



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

Brunna Cristina Bremer Boaventura

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DA ERVA MATE
(*Ilex paraguariensis*) EM INDIVÍDUOS COM DISLIPIDEMIA**

**FLORIANÓPOLIS – SC
2010**



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

Brunna Cristina Bremer Boaventura

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DA ERVA MATE
(*Ilex paraguariensis*) EM INDIVÍDUOS COM DISLIPIDEMIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina, na Linha de Pesquisa de Estudo Dietético e Bioquímico relacionado com o estado nutricional, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Nutrição

Orientadora: Professora Patrícia Faria Di Pietro, Dr.

**FLORIANÓPOLIS – SC
2010**

Brunna Cristina Bremer Boaventura

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DA ERVA MATE
(*Ilex paraguariensis*) EM INDIVÍDUOS COM DISLIPIDEMIA**

Esta dissertação foi julgada aprovada para obtenção do título de MESTRE EM NUTRIÇÃO e completa em sua forma pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 3 de fevereiro de 2010.

Profa. Rossana Pacheco da Costa Proença, Dr.

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Profa. Patrícia Faria Di Pietro, Dr.

Presidente (UFSC)

Profa. Adriane Belló-Klein, Dr.

Membro Externo (UFRGS)

Profa. Edna Regina Amante, Dr.

Membro (UFSC)

Profa. Sandra Regina Paulon Avancini, Dr.

Membro (UFSC)

*Dedico esta obra aos
meus pais José e Katy
pelo apoio e amor
incondicional em todos os
momentos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus que me proporcionou seguir este caminho;

À minha querida orientadora Patrícia Faria Di Pietro por toda a confiança, estímulo e dedicação, dando-me força para trilhar o caminho da pesquisa científica, proporcionando-me muita alegria e coragem para seguir em frente;

Ao Professor Edson Luiz da Silva, que além de acreditar no meu potencial, auxiliou-me em tudo que foi necessário com muita paciência e dedicação.

Às minhas incansáveis companheiras e amigas Aliny e Grazi por todos os momentos que vivenciamos e aprendemos durante a coleta;

Às colegas do Laboratório Elayne, Fernanda, Gabriela, Caroline, Arianna, Letícia, Haruna, Daisy e Pâmela por todo o trabalho, apoio e companheirismo durante a coleta e na realização das análises e, também, às bolsistas voluntárias Bruna e Elaine pelo esforço e ajuda na tabulação dos dados;

Às minhas amigas Claudia, Gabriele, Francilene e Carla pelo incentivo e contribuições durante esta trajetória;

Às minhas colegas do mestrado pelo maravilhoso convívio e aprendizado;

Aos voluntários do estudo que participaram com muita disposição e dedicação;

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina que realizou algumas das análises bioquímicas;

Ao PPGN, em especial à coordenadora Rossana e o secretário Nelson, por todo o apoio durante o mestrado;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Em especial agradeço aos meus pais, José e Katy, e aos meus irmãos, Patricia e Paulo, pela força, confiança e amor que me proporcionaram, dando-me coragem para seguir adiante na busca dos meus sonhos;

Ao meu noivo Filipe pelo seu amor, paciência e incentivo, motivos de minha alegria em todos os momentos;

Aos meus familiares por me apoiarem e torcerem por mim.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”
Albert Einstein

RESUMO

Os danos induzidos pelo estresse oxidativo nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, dentre elas, as cardiovasculares (DCV). Sendo assim, é crescente o interesse em tratamentos que visem a redução do estresse oxidativo, particularmente através da utilização de antioxidantes de origem alimentar. Os compostos fenólicos estão presentes em uma variedade de alimentos e bebidas de origem vegetal e fazem parte da dieta humana, sendo que o consumo de alimentos ricos nesses compostos tem sido associado a uma diminuição no risco de DCV. Diversos estudos *in vitro* e experimentais demonstraram que os compostos fenólicos, derivados da erva mate, exercem atividade antioxidante. Diante disso, o propósito do presente estudo foi avaliar a atividade antioxidante da ingestão prolongada de erva mate em indivíduos com dislipidemia. Os voluntários foram monitorados por 30 dias, caracterizando o período basal e, após, foram randomizados em três diferentes grupos: dieta controle (DC), erva mate (EM) e erva mate com dieta controle (ED). Os participantes receberam intervenção por 90 dias, sendo que os grupos foram avaliados após 20, 40, 60 e 90 dias de tratamento. Para verificar o potencial antioxidante da erva mate, no sangue dos indivíduos, foram analisados os parâmetros capacidade antioxidante (FRAP), glutathiona reduzida (GSH), enzima paroxonase (PON1), hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e proteína carbonilada (PC). A fim de avaliar o perfil lipídico, utilizou-se os parâmetros colesterol total (CT), colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL-c), colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), Não HDL-c e triglicerídeos (TG). A amostra foi composta por 74 voluntários dislipidêmicos, com idade média de 48 ± 11 anos, sendo 17 homens e 57 mulheres. Em relação à atividade antioxidante, foi observado aumento significativo nas concentrações de GSH e FRAP nos três grupos de intervenção e de PON1 no grupo ED. Não foi demonstrada redução significativa nos parâmetros de LOOH e PC em nenhum dos tratamentos. Quanto ao perfil lipídico, a erva mate ingerida, isoladamente, promoveu diminuição significativa nos valores de LDL-c em todos os tempos do estudo e, no grupo DC, houve redução somente após 40 dias de intervenção. Além disso, foi observada uma diminuição significativa nos valores de Não HDL-c nos três grupos de intervenção.

Sendo assim, a ingestão prolongada da erva mate, associada ou não a uma dieta controle, apresentou potencial antioxidante e hipolipemiante em indivíduos com dislipidemia.

Palavras-chave: erva mate, estresse oxidativo, antioxidantes, compostos fenólicos, dislipidemia

ABSTRACT

Cell and tissue damages induced by oxidative stress have been related with the etiology of many diseases, including cardiovascular disease (CVD). Thus, it's increasing the interest of treatments to reduce oxidative stress, particularly by using food antioxidants. Phenolic compounds naturally exist in many foods and beverages, and the consumption of food rich in this component has been associated with a decrease in the risk of development of CVD. Many *in vitro* and experimental studies have showed that phenolic compounds from yerba mate exert antioxidant activity. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the antioxidant activity of prolonged intake of yerba mate in dyslipidemic humans. Volunteers were monitored for 30 days, and this was the baseline period. After that, they were randomized in three different groups: controlled diet (DC), yerba mate (EM) and yerba mate with controlled diet (ED). Participants received intervention during 90 days and all groups were evaluated after 20, 40, 60 and 90 days of treatment. To verify the antioxidant potential of yerba mate in the blood's individuals, it was measured antioxidant capacity (FRAP), reduced glutathione (GSH), paraoxonase enzyme (PON1), lipid hidroperoxides (LOOH) and carbonyl protein (PC). To evaluate the lipid profile, it was measured the parameters of total cholesterol (CT), high density lipoprotein cholesterol (HDL-c), low density lipoprotein cholesterol (LDL-c), Non HDL-c and tryglicerides (TG). The study's sample was 74 dyslipidemic volunteers with 48 ± 11 years old, including 17 men and 57 women. In the antioxidant activity, was observed significantly increase of GSH and FRAP concentrations in the three intervention groups and in the ED group to PON1 values. It was not demonstrated significantly reduction of LOOH and PC levels with the different treatments. About the lipid profile, isolated intake of yerba mate promoted significant reduce in the LDL-c levels during all intervention period and in the DC group this reduce was showed afer 40 days of treatment. Moreover, in all intervention groups was observed a decrease of Non HDL-c values. Results suggest that prolonged intake of yerba mate, in association or not with a controlled diet, showed antioxidant and hipolipemic activity in dyslipidemic subjects.

Keywords: yerba mate, oxidative stress, antioxidants, phenolic compounds, dyslipidemia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Modificado de HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).....	22
Quadro 2 Principais agentes de defesa antioxidante nos sistemas biológicos (Modificado de SIES, 1993).....	26
Figura 1 Desenho do estudo de intervenção na avaliação do efeito antioxidante da erva mate em indivíduos com dislipidemia.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Conteúdo de fenóis totais, saponinas totais e compostos fenólicos da infusão de erva mate tostada.....	74
Tabela 2 Características dos indivíduos dos diferentes grupos de intervenção durante o período basal do estudo.....	75
Tabela 3 Concentrações de GSH, FRAP, PON1, LOOH e PC sanguíneos dos indivíduos dos grupos de intervenção durante o período basal e após 20, 40, 60 e 90 dias.....	76
Tabela 4 Determinações de CT, LDL-c, HDL-c, não HDL-c e TG sanguíneos dos indivíduos dos grupos de intervenção durante o período basal e após 20, 40, 60 e 90 dias.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGPI	Ácido Graxo Poliinsaturado
BHT	Butil Hidroxitolueno
CA	Circunferência abdominal
CAT	Catalase
CC	Circunferência da cintura
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CQ	Circunferência do quadril
CT	Colesterol total
DC	Grupo Dieta Controle
DCV	Doenças Cardiovasculares
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxiribonucleico)
DNPB	2,4 Dinitrofenilhidrazina
DTNB	Ácido 5,5 Ditio-2-Nitrobenzóico
ED	Grupo Erva Mate com Dieta Controle
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
EM	Grupo Erva Mate
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
FeCl ₃	Cloreto férrico
FOX	Fe ⁺³ <i>xylenol orange</i> (Oxidação do ferro com Alaranjado de Xilenol)
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Potential</i> (Potencial Antioxidante pela Redução do Ferro)
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
GST	Glutathione S-Transferase
H	Hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Alta Densidade)
HDL-c	Lipoproteína de Alta Densidade – colesterol

