 1997; CHISOLM III e CHAI, 2000).

Ainda não está claro como e onde se dá a modificação dessa lipoproteína *in vivo*, porém acredita-se que ela estaria mais suscetível à oxidação em ambientes como a parede vascular, onde o balanço entre compostos antioxidantes e oxidantes pode encontrar-se desfavorável, o que dificilmente ocorre no plasma que é rico em antioxidantes e proteínas que quelam metais (BERLINER e HEINECKE, 1996 e STEINBERG, 1997).

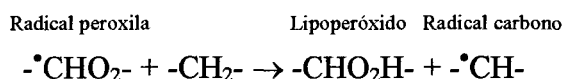
Dentre as diversas vias que tem sido sugeridas como responsáveis pela oxidação da LDL podemos citar a oxidação por metais tais como cobre e ferro. Estudos realizados com pacientes diabéticos têm mostrado que a glicação protéica e altos níveis de glicose sanguínea estimulam o processo de oxidação da LDL mediado por metais (BERLINER e HEINECKE, 1996). No entanto, é extremamente improvável que essa via desempenhe um papel importante em um indivíduo hígido, uma vez que os metais de transição cobre e ferro, no plasma, encontram-se ligados a proteínas, tais como transferrina, ceruloplasmina e albumina, inviabilizando a reação. Uma outra via seria a síntese de tióis, que ao deixarem células, como por exemplo, os macrófagos e as células endoteliais, podem sofrer autooxidação e gerar superóxido, que por sua vez, causa a oxidação da LDL na presença de metais. Reações envolvidas na geração de superóxido e outras espécies reativas, como a peroxidação lipídica, NADPH oxidase e a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, também podem resultar na oxidação da LDL. Além disso, enzimas como a lipoxigenase, por oxidação direta, e mieloperoxidase; pela produção de ácido hipocloroso e radical tirosil, também podem estar

relacionadas com a modificação da lipoproteína (BERLINER e HEINECKE, 1996 e STEINBERG, 1997).

A cadeia de reações de lipoperoxidação é usualmente definida como sendo um processo de deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados (PUFA). O processo de lipoperoxidação está dividido em três fases: iniciação, propagação e degradação. Iniciação é o ataque a um ácido graxo por qualquer espécie química, como o radical hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$) ou a forma protonada do ânion radical superóxido (HO_2^{\bullet}), que possui reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio (H) de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$), levando à formação de um radical centrado em carbono ($^{\bullet}\text{CH}-$). Em seguida, ocorre um rearranjo molecular deste radical com formação de um produto mais estável, o dieno conjugado, que por sua vez pode sofrer várias reações. A mais provável é uma reação com o oxigênio (O_2) que forma um radical peroxila ($\text{ROO}^{\bullet}/\text{RO}_2^{\bullet}$):



Os radicais peroxila também são capazes de abstrair átomos de hidrogênio de moléculas lipídicas, formando novos radicais peroxila e lipoperóxidos, o que é conhecido como fase de propagação:



Em situações de dano celular, a peroxidação também é favorecida pela síntese enzimática de lipoperóxidos pelas cicloxigenases e lipoxigenases. Os lipoperóxidos são compostos bastante estáveis, no entanto, na presença de complexos de metais de transição, como os sais de cobre e ferro, sua decomposição é acelerada e leva à formação de radicais alcóxila (RO^{\bullet}), pela quebra da ligação O-O, e peroxila, pela abstração de um hidrogênio. Epóxidos, compostos carbonílicos, gases hidrocarbonetos (pentano, etano, etileno) e aldeídos como o malonaldeído (MDA) e 4-hidroxi-2,3-trans-nonenal também são produtos da decomposição dos lipoperóxidos por metais. Eventualmente, o processo de peroxidação atinge também as proteínas de membrana. O MDA ataca grupos amino provocando o surgimento de ligações intramoleculares ou intermoleculares, o que pode ter consequências importantes, como inativação de enzimas, pelas alterações das estruturas terciária e quaternária protéica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

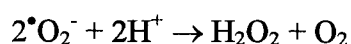
A propriedade que torna a LDL-ox mais aterogênica do que a LDL nativa, já é conhecida. A LDL-ox é reconhecida por receptores celulares chamados "scavenger", que ao contrário do receptor que reconhece a LDL nativa não sofre uma hiporregulação em resposta

ao excesso de colesterol celular, dando origem às células espumosas (*foam cells*). Ao que tudo indica o reconhecimento da LDL pelos receptores "*scavenger*" está relacionada à modificação de grupos ε-amino no processo de oxidação da porção protéica da lipoproteína. Em adição, a LDL-ox em si é quimiotática para monócitos, inibe a motilidade tecidual dos macrófagos, é citotóxica para células endoteliais em cultura, inibe a resposta vasodilatadora dessas últimas ao óxido nítrico (NO), é mitogênica para macrófagos e células musculares lisas, é imunogênica e pode estimular a liberação de proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1) e fator estimulador da colônia de macrófagos (M-CSF) de células endoteliais (STEINBERG, 1997).

1.4. As Defesas Antioxidantes

Radical livre é "qualquer espécie capaz de existência independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados" (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Essa característica leva os radicais livres a serem altamente reativos e se envolverem em reações de oxidação em cadeia. Como já mencionado anteriormente, eles também estão implicados na modificação da partícula de LDL. Para evitar que isso ocorra os organismos são dotados de vários mecanismos que ajudam a prevenir o acúmulo de radicais livres. Dentre esses, podemos citar as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e glutaciona-S-transferase (GST) e antioxidantes não enzimáticos (vitamina C, vitamina E, carotenos, flavonóides, etc.) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

A enzima superóxido dismutase catalisa a reação de dismutação do ânion radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) através da seguinte reação:



Nessa reação, e em outras que ocorrem no organismo, há formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que apesar de não ser um radical livre é um agente oxidante e está envolvido na geração dos mesmos. Isso pode ocorrer por várias vias:

- pela reação de Fenton: $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{1+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+}/\text{Cu}^{2+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$
- pela reação de Haber-Weiss: $\text{H}_2\text{O}_2 + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$
- por fissão homolítica: $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\cdot\text{OH}$

Para eliminar o peróxido de hidrogênio o organismo conta então com as enzimas CAT e GPx, como ilustrado a seguir (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).



Sabe-se, ainda, que a glutathiona reduzida (GSH) é um importante antioxidante, pois além de ser substrato para reações, como aquela catalisada pela GPx e outras peroxidases, ela também reage com outras espécies reativas, o que resulta em produtos neutros ou menos reativos e glutathiona oxidada. A enzima glutathiona redutase age justamente na reciclagem da glutathiona, para que não ocorra um esgotamento da GSH, como mostrado abaixo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).



A glutathiona-S-transferase, é uma enzima que atua no catabolismo de xenobióticos auxiliando, assim, na transformação de aldeídos tóxicos, produzidos no processo de lipoperoxidação, em produtos menos tóxicos e de eliminação mais fácil. Além dessa propriedade essa enzima também possui atividade de peroxidase (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Outras vias não enzimáticas também desempenham um papel de defesa contra as espécies reativas por sua atividade antioxidante ou por sua propriedade de quelar o cobre e o ferro, os quais são importantes catalisadores das reações de Fenton e Haber-Weiss. Dentre os compostos antioxidantes podemos citar o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), carotenos, ácido úrico, bilirrubina e flavonóides. Dentre os quelantes temos proteínas como a albumina, ceruloplasmina e transferrina ou compostos exógenos como a desferrioxamina e a penicilamina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

1.5. Aterosclerose em Modelos Animais

A dificuldade de se estudar a aterosclerose em humanos por ser de evolução lenta, envolver múltiplos fatores de difícil controle em estudos clínicos e portanto gerar resultados de interpretação complexa, criou a necessidade para o desenvolvimento de modelos animais (FEKETE, 1993). Muitos estudos já foram realizados nesse sentido. O modelo ideal deve ser de fácil manuseio e manutenção, ter baixo custo, tamanho adequado, reproduzir em laboratório, possuir características genéticas definidas, guardar semelhanças anatômicas, fisiológicas e bioquímicas com o homem quanto a aspectos do processo patológico e

desenvolver lesões com facilidade (VESSELINOVITCH, 1988). Dos animais já utilizados como modelos experimentais como, aves (pombos, galinha, peru, codorna), coelhos, lebres, porcos, cães e primatas não-humanos (*Macaca arctoides*, *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, *Macaca nemestrina*, *Saimiri sciureus*, *Cercopithecus aethiops*, *Papio anubis*, *Papio cynocephalus*, *Papio ursinus*), além de animais geneticamente manipulados (camundongo C57BR/cdj) ou selecionados (Coelho Watanabe com Hiperlipidemia Hereditária - WHHR), nenhum preenche todos os requisitos supracitados (JOKINEN e cols., 1985; VESSELINOVITCH, 1988). No entanto, tendo em vista a similaridade anatômica e fisiológica com o homem, o porco e os primatas não-humanos são atualmente considerados os melhores modelos de aterosclerose experimental (VESSELINOVITCH, 1988). Apesar disso, existem outros fatores como custo, questões envolvendo manuseio e manutenção e o fato de algumas espécies de macacos estarem sob risco de extinção, que acabaram levando os pesquisadores a optarem por outros modelos animais (JOKINEN e cols., 1985).

O coelho foi o primeiro animal a ser utilizado no estudo da aterosclerose (VESSELINOVITCH, 1988; JOKINEN e cols., 1985). Em virtude de seu baixo custo, facilidade para manuseio e manutenção em laboratório, viabilidade de desenvolvimento de lesões em curto espaço de tempo e de ser um modelo animal bem caracterizado, atualmente é o mais utilizado. No entanto, tem sido alvo de várias críticas, uma vez que o desenvolvimento de lesões está na dependência do uso de uma dieta hipercolesterolêmica (1-3% colesterol). Além disso o metabolismo lipídico e as lesões diferem das humanas e as complicações (calcificação, ulceração, trombose) não são comuns (JOKINEN e cols., 1985; PRIOR e cols., 1961). Uma crítica existente era de que nesse modelo não ocorreria regressão da lesão, no entanto, já se sabe hoje que as lesões são passíveis de regressão até um certo ponto. Essa descoberta fez com que o coelho despontasse como um possível modelo de estudo de regimes com potencial de regressão de lesões humanas (ARMSTRONG e HEISTAD, 1990).

A concentração sérica de colesterol pode aumentar em 37 vezes após um mês, podendo estar até 133 vezes aumentada após 4-5 meses de dieta hipercolesterolêmica. Após dois meses de tratamento é possível observar acúmulo lipídico nos nódulos linfáticos, medula óssea, baço e glândulas adrenais ao microscópio (PRIOR e cols., 1961). Dentre os fatores que colaboram para essa alta concentração de colesterol plasmático e tecidual estão o fato do coelho contar com uma alta capacidade de absorção do colesterol e da produção de ácidos biliares não ser afetada por essa maior absorção e conseqüente concentração plasmática (DIETSCHY e WILSON, 1970a e 1970b).

1.6. *Ilex paraguariensis* (Mate)

Ilex paraguariensis, Saint-Hilaire, popularmente conhecida como erva-mate ou simplesmente mate, trata-se de espécie pertencente à família Aquifoliaceae e gênero *Ilex* no qual estão englobadas aproximadamente 600 espécies. Cabe aqui ressaltar que algumas destas são utilizadas como adulterantes na comercialização da *Ilex paraguariensis*, dentre as quais podemos citar: *Ilex brevicuspis*, *Ilex theezans*, *Ilex microdonta*, *Ilex dumosa* var. *dumosa*, *Ilex taubertiana*, *Ilex pseudobruxus*, *Ilex integerrima* e *Ilex argentina* (SCHENKEL e cols., 1997).

O cultivo da planta, cuja comercialização era inicialmente baseada no extrativismo, é de grande importância econômica principalmente na região sul do Brasil, tendo espaço também no Paraguai e Argentina. Segundo dados do Departamento Rural de Economia do Paraná (DERAL), 270 mil toneladas são processadas no Brasil anualmente e cerca de 26 mil toneladas são exportadas, principalmente para o Uruguai (81%) e Chile (15%). O maior produtor é o estado do Paraná (280.000 t), seguido de Santa Catarina (246.000 t) e Rio Grande do Sul (150.000 t). As partes aéreas são utilizadas para preparar uma bebida, conhecida como chimarrão, muito apreciada por seu sabor amargo característico e propriedades estimulantes (MESQUITA, 2001).

À *Ilex paraguariensis* são atribuídas ações analéptica, inotrópica e cronotrópica positivas, diurética, glicogenolítica e lipolítica (BLUMENTHAL (Ed), 1998), colerética (GORZALCZANY e cols., 2001), hipocolesterolemiantes (FERREIRA e cols., 1997) e antioxidante (GUGLIUCCI, 1996). Além disso é utilizada na medicina popular para artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de fluidos, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas (GORZALCZANY e cols., 2001).

Atualmente, os pesquisadores tem trabalhado no sentido de esclarecer a composição química de extratos obtidos a partir de várias partes da planta e alguns estudos têm procurado relacionar compostos específicos, como os flavonóides, a determinadas propriedades, como a antioxidante (CARINI e cols., 1998).

Os ácidos neo-clorogênico, clorogênico, cripto-clorogênico, dicafeoilquinico, a rutina, a quercetina, o diglicosídeo de luteolina e a cafeilglicose são constituintes fenólicos já conhecidos do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (RICCO e cols., 1991; CARINI e cols., 1998; FILIP e cols., 2001). Destes, os ácidos dicafeoilquinico (6,8% do peso seco) e clorogênico (3 a 5% do peso seco) são os que estão presentes em maior proporção (FILIP e

cols., 2001 e CARINI e cols., 1998). Para todos os compostos supracitados já foi verificada uma atividade antioxidante *in vitro*, com exceção da cafeilglicose (CARINI e cols., 1998).

A partir de experimentos *in vitro* utilizando liposomas e o 2,2-difenil,1-picril-hidrazil (DPPH), Carini e cols. (1998) concluíram que os compostos polifenólicos presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* poderiam atuar como antioxidantes não só isoladamente, mas também de forma sinérgica conferindo ao extrato em si essa propriedade. Estudos utilizando diversos modelos de oxidação *in vitro* e *in vivo*, já constataram que os compostos polifenólicos presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* tem propriedades antioxidantes. Nesses experimentos foi constatado que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* inibiu significativamente a oxidação de liposomas (FILIP e cols., 2000) e de partículas de LDL (GUGLIUCCI e STAHL, 1995 e GUGLIUCCI, 1996), sendo eficiente também no sequestro do radical livre derivado de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (ABTS) (CAMPOS e cols., 1996). Também observou-se uma alta correlação entre o conteúdo de polifenóis e a atividade antioxidante de extratos de diferentes espécies (FILIP e cols., 2000). Ainda não se sabe ao certo através de qual, ou quais, mecanismos se dá essa ação antioxidante, porém, três possibilidades já foram sugeridas: i) sequestro de radicais livres; ii) quebra da reação de oxidação em cadeia pela interceptação de radicais intermediários e sua conseqüente neutralização; iii) quelação de metais. Pode-se considerar, ainda, a regeneração de α -tocoferol através de redução do radical α -tocoferoxil.

As folhas de *Ilex paraguariensis* também apresentam uma concentração alta de saponinas quando comparada com as demais espécies, que corresponde de 5 a 10% do peso da planta seca. As saponinas identificadas na *Ilex paraguariensis* são triterpênicas pentacíclicas, mono ou bidesmosídicas, tendo como aglicona o ácido ursólico ou o oleanólico e os açúcares arabinose, glicose e ramnose (SCHENKEL e cols., 1997).

Na *Ilex paraguariensis* também se encontram alcalóides purínicos como cafeína, teobromina e teofilina (ALIKARIDIS, 1987). A presença simultânea de teobromina e cafeína parece ser uma característica particular da *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*, não tendo sido observada em *Ilex brevicuspis*, *Ilex dumosa*, *Ilex microdonta* e *Ilex paraguariensis* var. *vestita* (REGINATTO e cols., 1999).