HNO ₂	Ácido Nitroso
HOCL	Ácido Hipocloroso
HO ₂ [•]	Radical Hidroperóxil
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HU	Hospital Universitário
IMC	Índice de Massa Corporal
L [•]	Radical Lipídico
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Baixa Densidade)
LDL-c	Lipoproteína de Baixa Densidade – colesterol
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
LPO	Peroxidação lipídica
M	Molar
MDA	Malondialdeído
mM	Milimol
Mn	Manganês
N	Normal
N ² O ³	Trióxido de Nitrogênio
N ² O ⁴	Tetróxido de Nitrogênio
nm	Nanometros
NO ⁻	Ânion Nitrosil
NO ⁺	Cátion Nitrosil
NO ⁺²	Cátion Nitrônio
NO [•]	Radical Óxido Nítrico
NOO [•]	Radical Dióxido de Nitrogênio
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{-•}	Radical Superóxido
[•] OH	Radical Hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ONOOH	Ácido Peroxinitroso
¹ Δg	Oxigênio singlet
PON1	Enzima Paroxonase
PPGN	Programa de Pós-Graduação em Nutrição
RL	Radical Livre
RO [•]	Radical Alcoxil

ROO [•]	Radical Peroxil
ROONO	Alquil Peroxinitrito
SESC	Serviço Social do Comércio
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i> (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)
TCA	<i>Trichloroacetic Acid</i> (Ácido Tricloroacético)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Tríglicerídeos
TPP	Trifenilfosfina
TNB	Ânion Tiolato
TPTZ	2,4,6-Tri (2-piridil)-s-triazina
TRAP	<i>Total radical-trapping antioxidant parameter</i> (Parâmetro Antioxidante de Total Sequestramento de Radicais)
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
μL	Microlitro

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL	17
CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	21
2.2 Antioxidantes	25
2.2.1 Compostos fenólicos	30
2.3 Estresse oxidativo	32
2.3.1 Estresse oxidativo, doenças cardiovasculares e dislipidemia.....	34
2.3.2 Estresse oxidativo, dislipidemia e dieta.....	35
2.4 Erva mate	36
CAPÍTULO 3 – MÉTODO GERAL	39
3.1 Caracterização do estudo	39
3.2 População do estudo	39
3.3 Aspectos éticos	40
3.4 Protocolo experimental	40
3.4.1 Grupo dieta controle (DC).....	41
3.4.2 Grupo erva mate (EM).....	41
3.4.2.1 Determinação dos fenóis e saponinas totais da erva mate.....	42
3.4.2.2 Caracterização dos compostos fenólicos da erva mate por cromatografia líquida de alta eficiência CLAE).....	43
3.4.3 Grupo erva mate com dieta controle (ED).....	43
3.5 Instrumentos e técnicas de coletas de dados	43
3.5.1 Avaliação clínica e antropométrica.....	43
3.5.2 Avaliação do consumo alimentar.....	44
3.5.3 Avaliação laboratorial.....	45
3.5.3.1 Exames laboratoriais.....	46
3.5.3.2 Estresse oxidativo.....	46
3.5.3.2.1 Capacidade antioxidante.....	47
3.5.3.2.2 Glutathiona reduzida.....	47
3.5.3.2.3 Enzima paroxonase.....	48
3.5.3.2.4 Hidroperóxidos lipídicos.....	48
3.5.3.2.5 Proteína carbonilada.....	49
3.6 Tratamento e análise dos dados	49
CAPÍTULO 4 – ARTIGO ORIGINAL	52

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
APÊNDICES	
APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	95
APÊNDICE B – Questionário clínico.....	97
APÊNDICE C – Avaliação antropométrica e pressão arterial.....	99
APÊNDICE D – Recordatório de 24 horas.....	100
APÊNDICE E – Registro alimentar de 3 dias.....	101
ANEXOS	
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.....	105

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os danos induzidos pelo estresse oxidativo nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, tais como artrites reumáticas, aterosclerose, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão, problemas pulmonares, entre outras (FANG; YANG; WU, 2002).

Dentre as principais doenças relacionadas ao estresse oxidativo, há estimativa de que as cardiovasculares (DCV) serão responsáveis pela morte de mais de 24 milhões de pessoas, por ano, até 2030 (SMITH et al., 2004). A hipercolesterolemia e, particularmente, os valores plasmáticos elevados da lipoproteína de baixa densidade (LDL – do inglês *Low Density Lipoprotein*), são considerados fatores primários de risco para essas doenças (KADAR; GLASZ, 2001). Muitos estudos têm demonstrado, claramente, que a redução e/ou a prevenção do aumento da concentração plasmática de colesterol total e LDL-colesterol (LDL-c) reduzem o risco de eventos, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral e mortalidade por causas cardiovasculares (ANDREWS et al., 2001; BROWN et al., 2001; GRUNDY, 2002; SEVER et al., 2003). Da mesma forma, estudos epidemiológicos demonstraram uma associação inversa entre a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes, como as vitaminas A, C e E e os compostos fenólicos e a morbi-mortalidade por DCV (GELEIJNSE et al., 2002; HUXLEY e NEIL, 2003; OSGANIAN et al., 2003; STOCKER, 2007).

A maioria das DCV resulta de complicações derivadas da aterosclerose (MADAMANCHI; VENDROV; RUNGE, 2005; SINGH; JIALAL, 2006). Inúmeras evidências indicam a importante participação da LDL modificada oxidativamente (LDL-ox) em todos os estágios da doença aterosclerótica (STOCKER; KEANEY, 2004; ZHAO; SHEN, 2005; SBC, 2007). No espaço subendotelial das artérias, a LDL-ox modificada por espécies reativas de oxigênio e/ou de nitrogênio é captada pelos macrófagos e células musculares lisas, através do reconhecimento pelo receptor celular *scavenger*, que resulta em um substancial acúmulo de colesterol intracelular e formação das células espumosas, as quais são os principais constituintes da placa de ateroma (CHISOLM; STEIBERG, 2000; SBC, 2007). Diversos fatores de risco, incluindo as dislipidemias, a hipertensão arterial, o diabetes

mellitus e o tabagismo são amplificados pelos efeitos deletérios da LDL-ox, iniciando uma reação inflamatória crônica, cujo resultado é a vulnerabilidade da placa de ateroma, tornando-a mais susceptível à ruptura e à trombose (WILLERSON; RIDKER, 2004).

Assim, é crescente o interesse de tratamentos para reduzir o estresse oxidativo mediado pelas espécies reativas e pelos radicais livres, particularmente através da utilização de antioxidantes de origem alimentar, como as vitaminas C e E, os flavonóides e outros compostos fenólicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Muita atenção tem sido dada a esses últimos como agentes antioxidantes de origem dietética. Os compostos fenólicos existem, naturalmente, em uma grande variedade de alimentos e bebidas de origem vegetal e fazem parte da dieta humana, sendo que o consumo de alimentos ricos nesses compostos tem sido associado a uma diminuição no risco de DCV (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; HERTOOG; HOLLMAN; KATAN, 1992; HERTOOG; HOLLMAN; VAN DE PUTTE, 1993b; HUXLEY e NEIL, 2003).

Dentre as várias espécies de plantas pesquisadas, a erva mate (*Ilex paraguariensis*), espécie vegetal encontrada na América do Sul, apresenta alguns compostos fenólicos (principalmente derivados do ácido cafeoilquínico, como o ácido clorogênico e seus isômeros), incluindo os flavonóides quercetina, rutina e luteolina (CARINI et al., 1998; BASTOS et al., 2005, BASTOS et al., 2006a). O extrato aquoso de erva mate apresentou elevado potencial antioxidante *in vitro* (CAMPOS; ESCOBAR; LISSI, 1996; CARINI et al., 1998; FILIP et al., 2000; SCHINELLA et al., 2000, CHANDRA; DE MEJIA, 2004; BASTOS et al., 2006b), inibindo, inclusive, a oxidação *in vitro* e *ex vivo* do plasma e da LDL (GUGLIUCCI e STAHL, 1995; GUGLIUCCI, 1996; BRACESCO et al., 2003; SILVA et al., 2008). Foi também demonstrado, em um estudo desenvolvido em nosso laboratório, que o extrato aquoso de erva mate inibiu a progressão da aterosclerose em coelhos alimentados com colesterol (MOSIMANN et al., 2006).

Diante do exposto, onde foi evidenciado que o extrato aquoso de erva mate possui atividade antioxidante *in vitro*, que aumenta a proteção do plasma e da LDL de seres humanos contra reações de oxidação, apresentando capacidade para inibir a progressão da aterosclerose experimental, é plausível acreditar que a erva mate pode

proteger os indivíduos contra complicações para as DCV. Dessa forma, é importante avaliar o seu potencial em reduzir os marcadores do estresse oxidativo em indivíduos com dislipidemia, para estabelecer, assim, uma possível contribuição para a saúde humana.

CAPÍTULO 2
REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio

Radicaís livres (RL) é um termo utilizado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos. Este desemparelhamento de elétrons confere alta reatividade a esses átomos e moléculas, tornando-os capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa e desencadeando, assim, reações de oxido-redução (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Assim, os RL podem ceder o seu elétron desemparelhado, oxidando-se, ou receber outro elétron, reduzindo-se (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e as de nitrogênio (ERN) constituem substâncias reativas e instáveis, geradas *in vivo*, tanto em condições fisiológicas, quanto em condições patológicas. As ERO e as ERN são termos coletivos que incluem ambos radicaís de oxigênio e de nitrogênio, respectivamente, e algumas espécies não radicaís que são agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidas em radicaís (Quadro 1) (HALLIWELL, 1996b; FANG; YANG; WU, 2002).

Em razão das ERO e ERN serem termos que incluem tanto espécies radicaís e não radicaís, essas são nomenclaturas mais apropriadas quando comparadas ao termo RL, o qual engloba apenas espécies radicaís.

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio (O_2) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). Durante este processo são formados os intermediários reativos como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o hidroperoxil (HO_2^{\bullet}) e o hidroxil ($\bullet OH$) (COHEN, 1989).

Quadro 1 - Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Modificado de HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

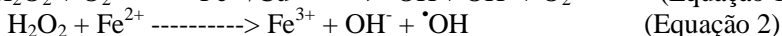
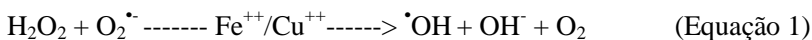
	Espécies Radicais	Espécies Não Radicais
ERO	Superóxido, $O_2^{\cdot-}$ Radical Hidroxil, $\cdot OH$ Radical Peroxil, RO_2^{\cdot} Alcoxil, RO^{\cdot} Hidroperoxil, HO_2^{\cdot}	Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 Ácido hipocloroso, $HOCl$ Ozônio, O_3 Oxigênio singlet, $^1\Delta g$
ERN	Óxido nítrico, NO^{\cdot} Dióxido de nitrogênio, NO_2^{\cdot}	Ácido nitroso, HNO_2 Tetróxido de Nitrogênio, N_2O_4 Trióxido de Nitrogênio, N_2O_3 Peroxinitrito, $ONOO^{\cdot}$ Ácido peroxinitroso, $ONOOH$ Cátion nitrônio, NO_2^+ Alquil peroxinitrito, $ROONO$

O $O_2^{\cdot-}$ é o primeiro intermediário resultante da redução monovalente do O_2 até H_2O . Ocorre em quase todas as células aeróbicas e é considerado o principal produto das ERO, uma vez que as demais ERO serão formadas a partir deste radical. O $O_2^{\cdot-}$ é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Os principais danos causados pelo $O_2^{\cdot-}$, em sistemas biológicos, são a destruição de centros metálicos de proteínas, oxidação de cadeias laterais de aminoácidos e a formação de outras espécies oxidativas, como o $\cdot OH$ e o $ONOO^{\cdot}$ (WINTERBOURN; KETTLE, 2003). A forma protonada do $O_2^{\cdot-}$ é representada pelo HO_2^{\cdot} , sendo este mais reativo que o $O_2^{\cdot-}$, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A partir da redução univalente do O_2 , seguida por dismutação do $O_2^{\cdot-}$ mediada pela enzima superóxido dismutase (SOD), ou também pela redução bivalente do O_2 , ocorre a formação do H_2O_2 (FREIDOVICH, 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; EVANS; HALLIWELL, 2001). Apesar de não ser RL, pela ausência de elétrons desemparelhados na sua última camada, o H_2O_2 é um metabólito do

oxigênio extremamente deletério, pois participa da reação que origina o $\cdot\text{OH}$. Além disso, o H_2O_2 é mais estável e capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com membranas e com proteínas ligadas ao ferro (Fe^{++}), tornando-se extremamente tóxico para as células (HALLIWELL, 1996a; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Através da reação entre o $\text{O}_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 é formado o $\cdot\text{OH}$, o qual é considerado a espécie mais reativa, sendo capaz de reagir com todas as biomoléculas, produzindo derivados que não podem ser regenerados pelo metabolismo celular. Esta reação pode ocorrer na presença de um cátion de transição como o Fe^{++} ou o cobre (Cu^{++}) e é chamada de Reação de Haber-Weiss (1934) (Equação 1). Outra reação onde há a formação do $\cdot\text{OH}$, dá-se, através do H_2O_2 com Fe^{++} e é chamada de reação de Fenton (1894) (Equação 2). Os principais alvos do $\cdot\text{OH}$ são o ácido desoxiribonucléico (DNA – do inglês *desoxiribonucleic acid*) que sofre danos em suas bases levando à quebra da dupla cadeia e os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), que sofrem peroxidação lipídica (LPO) (HALLIWELL, 2000).



Outra ERO é o $^1\Delta_g$ que é a forma excitada do oxigênio molecular e possui elétrons emparelhados no orbital externo. Esta espécie é formada pela oxidação de outros intermediários reativos de oxigênio e seus alvos preferenciais em reações químicas são as duplas ligações dos AGPI, proteínas e DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; THOMAS, 2003).

Em associação com o cloro, outra ERO é o HOCL, o qual é formado pela ação da mieloperoxidase de fagócitos (exceto macrófagos) e, posteriormente, liberado no meio extracelular. É considerado um potente agente antibacteriano, entretanto, pode ter efeito deletério, uma vez que este é capaz de alterar a função de algumas proteínas, até mesmo em baixas concentrações (SUOMALAINEN et al., 1991; MCCORD, 2000).

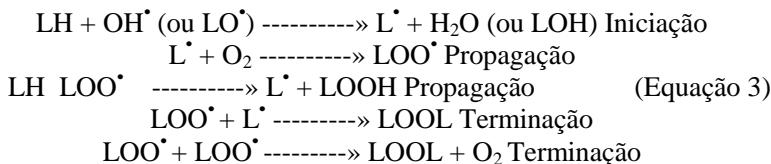
Além das ERO, há também as ERN que contribuem para a lesão tecidual e formação de processos inflamatórios. Um exemplo importante de ERN é o $\text{NO}\cdot$, um radical muito reativo e abundante formado a partir

da arginina, que atua como um sinal biológico oxidativo importante em uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo o relaxamento do músculo liso e a redução da pressão arterial. Também pode ser produzido pela ativação de macrófagos, contribuindo para a regulação da imunidade. Excesso de NO^\bullet é citotóxico e pode reagir diretamente com biomoléculas ou combinado com o $\text{O}_2^\bullet^-$ para formar o ONOO^- , aumentando, assim, o estresse nitrosativo, já que este é capaz de induzir a LPO. Em pH fisiológico, o ONOO^- é protonado, formando o ONOOH , o qual se dissocia rapidamente em duas potentes espécies reativas, o OH^\bullet e o NO_2^\bullet (BECKMAN, 1996; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007).

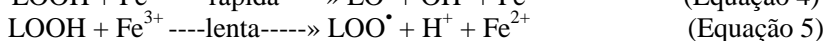
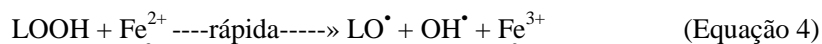
A geração de ERO e ERN no organismo é fisiológica e contínua, sendo fundamental em alguns processos biológicos, como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização celular e síntese de substâncias biológicas importantes (LANDER, 1997; FREIDOVICH, 1999). Entretanto, em concentrações elevadas, provocam lesões celulares, por meio de modificações no DNA, proteínas, lipídeos e outras biomoléculas, resultando em uma variedade de consequências biológicas e originando diversos processos patológicos (STOHS, 1996; GRACY et al, 1999; MCCORD, 2000; PAPA HARALAMBUS; GRIENGLING, 2007).

Dos componentes celulares, a membrana é a mais susceptível à ação das ERO e ERN, em decorrência da LPO que acarreta alteração na estrutura e na permeabilidade da membrana celular e posterior perda de seletividade nas trocas iônicas. A membrana das células contém grandes quantidades de AGPI, tornando-os alvos excelentes para o ataque de RL. O processo de LPO ocorre em três etapas bem definidas: iniciação, propagação e terminação (Equação 3). A etapa de iniciação é caracterizada pelo sequestro de um átomo de hidrogênio do AGPI presente na membrana celular. Tal remoção pode ser realizada pelo OH^\bullet , com conseqüente formação de um radical lipídico centrado em carbono (L^\bullet). Na primeira equação da propagação, o L^\bullet reage, rapidamente, com o O_2 , produzindo um radical peroxil (LOO^\bullet), que por sua vez, sequestra novo hidrogênio do AGPI, produzindo um hidroperóxido lipídico (LOOH), enquanto gera um novo L^\bullet na segunda equação da propagação. A terminação da LPO ocorre quando os radicais L^\bullet e LOO^\bullet , produzidos

nas etapas anteriores, propagam-se até estabilizarem-se (THOMAS et al., 1990; DE GROOT, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).



A LPO pode ser catalisada por íons de ferro ou cobre, por conversão dos LOOH em radicais altamente reativos, como o alcóxil (LO^\bullet) e peróxil (LOO^\bullet), que por sua vez iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação. Essas reações podem ser rápidas (Equação 4) ou lentas (Equação 5) dependendo da valência do ferro, conforme demonstrado abaixo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).