Nas sementes de *Ilex paraguariensis* foram encontrados os ácidos graxos láurico, palmítico, esteárico, araquidônico, palmitoléico, oléico e linoléico. Nas frutas as antocianinas cianidina-3-xilosilglicose e cianidina-3-glicosídeo já foram identificadas (ALIKARIDIS, 1987).

Além dos compostos já citados estão presentes também aminoácidos (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, cistina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, tirosina e valina), compostos nitrogenados (trigonelina e colina), carboidratos (sacarose, rafinose, glicose e levulose) e vitaminas (ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, ácido nicotínico e caroteno) (ALIKARIDIS, 1987).

Apesar de Blumenthal ed. (1998) referir que não são conhecidas contra-indicações ou efeitos colaterais para o uso da *Ilex paraguariensis*, estudos mais recentes relataram atividades genotóxica e mutagênica *in vitro* para o extrato aquoso. O estudo ainda sugere o envolvimento de espécies reativas de oxigênio, possivelmente presentes no extrato, na genotoxicidade (LEITÃO e BRAGA, 1994 e FONSECA e cols., 2000). Além disso, o consumo do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* têm sido associado ao aumento do risco para o desenvolvimento de cânceres de esôfago (VASSALO e cols., 1985), de bexiga (DE STEFANI e cols., 1991) e rins (DE STEFANI e cols., 1998). No entanto, resta estabelecer se esses efeitos são devidos aos compostos constituintes da *Ilex paraguariensis* per se, ou oriundos de seus contaminantes.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Estudos epidemiológicos têm sugerido uma importante participação dos flavonóides e compostos polifenólicos, como agentes antioxidantes naturais, na prevenção de doença arterial coronariana (HERTOG e cols, 1995; HERTOG e cols., 1997a e HERTOG e cols., 1997b). O extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (erva-mate) é uma importante fonte de consumo desses e de outros compostos, como as saponinas, pela população da América do Sul. As saponinas, por sua vez, têm sido alvo de diferentes estudos que exploram o potencial desses compostos anfífilos em reduzir o colesterol sérico. Baseado nas informações sobre o potencial antioxidante *in vitro* do extrato de *Ilex paraguariensis*, o objetivo geral desse trabalho foi verificar a capacidade da erva-mate em inibir a progressão da aterosclerose *in vivo*, utilizando coelhos alimentados com colesterol como modelo experimental de aterosclerose.

Afim de verificar se três ervas-mate disponíveis no mercado possuem diferentes atividades contra lipoperoxidação sérica, o objetivo inicial foi estudar o efeito antioxidante de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis*, obtidos a partir da infusão de erva-mate de diferentes marcas comerciais, em ensaios *in vitro* com soro humano e em ensaios *ex vivo* com o soro de ratos Wistar obtido antes e após a administração intragástrica do extrato de erva-mate. O estudo *ex vivo* teve como objetivo a verificação da atividade antioxidante do extrato após a sua absorção e transformação metabólica. Em segundo lugar, e como objetivo principal, avaliou-se a capacidade do extrato aquoso de erva-mate em inibir a progressão da aterosclerose em coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica. A verificação do efeito do extrato de *Ilex paraguariensis* na formação das placas ateromatosas nas artérias dos coelhos foi feita pela medida da extensão das placas na artéria aorta e pela determinação do conteúdo de colesterol arterial.

Considerando, ainda, que a susceptibilidade da parede arterial ao estresse oxidativo e à formação da placa aterosclerótica são altamente influenciadas pela adequação do sistema antioxidante celular, a determinação das várias enzimas que compõem este sistema foi realizada, bem como a quantificação dos níveis de peroxidação lipídica nas artérias e a susceptibilidade do soro à peroxidação *in vitro*, com ions cobre.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

A Erva Mate Extra Fontana® foi gentilmente doada pela Moinhos Unidos do Brasil-Mate S.A. (Curitiba, PR). A Erva Mate Jacutinga® (Indústria Jacutinga LTDA, Catanduvas, SC) e a Erva Mate Regina® (Ervateira Regina LTDA, Catanduvas, SC) foram adquiridas em supermercado. Quercetina, ácido tiobarbitúrico (TBA), hidroxitolueno-butílico (BHT), sódio dodecil sulfato (SDS), triton, ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), ácido 2-nitrobenzóico (DTNB), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada reduzida (NADPH), glutatona oxidada (GSSG), glutatona reduzida (GSH), glutatona redutase (GR), ter-butilhidroperóxido (t-BuOOH), adrenalina, glicina, 1-cloro,2,4-dinitrobenzeno (CDNB), albumina e colesterol foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). O 1,1,3,3-tetrametoxipropano (MDA) foi da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Cloreto de cobre (CuCl₂), cloreto de potássio (KCl), ácido tricloroacético (TCA), clorofórmio e formaldeído foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, RJ). Ácido etilenoaminotetracético (EDTA) e metanol foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, RJ). O pentobarbital sódico (Hypnol) é da FV-Fonto Veter (Itapira, SP). O reagente de Folin-Ciocalteu, SUDAN IV, hematoxilina e os demais reagentes foram de outras marcas nacionais.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação do Extrato

O extrato aquoso de erva mate foi obtido pela adição de água quente (aprox. 100°C) sobre folhas secas e moídas de *Ilex paraguariensis*, na proporção de 50 mg/mL, conforme a preparação usual consumida pela população. Após 20 min de extração a mistura foi filtrada em papel de filtro e usada imediatamente nos experimentos. A concentração de substâncias sólidas no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* foi determinada pela pesagem de 1 mL do extrato após evaporação.

3.2.2. Medida de Fenóis Totais do Extrato

Os fenóis totais foram determinados segundo metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). A 100 μL do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (50 mg/mL) foram adicionados 1,5 mL do Reagente de Folin diluído 3 vezes e 4 mL de bicarbonato de sódio 7,5% (Na_2CO_3). Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente a absorbância foi determinada em 765 nm. Como padrão foi utilizada a quercetina.

3.2.3. Ensaio de Lipoperoxidação *in vitro*

O “pool” de soro humano foi preparado a partir de amostras de sangue obtidas de 3-5 indivíduos saudáveis, após jejum de 12 a 15 h. O sangue foi centrifugado a 750 x g por 15 min e o soro foi utilizado imediatamente nos ensaios de oxidação. A verificação dos melhores índices de oxidação foi realizada testando-se diferentes diluições de soro em PBS pH 7,4 e diferentes concentrações de cloreto de cobre. Os níveis mais altos de oxidação foram observados com o soro diluído 20 vezes e CuCl_2 100 μM . Assim, o soro diluído 20x em PBS foi incubado com CuCl_2 100 μM na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* de três marcas comerciais, Fontana®, Regina® e Jacutinga® (diluições de 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 e 1400 vezes), a 37°C por 5h com agitação. Alíquotas das misturas foram retiradas após diferentes períodos de incubação e a oxidação foi interrompida pela adição de hidroxitolueno butilato (BHT) 4%. As amostras foram imediatamente congeladas a -20°C até a determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

3.2.4. Ensaio de Lipoperoxidação *ex vivo*

O sangue de 20 ratos Wistar jovens, em jejum de 12 a 15 h, foi coletado 1 e 3 h após a administração intragástrica de 2 mL de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* Fontana® ou 2 mL de água (controles). Os animais foram anestesiados com éter etílico e, após a laparotomia, o sangue foi coletado da artéria aorta abdominal. O soro foi obtido por centrifugação, diluído 2, 5 e 20 vezes com PBS pH 7,4 e incubado com CuCl_2 100 μM (concentração final) a 37°C

com agitação. Aliquotas das misturas foram retiradas após 0, 1, 2, 3, 4 e 5h para a monitoração dos níveis dos produtos de lipoperoxidação (TBARS). Ensaios adicionais foram realizados com o soro sem diluição.

3.2.5. Determinação de TBARS

As substâncias reativas foram monitoradas conforme procedimento descrito previamente por Ohkawa e cols. (1979). Às alíquotas de 250 µL foram adicionados 25 µL de BHT 4% em metanol e 1 mL de ácido tricloroacético 12% (TCA). A seguir, agitou-se a mistura em agitador tipo vórtex. A essa mistura foram adicionados 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,73% (TBA) e 750 µL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,4 contendo 0,1mM EDTA. Os tubos foram agitados e levados à fervura (100°C) por uma hora. Após a fervura os tubos foram resfriados sob água corrente e centrifugados a 1000 x g por 15 min. As absorbâncias do sobrenadante foram lidas em 532 nm. Como padrão foi usado o 1,1,3,3-tetrametoxipropano recentemente preparado.

3.2.6. Efeito do Extrato de *Ilex paraguariensis* na Aterosclerose Experimental

3.2.6.1. Animais e Protocolo Experimental

Foram utilizados coelhos machos, com aproximadamente 2 meses de idade e 1,7 a 2 kg de peso, da linhagem New Zealand brancos (n=30), fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina, e mantidos em gaiolas individuais sob ciclo de luz natural. Os coelhos foram distribuídos em quatro grupos experimentais de 4-11 animais em cada grupo e foram alimentados com 100 g de ração por dia, tendo em vista que a extensão da aterosclerose depende da ingestão de colesterol (BOCAN e cols., 1993). Um grupo de coelhos consistiu em animais controles (Grupo C), os quais foram alimentados com a ração padrão (Ração Anhangüera DU COELHO – Anexo A). O segundo grupo recebeu a dieta padrão e, ao invés de água, receberam aproximadamente 400 mL do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, equivalente a 1,3 g de fenóis totais, preparado conforme anteriormente descrito (Grupo CI). O terceiro grupo recebeu a dieta contendo 1% de colesterol (Grupo HC) para induzir a formação

de placas ateromatosas. O quarto grupo recebeu a dieta rica em colesterol e o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (Grupo HCI). A ração foi preparada semanalmente e mantida em geladeira para diminuir os níveis de oxidação. O colesterol foi dissolvido em éter etílico e misturado com a ração padrão, em seguida a ração enriquecida com colesterol foi mantida à temperatura ambiente por um dia, para completa evaporação do solvente.

Após dois meses de tratamento com as diferentes dietas, os animais, em jejum de 12 a 15 horas, foram mortos por deslocamento cervical ou por exsanguinação através de punção cardíaca sob anestesia com pentobarbital (50 mg/kg) e o sangue foi transferido para tubos de ensaio. O soro foi isolado por centrifugação (750 x g, 15 min) e utilizado imediatamente para os ensaios de lipoperoxidação e quantificação dos lipídios plasmáticos (colesterol total, HDL-C e triglicerídios). Após a laparotomia o fígado e a artéria aorta foram rapidamente removidos para preparação de homogenatos e posterior medida de TBARS, proteínas totais e defesas antioxidantes.

O presente protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (Anexo B).

3.2.6.2. Preparação do Homogenato Arterial e Hepático

A artéria aorta e alíquotas do fígado foram lavados em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,85%. A gordura e o tecido perivascular arteriais foram cuidadosamente retirados. As amostras foram secas em papel de filtro, pesadas e homogeneizadas (1:9, p/v) em tampão fosfato 20 mM pH 7,4 contendo triton 0,1% e NaCl 150 mM, com homogeneizador Tissue Tearor Homogenizer. Após centrifugação a 10.000 x g durante 5 minutos, os sobrenadantes foram mantidos a -20°C até a sua utilização para a quantificação de proteínas totais pela metodologia de Lowry e cols. (1951), atividade das enzimas antioxidantes e dos níveis de lipoperoxidação (TBARS).

3.2.6.3. Preparação do Hemolisado

Após a separação do soro, adicionou-se aos eritrócitos volume igual de água destilada. A mistura foi mantida a -20°C por 60 minutos e a seguir foi colocada a 4°C para provocar a hemólise dos eritrócitos. Depois de descongelada a amostra foi centrifugada a 750 x g por 15

min. O sobrenadante foi, então, diluído (1:4, v/v) em tampão fosfato e mantido a -20°C até a sua utilização para a quantificação da atividade das enzimas antioxidantes.

3.2.6.4. Determinação de Colesterol Total, Triglicerídios e HDL-C no soro

Após a separação do soro por centrifugação quantificou-se o colesterol pela metodologia da colesterol oxidase. Após precipitação quantitativa das lipoproteínas que contém apo B com uma solução de ácido fosfotúngstico 1,5 mM e cloreto de magnésio 54 mM a concentração de HDL-C foi quantificada no sobrenadante pela metodologia da colesterol oxidase e a determinação de triglicerídios séricos foi realizada pela metodologia de Trinder modificada. Para todas as determinações foram utilizados kits diagnósticos do Laboratório Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, MG).

3.2.6.5. Determinação Tecidual de Colesterol Total

A extração de lípidios foi realizada segundo Folch e cols. (1957). Um volume de homogenato equivalente a 1 g de tecido foi extraído por 24 h com 10 mL de metanol e 20 mL de clorofórmio. Essa mistura foi filtrada em papel filtro e o resíduo lavado com 5 mL de clorofórmio. Ao filtrado adicionou-se 7 mL de H_2O que ficou extraíndo por 24 h. Descartou-se a fase superior e adicionou-se 4 mL de uma solução de clorofórmio, metanol e H_2O (3:48:47, v/v/v). Após 24 h, a fase superior foi descartada e a fase orgânica foi evaporada em evaporador rotativo. O resíduo foi ressuspensionado em solução salina e metanol (2:1, v/v) e o conteúdo de colesterol foi determinado pela metodologia da colesterol oxidase.

3.2.6.6. Determinação dos Níveis de Lipoperoxidação Arterial, Hepática e Sérica (TBARS)

Alíquotas dos homogenatos arterial e hepático foram utilizadas para a determinação de TBARS, conforme metodologia descrita anteriormente. A lipoperoxidação do soro dos coelhos foi induzida com cloreto de cobre 200 μM (concentração final) a 37°C com agitação.

Alíquotas das misturas foram retiradas após passadas 5 h para determinação de TBARS.

3.2.6.7. Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da glutathione-S-transferase foi medida em 340 nm, de acordo com Habig e cols. (1974). As análises foram feitas em duplicatas e os valores da atividade enzimática expressas em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

3.2.6.8. Catalase (CAT)

Para análise da atividade desta enzima foi utilizado o método descrito por Aebi (1984), que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio, em 240 nm durante 30 segundos. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas, sendo os valores expressos em $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

3.2.6.9. Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida em 480 nm de acordo com o método do adrenocromo (MISRA e FRIDOVICH, 1972), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que forma o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, cuja formação é retardada pela enzima presente na amostra. Para medida de atividade enzimática no hemolisado foi utilizado o sobrenadante da mistura de amostra, clorofórmio, etanol e água destilada (8:3:5:8, v/v/v/v) centrifugada a 10.000 x g durante 10 min.

3.2.6.10. Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx catalisa uma reação de redução do t-BuOOH, às custas de oxidação de GSH. A glutathione oxidada (GSSG) produzida é reciclada em uma reação redox com NADPH catalisada pela glutathione redutase (GR). Este ensaio baseia-se na medida do decréscimo de absorvância do NADPH em 340 nm, promovido durante a redução da GSSG. A velocidade de

oxidação de NADPH é portanto proporcional a atividade da GPx. Os valores da atividade desta enzima são expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ (FLOHÉ e GUNZLER, 1984).

3.2.6.11. Glutathione Redutase (GR)

O método utilizado para a análise da atividade da enzima GR foi o proposto por Carlberg e Mannervick (1975), onde se acompanha a taxa de oxidação do NADPH em 340 nm, utilizado na redução da glutathione oxidada (GSSG) pela glutathione redutase presente na amostra.

3.2.6.12. Glutathione Reduzida (GSH)

Para avaliar a concentração arterial de pequenos tióis, como GSH, empregou-se o método de Beutler e cols. (1963). A adição de 0,2 ml de ácido 2-nitrobenzóico 2,5 mM (DTNB) nas cubetas contendo 1,9 ml de tampão Tris-HCL pH 8,0 e 0,1 ml da amostra, permite, após cerca de 3 minutos, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412 nm.