Ocorrem também alterações importantes nas moléculas protéicas por meio da ação danosa de ERO e ERN, desencadeando o processo de oxidação dos aminoácidos e alterando, assim, a capacidade funcional das proteínas. Essas alterações funcionais das proteínas fazem com que se tornem mais susceptíveis à degradação pelas enzimas proteolíticas (LEVINE et al., 1990; PACKER, 1997; DALLE-DONNE et al., 2006).

Para neutralizar os efeitos e evitar os danos causados nas biomoléculas pela produção excessiva de ERO e ERN, os organismos apresentam mecanismos de defesa enzimáticos e não-enzimáticos, denominados antioxidantes.

2.2 Antioxidantes

Os organismos aeróbios, em sua evolução adaptativa à atmosfera rica em O_2 , desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante para limitar a produção de radicais intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993; HALLIWELL, 1996a).

Segundo Halliwell e Gutteridge (1999) os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada à do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz, protegendo as células contra a ação dos oxidantes.

O sistema de defesa antioxidante pode atuar através de três mecanismos na proteção do organismo humano. O primeiro mecanismo de proteção atua como detoxificador das ERO e ERN, impedindo a sua formação, e conseqüentemente, o ataque sobre os lipídeos, proteínas, e as bases do DNA, evitando assim, a formação de lesões e perda da integridade celular. O outro mecanismo de defesa tem a função de reparar as lesões provocadas pelas espécies reativas, sendo que este processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e reconstituição das membranas celulares (SIES, 1993).

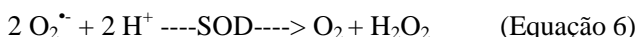
Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos, os quais são produzidos pelo próprio organismo ou provindos de fontes exógenas (dietéticas) (Quadro 2).

Quadro 2 - Principais agentes de defesa antioxidante nos sistemas biológicos (Modificado de SIES, 1993).

Antioxidantes enzimáticos	Antioxidantes não enzimáticos
Superóxido Dismutase (SOD)	Glutathiona reduzida (GSH)
Catalase (CAT)	Ácido úrico
Glutathiona peroxidase (GPx)	Ácido ascórbico (vitamina C)
Glutathiona Redutase (GR)	Bilirrubina
Glutathiona S-Transferase (GST)	Ubiquinol-10
NADPH-quinona oxiredutase	Compostos fenólicos (flavonóides)
Enzimas de reparo	Licopeno
	α-tocoferol (vitamina E)
	β-caroteno
	Proteínas do plasma
	Zinco
	Selênio

O sistema de defesa antioxidante enzimático é formado por várias enzimas, dentre as quais se destacam a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase (GPx).

A SOD é caracterizada como uma das enzimas mais importantes e atua como antioxidante celular, estando presente nos organismos aeróbios, sob duas formas distintas, de acordo com a presença do cofator metálico no sítio ativo. A primeira contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como cofator no sítio ativo e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. A segunda contém Mn^{2+} como cofator no sítio ativo, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo. A SOD catalisa a dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$, convertendo-o em O_2 e H_2O_2 (HALLIWELL, 1996a ; DIPLOCK et al., 1998) (Equação 6).

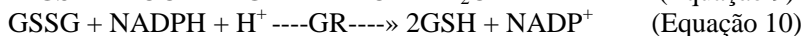
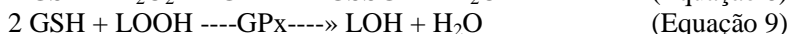


O segundo sistema de prevenção é constituído pela enzima CAT. Ela está presente em quase todos os organismos aeróbios e em algumas células anaeróbias, controlando os processos de oxidação em tecidos quando ocorre um aumento na concentração de H_2O_2 celular. A CAT atua na conversão do H_2O_2 em O_2 e H_2O (HALLIWELL, 1996a; DIPLOCK et al., 1998) (Equação 7).



O terceiro sistema de defesa antioxidante pode ser representado pela GPx e glutaciona redutase (GR) e atuam em conjunto com a glutaciona reduzida (GSH), um antioxidante não enzimático. A GPx catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos em H_2O e seus correspondentes alcoóis a partir da oxidação da GSH à glutaciona oxidada (GSSG) (Equação 8 e 9). A GPx está presente no organismo sob duas formas, dependente e independente de selênio. A presença de selênio na enzima explica a importância desse metal e sua atuação como antioxidante nos organismos vivos. A GR, uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida (NADPH), tem a função de regenerar a GSH (Equação 10). O processo de regeneração da GSH favorece a manutenção da concentração

intracelular elevada de GSH em relação à GSSG (HALLIWELL, 1996b; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; FANG; YANG; WU, 2002; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). A GSH é o maior composto tiol de baixo peso molecular em vegetais e animais, constituindo-se num importante antioxidante natural. Ela pode ser proveniente da dieta ou também ser sintetizada no organismo humano, portanto é considerada um antioxidante endógeno e exógeno (FANG; YANG; WU, 2002). Seu grupo tiol reativo confere efetiva propriedade redutora, permitindo interagir com diversas moléculas reativas, tais como LOOH, H₂O₂, ONOO⁻, O₂^{-•} e OH[•]. Além disso, a GSH tem importante participação no processo de regeneração da vitamina C (BIANCHI; ANTUNES, 1999; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).



Outra enzima que apresenta atividade antioxidante é a enzima paroxonase (PON1). A PON1 encontra-se distribuída em vários órgãos, como fígado, rins e intestino, bem como no plasma, onde se encontra associada à HDL (TOMÁS et al., 2004). À PON-1 é atribuída a propriedade de catalisar a hidrólise dos hidroperóxidos lipídicos na LDL, bem como a de outros substratos, incluindo metabólitos ativos de organofosforados, como o paroxon (de onde origina o seu nome), e outros substratos (MACKNESS et al., 1998). Além disso, foi demonstrado que a PON-1 é capaz de hidrolisar peróxidos lipídicos presentes em lesões ateroscleróticas humanas (AVIRAM et al., 2000). A PON1 está associada às lipoproteínas de alta densidade (HDL) o que implica uma contribuição anti-inflamatória e antioxidante para esta lipoproteína (MACKNESS e MACKNESS, 2004). Estudos *in vitro* verificaram que a PON1 age na inibição da oxidação de LDL (MACKNESS; ARROL; DURRINGTON, 1991; DURRINGTON; MACKNESS; MACKNESS, 2001; LI; LIU; LIANG, 2003)

Em relação ao sistema não enzimático de defesa antioxidante, ele é composto por antioxidantes lipofílicos como os tocoferóis, os carotenóides, os compostos fenólicos e o retinol; e antioxidantes hidrofílicos, como o ácido ascórbico, o ácido úrico, a glutatona

reduzida, entre outros (SEN; PACKER, 2000; NIJVELDT et al., 2001). Dos antioxidantes provenientes da dieta, ou exógenos, podemos citar, entre os mais estudados, as vitaminas A, C e E, os flavonóides e outros compostos fenólicos, os minerais como o zinco, selênio e cobre, além de compostos bioativos encontrados em plantas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; FANG; YANG; WU, 2002; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O ácido ascórbico (vitamina C) é considerado o principal antioxidante hidrossolúvel, o qual está presente nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos, comumente encontrado na forma de ascorbato (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O ascorbato atua protegendo biomembranas contra a peroxidação e é considerado um antioxidante endógeno capaz de proteger os lipídios do dano de peroxidação induzido pelo RO_2^{\cdot} (SIES, 1993; SOWELL; FREI; STEVENS, 2004). Além disso, o ácido ascórbico tem se mostrado eficiente em sequestrar hipoclorito e $^1\Delta_g$ (SIES, 1993), como também de participar do ciclo da vitamina E, regenerando o α -tocoferol. Desta forma, o ascorbato regenera a vitamina E, doando um hidrogênio ao radical α -tocoferoxil, formado na inibição da LPO (BIANCHI e ANTUNES, 1999; FANG; YANG; WU, 2002; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A vitamina E ocorre na natureza em oito formas estruturais: quatro tocoferóis (α , β , γ , δ) e quatro tocotrienóis (α , β , γ , δ) (BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999; JIANG et al., 2001). Em função de sua característica lipossolúvel, a vitamina E representa o principal antioxidante presente em membranas celulares, sistemas de membranas e lipoproteínas plasmáticas de mamíferos (YU, 1994; TRABER e ATKINSON, 2007). A forma α -tocoferol é predominante em tecidos humanos e a principal forma encontrada em suplementos nutricionais. Dentre os tocoferóis, o α -tocoferol é mais eficaz na doação de elétrons e é também considerado mais potente antioxidante interruptor de cadeia (*chain breaker*), inibindo a LPO. Ele age através da doação do seu hidrogênio radicalar fenólico para o RO_2^{\cdot} , interrompendo a propagação das reações em cadeia e impedindo a LPO induzida pelas espécies reativas nas membranas biológicas (KAMAL-EDIN e APPELQVIST, 1996; BIANCHI e ANTUNES, 1999; FANG;

YANG; WU, 2002; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; TRABER e ATKINSON, 2007).

O β -caroteno é, quantitativamente, o mais importante e mais ativo dos carotenóides e é considerado um forte agente antioxidante. Suas propriedades antioxidantes têm sido atribuídas à sua longa cadeia, contendo duplas ligações conjugadas (YU, 1994; FANG; YANG; WU, 2002). A atividade antioxidante do β -caroteno está relacionada com a inibição da LPO, inativação de $^1\Delta_g$, $^{\bullet}\text{OH}$, e $\text{O}_2^{\bullet-}$ (VALKO et al., 2006).

O licopeno é um carotenóide presente em diversas frutas, legumes e verduras (melancia, goiaba, pitanga e tomate) e pode ser sintetizado e armazenado no aparato fotossintético, constituindo-se uma defesa contra a foto-oxidação (PATEU et al., 1998). Sua ação antioxidante envolve a transferência da energia excitada do O_2 para o carotenóide, através da sua rotação e interação com solventes próximos, dissipando energia da molécula excitada. Possui ação sobre radicais peróxidos e NO_2^{\bullet} , sendo, ao menos, duas vezes mais eficiente que o β -caroteno sobre os radicais peróxidos e o mais eficiente sequestrador de ERO (RAO, 2002).

Já a propriedade antioxidante de alguns minerais está relacionada, principalmente, à atuação como cofatores de certas enzimas que compõem o sistema enzimático de defesa contra as ERO e ERN. O selênio é considerado um mineral essencial para a proteção contra a LPO de membranas celulares e subcelulares. Concentrações reduzidas de selênio nas células e tecidos resultam na diminuição da atividade da GPx, resultando em maior suscetibilidade das células e do organismo aos danos oxidativos induzidos pelas ERO e ERN (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

2.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão, amplamente, distribuídos no reino vegetal, sendo conhecidas, atualmente, mais de 8.000 estruturas. Estão presentes, naturalmente, numa grande variedade de alimentos e bebidas de origem vegetal, como frutas, legumes, sementes, flores, folhas, sucos, chás e vinho tinto. São caracterizados como metabólitos de plantas que possuem um anel aromático com um ou mais

substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (HUXLEY; NEIL, 2003; MANACH et al., 2004; D'ARCHIVIO et al. 2007).

As propriedades benéficas dos compostos fenólicos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar os RL (DECKER, 1997). Além do potencial antioxidante, eles possuem outras propriedades como atividade antiinflamatória, antiagregação plaquetária, diurética, antiviral, anticarcinogênica e vasodilatadora (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; NEIVA et al., 1999; CREN-OLIVÉ et al., 2003; ODONTUYA; HOULT; HOUGHTON, 2005).

Dentre o grupo de compostos fenólicos, destacam-se os flavonóides e os ácidos fenólicos. Esses compostos têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio, portanto inibem as reações, em cadeia, provocadas pelos RL, além de auxiliarem na preservação da vitamina E e do β -caroteno (SALAH et al., 1995; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; RICE-EVANS, 2001). Estudos *in vitro* demonstraram que os flavonóides são potentes neutralizadores de diversas ERO e ERN e podem interferir na ação oxidante de metais de transição (VAN ACKER et al., 1996). Foi verificado que os flavonóides miricetina, quercetina e rutina se apresentaram mais eficazes do que a vitamina C na proteção contra o dano oxidativo, induzido pelo H_2O_2 no DNA de linfócitos humanos (NOROOZI; ANGERSON; LEAN, 1998). Além disso, a quercetina e a epicatequina foram mais eficientes que as vitaminas C e E na inibição da oxidação da LDL pela enzima 15-lipoxigenase (SILVA; ABDALLA; TERAQ, 2000). Foi, também, demonstrado que a quercetina, um dos principais flavonóides encontrados em alimentos vegetais, é capaz de sequestrar $O_2^{\cdot-}$ e peróxidos lipídicos, inibindo a oxidação da LDL e os efeitos citotóxicos das LDL-ox em macrófagos (NEGRE-SALVAGYRE; SALVAGYRE, 1992; COS et al., 1998; OSADA et al., 2001).

Dentre os ácidos fenólicos, destacam-se os derivados do ácido cafeoilquínico, como o ácido clorogênico e seus isômeros. O ácido caféico está presente nos alimentos, principalmente esterificado com o ácido quínico, denominando-se ácido clorogênico (D'ARCHIVIO et al., 2007). O café é a maior fonte de ácido clorogênico na dieta humana, sendo que outras fontes dietéticas incluem frutas, legumes, grãos e a erva mate, a qual possui particular importância para a população do sul do Brasil (CARINI et al., 1998; CLIFFORD, 2000; MONTEIRO;

TRUGO, 2005). Semelhante aos flavonóides, os ácidos clorogênico e caféico são ótimos antioxidantes *in vitro* (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996, SOARES, 2002), inclusive com capacidade de inibir a oxidação da LDL (LARANJINHA; ALMEIDA; MADEIRA, 1994; NARDINI et al., 1998).

2.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um termo utilizado para caracterizar o desequilíbrio nas concentrações das ERO e ERN e os mecanismos de defesa antioxidantes do organismo (SIES, 1986). No entanto, esse conceito vem se adaptando às recentes descobertas que demonstram que as ERO e ERN podem atuar como segundos mensageiros de vias específicas na sinalização celular. Esses dois conceitos têm sido recentemente incorporados dentro de uma nova definição: "um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a um desarranjo da sinalização e do controle redox e/ou a um dano molecular (JONES, 2006).

Há vários métodos reconhecidos para avaliar o estado de estresse oxidativo, entretanto, nenhum destes pode ser considerado padrão-ouro. Com base em evidências encontradas na literatura, três metodologias têm sido utilizadas para avaliação do estresse oxidativo em sistemas biológicos: *i*) determinação da concentração de antioxidantes; *ii*) determinação de indicadores indiretos da atividade das espécies reativas e; *iii*) avaliação direta das espécies reativas (JACKSON, 1999).

Dentre os indicadores de LPO, propostos para investigação do estresse oxidativo *in vivo* e *in vitro*, destacam-se o malondialdeído (MDA), determinado pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobárbítico (TBARS - do inglês Thiobarbituric Acid Reactive Substances); os LOOH, quantificados através da oxidação do ferro com alaranjado de xilenol (FOX - do inglês Fe⁺³ *xylenol orange*); e os dienos conjugados, pentano, etano e os F₂-isoprostanos (FIRUZI et al., 2006).

As proteínas também são comumente atacadas pela ação das ERO e ERN, portanto, torna-se importante a análise da oxidação destes componentes moleculares. Diversos processos patológicos e fisiológicos apresentam oxidações catalisadas por metais que têm sido identificados

como uma modificação covalente de proteínas. Uma característica desta modificação oxidativa é a introdução de grupos carbonil em resíduos de aminoácidos de proteínas. A reação destes grupos com reagentes carbonil-específicos fornece um método de detecção e quantificação de oxidação catalisada por metais, onde o 2,4-dinitrofenilhidrazina é um reagente carbonil clássico (LEVINE et al.,1990). Outros marcadores propostos para a avaliação das proteínas oxidadas ou carboniladas, são 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, 5-OH-citosina, 8-OH-adenina e 8-OH-guanina (JACKSON, 1999).

A avaliação da atividade antioxidante pode ser determinada a partir da concentração de antioxidantes no sangue e nas células ou pela determinação da atividade celular de enzimas antioxidantes (FANG; YANG; WU, 2002). Em estudos epidemiológicos e clínicos, além de dosagens individuais, tem sido proposta a avaliação da capacidade antioxidante dos fluidos biológicos, como, por exemplo, através da técnica FRAP (do inglês *ferric reducing antioxidant potential*), em que a capacidade antioxidante do plasma é verificada através do potencial antioxidante redutor férrico, ou ainda através do parâmetro TRAP (do inglês *total radical-trapping antioxidant parameter*), em que são detectados os RO_2^* sequestrados pelos antioxidantes plasmáticos (WAYNER et al., 1985; BENZIE; STRAIN, 1996; CAO; PRIOR, 1998; GHISELLI et al. 2000; EVELSON et al., 2001).

A detecção direta de espécies reativas pode ser realizada através de técnicas de ressonância paramagnética de elétrons. Embora esta técnica seja eficaz para detectar espécies reativas em sistemas biológicos, o seu elevado custo e outras limitações metodológicas dificultam seu uso rotineiro (FANG; YANG; WU, 2002). Portanto, os estudos têm, frequentemente, utilizado métodos para aferição indireta das lesões oxidativas, sendo que dentre estes, destacam-se os espectrofotométricos e cromatométricos, que medem a atividade enzimática (SOD, CAT, GPx e GR) e/ou a concentração de tripeptídeos (glutathiona total, GSH e GSSG), LOOH e aldeídos (MDA). Estas medidas podem ser realizadas em tecidos, sangue e outros fluidos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os danos induzidos pelo estresse oxidativo têm sido associados à gênese de diversas doenças, como o câncer, DCV, aterosclerose, hipertensão, injúria isquemia-reperusão, diabetes, doenças

degenerativas, artrite reumatóide e envelhecimento (VALKO et al., 2007).