3.2.6.13. Glutathione Total (GT) e Glutathione Oxidada (GSSG)

Para esta análise foi utilizado o método enzimático de Tietze (1969), onde a taxa de oxidação do NADPH usada na redução da glutathione oxidada (GSSG) catalisada pela glutathione redutase (GR) permite avaliar indiretamente a concentração da glutathione total presente na amostra. As concentrações obtidas neste ensaio, bem como no ensaio para GSH, são expressas em mM. Os valores da glutathione oxidada foram calculados por estequiometria ($2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG}$), a partir da concentração da glutathione total.

3.2.6.14. Coloração de Sudan Red

As artérias aorta foram fixadas com formalina a 10% por 24 horas, lavadas em etanol

70% e imersas em solução de Herxeheimer (Sudan IV 1% em etanol 70% e acetona) à temperatura ambiente, por 15 minutos. As artérias foram transferidas para uma solução de etanol 70% por 20 minutos e lavadas em água corrente por 1 hora. Em seguida, as aortas foram imersas em solução de hematoxilina de Harris diluída 20 vezes, por 5 minutos e lavadas em água corrente por 30 minutos. As artérias coradas foram fotografadas e a percentagem da área da lesão aterosclerótica foi determinada por planimetria computadorizada de distribuição de sudanofidia em fotografias com o auxílio do software Quantimet-500 adaptado para um sistema óptico Leica.

3.3. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e teste complementar de Tukey–Kramer, considerando um nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do Extrato Aquoso de *Ilex paraguariensis*

Foram preparados extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* de três marcas comerciais, Fontana®, Regina® e Jacutinga®, na concentração de 50 mg de erva-mate por mililitro de água à 100°C. Foi então realizada a caracterização desses extratos quanto às concentrações de substâncias sólidas e fenóis totais, como previamente descrito nas seção Materiais e Métodos. Os resultados estão apresentados na tabela 1 e figura 1.

Tabela 1. Conteúdo de extrato seco e fenóis totais em 3 ervas-mate comerciais.

Erva-Mate Comercial	Extrato Seco (mg/mL)	Fenóis Totais (mmol/g)
Fontana®	16,1 ± 0,98	0,5941
Regina®	18,1 ± 0,63	0,5364
Jacutinga®	15,2 ± 0,32	0,7123

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão de 5 determinações para cada erva-mate.

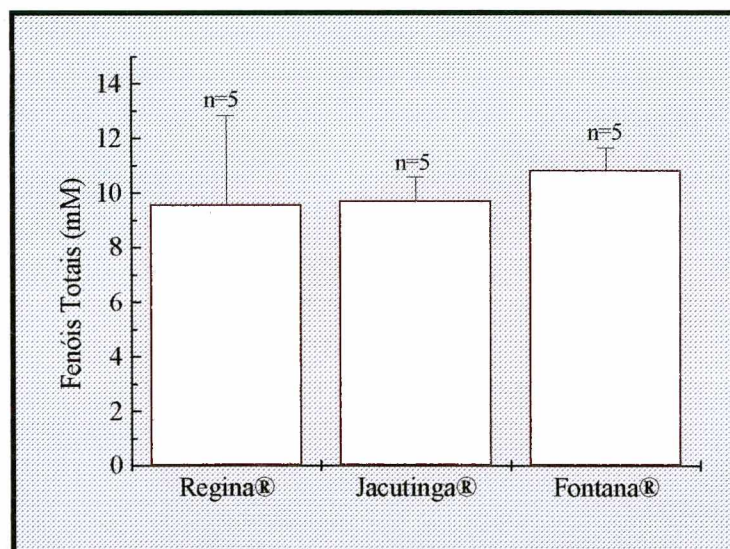


Figura 1: Concentração de fenóis totais do extrato aquoso (50 mg/mL) de *Ilex paraguariensis* de três marcas comerciais, Fontana®, Regina® e Jacutinga®.

As três ervas-mate comerciais estudadas não apresentaram resultados significativamente diferentes em relação ao extrato seco e ao conteúdo de compostos fenólicos.

4.2. Atividade Antioxidante da *Ilex paraguariensis* *in vitro*

Para avaliar o potencial antioxidante da *Ilex paraguariensis in vitro* foram inicialmente realizados vários ensaios de oxidação de soro humano com cloreto de cobre, a fim de padronizar as condições de lipoperoxidação. Os índices de lipoperoxidação foram medidos através da absorbância em 532 nm das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente MDA, em sistemas de incubação de soro humano com cloreto de cobre à 37°C durante 5 horas. Inicialmente, foi avaliado o efeito da diluição do soro em tampão fosfato pH 7,4 e os resultados estão mostrados na Figura 2.

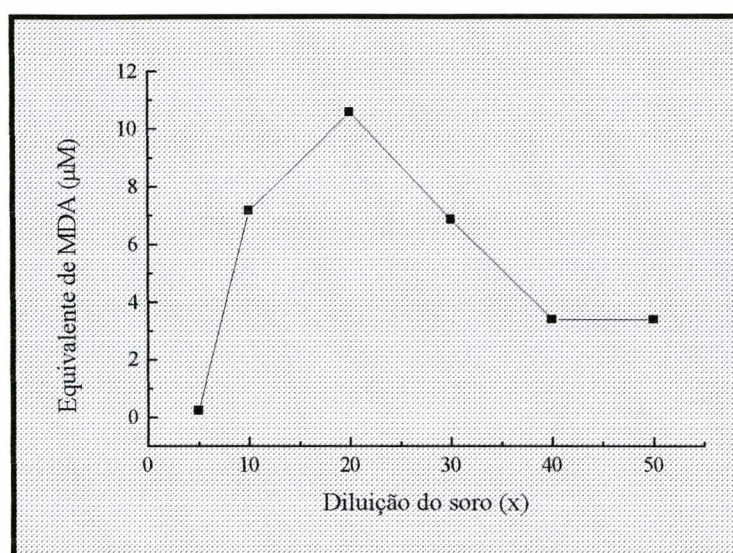


Figura 2: Efeito da diluição de soro humano nos níveis de lipoperoxidação. O “pool” de soro humano foi diluído 5, 10, 20, 30, 40 e 50 vezes em tampão fosfato (PBS) pH 7,4 e oxidado com CuCl_2 100 μM à 37°C por 5 h. Os resultados são a média de dois diferentes ensaios.

Os resultados mostraram que a diluição de 20 vezes foi a que apresentou os melhores índices de lipoperoxidação. Assim, nos experimentos seguintes utilizou-se essa diluição do soro, e diferentes concentrações de cloreto de cobre foram testadas (Figura 3).

Dos resultados obtidos com os ensaios realizados com diferentes concentrações de cobre pode-se verificar um aumento nos níveis de TBARS com a concentração de CuCl_2 acima de 50 μM . No entanto, não houve diferença acentuada no grau de lipoperoxidação ao se utilizar CuCl_2 nas concentrações de 100, 200 ou 400 μM . Assim, nos ensaios subseqüentes optou-se por utilizar soro diluído 20 vezes e CuCl_2 100 μM .

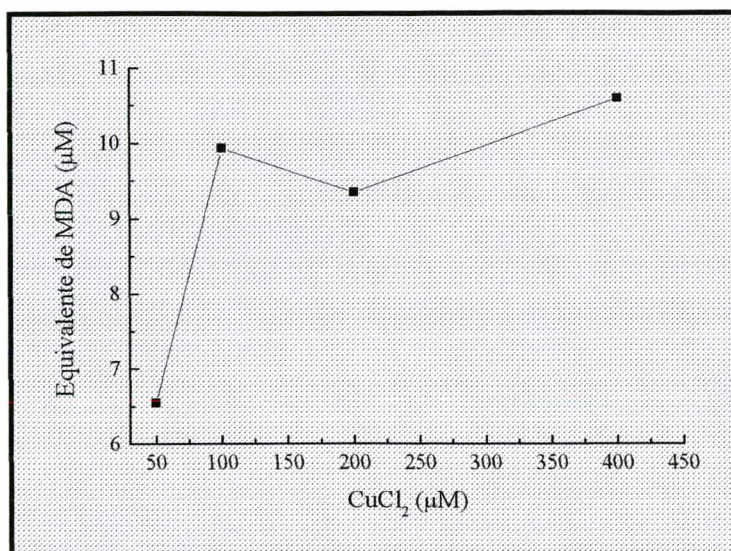


Figura 3: Efeito da concentração de cobre na lipoperoxidação sérica. “Pool” de soro humano diluído 20 vezes em PBS foi incubado com CuCl₂ nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 μM, à 37°C por 5 h. Os resultados são expressos como a média de dois diferentes ensaios.

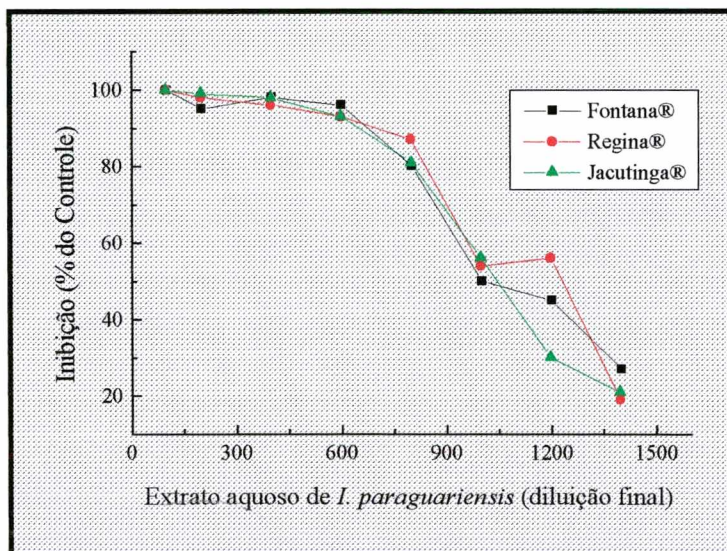


Figura 4: Inibição da lipoperoxidação sérica pelo extrato aquoso de 3 ervas-mate comerciais. Soro humano diluído 20 vezes em PBS foi oxidado com CuCl₂ a 100 μM, à 37°C por 5h, na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* de três marcas comerciais, Fontana®, Regina® e Jacutinga®. O extrato aquoso, inicialmente preparado na concentração de 50 mg/mL, foi diluído 100 a 1400 vezes nos sistemas de incubação. A concentração final de extrato seco nos sistemas variou de 11,7 a 164,0 μg/mL. Os resultados estão expressos como média de 2 diferentes experimentos para cada erva-mate.

Em seguida, foi verificado o potencial antioxidante das 3 marcas comerciais de *Ilex paraguariensis* nos ensaios de lipoperoxidação sérica. Os resultados apresentados na figura 4 demonstraram que, nas condições experimentais utilizadas, não houve diferença entre as três marcas comerciais de ervas-mate estudadas. Os extratos aquosos inibiram significativamente a lipoperoxidação sérica e a inibição foi dependente da concentração do extrato nos sistemas de incubação (Figura 4). Nos ensaios seguintes foi utilizada a erva-mate da marca comercial Fontana® que apresentou valores intermediários de compostos fenólicos (Tabela 1).

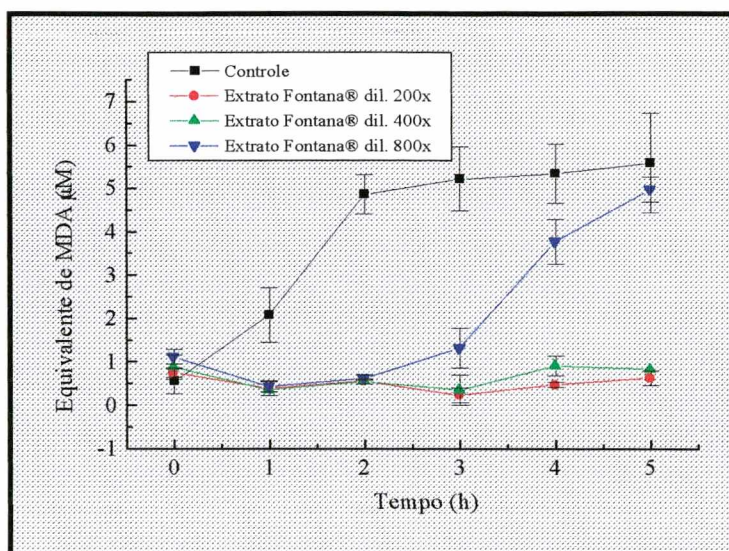


Figura 5: Cinética de inibição da lipoperoxidação sérica pelo extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. Soro humano diluído 20 vezes em PBS foi oxidado com CuCl_2 100 μM , à 37°C durante 5 h, na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações de extrato aquoso da erva-mate Fontana®. Os resultados são média \pm desvio-padrão de 2 experimentos para cada diferente concentração de erva-mate.

Os resultados da cinética de lipoperoxidação sérica e a inibição pelo extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* estão apresentados na Figura 5. A partir do momento de incubação do soro humano com o cobre houve um aumento progressivo dos níveis de TBARS, diminuindo após 3 h de incubação. O extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* diluído 400 vezes inibiu completamente a lipoperoxidação sérica, conforme pode ser observado pela ausência de progressão dos níveis de TBARS. O extrato aquoso diluído 800 vezes inibiu a lipoperoxidação nas 3 h iniciais de incubação. Após esse período de fase “lag” os níveis de TBARS aumentaram linearmente até se aproximarem dos valores controles sem extrato observados nas 5 h de oxidação, indicando assim, um consumo dos compostos antioxidantes existentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante a fase inicial de oxidação do soro

(Figura 5).

A inibição da lipoperoxidação sérica esteve associada ao conteúdo de fenóis totais presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (Figura 6).

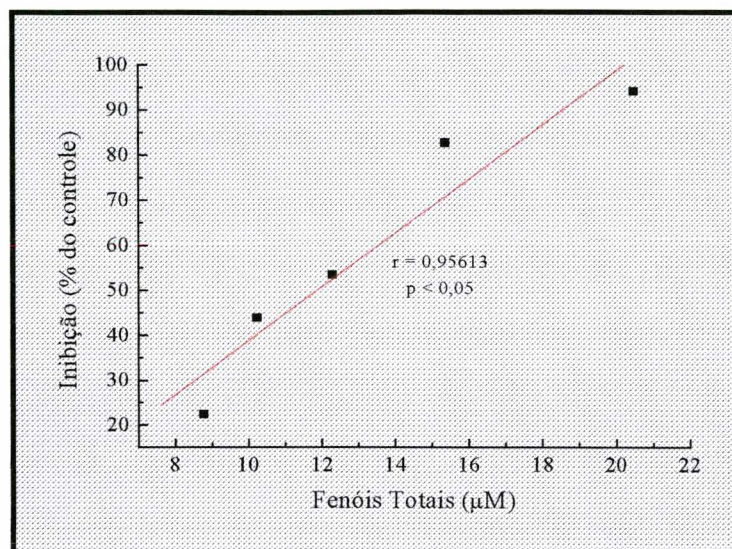


Figura 6: Correlação entre o grau de inibição da lipoperoxidação sérica pelo extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e a concentração de fenóis totais. Os dados foram obtidos a partir dos resultados apresentados na figura 4.

4.3. Atividade Antioxidante *ex vivo* da *Ilex paraguariensis*

Para verificar se o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* ainda possui atividade antioxidante após a modificação metabólica de seus constituintes foram realizados ensaios de lipoperoxidação sérica antes e após a administração intragástrica do extrato em ratos. Como pode ser observado na figura 7, a administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* não protegeu o soro contra a lipoperoxidação em amostras de sangue coletadas 1 h após a administração. Resultados semelhantes foram, também, obtidos nos experimentos realizados com o soro obtido 3 h após a administração intragástrica do extrato. A administração de extrato mais concentrado (125 mg/mL) também não modificou a resposta do soro contra a lipoperoxidação iniciada por íons cobre (resultados não mostrados).