2.3.1 Estresse oxidativo, doenças cardiovasculares e dislipidemia

As DCV são as principais doenças associadas ao estresse oxidativo. As dislipidemias e os valores plasmáticos elevados da LDL constituem-se os fatores de risco primários para o desenvolvimento de DCV (KADÀR; GLASZ, 2001). As dislipidemias podem ser definidas como alterações metabólicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo lipídico, que ocasionam alterações nos valores plasmáticos das lipoproteínas. Do ponto de vista laboratorial, as dislipidemias podem ser classificadas como hipercolesterolemia isolada (aumento do LDL-c ≥ 160 mg/dL), hipertrigliceridemia isolada (aumento dos triglicédeos (TG) ≥ 150 mg/dL), hiperlipidemia mista (aumento do LDL-c ≥ 160 mg/dL e TG ≥ 150 mg/dL) e diminuição isolada do HDL-c (≤ 40 mg/dL para homens e ≤ 50 mg/dL para mulheres) associada ou não ao aumento de TG ou LDL-c (SBC, 2007).

A maioria das DCV resulta de complicações derivadas da aterosclerose, sendo que as dislipidemias estão associadas a essas doenças basicamente por darem início ao processo aterogênico (MADAMANCHI; VENDROV; RUNGE, 2005; SINGH; JIALAL, 2006). Segundo a IV Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007), a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre.

Um importante evento de iniciação da aterosclerose é a presença de LDL-ox no espaço subendotelial da parede arterial. A LPO, a qual ocorre em membranas celulares e na LDL, é uma das maiores contribuintes para a doença aterosclerótica e disfunção endotelial (DUSTING; TRIGGLE, 2005). O processo de oxidação aumenta a aterogenicidade da LDL, favorecendo o recrutamento dos monócitos circulantes para o espaço intimal, inibindo a capacidade dos macrófagos residentes de deixarem a íntima, promovendo assim a formação das células espumosas e, por fim, causando a disfunção endotelial (STOCKER; KEANEY, 2004; ZHAO; SHEN, 2005).

2.3.2 Estresse oxidativo, doenças cardiovasculares e dieta

A dieta tem sido considerada um fator preponderante ao desenvolvimento de DCV (O'KEEFE et al., 2008). Vários estudos relataram que a alta ingestão de ácidos graxos saturados e de colesterol, assim como de ácidos graxos isômeros *trans*, está associada às dislipidemias e DCV (NICKLAS et al., 2002; DEBOER et al., 2003; CASTRO et al., 2004). Por outro lado, diversos estudos mostraram evidências de que a prevenção das dislipidemias pode ser resultante de um elevado consumo de frutas, vegetais, oleaginosas e grãos integrais, os quais estão associados, significativamente, com menor risco de desenvolvimento de DCV. O efeito protetor desses alimentos é provavelmente mediado por diversos nutrientes benéficos à saúde, tais como gorduras insaturadas, vitaminas, minerais e fibras (KUSHI; LENART; WILLETT, 1995; BAZZANO et al., 2002; HU; WILLET, 2002, SBC, 2007).

Dentre os constituintes alimentares com propriedades antioxidantes, estão as vitaminas A, C e E, os carotenóides β -caroteno e licopeno e os compostos fenólicos, sendo que estes componentes estão relacionados à proteção contra o estresse oxidativo e às DCV (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; STEINBERG; LEWIS, 1997; STEINBERG; WITZTUM, 2002).

De fato, estudos prospectivos verificaram uma associação inversa entre o consumo de carotenóides e vitaminas C e E, através da dieta ou de suplementação, com DCV (GAZIANO et al., 1995; KLIPSTEIN-GROBUSCH et al., 1999; SIMON; HUDES, 1999; FORD; GILES, 2000; OSGANIAN et al., 2003; STOCKER, 2007). Entretanto, as vitaminas não são os únicos componentes ativos nos alimentos. Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram uma associação inversa entre o consumo de compostos fenólicos e a mortalidade por DCV (HERTOG et al., 1993a; HERTOOG et al., 1995; KNEKT et al., 1996; GELEIJNSE et al., 2002; HUXLEY; NEIL, 2003).

A utilização de alimentos que apresentam atividade antioxidante tem sido verificada em diversos estudos, sendo que, na região sul do Brasil, um alimento que se destaca entre as espécies vegetais, apresentando elevado potencial antioxidante é a erva mate (*Ilex paraguariensis*).

2.4 Erva mate

A erva mate é uma planta originária da região subtropical da América do sul, estando presente no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, sendo considerada uma planta economicamente importante para esses países. A infusão ou decocção das partes aéreas da *Ilex paraguariensis* é amplamente utilizada no preparo de uma bebida muito apreciada pelo seu sabor amargo peculiar e de propriedades estimulantes (FILIP et al., 2001, BASTOS et al., 2007).

A erva mate pode ser preparada de quatro diferentes formas: o tradicional chimarrão, o mate cozido e o tererê (preparado com as folhas verdes) e o chá mate (preparado com as folhas tostadas) (MAZZAFERA, 1997; BASTOS et al., 2005).

A infusão de erva mate é conhecida por suas propriedades estimulantes, devido à presença dos alcalóides purínicos, cafeína e teobromina (BASTOS et al., 2007; HECK; DE MEIJA, 2007). Outros constituintes de importância da *Ilex paraguariensis* são as saponinas, que demonstraram efeito hipocolesterolemiantes em ratos (STEIN et al., 2005) e alguns compostos fenólicos (ácidos clorogênico e caféico), incluindo os flavonóides quercetina, rutina e luteolina (CARINI et al., 1998; BASTOS et al., 2005, BASTOS et al., 2006a) que conferem o potencial antioxidante desta espécie vegetal.

Estudos, utilizando diversos modelos de oxidação *in vitro* e *ex vivo*, já constataram que os compostos fenólicos presentes na erva mate têm propriedades antioxidantes. Como por exemplo, a inibição da oxidação de lipossomas (FILIP et al., 2000), de partículas de LDL (GUGLIUCCI; STAHL, 1995; GUGLIUCCI, 1996; BRACESCO et al., 2003) e como sequestradores de RL (CAMPOS; ESCOBAR; LISSI, 1996). Também se observou uma correlação positiva entre o conteúdo de compostos fenólicos, particularmente, ácido clorogênico, e a atividade antioxidante de extratos de diferentes espécies de *Ilex paraguariensis* (FILIP et al., 2000; SCHINELLA et al., 2000). Carini e colaboradores (1998) e Silva e colaboradores (2008) demonstraram que os compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* atuam como antioxidantes não só, isoladamente, mas também de forma sinérgica. De particular importância, são os relatos de que a ingestão aguda de infusão de erva mate (chimarrão) por indivíduos

saudáveis aumentou a proteção antioxidante do plasma (GUGLIUCCI, 1996) e das partículas de LDL (SILVA et al., 2008) contra as reações mediadas por ERO e ERN. No entanto, resta estabelecer se o consumo prolongado de erva mate, associado ou não à intervenção dietética, por indivíduos dislipidêmicos, diminui o estresse oxidativo avaliado pela medida de marcadores sanguíneos.

CAPÍTULO 3
MÉTODO GERAL

3. MÉTODO GERAL

3.1 Caracterização do estudo

Este estudo é caracterizado como um ensaio clínico randomizado, o qual foi desenvolvido no Laboratório de Lipídeos, Antioxidantes e Aterosclerose da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Teve duração de 120 dias, sendo 30 de monitoramento basal e 90 dias de período de intervenção. Este período foi estipulado conforme a IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemia e Prevenção de Aterosclerose (SBC, 2007) que preconiza intervenção, através de mudança de estilo de vida (alimentação) por até 90 dias antes do início da terapia medicamentosa.

3.2 População do estudo

A amostra foi composta por voluntários dislipidêmicos, com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos.

Os participantes foram recrutados na comunidade da UFSC, através de cartazes fixados nos murais do Hospital Universitário (HU) da UFSC, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), do Serviço Social do Comércio (SESC) de Florianópolis, da Clínica Cardiosport e através de e-mails. O período de recrutamento ocorreu entre os meses de fevereiro e agosto de 2008.

Foram incluídos os voluntários que apresentaram colesterol total (CT) ≥ 200 mg/dL, e/ou LDL-c ≥ 130 mg/dL, e/ou HDL-c ≤ 40 mg/dL ou 50 mg/dL, para homens ou mulheres respectivamente.

Os critérios de exclusão para a participação no estudo foram: uso de medicamento hipocolesterolemizante, presença de doenças hepáticas, renais, neoplasias, distúrbios tireoideanos, diabetes, angina, alcoolismo, tabagismo, uso de suplementos alimentares, obesidade mórbida e prática intensa de atividade física.

Após o início do estudo foram excluídos os participantes que apresentaram anormalidades nos exames laboratoriais de controle (uréia, creatinina, glicose, ácido úrico, hemograma completo e as atividades das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase), bem como ausência de manutenção

dos valores do perfil lipídico no período basal dentro de uma variação de 10%; que introduziram o uso de medicamentos; alteraram o nível de atividade física; que apresentaram intolerância à erva mate ou; que interromperam a ingestão da infusão por três dias consecutivos ou mais.

Todos os participantes foram orientados a não modificar o estilo de vida durante o estudo, mantendo a mesma alimentação pregressa (aqueles que não receberam intervenção dietética) e o mesmo nível de atividade física. Estas informações foram monitoradas todas as vezes que os indivíduos retornavam para as coletas sanguíneas. Não foram feitas modificações no tratamento dos indivíduos que recebiam medicação para a hipertensão.

3.3 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC, denominado “Efeito hipocolesterolêmico, hipoglicêmico, anti-inflamatório e antioxidante da erva mate (*Ilex paraguariensis*) em seres humanos, sob número de protocolo 140/2008 (ANEXO A).

A participação dos voluntários no estudo se deu mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

3.4 Protocolo experimental

O estudo teve duração de 120 dias, sendo os primeiros 30, de monitoramento basal. Neste período, realizou-se três coletas de sangue com intervalos de 15 dias (tempos -30, -15 e 0) para as determinações laboratoriais, a fim de verificar a variabilidade dos parâmetros bioquímicos de controle e do perfil lipídico (Figura 1).

Após os trinta dias de monitoramento (tempo 0) os indivíduos foram randomizados aleatoriamente em três diferentes grupos: erva mate (EM), dieta controle (DC), erva mate com dieta controle (ED).

Após a randomização, seguiu-se um período de 90 dias de intervenção, totalizando quatro encontros, sendo que os três primeiros tiveram intervalos de 20 dias e, entre o penúltimo e o último, 30 dias (Figura 1). Em todos os momentos foram realizadas coletas sanguíneas

para as determinações bioquímicas, bem como a avaliação do consumo alimentar e monitoramento de variáveis antropométricas e de pressão arterial.

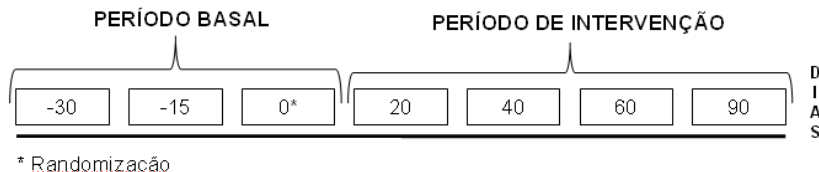


Figura 1 Desenho do estudo de intervenção na avaliação do efeito antioxidante da erva mate em indivíduos com dislipidemia.

3.4.1 Grupo dieta controle (DC)

Os participantes deste grupo receberam orientações para uma dieta hipocolesterolêmica padrão, pobre em gorduras saturadas, *trans* e colesterol, com base nas recomendações da IV Diretriz Brasileira para Dislipidemia e Aterosclerose (SBC, 2007). A partir do consumo dietético habitual de cada indivíduo, a dieta controle consistiu na diminuição de carnes vermelhas, ovos, manteiga e bacon e a substituição de alimentos como queijos, leite e iogurte pela versão desnatada.

3.4.2 Grupo erva mate (EM)

Os integrantes deste grupo receberam a erva mate tostada e acondicionada em sacos plásticos hermeticamente fechados, uma peneira e um copo graduado. Foram orientados a preparar, diariamente, a infusão de mate tostado, na proporção de 20 mg/mL, e ingerir, aproximadamente, 330 mL do chá três vezes ao dia, junto às principais refeições, perfazendo um consumo total de aproximadamente 1 litro de infusão de erva mate por dia. A infusão foi obtida pela adição de água quente (80-90°C) sobre folhas secas, moídas e tostadas de *Ilex paraguariensis* comercial, fornecida pela empresa Leão Júnior (Curitiba-PR). Após 10 min de infusão, a bebida foi filtrada e consumida pelos participantes. A erva mate foi coletada em Irati-PR, Brasil, e a espécie identificada como autêntica *Ilex paraguariensis* pelo Departamento de Botânica da UFSC e uma contra prova foi armazenada no mesmo local com o código FLOR 37066.

3.4.2.1 Determinação dos fenóis e saponinas totais da erva mate

O conteúdo de fenóis totais da infusão de erva mate tostada foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, segundo método descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999). Cinquenta microlitros do extrato aquoso de erva mate foram misturados com 150 μL de etanol (95%), 800 μL de água destilada e 80 μL do reagente de Folin-Ciocalteu (50%). Após 5 min, foram adicionados 150 μL de bicarbonato de sódio 5% e a mistura permaneceu à temperatura ambiente por 1 h, na ausência de luz. A leitura da absorbância do produto colorido foi realizada em comprimento de onda de 765 nm (espectrofotômetro Spectrum SP2000 – Xangai, China). O ácido clorogênico foi usado como padrão e os resultados foram expressos em mg/mL.

A quantificação das saponinas totais na infusão de erva mate tostada foi realizada por método espectrofotométrico, conforme extração descrita por Gnoatto, Schenkel e Bassani (2005) e reação com vanilina e ácido perclórico descrita por Fan e He (2006). As saponinas contidas em 10 mL das infusões foram submetidas à hidrólise com 5 mL de HCl 4N sob refluxo por 2 h. As sapogeninas foram extraídas com a adição de 6 mL de clorofórmio, em um processo repetido por quatro vezes. A fração clorofórmica foi evaporada em evaporador rotativo e o resíduo foi ressuspenso em 2,5 mL de etanol. Para a quantificação, alíquotas da solução etanólica foram evaporadas e adicionadas 300 μL de vanilina a 5%, preparada em ácido acético glacial, e 1 mL de ácido perclórico sobre o resíduo seco. A mistura foi mantida em banho-maria a 60 °C por 45 min e, logo após, resfriada em banho de gelo. Por fim, acrescentou-se 1,0 mL de ácido acético glacial e a leitura da absorbância foi realizada em 548 nm. Como padrão, utilizou-se o ácido ursólico, núcleo triterpênico majoritário das saponinas de *Ilex paraguariensis* (GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005) e os resultados foram expressos em mg/mL.

3.4.2.2 Caracterização dos compostos fenólicos da erva mate por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise dos compostos fenólicos, via CLAE do extrato aquoso de erva mate, foi realizada através da injeção de 10 µL das amostras em cromatógrafo Shimadzu LC-10 (Quioto, Japão), equipado com coluna de fase reversa (Shim-pack C18, 4,6 mm Ø X 25 cm comprimento) termostatizada a 40 °C e detector UV-visível (Shimadzu SPD 10A, 280 nm e 306 nm) de acordo com método previamente descrito (STRASSMANN et al., 2008). A fase móvel utilizada foi composta de água:acetato de etila:n-butanol (350:1:10, v/v/v), com fluxo de 0,8 mL/min. Os compostos foram identificados e quantificados através da utilização de padrões externos.

3.4.3 Grupo erva mate com dieta controle (ED)

Os indivíduos do grupo ED receberam a dieta controlada em gorduras e infusão de erva mate tostada simultaneamente.

3.5 Instrumentos e técnicas de coleta de dados

3.5.1 Avaliação clínica e antropométrica

Inicialmente, os participantes responderam um questionário com dados sócio-demográficos, história clínica e familiar, alterações gastrintestinais, alergias alimentares, consumo hídrico, tabagismo, uso de medicamentos e prática de atividade física (Apêndice B).

Para o monitoramento da pressão arterial, foi certificado de que o voluntário não estivesse com a bexiga cheia, não tivesse praticado exercícios físicos ou fumado até 30 min antes à aferição. Houve um descanso de 5 a 10 min e, no momento da medida, foram mantidas as pernas descruzadas e o braço na altura do coração. O manguito usado foi da marca Embramac®, com bolsa de borracha de largura igual a 40% e comprimento igual a 80% da circunferência do braço. O estetoscópio utilizado foi da marca BD®. Foi palpado o pulso radial e inflado até seu desaparecimento para estimar a pressão sistólica. Posicionou-se a campânula do estetoscópio sobre a artéria braquial e foi inflado,

rapidamente, até ultrapassar 20 a 30 mmHg, o nível estimado da pressão sistólica. Em seguida, o manguito foi desinflado lentamente, a pressão sistólica determinada no aparecimento dos sons de Korotkoff e a diastólica no desaparecimento deste som. Os valores não foram arredondados (SBC, 2004) (Apêndice C).

Em todos os momentos do estudo, foram monitorados os parâmetros antropométricos (peso, altura, circunferências da cintura, do abdômen e do quadril) (Apêndice C). Para a aferição do peso, utilizou-se a balança digital da marca Marte® PP180, com capacidade máxima de 180 kg e sensibilidade de 0,1 kg. Os indivíduos deviam estar descalços ou com meias finas e vestindo roupas leves, permanecendo em pé sobre a plataforma, com os pés unidos, com o peso igualmente distribuído em ambos os pés e os braços pendentes ao lado do corpo (OMS, 1995).

A altura foi obtida através do antropômetro da marca Seca®, com altura máxima de 220 cm e escala de 0,1 cm. Os participantes deviam permanecer em pé, com os braços pendentes ao lado do corpo, colocando as superfícies posteriores dos calcanhares, as nádegas e a região occipital em contato com a parede. A cabeça foi posicionada de modo que a linha da visão ficasse perpendicular ao corpo. A régua foi posicionada até o ponto mais alto da cabeça, com uma pressão suficiente para comprimir o cabelo (OMS, 1995). O índice de massa corporal (IMC) foi calculado através da razão peso (kg) e altura (m) ao quadrado e classificado de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2000).

3.5.2 Avaliação do consumo alimentar

Para monitorar qualitativamente o consumo alimentar foram utilizados os métodos: recordatório de 24 horas (R24h) (Apêndice D) e registro alimentar de 3 dias (Apêndice E).

O R24h foi aplicado por nutricionista, com auxílio de medidas caseiras e um registro fotográfico para inquéritos dietéticos (ZABOTTO, 1996) somente no primeiro encontro (tempo -30), a fim de verificar possíveis associações da alimentação do dia anterior com os parâmetros bioquímicos analisados.