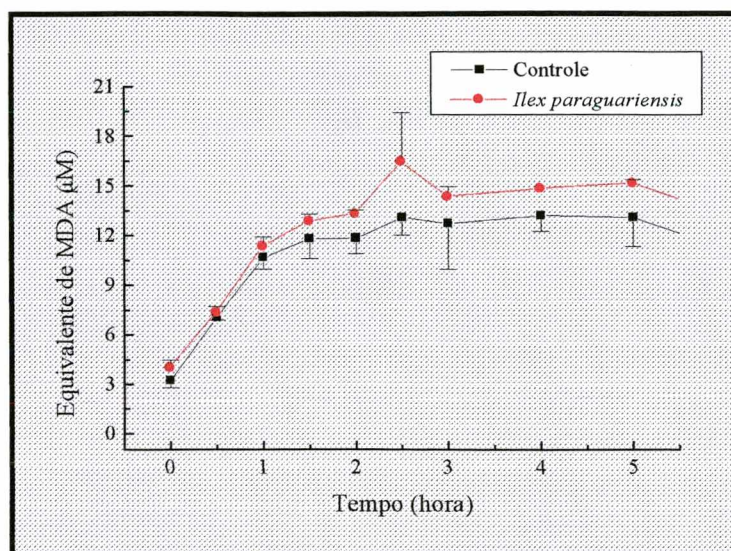


Figura 7: Efeito da administração intragástrica de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* na cinética de lipoperoxidação sérica. O soro de ratos, obtido 1 h após administração intragástrica de 2 mL de água (controle; n=5) ou extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (50 mg/mL; n=5), foi diluído 20 vezes em PBS e incubado com CuCl_2 100 μM à 37°C durante 5 h. Os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão.

4.4. Efeito Antiaterogênico do Extrato Aquoso de *Ilex paraguariensis* *in vivo*

Com o objetivo de avaliar o potencial do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em inibir a progressão da aterosclerose *in vivo*, foram realizadas determinações da extensão das lesões ateroscleróticas em coelhos alimentados com dieta contendo 1% de colesterol e que ingeriram o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. Após dois meses de tratamento com a ração enriquecida em colesterol, os animais apresentaram elevados níveis de lipídios séricos e placas de ateroma bem definidas e visíveis na artéria aorta. Os coelhos consumiram diariamente 100 g de ração, enriquecida ou não com colesterol e consumiram em média 414 mL de água (Grupos C e HC) ou extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (Grupo CI e HCI), equivalente a 1,3 g de fenóis totais. Todos os animais apresentaram o mesmo ganho de peso durante o período experimental, indicando assim, que a dieta rica em colesterol ou a ingestão do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* não interferiu no crescimento dos animais.

As Figuras 8, 9 e 10 ilustram o perfil lipídico sérico dos animais.

A ingestão do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* pelos coelhos dos grupos controles, por um período de 2 meses, diminuiu os níveis de colesterol total em aproximadamente 50%, no entanto esses resultados não foram estatisticamente significativos (Figura 8). O tratamento com a dieta rica em colesterol aumentou aproximadamente 11 vezes os níveis séricos de colesterol total (Grupos HC e HCI; $p < 0,001$). A administração simultânea da dieta rica em colesterol e extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* reduziu os níveis de colesterol total em aproximadamente 12% apenas (Grupo HCI *versus* HC), sendo que esses valores não foram estatisticamente significativos.

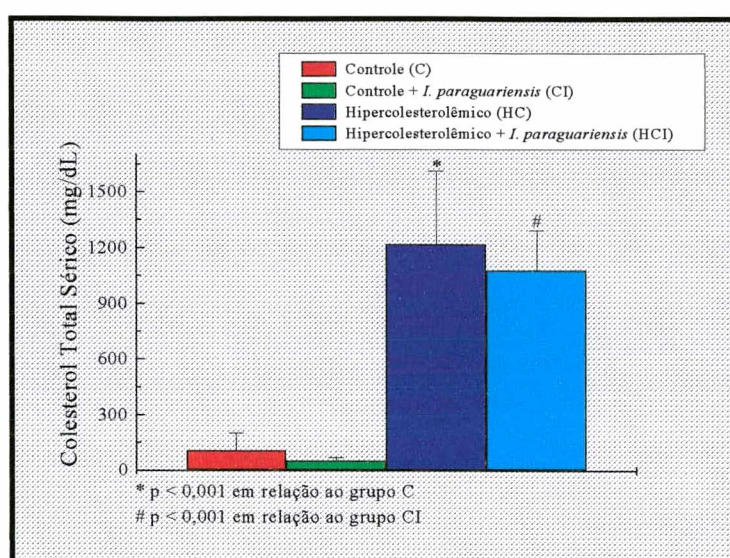


Figura 8: Níveis de colesterol total sérico dos animais do grupo controle (C; n=5), grupo controle-Ilex (CI; n=4), grupo hipercolesterolêmico (HC; n=11) e grupo hipercolesterolêmico-Ilex (HCI; n=10).

A administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* não modificou os níveis séricos de triglicerídios nos animais controles (Figura 9). O tratamento com a dieta aterogênica aumentou os triglicerídios séricos em aproximadamente 3 vezes (Grupo HC *versus* C), no entanto, devido à grande variação dos resultados, esses não foram estatisticamente significativos. A administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* aos animais que estavam recebendo a dieta rica em colesterol (Grupo HCI) reduziu os valores de triglicerídios em aproximadamente 21% em relação ao grupo HC, mas novamente, esses resultados não foram significativos em nível de 5%.

A dieta hipercolesterolêmica provocou um decréscimo significativo na concentração do HDL-C e, embora, os grupos tratados com o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* tenham

mostrado aumentos de 12% no grupo CI em relação ao grupo C e de 7% no grupo HCI em relação ao grupo HC, esses não se mostraram significativos.

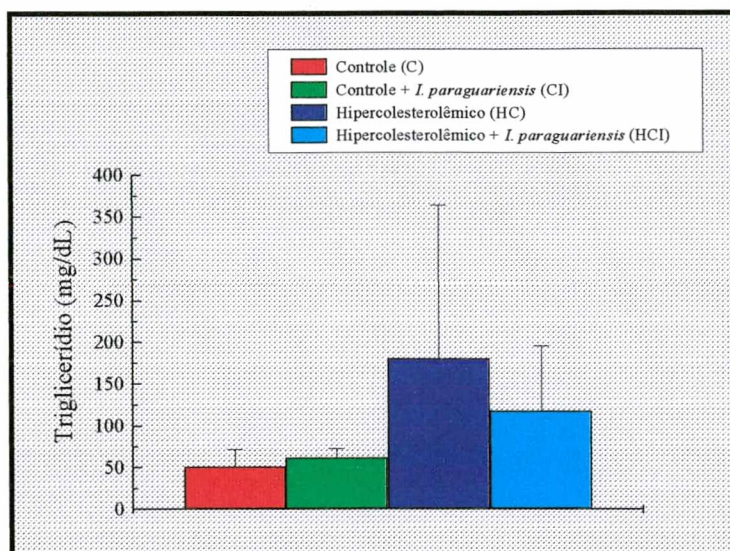


Figura 9: Níveis de triglicerídios sérico dos animais do grupo controle (C; n=5), grupo controle-Ilex (CI; n=4), grupo hipercolesterolêmico (HC; n=11) e grupo hipercolesterolêmico-Ilex (HCI; n=10).

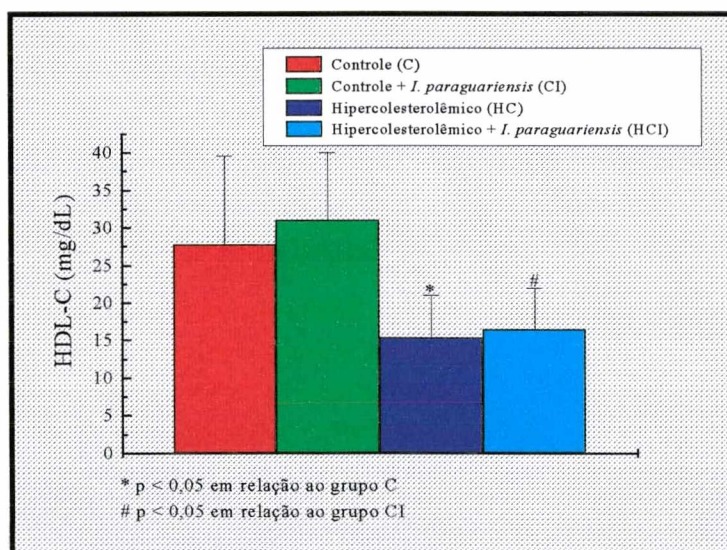


Figura 10: Níveis de HDL-C dos animais do grupo controle (C; n=5), grupo controle-Ilex (CI; n=4), grupo hipercolesterolêmico (HC; n=11) e grupo hipercolesterolêmico-Ilex (HCI; n=10).

Esses resultados, portanto, mostraram claramente que a administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* não provocou alterações significativas ($p > 0,05$) no perfil lipídico dos animais em estudo.

Em seguida, foi determinado o conteúdo de colesterol no fígado e na artéria aorta dos animais (Figuras 11 e 12).

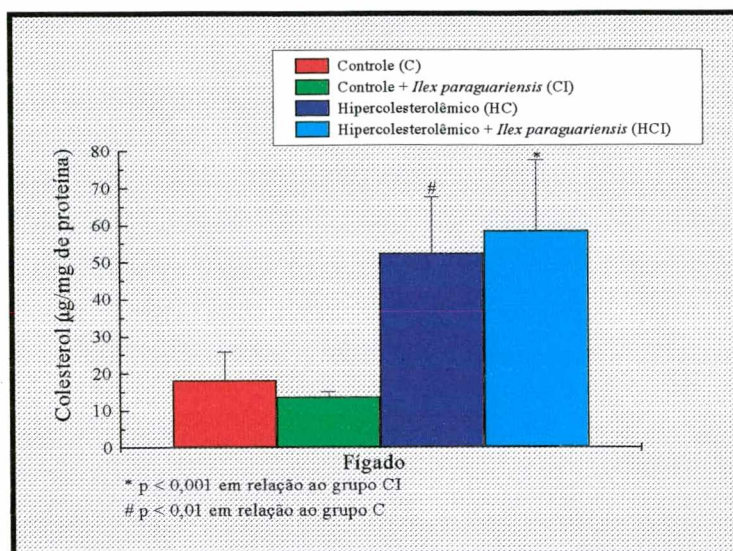


Figura 11: Concentração de colesterol hepático de coelhos do grupo controle (C; n=5), grupo controle-Ilex (CI; n=5), grupo hipercolesterolêmico (HC; n=8) e grupo hipercolesterolêmico-Ilex (HCI; n=7).

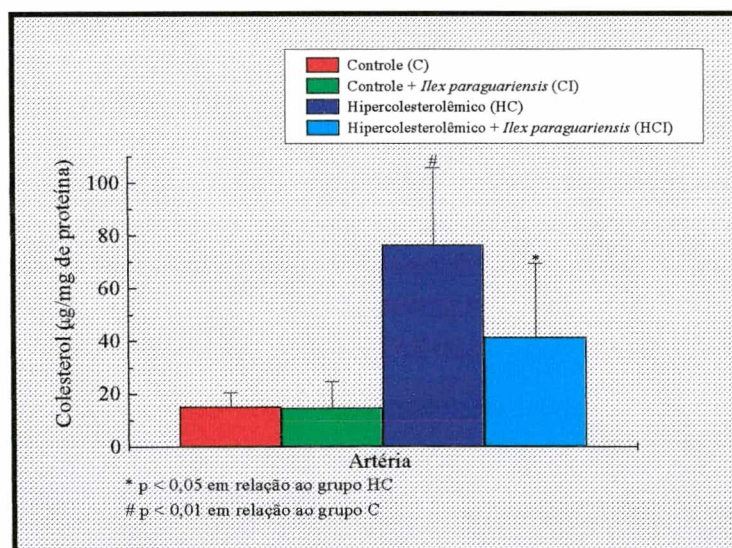


Figura 12: Concentração de colesterol arterial de coelhos do grupo controle (C; n=5), grupo controle-Ilex (CI; n=5), grupo hipercolesterolêmico (HC; n=6) e grupo hipercolesterolêmico-Ilex (HCI; n=7).

Os resultados apresentados na Figura 11 mostraram que a dieta hipercolesterolêmica provocou um aumento significativo na concentração de colesterol hepático, independente da ingestão do extrato de *Ilex paraguariensis* (Grupos HC e HCI *versus* C e CI, respectivamente,

$p < 0,01$). Além disso, o extrato de *Ilex paraguariensis* não modificou significativamente o conteúdo de colesterol hepático (Grupos CI e HCI *versus* C e HC, respectivamente).

Em relação ao conteúdo de colesterol arterial (Figura 12), como já era esperado, a dieta aterogênica elevou significativamente os níveis de colesterol na artéria aorta dos animais do grupo HC em relação aos animais controles do grupo C (aproximadamente 5 vezes; $p < 0,01$), condizente com a presença das lesões ateroscleróticas nos animais hipercolesterolêmicos. A administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* aos animais que estavam recebendo a dieta rica em colesterol (grupo HCI) provocou uma redução significativa no conteúdo de colesterol arterial, na ordem de 2 vezes ($p < 0,05$). Os valores de colesterol arterial nesse grupo de animais não foram estatisticamente diferentes dos níveis de colesterol dos animais controles, provavelmente devido à grande variação dos resultados. Além disso, o extrato de *Ilex paraguariensis* não modificou o conteúdo de colesterol arterial nos animais controles (CI *versus* C).

Além do conteúdo de colesterol arterial, a extensão das placas ateroscleróticas nos coelhos alimentados com colesterol foi, também, avaliada pela medida da área das lesões, após coloração das artérias. As figuras 13 e 14 mostram as artérias coradas com Sudan e Hematoxilina e os resultados da área das lesões, em percentagem da área total da artéria, calculados a partir dessas artérias, estão mostrados na tabela 2. A figura 13 apresenta apenas as imagens das artérias compostas por partes do arco aórtico e aorta torácica, tendo em vista que o restante da artéria foi utilizado para a realização de outros ensaios.

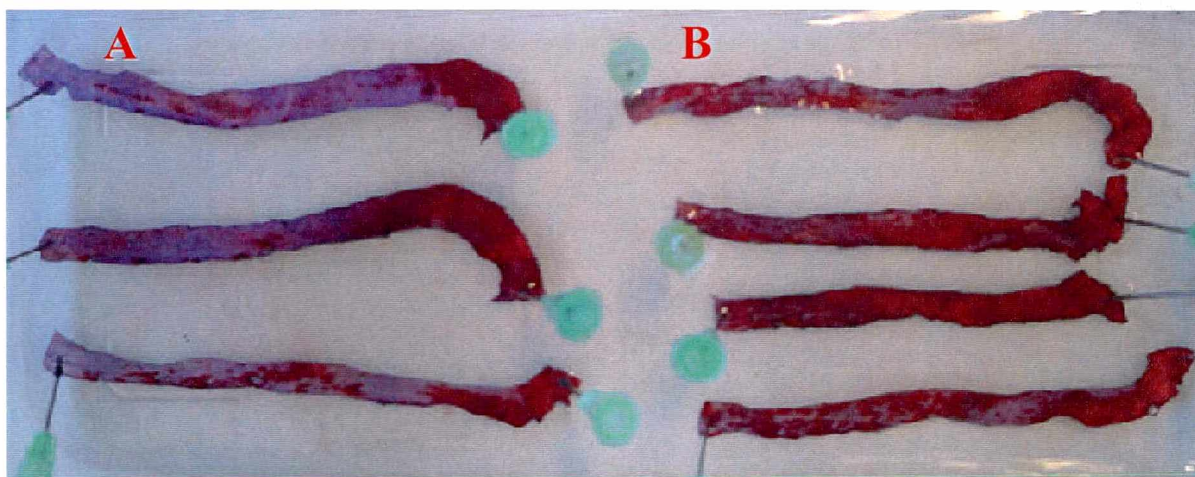


Figura 13: Arco aórtico e aorta torácica corados com Sudan IV e Hematoxilina de Harris. As placas de ateroma são evidenciadas por sua coloração vermelha. **A)** Grupo hipercolesterolêmico-*Ilex paraguariensis*; **B)** Grupo hipercolesterolêmico.



Figura 14: Aortas coradas com Sudan IV e Hematoxilina de Harris. As placas de ateroma são evidenciadas por sua coloração vermelha. **A)** Aorta de coelho hipercolesterolêmico; **B)** Aorta de coelho hipercolesterolêmico-*Ilex paraguariensis*.

Tabela 2. Área das lesões ateroscleróticas na artéria aorta de coelhos alimentados com dieta rica em colesterol com e sem a ingestão concomitante de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (% da área total da artéria).

Grupos	Área da lesão (%)		
	Aorta Total	Arco Aórtico e Artéria Torácica	Média
Hipercolesterolêmico (HC)	50,6 (n = 1)	60,3 ± 10,8 (n = 4)	58,3 ± 10,3 (n = 5)
Hipercolesterolêmico -Ilex (HCI)	28,3 (n = 1)	39,3 ± 6,5* (n = 3)	36,5 ± 7,6* (n = 4)

* $p < 0,005$ em relação ao grupo Hipercolesterolêmico. Os resultados estão expressos como a média \pm desvio-padrão da quantificação da lesão realizada nas aortas mostradas nas figuras 13 e 14.

Podemos observar que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* reduziu significativamente a área das lesões ateroscleróticas em coelhos alimentados com dieta rica em colesterol (Figuras 13 e 14 e Tabela 2). Houve uma redução de aproximadamente 44 % das lesões na aorta total e redução de 35 % quando são consideradas as lesões apenas no arco aórtico e aorta torácica. A artéria total apresentou uma área de lesão, em percentagem da área total, ligeiramente menor que o arco aórtico e aorta torácica, em ambos os grupos de animais (Tabela 2). Isto é compreensível tendo em vista que a seqüência de formação das lesões ateroscleróticas em coelhos alimentados com colesterol ocorre primeiramente no arco aórtico, em seguida na aorta torácica e, finalmente, na aorta abdominal. Apesar da variação dos resultados obtidos com a área das lesões na artéria total e no arco aórtico e aorta torácica, a junção de todos os resultados não aumentou o desvio-padrão (Tabela 2), e assim, ambos foram utilizados para efeito de cálculo e comparação.

A redução das lesões em aproximadamente 44 e 35 % nos animais que ingeriram o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, demonstrada nas figuras 13 e 14 e tabela 2, está bastante próxima dos valores observados com a redução do conteúdo de colesterol arterial, 46 %, onde foi utilizada a artéria aorta total e um número maior de amostras (Figura 12).

4.5. Lipoperoxidação Tecidual e Sérica

Na tentativa de elucidar alguns possíveis mecanismos pelos quais o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* estaria atuando na inibição da progressão da aterosclerose, foram determinados os níveis de lipoperoxidação arterial e hepático, bem como a atividade das enzimas antioxidantes. Os resultados apresentados na figura 15 demonstraram que os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado e aorta foram estatisticamente semelhantes para todos os animais dos grupos de estudo, possivelmente pela grande variação dos resultados. Apesar disso, é possível observar uma tendência de maiores índices de TBARS na aorta dos animais hipercolesterolêmicos (Figura 15).

A hipercolesterolemia provocou um aumento de aproximadamente 2 vezes nos níveis de lipoperoxidação sérica dos animais do grupo hipercolesterolêmico em relação ao grupo controle, porém não significativo. A ingestão do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* não modificou os níveis de TBARS no soro dos animais (Figura 16). Da mesma forma, o extrato de erva-mate não aumentou a resistência à oxidação sérica induzida por CuCl_2 (dados não

apresentados).

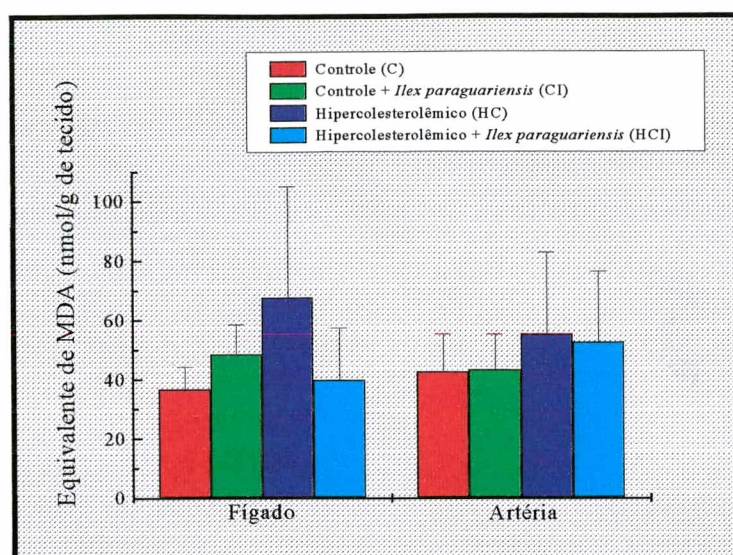


Figura 15: Grau de lipoperoxidação em fígado e artéria de animais do grupo controle (C; n=3-5), grupo controle-Ilex (CI; n=3-5), grupo hipercolesterolêmico (HC; n=5-8) e grupo hipercolesterolêmico-Ilex (HCI; n=5-6) medido pelo TBARS.

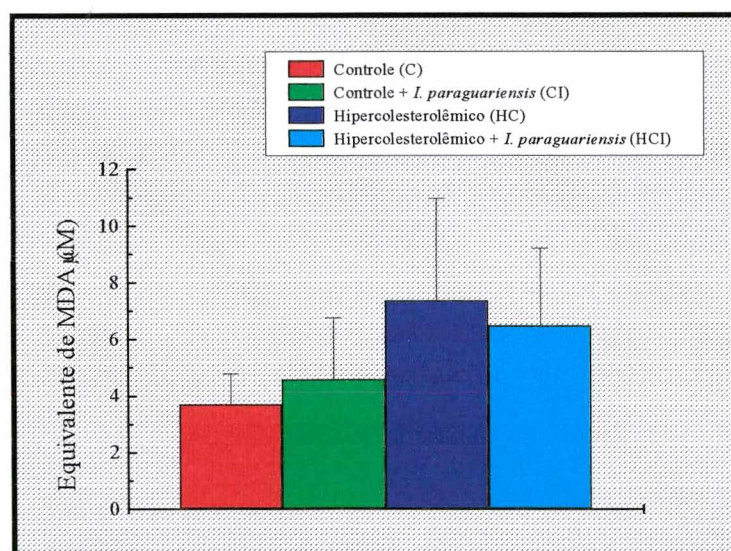


Figura 16: Grau de lipoperoxidação em soro dos animais do grupo controle (C; n=4), grupo controle-Ilex (CI; n=4), grupo hipercolesterolêmico (HC; n=6) e grupo hipercolesterolêmico-Ilex (HCI; n=5), após 2 meses de tratamento, medido pelo TBARS.

Em relação às atividades das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase, catalase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase e superóxido dismutase, no fígado e na artéria, os resultados apresentados nas figuras 17, 18, 19, 20 e 21 não demonstraram diferenças

relevantes entre os vários grupos de estudo, bem como os níveis desses parâmetros nos eritrócitos (resultados não mostrados). No entanto, parece existir uma tendência à maior atividade da glutatona peroxidase nas artérias dos animais dos grupos hipercolesterolêmicos (Figura 17). Os níveis de glutatona reduzida e oxidada também foram semelhantes entre os diferentes grupos de animais (Figuras 22 e 23).

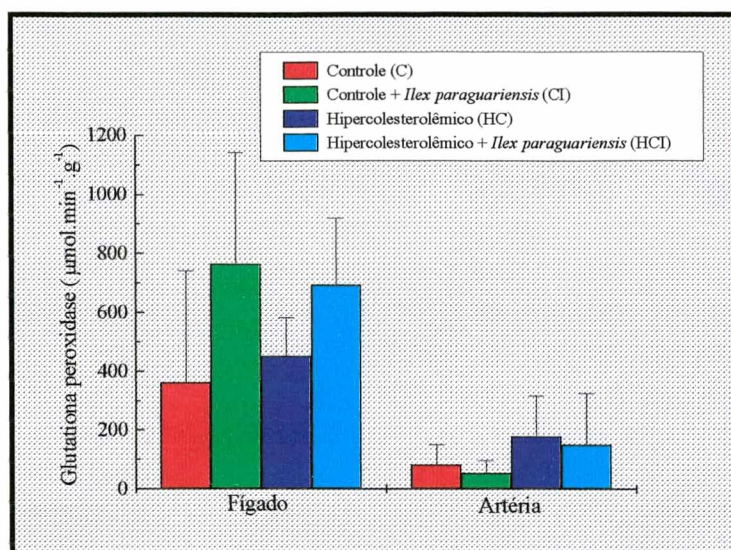


Figura 17: Atividade enzimática da GPx em fígado e artéria de animais do grupo controle (C; n=4), grupo controle-Ilex (CI; n=5), grupo hipercolesterolêmico (HC; n=6) e grupo hipercolesterolêmico-Ilex (HCI; n=5).

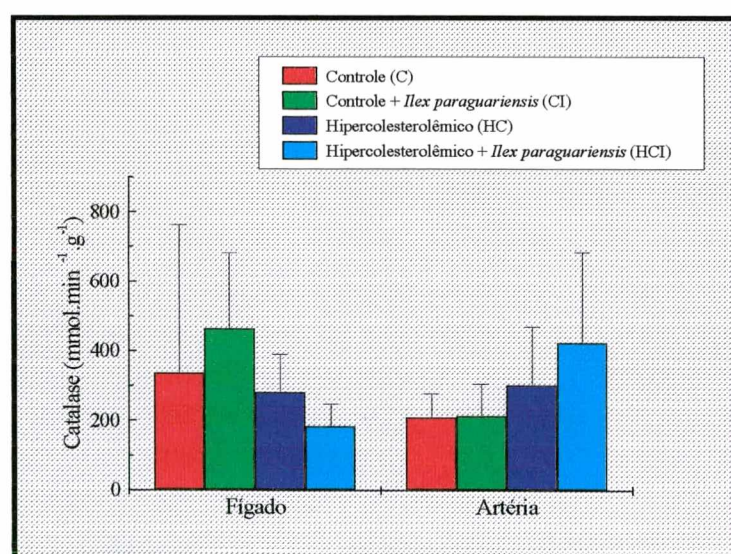


Figura 18: Atividade enzimática da CAT em fígado e artéria de animais do grupo controle (C; n=4), grupo controle-Ilex (CI; n=5), grupo hipercolesterolêmico (HC; n=6) e grupo hipercolesterolêmico-Ilex (HCI; n=5).

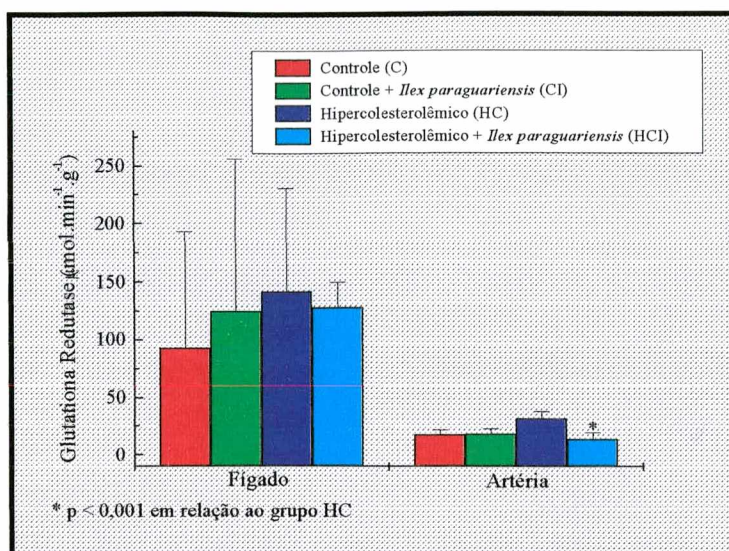


Figura 19: Atividade enzimática da GR em fígado e artéria de animais do grupo controle (C; n=4), grupo controle-Ilex (CI; n=5), grupo hipercolesterolêmico (HC; n=6) e grupo hipercolesterolêmico-Ilex (HCI; n=5).

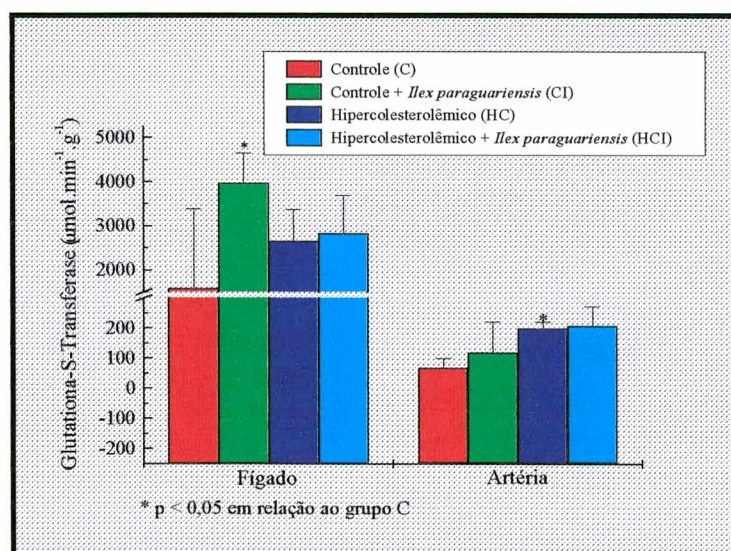


Figura 20: Atividade enzimática da GST em fígado e artéria de animais do grupo controle (C; n=4), grupo controle-Ilex (CI; n=5), grupo hipercolesterolêmico (HC; n=6) e grupo hipercolesterolêmico-Ilex (HCI; n=5).

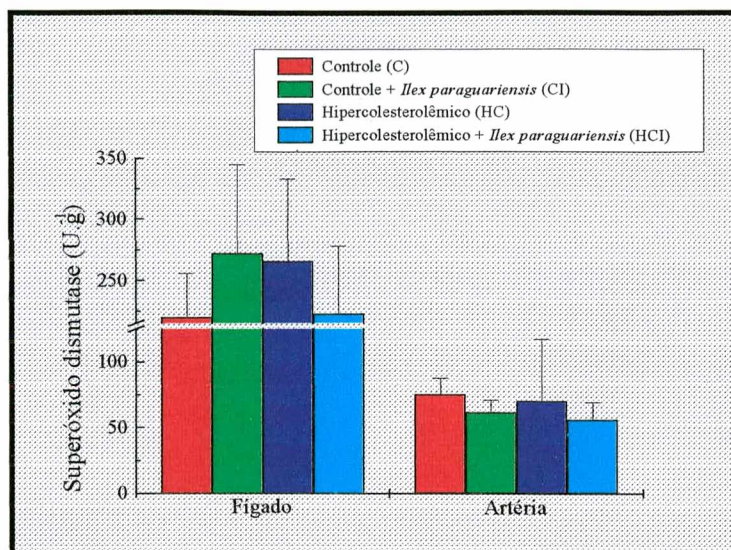


Figura 21: Atividade enzimática da SOD em fígado e artéria de animais do grupo controle (C; n=4), grupo controle-Ilex (CI; n=5), grupo hipercolesterolêmico (HC; n=6) e grupo hipercolesterolêmico-Ilex (HCI; n=5).

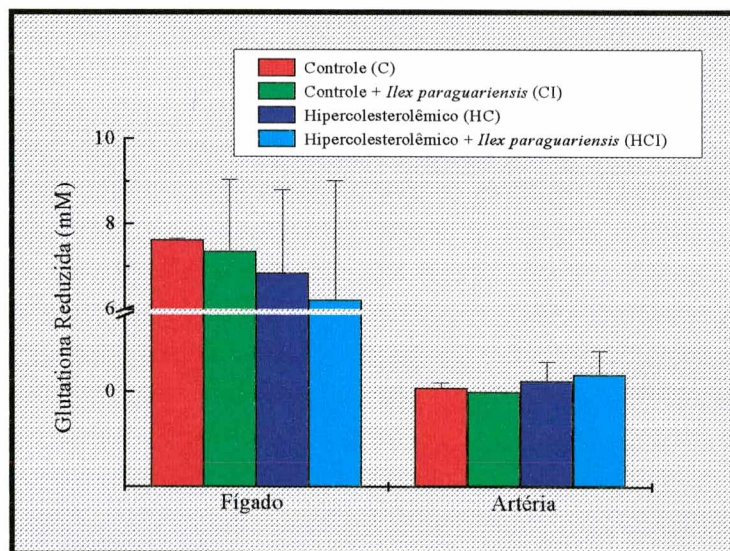


Figura 22: Concentração de GSH em fígado e artéria de animais do grupo controle (C; n=2), grupo controle-Ilex (CI; n=2), grupo hipercolesterolêmico (HC; n=6) e grupo hipercolesterolêmico-Ilex (HCI; n=5).

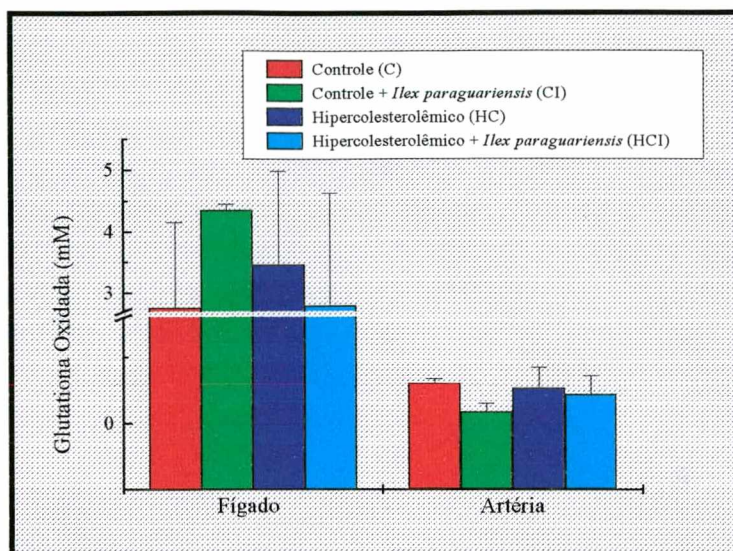


Figura 23: Concentração de GSSG em fígado e artéria de animais do grupo controle (C; n=2), grupo controle-Ilex (CI; n=2), grupo hipercolesterolêmico (HC; n=6) e grupo hipercolesterolêmico-Ilex (HCI; n=5).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A aterosclerose é uma síndrome que atinge grande parte da população mundial e, na atualidade, é causa importante de morbidade, além de estar diretamente relacionada à mortalidade por diferentes doenças do aparelho circulatório, como o infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, hipertensão arterial sistêmica e trombose. Os custos envolvidos no tratamento de pacientes com doenças cardiovasculares, em particular, é sabidamente alto e representa uma percentagem expressiva dos gastos públicos em saúde. Como estratégias preventivas, são recomendadas mudanças no estilo de vida e manutenção do colesterol sérico dentro de níveis desejáveis (< 200 mg/dL) (SANTOS, 2001).

A aterosclerose é a base para o desenvolvimento das doenças do aparelho circulatório, com destaque para a doença arterial coronariana (DAC). A LDL oxidada é uma partícula aterogênica que desempenha um importante papel no desenvolvimento da lesão arterial (STEINBERG, 1997), em função disso vários pesquisadores tem concentrado seus estudos em compostos com potencial antioxidante, como o probucol, α -tocoferol, compostos polifenólicos, carotenóides, ácido ascórbico e saponinas. Muitos vegetais, que normalmente fazem parte da nossa dieta, são ricos em compostos polifenólicos com atividade antioxidante, particularmente, o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*.

A *Ilex paraguariensis*, popularmente conhecida como erva-mate, é comercializada no Brasil sob duas formas: erva para chimarrão e chá-mate. Os estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul são os responsáveis pela produção nacional, com destaque para o volume de produção dos dois primeiros. Segundo dados de 2000, a produção nacional de erva-mate era de 680 mil toneladas por ano e o país contava com 750 indústrias de beneficiamento que processavam 270 mil toneladas por ano (MESQUITA, 2001).

O maior consumidor nacional é o estado do Rio Grande do Sul, seguido pelo estado do Paraná (WINGE e cols., 1995). Apesar da taxa de mortalidade por doenças do aparelho circulatório no Rio Grande do Sul ser a quarta maior do país e semelhante à média dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, é sabido que a dieta da população do Rio Grande do Sul é “potencialmente” aterogênica, rica em carne vermelha e em ácidos graxos saturados de origem animal, se comparada com a de outros estados. Além disso, o consumo de erva-mate, na forma de chimarrão, pela população gaúcha é, indubitavelmente, o maior do país. Baseado nessas informações, é plausível pensar que o consumo de erva-mate poderia contribuir para

que a taxa de mortalidade por doenças do aparelho circulatório nessa população não seja ainda mais elevada. Raciocínio semelhante pode ser aplicado ao Uruguai, onde a prevalência de doenças coronarianas é semelhante àquela observada nos países Europeus (CONIGLIO e cols., 1994), enquanto que o consumo de carne bovina é o mais alto do mundo (PETERSON, 1978). Segundo Ferreira e cols. (1997), no Uruguai o hábito de beber chimarrão, que também se encontra como o maior do mundo, pode ser responsável pela relativa baixa incidência de aterosclerose na população desse país. Apesar de ainda ser mera especulação, sem a existência de estudos epidemiológicos abordando a relação do consumo da erva-mate e doenças cardiovasculares, os resultados apresentados nesse trabalho, utilizando animais como modelo experimental, sugerem que o consumo de extrato aquoso de erva-mate pode reduzir significativamente a progressão da aterosclerose.

Nossos resultados mostraram que as três ervas-mate comerciais estudadas apresentaram semelhante conteúdo de fenóis totais e atividade antioxidante. Os extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* inibiram a lipoperoxidação sérica *in vitro* induzida por CuCl_2 (Figuras 4 e 5), sendo que essa inibição esteve associada à concentração de fenóis totais (Figura 6). Resultados semelhantes foram relatados por Gugliucci e Stahl (1995) em experimentos de oxidação de soro e LDL induzida por cobre. Outros autores também já haviam constatado o potencial do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* como seqüestrador de radicais livres (CAMPOS e cols., 1996; CARINI e cols., 1998 e SCHINELLA e cols., 2000) e seu potencial antioxidante utilizando diferentes sistemas de lipoperoxidação (SCHINELLA e cols., 2000 e FILIP e cols., 2000). Filip e cols. (2000) demonstraram uma correlação positiva entre a concentração de compostos fenólicos em várias espécies de *Ilex*, principalmente na forma de derivados cafeícos, e o grau de inibição da lipoperoxidação em liposomas induzida por hidrocloreto de 2,2'-azobis-amidinopropano (AAPH), um azo composto que gera radicais livres no meio aquoso. Posteriormente, esses mesmos autores demonstraram que dentre as diferentes espécies de *Ilex* estudadas (*I. paraguariensis*, *I. brevicuspis*, *I. theezans*, *I. dumosa*, *I. microdonta*, *I. pseudobruxus*, *I. taubertiana*, e *I. argentina*), a *Ilex paraguariensis* foi a espécie que apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos, tais como ácido clorogênico, ácido cafeíco, ácido dicafeoilquínico, rutina, quercetina e kaempferol (FILIP e cols., 2001). Assim, uma vez que no sistema de lipoperoxidação com AAPH a espécie com maior potencial antioxidante foi a *Ilex paraguariensis*, esses dados apenas confirmam que a concentração de compostos fenólicos é diretamente proporcional à atividade antioxidante *in vitro* (FILIP e cols., 2000). Vanderjagt e cols. (2002) também chegaram a resultados semelhantes ao compararem o potencial antioxidante de 30 plantas medicinais amplamente

utilizadas no Novo México. Os autores concluíram que o extrato das folhas de *Ilex paraguariensis* era o que possuía o maior poder antioxidante dentre os estudados, inferindo-se daí uma provável maior quantidade de compostos antioxidantes.

Os compostos fenólicos, tais como flavonóides e catequinas, são absorvidos e transformados no intestino e fígado a metabólitos que ainda apresentam atividade antioxidante no plasma (MANACH e cols, 1998; SILVA e cols., 1998a e 1998b; MOON e cols, 2001). Com o objetivo de verificar se a absorção e o metabolismo não alteravam as propriedades antioxidantes do extrato de *Ilex paraguariensis*, foi realizado experimento com o soro de ratos obtido após a administração intragástrica do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (Figura 7). Contudo, não foi verificado o efeito protetor esperado no plasma dos animais que receberam o extrato. Existem três hipóteses que podem justificar tal resultado: i) os compostos que conferem a atividade antioxidante do extrato *in vitro*, após absorvidos seriam catabolizados em produtos sem atividade antioxidante; ii) os compostos com potencial antioxidante não estariam sendo absorvidos; iii) tais compostos são pouco absorvidos, atingindo concentrações plasmáticas insuficientes para que apresentem alguma atividade antioxidante. Dentre os compostos antioxidantes presentes no extrato de *Ilex paraguariensis* destacam-se, pela concentração, os ácidos cafeoilquínicos (aprox. 10%), principalmente o ácido clorogênico (FILIP e cols., 2001), e as saponinas (5-10%) (SCHENKEL e cols. 1997). A segunda hipótese pode ser a mais plausível, pois segundo Azuma e cols. (2000), o ácido clorogênico não é absorvido pelo intestino de ratos. As saponinas poderiam atuar potencialmente como antioxidantes, conforme descrito para as saponinas do extrato de *Panax quinquefolium* (LI e cols., 1999). Infelizmente, porém, ainda não se dispõe de informações com relação à atividade antioxidante ou absorção e metabolismo das saponinas encontradas na *Ilex paraguariensis*, em particular.

É interessante notar que os níveis de TBARS no soro de coelhos que ingeriram o extrato de erva-mate por um longo período não foram inferiores aos dos animais controles (Figura 16), nem se apresentou resistente à lipoperoxidação induzida por cobre. O prolongado período da coleta de sangue após a última ingestão do extrato de *Ilex paraguariensis* pelos animais e a grande variação dos resultados podem ser responsáveis pela ausência de inibição da lipoperoxidação. Em seres humanos, no entanto, o ácido clorogênico pode ser absorvido (OLTHOF e cols., 2001), e após a ingestão do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* por indivíduos saudáveis observou-se inibição da lipoperoxidação sérica (GUGLIUCCI, 1996). Cabe ainda destacar que, apesar do ácido clorogênico ser um dos principais polifenóis presentes no extrato de *Ilex paraguariensis*, o seu potencial antioxidante é menor do que

aquele observado para o extrato total (CARINI e cols., 1998), indicando existir um efeito sinérgico entre os vários compostos constituintes. Assim, resta estabelecer quais compostos do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* são relevantes para a ação antioxidante e quais são absorvidos pelas diferentes espécies animais, e atingem concentrações plasmáticas suficientes para exercerem o efeito antioxidante.

A ingestão do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* por um período de dois meses diminuiu os níveis séricos de colesterol total em aproximadamente 50% nos coelhos controles que receberam a dieta padrão, não aterogênica (Figura 8). Apesar dos valores não serem significativamente diferentes em nível de 5%, provavelmente devido ao pequeno número de animais estudados, essa é uma redução considerável, próxima àquela observada em seres humanos que fazem uso de fármacos hipocolesterolêmicos. Esse efeito hipocolesterolêmico do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* pode ser devido à presença das saponinas. Há muito se sabe que as saponinas, pela sua estrutura anfifílica - uma aglicona apolar e açúcares polares - apresentam a capacidade de formar micelas com o colesterol. As micelas aprisionam o colesterol no seu interior, dificultando a absorção intestinal e promovendo a excreção do colesterol pelas fezes (MALINOW e cols., 1977).

Um mecanismo adicional para a ação hipocolesterolemiantes das saponinas está relacionado à formação de grandes micelas mistas com os ácidos biliares (OAKENFULL, 1986). Os ácidos biliares complexados são excretados pelas fezes, favorecendo o catabolismo do colesterol no fígado. Assim, a eliminação fecal aumentada de ácidos biliares na forma de complexos com as saponinas resulta numa diminuição do colesterol plasmático. Isso ocorre pela falta de ácidos biliares intestinais para a formação de micelas mistas com o colesterol que seria absorvido e pelo catabolismo aumentado do colesterol hepático, além da eliminação do colesterol intestinal complexado com as saponinas. Esses mecanismos explicam o efeito hipocolesterolemiantes das saponinas observado em ratos e suínos (TOPPING e cols., 1980; OAKENFULL e cols., 1984; HIDAKA e cols., 1987). As saponinas e/ou outros compostos presentes no extrato de *Ilex paraguariensis* poderiam, ainda, diminuir os níveis séricos de colesterol através da inibição das enzimas hepáticas responsáveis pela síntese e esterificação do colesterol, HMG-CoA-redutase e acil colesterol aciltransferase (ACAT), respectivamente, ou ativar a enzima colesterol-7 α -hidroxilase, responsável pela síntese de ácidos biliares a partir do colesterol. No entanto, esse mecanismo parece pouco provável tendo em vista que os coelhos tratados e não tratados com o extrato apresentaram semelhante conteúdo de colesterol hepático (Figura 11).

Em relação às saponinas presentes na *Ilex paraguariensis*, Ferreira e cols. (1997) demonstraram que elas inibem a difusão passiva de ácido cólico através de membrana de diálise, devido à formação de grandes micelas mistas. A membrana de diálise foi usada como modelo de absorção de ácidos biliares e, segundo os autores, esse mecanismo pode justificar a relativa baixa incidência de doenças cardíacas no Uruguai, através da manutenção dos níveis de colesterol sérico, a despeito do alto consumo de carne vermelha. No entanto, resta estabelecer se o consumo de extrato de *Ilex paraguariensis* realmente reduz os níveis de colesterol sérico em seres humanos. A extrapolação de nossos resultados para os seres humanos requer alguns cuidados, pois a ingestão do extrato pelos coelhos foi relativamente elevada e seria necessário, talvez, um consumo de aproximadamente 200 g de extrato seco de *Ilex paraguariensis* por dia, considerando um homem de 70 quilos.

O tratamento dos animais com a dieta aterogênica aumentou significativamente os níveis séricos de colesterol total e reduziu os níveis de HDL-colesterol (Figura 10), bem como aumentou o conteúdo de colesterol hepático (Figura 11). Esses resultados estão de acordo com aqueles descritos previamente (PRIOR e cols., 1961; SILVA e cols., 2001), e devem-se à absorção intestinal de colesterol não controlada em coelhos (DIETSCHY e WILSON, 1970a e 1970b). O extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* fornecido simultaneamente com a dieta rica em colesterol não modificou os níveis de colesterol sérico ou hepático, possivelmente pela acentuada hipercolesterolemia provocada pela grande quantidade de colesterol presente na dieta (Figura 8). Outros autores, utilizando coelhos alimentados com colesterol como modelo de aterosclerose e estudando o efeito de compostos polifenólicos presentes no extrato de semente de uva (YAMAKOSHI e cols., 1999), no vinho tinto (LUZ e cols., 1999) e no chá verde e chá preto (TIJBURG e cols., 1997), também não observaram diminuição nos níveis de colesterol sérico. Yamakoshi e cols. (2000) relataram que as saponinas e as isoflavonas extraídas de soja também não modificaram o perfil lipídico de coelhos alimentados com dieta contendo 1% de colesterol. Apenas quando a hipercolesterolemia foi considerada moderada - em coelhos alimentados com dieta sem colesterol e rica em caseína - foi possível verificar o efeito hipocolesteremiante dos flavonóides presentes no suco de laranja (KUROWSKA e cols., 2000).

O principal resultado desse trabalho foi a demonstração de que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* pode inibir a progressão da aterosclerose *in vivo*. Assim, embora o perfil lipídico sérico dos animais hipercolesterolêmicos não tenha sido alterado pela administração do extrato de erva-mate, o conteúdo de colesterol arterial e a área da lesão aterosclerótica mostraram-se significativamente diminuídos no grupo de animais que recebeu a dieta rica em

colesterol e o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, em relação aos coelhos que receberam apenas a dieta hipercolesterolêmica (Figuras 12 a 14 e Tabela 2). Resultados semelhantes foram relatados por outros autores em estudos utilizando vinho tinto e produtos não alcoólicos do vinho (LUZ e cols., 1999) ou extratos ricos em polifenóis, como a proantocianidina de semente de uva e isoflavona de soja (YAMAKOSHI e cols. 1999 e YAMAKOSHI e cols., 2000). O aumento dos níveis plasmáticos de colesterol, particularmente LDL-C, está positivamente associado ao desenvolvimento e gravidade da aterosclerose e a diminuição do colesterol plasmático é considerada a principal forma de prevenção da doença (SANTOS, 2001). Nesse mecanismo se baseiam os principais tratamentos dietéticos e farmacológicos para a hipercolesterolemia e a erva-mate poderia prevenir o desenvolvimento da aterosclerose em seres humanos pela manutenção dos níveis séricos de colesterol, conforme discutido acima.

No entanto, os nossos resultados com coelhos hipercolesterolêmicos como modelo experimental demonstraram, de forma definitiva, que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* mostrou ter a capacidade de inibir a progressão da aterosclerose, apesar dos elevados níveis de colesterol sérico. Esse resultado é interessante, pois salienta a importância e o envolvimento de outros mecanismos na patogênese da aterosclerose, além da hipercolesterolemia, e nos leva a questionar o mecanismo pelo qual o extrato de erva-mate atuou na inibição da aterosclerose nos coelhos alimentados com colesterol.

Embora exista uma forte relação entre elevados níveis séricos de colesterol e aterosclerose, inúmeras evidências sugerem que a aterogênese é dependente do aumento do estresse oxidativo arterial (BERLINER e HEINECKE, 1996). Esta dependência está associada ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio nas células endoteliais da artéria (OHARA e cols., 1993) e essas espécies reativas podem estimular a progressão da aterosclerose, em parte, pela disfunção endotelial, que é considerada como o primeiro estágio da aterosclerose (ROSS, 1999), pelo dano causado às células musculares lisas (KUNSCH e MEDFORD, 1999) ou pela modificação oxidativa da LDL (STEINBERG, 1997). A oxidação da LDL está associada ao recrutamento de monócitos circulantes, os quais se transformam em macrófagos no espaço subendotelial e passam a internalizar a LDL modificada, levando à formação de células espumosas e ao desenvolvimento das estrias gordurosas (STEINBERG e cols., 1989). Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) têm sido usados como um dos mais comuns marcadores de lipoperoxidação. Em nosso trabalho, os coelhos hipercolesterolêmicos demonstraram uma tendência à elevação dos níveis de TBARS na artéria aorta e no soro, em relação aos coelhos controles (Figuras 15 e 16). As diferenças

podem não ter sido significativas em nível de 5% devido à grande variabilidade dos resultados e/ou pelos níveis de TBARS serem representativos de toda a artéria aorta e não apenas do arco aórtico, onde a extensão das lesões ateroscleróticas é maior. Yamakoshi e cols. (2000) observaram aumento significativo de TBARS apenas no arco aórtico de coelhos alimentados com colesterol. Outros autores relataram elevações mais significativas nos níveis de TBARS e sugerem que a peroxidação lipídica pode ter uma participação importante na aterogênese em coelhos alimentados com colesterol (DEL BOCCIO e cols., 1990; PRASAD e KALRA, 1993; YAMAKOSHI e cols., 1999). A ausência de inibição dos níveis de lipoperoxidação arterial e sérica pelo extrato de *Ilex paraguariensis* nos coelhos hipercolesterolêmicos (Figuras 15 e 16), sugere que o efeito antiaterosclerótico da erva-mate ocorreu por um mecanismo distinto da sua ação antioxidante observada *in vitro* (Figura 4). No entanto, cabe aqui ressaltar que o ensaio colorimétrico (TBARS) está sujeito a vários interferentes, demonstrando pouca especificidade. Nessa reação o ácido tiobarbitúrico pode reagir com compostos como o ácido siálico, prostaglandinas, deoxirribose e certos aldeídos, o que leva a uma superestimação do grau de lipoperoxidação (HONG e cols., 2000). Logo, a conclusão definitiva sobre o efeito do extrato de erva-mate no “*status*” antioxidante dos animais requer estudos adicionais com a utilização de ensaios mais específicos.

Por outro lado, a relevância dos coelhos alimentados com colesterol como modelo para o estudo de compostos antioxidantes, em termos de mecanismo de ação na formação da placa aterosclerótica, tem sido alvo de contestação. Em seres humanos a LDL é a principal lipoproteína aterogênica, enquanto que em coelhos submetidos à dieta rica em colesterol a β -VLDL é a partícula mais importante (SIMIONESCU e cols., 1986). A β -VLDL é uma lipoproteína rica em colesterol e com densidade semelhante a VLDL. Já foi demonstrado que a β -VLDL pode ser captada por macrófagos sem que ocorra modificação oxidativa da lipoproteína, embora esta oxidação acelere a captação e a formação de células espumosas (MAHLEY, 1983; PARTHASARATHY e cols., 1989), particularmente em monócitos de coelhos hipercolesterolêmicos (SILVA e cols., 1997). Além disso, a β -VLDL modificada oxidativamente, enquanto partícula circulante, parece não contribuir de forma significativa para a formação da placa aterosclerótica em coelhos hipercolesterolêmicos se comparada com a β -VLDL nativa (SILVA e ABDALLA, 1998; SILVA e cols., 2001). Assim, existe a possibilidade de que a aterosclerose se desenvolva em coelhos alimentados com colesterol sem a necessidade de lipoperoxidação. Nesta situação seria improvável que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* diminuísse os índices de lipoperoxidação, sendo que o efeito

antiaterosclerótico observado deve-se, realmente, à ação do extrato em outros mecanismos da aterogênese. Ainda de acordo com essa hipótese, Tijburg e cols. (1997) demonstraram que compostos com conhecido efeito antioxidante *in vitro*, como chá verde, chá preto, e vitamina E, não reduziram os níveis de lipoperoxidação no soro e na LDL nem inibiram de forma efetiva a progressão da aterosclerose em coelhos.

Em seres humanos, no entanto, o efeito antioxidante *in vivo* do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* pode ser importante na patogênese da aterosclerose, ao contrário dos resultados de inibição da lipoperoxidação sérica pela erva-mate apresentados nesse estudo com ratos e coelhos. Até o momento, o único trabalho existente na literatura, de que temos conhecimento, foi descrito por Gugliucci (1996) e demonstra que o extrato aquoso de erva-mate é absorvido por indivíduos saudáveis e atinge a circulação sanguínea em quantidades suficientes para inibir a lipoperoxidação plasmática induzida por cobre. O autor descreve que houve também inibição da oxidação da LDL após a ingestão da erva-mate, mas isto foi observado apenas quando a LDL foi isolada após a oxidação ter sido realizada no plasma, o que é natural, pois se ocorre oxidação dos lipídios plasmáticos, também ocorre oxidação das lipoproteínas, uma vez que os lipídios se encontram no plasma na forma de lipoproteínas. Quando a LDL foi isolada do plasma obtido após a ingestão do extrato de erva-mate antes de ser oxidada não houve inibição da lipoperoxidação (GUGLIUCCI, 1996). Esses resultados sugerem que os compostos antioxidantes existentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* são absorvidos e ainda apresentam ação antioxidante no plasma, mas não se acumulam na partícula de LDL. Devido às características estruturais dos compostos polifenólicos e, principalmente, de seus metabólitos com diferentes graus de hidrofobicidade, ainda existem muitas inconsistências na literatura em relação à capacidade de adesão, ou incorporação, desses compostos nas lipoproteínas (FUHRMAN e cols., 1995; YAMAKOSHI e cols., 1999, LUZ e cols., 1999). Deve-se considerar, ainda, a forma de isolamento das lipoproteínas, por resinas cromatográficas ou por ultracentrifugação, as quais podem modificar a interação dos polifenóis com as lipoproteínas. Assim, se os compostos polifenólicos ou saponinas existentes no extrato de erva-mate conseguem penetrar no espaço subendotelial das artérias, aderidos ou não às partículas de LDL, e protegerem a lipoproteína contra a lipoperoxidação *in vivo*, permanece ainda a ser estabelecido.

O extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* pode diminuir a aterosclerose por seus efeitos vasodilatadores. Muccillo-Baisch e cols. (1998) demonstraram que o extrato de *Ilex paraguariensis* causou o relaxamento de anéis de artéria mesentérica de ratos através do aumento da concentração de óxido nítrico, ou outro composto relacionado, o qual induz o

vasorelaxamento nas células musculares lisas (WINQUIST e cols., 1984). A importância do óxido nítrico tem sido estabelecida em várias funções do sistema cardiovascular, como a regulação do tônus vascular (LOWENSTEIN, e cols., 1994) e a manutenção da integridade endotelial (MELLION e cols., 1981). Além disso, o óxido nítrico pode reagir com o ânion radical superóxido e formar o peroxinitrito, molécula altamente reativa que está envolvida na modificação oxidativa de LDL e proteínas (BECKMAN e cols., 1990; HOGG e cols., 1993). Além dos efeitos deletérios do peroxinitrito, o óxido nítrico é consumido nessa reação não podendo, assim, exercer a sua função moduladora do relaxamento vascular. Logo, o desequilíbrio na concentração de óxido nítrico tem inúmeras implicações patofisiológicas, incluindo hipertensão e aterosclerose (LOWENSTEIN, e cols., 1994).

Para bloquear o efeito dos agentes oxidantes, existe *in vivo* um importante sistema antioxidante, composto por vitaminas, principalmente E e C, e enzimas antioxidantes, tais como glutatona peroxidase, catalase e superóxido dismutase. Um possível efeito modulador do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* na atividade dessas enzimas foi avaliado na artéria aorta e no fígado dos animais. Nossos resultados demonstraram que o extrato de erva-mate não modificou a atividade das enzimas antioxidantes, ou a concentração de glutatona reduzida e oxidada (Figuras 17 a 23). Foi possível observar apenas uma tendência à elevação da atividade da glutatona peroxidase nas artérias dos coelhos hipercolesterolêmicos.

Os resultados sobre a atividade das enzimas antioxidantes em coelhos alimentados com colesterol, não estão, ainda, bem caracterizados. Del Boccio e cols. (1990) demonstraram elevação na atividade da glutatona peroxidase e superóxido dismutase e diminuição da catalase na artéria aorta de coelhos hipercolesterolêmicos. Por sua vez, Mahfouz e cols. (2000) descreveram um aumento na atividade da glutatona peroxidase e catalase em eritrócitos, e uma diminuição dessas enzimas no fígado, enquanto a atividade da superóxido dismutase nesses tecidos não sofreu alteração. Silva e cols. (1995) relataram um aumento da atividade plasmática da superóxido dismutase e diminuição da glutatona peroxidase nos animais hipercolesterolêmicos. Além disso, a atividade da fração C da SOD, que se encontra ligada ao endotélio vascular e pode ser liberada para a circulação sanguínea pela injeção de heparina, se apresentou significativamente diminuída nos coelhos hipercolesterolêmicos (Silva e cols., 1995).

A grande variação dos nossos resultados pode ter prejudicado a visualização de possíveis diferenças significativas, e a interpretação do efeito do extrato de erva-mate na atividade das enzimas antioxidantes em coelhos hipercolesterolêmicos não pode ser conclusiva por hora.

Em síntese, os resultados desse trabalho mostraram que o extrato de *Ilex paraguariensis* inibiu de forma efetiva a progressão da aterosclerose em coelhos alimentados com colesterol, sem diminuir os níveis séricos de colesterol. O mecanismo de ação do extrato não esteve, aparentemente, associado à inibição da lipoperoxidação e, no momento, o efeito do extrato de erva-mate em outros mecanismos da aterogênese, tais como inibição da agregação plaquetária, inibição da expressão de moléculas de adesão e indução do óxido nítrico, dentre outros, não podem ser excluídos. Indiretamente, os resultados desse estudo demonstraram a importância de outros mecanismos, além da hipercolesterolemia, para a formação da placa de ateroma. O efeito inibitório da erva-mate sobre esses mecanismos deve ser investigado e pode contribuir para a introdução de novas estratégias terapêuticas. Finalmente, nenhuma conduta clínica direta baseada em nossos resultados deve ser tomada, principalmente por causa dos possíveis efeitos carcinogênicos atribuídos à *Ilex paraguariensis* não estarem, ainda, totalmente esclarecidos. No entanto, os resultados desse estudo justificam a realização de um estudo clínico apropriado para verificar o efeito do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e de seus constituintes como agentes protetores contra o desenvolvimento da aterosclerose em seres humanos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- O extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* inibiu significativamente a lipoperoxidação sérica *in vitro* induzida por cloreto de cobre, sendo dependente da concentração do extrato de erva-mate nos sistemas;
- O extrato aquoso de erva-mate não inibiu o processo de lipoperoxidação sérica *ex vivo*, em soro de ratos que receberam o extrato por via intragástrica;
- A ingestão do extrato aquoso de erva-mate não alterou o perfil lípidico dos coelhos normo e hipercolesterolêmicos, após dois meses de tratamento;
- O extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* inibiu a progressão da aterosclerose em coelhos que receberam dieta hipercolesterolêmica;
- Não foram constatadas diferenças relevantes na atividade das enzimas antioxidantes e níveis de lipoperoxidação arterial e hepático dos animais que ingeriram o extrato de erva-mate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, p. 121-144, 1987.

ARMSTRONG, M. L.; HEISTAD, D. D. Animal models of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 85, p. 15-23, 1990.

AZUMA, K.; IPPOUSHI, K.; NAKAYAMA, M.; ITO, H.; HIGASHIO, H.; TERAQ, J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 5496-5500, 2000.

BECKMANN, J. S.; BECKMANN, T. W.; CHEN, J.; MARCHALL, P. A.; FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 1620-1624, 1990.

BERLINER, J. A.; HEINECKE, J. W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 5, p. 707-727, 1996.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, n. 5, p. 882-890, 1963.

BLUMENTHAL, M. (Ed.) **The Complete German Commission E Monographs. Therapeutic Guide to Herbal Medicines**. 1^a ed. Boston: Integrative Medicine Communications, 1998. p. 167-168.

BOCAN, T. M. A.; MUELLER, S. B.; MAZUR, M. J.; UHLENDORF, P. D.; BROWN, E. Q.; KIEFT, K. A. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. **Atherosclerosis**, v. 102, p. 9-22, 1993.

CAMPOS, A. M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E. A. The total reactive antioxidant potential (trap) and total antioxidant reactivity (tar) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. **Journal of the Brazilian Chemistry Association**, v. 7, n. 1, p. 43-49, 1996.

CARINI, M.; FACINO, R. M.; ALDINI, G.; CALLONI, M.; COLOMBO, L. Characterization of phenolic antioxidants from maté (*Ilex Paraguayensis*) by liquid

chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, p. 1813-1819, 1998.

CARLBERG, I; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 14, p. 5475-5480, 1975.

CHISOLM III, G. M.; CHAI, Y. Regulation of cell growth by oxidized LDL. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 12, p. 1697-1707, 2000.

CONIGLIO, R.I.; CASTILHO, S.; DAHINTEN, E.; DOUBNIA, M.I.; VÁSQUEZ, L.A. Factores de riesgo para la arteriosclerosis coronaria. **Medicina**, v. 54, p. 117-128, 1994.

DEL BOCCIO, G.; LAPENNA, D.; PORRECA, E.; PENELLI, A.; SAVINI, F.; FELICIANI, P.; RICCI, G.; CUCCURULLO, F. Aortic antioxidant defense mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. **Atherosclerosis**, v. 81, p. 127-135, 1990.

DE STEFANI, E.; CORREA, P.; FIERRO, L.; FONTHAM, E.; CHEN, V.; ZAVALA, D. Black tobacco, maté, and bladder cancer. **Cancer**, v. 67, p. 536-540, 1991.

DE STEFANI, E.; FIERRO, L.; MENDILAHARSU, M.; RONCO, A.; LARRINAGA, M. T.; BALBI, J. C.; ALONSO, S.; DENEIO-PELLEGRINI, H. Meat intake, 'mate' drinking and renal cell cancer in Uruguay: a case-control study. **British Journal of Cancer**, v. 78, p. 1239-1243, 1998.

DIETSCHY, J. M.; WILSON, J. D. Regulation of cholesterol metabolism. **New England Journal of Medicine**, v. 282, p. 1179-1183, 1970a.

DIETSCHY, J. M.; WILSON, J. D. Regulation of cholesterol metabolism. **New England Journal of Medicine**, v. 282, p. 1241-1249, 1970b.

FEKETE, S. Animal models in experimental atherosclerosis: a critical review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 41, p. 3-9, 1993.

FERREIRA, F.; VÁSQUEZ, A.; GÜNTER, C.; MOYNA, P. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by *Ilex paraguariensis* St. Hil. saponins. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 79-81, 1997.

FILIP, R.; LOTITO, S. B.; FERRARO, G.; FRAGA, C. G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, 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**, v. 72, p. 774-778, 2001.

FLOHE, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FOLCH, J.; LEE, M.; STANLEY, G. H. A. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-503, 1957.

FONSECA, C. A. S.; OTTO, S. S.; PAUMGARTTEN, F. J. R.; LEITÃO, A. C. Genotoxic, mutagenic, and clastogenic activities of mate-chimarrão (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 19, n. 4, p. 333-346, 2000.

FUHRMAN, B.; LAVY, A.; AVIRAM, M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low density lipoprotein to lipid peroxidation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 549-554, 1995.

GORZALCZANY, S.; FILIP, R.; ALONSO, M. DEL R.; MIÑO, J.; FERRARO, G. E.; ACEVEDO, C. Choleric effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 291-294, 2001.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A. J. C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 35, n. 1, p. 47-56, 1995.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex Paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, p. 338-344, 1996.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione-S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2^a ed. Nova Iorque: Oxford University Press, 1989. 543 p.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; KROMHOUT, D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. **The Lancet**, v. 349, p.699, 1997a.

HERTOG, M. G. L.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S.; PEKKARINEN, M.; SIMIC, B. S.; TOSHIMA, H.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, n. 4, p. 381-386, 1995.

HERTOG, M. G. L.; SWEETNAM, P. M.; FEHILY, A. M.; ELWOOD, P. C.; KROMHOUT, D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of man: the Caerphilly study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 1489-1494, 1997b.

HIDAKA, K.; ITO, M.; MATSUDA, Y. New triterpene saponins from *Ilex pubescens*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p. 524-597, 1987.

HOGG, N.; DARLEY-USMAR, V. M.; WILSON, M. T.; MONCADA, S. The oxidation of α -tocopherol in human low-density lipoprotein by the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. **FEBS Letters**, v. 326, p. 199-203, 1993.

HONG, Y.; YEH, S.; CHANG, C.; HU, M. Total plasma malondialdehyde levels in 16 taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. **Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 8, p. 619-625, 2000.

JOKINEN, M. P.; CLARKSON, T. B.; PRICHARD, R. W. Recent advances in molecular pathology: animal models in atherosclerosis research. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 42, p. 1-28, 1985.

KADÁR, A.; GLASZ, T. Development of atherosclerosis and plaque biology. **Cardiovascular Surgery**, v. 9, n. 2, p. 109-121, 2001.

KUNSCH, C.; MEDFORD, R.M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. **Circulation Research**, v. 85, p. 753-766, 1999.

KUROWSKA, E. M.; BORRADAILE, N. M.; SPENCE, J. D.; CARROL, K. K. Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits. **Nutrition Research**, v 20, n. 1, p. 121-129, 2000.

LEITÃO, A. C.; BRAGA, R. S. Mutagenic and genotoxic effects of mate (*Ilex paraguariensis*) in prokaryotic organisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 1517-1525, 1994.

LI, J.; HUANG, M.; TEOH, H.; MAN, R. Y. K. Panax Quinquefolium saponins protects low density lipoproteins from oxidation. **Life Sciences**, v. 64, n. 1, p. 53-62, 1999.

LOWENSTEIN, C.J.; DINNERMAN, J.L.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: physiological messenger. **Annals of Internal Medicine**, v. 120, p. 227-237, 1994.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-269, 1951.

LUZ, P. L. da; SERRANO Jr. C. V.; CHACRA, A. P.; MONTEIRO, H. P.; YOSHIDA, V. M.; FURTARDO, M.; FERREIRA, S.; GUTIERREZ, P.; PILEGGI, F. The effect of red wine on experimental atherosclerosis: lipid-independent protection. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 65, p. 150-159, 1999.

MAHFOUZ, M. M.; KUMMEROW, F. A. Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 11, p. 293-302, 2000.

MAHLEY, R.W. Development of accelerated atherosclerosis: concepts derived from cell biology and animal models. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 107, p. 393-397, 1983.

MALINOW, M.R.; McLAUGHLIN, P.; STAFFORD, C.; LIVINSTON, A.L.; KOHLER, G.O.; CHEKEE, P. Effect of alfafa saponins on intestinal cholesterol absorption in rats. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 30, p. 2061-2067, 1977.

MANACH, C.; MORAND, C.; CRESPEY V.; DEMIGNE, C.; TEXIER, O.; REGERAT, F.; REMSY, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. **FEBS Letters**, v. 426, p. 331-336, 1998.

MELLION, B.T.; IGNARRO, L.J.; OHLSTEIN, E.H.; PONTECORVO, E. G.; HYMAN,

A.L.; KADOWITZ, P. J. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3'5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. **Blood**, v. 57, p. 946-955, 1981.

MESQUITA, A. Brasil quer expandir o consumo da erva-mate. Universidade de Erechim e Embrapa do Paraná pesquisam novas aplicações para planta. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 3 jun. 2001. Agrofólia. p. F1.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **DATASUS**. Morbidade hospitalar por local de internação e mortalidade geral. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm>>. Acesso em: 18 de Agosto de 2002.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

MOON, J-K.; TSUSHIDA, T.; NAKAHARA, K.; TERAOKA, J. Identification of quercetin 3-O- β -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, p. 1274-1285, 2001.

MORTON, L. W.; CACCETTA, R. A.; PUDDEY, I. B.; CROFT, K. D. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 3, p. 152-159, 2000.

MUCCILLO-BAISCH, A.L.; JOHNSTON, K.B.; PAGANINI-STEIN, F.L. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 133-139, 1998.

OAKENFULL, D. Aggregation of saponins and bile acids in aqueous solution. **Australian Journal of Chemistry**, v. 39, p. 1671-1683, 1986.

OAKENFULL, D.; FENWICK, D.; TOPPING, D.; ILLMANN, R. Prevention of dietary hypercholesterolaemia in rats by soy bean and quillaja saponins. **Nutrition Reports International**, v. 29, p. 1039-1046, 1984.

OHARA, Y.; PETERSON, T. E.; HARRISON, D. G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p. 2546-2551, 1993.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 66-71, 2001.

PARTHASARATHY, S.; QUINN, M. T.; SCWENKE, D. C.; CAREW, T. E.; STEINBERG, D. Oxidative modification of beta-very low density lipoprotein. **Arteriosclerosis**, v. 9, p. 398-404, 1989.

PETERSON, L.E. Meat in international trade. **In Focus**, v. 4, p. 2-4, 1978.

PRASAD, K.; KALRA, J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: effect of vitamin E. **American Heart Journal**, v. 125, p. 958-973, 1993.

PRIOR, J. T.; KURTZ, D. M.; ZIEGLER, D. D. The hypercholesterolemic rabbit. An aid to understanding arteriosclerosis in man? **Archives of Pathology**, v. 71, p. 82-94, 1961.

REGINATTO, F. H.; ATHAYDE, M. L.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species - caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 10, n. 6, p. 443-446, 1999.

RICCO, R. A.; WAGNER, M. L.; GURNI, A. A. Estudio comparativo de flavonoides en seis especies austrosudamericanas del género *Ilex*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 10, n. 1, p. 29-35, 1991.

ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 115-126, 1999.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, v. 362, p. 801-809, 1993.

SANTOS, R. D. (Coord.). III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose da sociedade brasileira de cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 77, suplemento III, p. 1-48, 2001.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MONTANHA, J. A.; HEIZMANN, B. M.; ATHAYDE, M. L.; TAKETA, A. T. C.; PIRES, V. S.; GUILLAUME, D. Saponins from maté (*Ilex*

paraguariensis) and other South American Ilex species: ten years research on Ilex saponins. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 49, p. 359-363, 1997.

SCHINELLA, G. R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P. M. de; TOURNIER, H. A. Antioxidant effects of an aqueous extract of Ilex Paraguariensis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 357-360, 2000.

SILVA, E. L.; MORIEL, P.; CHANG, Y. H.; ABDALLA, D.S.P. Plasma antioxidant enzymes and oxidized lipoproteins in hypercholesterolemic rabbits. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 36, n. 3, p. 679-687, 1995.

SILVA, E. L.; MENEGHETTI, J. C.; COELHO, I. J. C.; ABDALLA, D. S. P. Plasma clearance and biodistribution of oxidatively modified ^{99m}Tc-β-VLDL in rabbits. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 705-717, 1997.

SILVA, E. L.; ABDALLA, D. S. P. Increased metabolism of peroxynitrite-modified ¹²⁵I-β-VLDL by monocytes from hypercholesterolemic rabbits. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 46, p. 343-353, 1998.

SILVA, E.L.; PISKULA, M.K.; TERAJO, J. Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, p. 1209-1216, 1998a.

SILVA, E.L.; PISKULA, M.K.; YAMAMOTO, N.; MOON, J-K.; TERAJO, J. Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. **FEBS Letters**, v. 430, p.405-408, 1998b.

SILVA, E.L.; MENEGHETTI, J.C.; COELHO, I.J.C.; ABDALLA, D.S.P. Peroxynitrite-modified ^{99m}Tc-β-VLDL: Tissue distribution and plasma clearance rate. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p. 440-449, 2001.

SIMIONESCU, N.; VASILE, E.; LUPU, F.; POPESCU, G.; SIMIONESCU, M. Prelesional events in atherogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 123, p. 109-125, 1986.

SINGLETON, V. L.; Jr. ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

STEINBERG, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 34, p. 20963-20966, 1997.

STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T. E.; KHOO, J. C.; WITZTUM, J. L. Beyond cholesterol - Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 915-924, 1989.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502-522, 1969.

TIJBURG, L.B.M.; WISEMAN, S.A.; MEIJER, G.W.; WESTRATE, J.A. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis**, v. 135, p. 37-47, 1997.

TOPPING, D.L.; STORER, G.B.; CALVERT, G.D. Effects of dietary saponins on fecal bile acids and neutral steroids, plasma lipids, and lipoprotein turnover in the pig. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 33, p. 783-786, 1980.

VANDERJAGT, T. J.; GHATTAS, R.; VANDERJAGT, D. J.; CROSSEY, M.; GLEW, R. H. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. **Life Sciences**, v. 70, p. 1035-1040, 2002.

VASSALO, A.; CORREA, P.; DE STEFANI, E.; CENDÁN, M.; ZAVALA, D.; CHEN, V.; CARZOGGIO, J.; DENEIO-PELLEGRINI, H. Esophageal cancer in Uruguay: a case-control study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 75, p. 1005-1009, 1985.

VESSELINOVITCH, D. Animal models and the study of atherosclerosis. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 112, p. 1011-1017, 1988.

WINGE H.; FERREIRA A. G.; MARIATH, J. E. de A., TARASCONI, L. C (Org.). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. 1ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 1995. p. 27-40.

WINQUIST, R.J.; BUNTING, P.B.; BASKIN E.P.; WALLACE, A.A. Decreased endothelium-dependent relaxation in New Zealand genetic hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 2, p. 536-541, 1984.

YAMAKOSHI, J.; KATAOKA, S.; KOGA, T.; ARIGA, T. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Atherosclerosis**, v. 142, p. 139-149, 1999.

YAMAKOSHI, J.; PISKULA, M. K.; IZUMI, T.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; OBATA, A.; KIKUCHI, M. Isoflavone aglycone-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol fed rabbits. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1887-1893, 2000.

ANEXOS

ANEXO A

COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO

Rações Anhangüera (DU COELHO)

Farelo de alfafa
 Farelo de arroz
 Farelo de arroz desengordurado
 Farelo de soja
 Farelo de trigo
 Fosfato bicálcico
 Levedura de cana-de-açúcar
 Milho integral moído
 Óleo de soja degomado
 Calcário calcítico
 Casca de aveia moída
 Casca de soja moída
 Cloreto de sódio (sal comum)
 Melaço
 Premix vitamínico mineral

Eventuais substitutivos:
 Farelo de glúten de milho - 60
 Farelo de milho degerminado
 Farinha de ossos calcinados
 Triguinho
 Farelo de cevada
 Feno de leguminosa
 Sorgo integral moído

Níveis de garantia:
 Umidade (máxima): 12%
 Proteína bruta (mínima): 17%

Extrato etéreo (mínimo): 3%
 Matéria fibrosa (máxima): 16%
 Matéria mineral (máxima): 12%
 Cálcio (máximo): 1,20%
 Fósforo (mínimo): 0,65%

Enriquecimento/kg de produto:

Ácido patotênico: 20 mg
 Colina: 500 mg
 Cobre: 6 mg
 Cobalto: 1,6 mg
 Ferro: 40 mg
 Selênio: 0,15 mg
 Iodo: 0,40 mg
 Manganês: 45 mg
 Vitamina A: 10000 UI
 Vitamina B1: 2 mg
 Vitamina B12: 6 mcg
 Vitamina B2: 5 mg
 Vitamina B6: 5 mg
 Vitamina D3: 900 UI
 Vitamina E: 50 mg
 Vitamina K3: 3 mg
 Zinco: 50 mg
 Niacina: 30 mg
 Coccidiostático: 125 mg
 Antioxidante: 100 mg

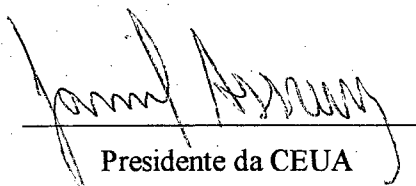
ANEXO B

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA****Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação****Comissão de Ética no Uso de Animais****Fone: (048) 331-9514 Fax: (048) 331-9599****e-mail: prpg@reitoria.ufsc.br****CERTIFICADO DE CREDENCIAMENTO**

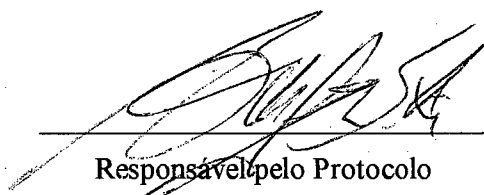
Certificamos que o Protocolo de Ensino/Pesquisa cadastrado sob os números 071/CEUA e 23080.001075/2001-02, com o título “**Avaliação do efeito antioxidante do extrato aquoso de *ilex paraguariensis***”, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **EDSON LUIZ DA SILVA**, do Departamento de Análises Clínicas/CCS; está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA/UFSC em reunião de 08/05/2001.

Este certificado expira em 08/05/2003.

Florianópolis, 11 de março de 2002.



Presidente da CEUA



Responsável pelo Protocolo