Nos encontros subsequentes, foi entregue o registro alimentar

de 3 dias, o qual os participantes preencheram com a descrição dos alimentos consumidos em um dia de semana, um no final de semana e o outro na data anterior à coleta sanguínea.

Os voluntários foram orientados a preencher o formulário, indicando o tipo de refeição, horários, tipo de alimentos e quantidades consumidas. Lembrando que só deviam ser anotadas as quantidades dos alimentos ingeridos.

Para melhor compreensão e correto preenchimento do registro alimentar, foram demonstradas medidas caseiras padrões, como talheres (colher de café, chá, sobremesa, sopa e servir, escumadeira, concha, pegador); pratos (pires, sobremesa, fundo e raso); copos (requieirão, americano, duplo); xícaras e canecas; e taça de sobremesa. Frutas, pães, bolachas, doces foram quantificados em fatias, pedaços ou unidades com seus respectivos tamanhos (pequeno, médio e grande). Para alimentos como arroz, macarrão, saladas, legumes, purês, carne picada ou moída, doce mole e outros, foram quantificados em colheres e escumadeiras (rasas ou cheias) ou pegadores. Feijão, sopas e molhos foram determinados em colheres (rasas ou cheias) ou conchas (pequena, média ou grande). As carnes foram quantificadas em tamanho pequeno, médio e grande, conforme orientação prévia de tamanhos de porções. Os tipos de preparações foram especificados (frito, cozido, assado, ensopado, grelhado, à milanesa, refogado). Os participantes foram orientados a ser os mais fidedignos possíveis na marcação, inclusive anotando “pequenas ingestões”, popularmente, conhecidas por “beliscos”.

3.5.3 Avaliação laboratorial

Foram coletadas amostras sanguíneas (20 mL) dos voluntários, após jejum de 12-14 h, através de punção da veia intermédia do antebraço, com sistema a vácuo, por um profissional da área da farmácia, (Vacuntainer-BD-São Paulo/Brasil) em tubos secos ou com ácido etileno-diaminoacético (EDTA). Para a separação do soro e do plasma, os tubos foram centrifugados (1000 x g por 15 min). O soro foi usado na determinação da capacidade antioxidante, dos hidroperóxidos lipídicos, da atividade da enzima paroxonase, das variáveis do perfil lipídico, da uréia e creatinina e das enzimas hepáticas. Utilizou-se o

plasma para a quantificação da concentração de proteína carbonilada. Uma alíquota de sangue total foi usada para o isolamento de eritrócitos na determinação de glutathiona reduzida e para a realização do hemograma. Os marcadores do estresse oxidativo foram avaliados imediatamente após a coleta do sangue ou após o armazenamento das amostras a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante uma a quatro semanas, dependendo do marcador, conforme descrito por Firuzi e colaboradores (2006). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.5.3.1 Exames laboratoriais

As concentrações séricas de CT e TG foram determinadas por métodos enzimáticos, automatizados e colorimétricos (reação de Trinder), usando as enzimas colesterol-oxidase e glicerol fosfato oxidase, respectivamente, e o HDL-c por método homogêneo, em equipamento automatizado *Wiener Analyzer*, de acordo com as instruções do fabricante (Wiener Laboratórios S.A.I.C - Rosario, Argentina). O LDL-c foi calculado pela equação de Friedewald (Friedewald, Levy & Fredrickson, 1972): $\text{LDL} = (\text{CT} - (\text{HDL} + \text{TG}/5))$ e o Não HDL-c foi obtido pela diferença do CT e do HDL-c.

Para um maior controle intrapessoal das variáveis bioquímicas, foram determinadas as concentrações sanguíneas de uréia, creatinina, glicose, ácido úrico (UR), hemograma completo e as atividades das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase. Essas análises foram avaliadas pelos métodos usuais na rotina de laboratório, em equipamentos automatizados – *Wiener Analyzer* (Wiener Laboratórios S.A.I.C. - Rosario, Argentina) e Sysmex XE-2100D (Kobe, Japão), segundo as instruções dos fabricantes.

3.5.3.2 Estresse oxidativo

O estado de estresse oxidativo foi avaliado a partir da determinação da concentração de glutathiona reduzida eritrocitária, capacidade antioxidante, hidroperóxidos lipídicos, proteínas plasmáticas oxidadas e enzima paroxonase.

3.5.3.2.1 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante sérica foi determinada através do potencial antioxidante redutor férrico (FRAP – do inglês, *ferric reducing antioxidant potential*), de acordo com a técnica descrita por Benzie e Strain (1996). Neste ensaio, os antioxidantes presentes no soro foram avaliados como redutores do Fe^{+3} a Fe^{+2} , o qual é quelado pela 2,4,6-tri (2-pyridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ com absorvância máxima em 593 nm. Dez microlitros de plasma foram misturados a 1 mL de reagente de trabalho (FeCl_3 1,7 mM preparado em acetato de sódio 300 mM, pH 3,6 e TPTZ 0,8 mM preparado em ácido clorídrico (HCl) 40 mM). Incubou-se as amostras por 15 min a 37° C e, posteriormente, a absorvância foi lida em 593 nm contra o branco da reação. O trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E, foi utilizado como padrão e a capacidade antioxidante foi expressa em equivalentes trolox em $\mu\text{mol/L}$.

3.5.3.2.2 Glutaciona Reduzida

A glutaciona reduzida (GSH) foi determinada a partir de alíquota preparada em extrato ácido, através do método proposto por Beutler, Duron e Kelly (1963). A adição de 50 μL de ácido 3-ditionitrobenzóico 10 mM (DTNB) em tubos contendo 800 μL de Tampão fosfato 0,2 M e 50 μL da amostra, possibilita, após cerca de 3 min, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, de absorvância máxima em 412 nm. O branco foi preparado substituindo-se o extrato ácido por água deionizada. A concentração de GSH foi calculada, utilizando-se a equação da reta com os valores da concentração e da absorvância da curva-padrão, preparada com diferentes concentrações de GSH (Sigma-Aldrich, St Louis – EUA). O resultado final foi multiplicado pelo fator de diluição (2,5) durante o procedimento de obtenção do extrato ácido e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$.

3.5.3.2.3 Enzima paroxonase

A atividade da enzima paroxonase (PON1) foi determinada de acordo com o método descrito por Gan, Smolen, Eckerson e Ladu (1991). A reação foi iniciada com a adição de 20 μL de soro diluído 20 vezes em 2 mL de tampão Tris HCl 20 mmol/L, pH 8,0, contendo CaCl_2 1 mmol/L e acetato de fenila 1 mmol/L, usado como substrato. A cinética da reação de formação do fenol foi monitorada com leituras a cada minuto, durante 5 min, e lido a 270 nm, a 25°C. Para corrigir a hidrólise espontânea do acetato de fenila, foi incluído um branco de reação. No cálculo da atividade, considerou-se o coeficiente de absorvibilidade molar de $1,31 \times 10^3 \text{ L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em U/mL, sendo que uma unidade arilesterase corresponde a 1 μmol de acetato de fenila hidrolisado por minuto, por mL de soro.

3.5.3.2.4 Hidroperóxidos lipídicos

Os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) presentes no soro foram determinados pelo método da oxidação do ferro com alaranjado de xilenol, conforme descrito por Jiang, Hunt e Wolff (1992). O princípio do método se baseia na rápida oxidação do Fe^{+2} a Fe^{+3} em meio ácido, mediada pelos peróxidos lipídicos. O Fe^{+3} na presença de alaranjado de xilenol forma um complexo (Fe^{+3} -alaranjado de xilenol) que é quantificado espectrofotometricamente em 560 nm. Alíquotas de 90 μL de soro foram misturadas com 10 μL de trifetilfosfina (TEPP) 20 mM ou com 10 μL de metanol (branco da amostra). Os tubos foram agitados em agitador tipo vortex e mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 30 min, com agitações subsequentes a cada 10 min. Após este período, 1,0 mL de reagente de trabalho, contendo alaranjado de xilenol 1 mM e sulfato de ferro e amônio 2,5 mM preparados em H_2SO_4 250 mM e BHT 4,4 mM em metanol, foi adicionado aos tubos, os quais foram agitados em vortex e novamente mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 60 min, com agitações a cada 10 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 16000 x g por 10 min e as absorbâncias foram lidas em 560 nm contra um branco da reação. A concentração de LOOH foi calculada pela diferença entre as absorbâncias das amostras incubadas

com metanol (branco) e com TPP, utilizando-se o H_2O_2 como padrão. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$.

3.5.3.2.5 Proteína carbonilada

A determinação das proteínas modificadas oxidativamente ou carboniladas (PC) foi realizada através do método proposto por Levine et al. (1990) que consiste na reação da 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as carbonilas das proteínas, formando hidrazonas que podem ser detectadas espectrofotometricamente. Aliquotas de $100\mu\text{L}$ de plasma foram misturadas com $600\mu\text{L}$ de DNPH 10 mM e $600\mu\text{L}$ de ácido clorídrico (HCl) 0,2 N (branco da amostra) e os tubos mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 60 min, com agitações regulares a cada 10 min. Em seguida, $600\mu\text{L}$ de TCA 20% foram adicionados aos tubos, os quais foram novamente agitados em vortex, mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 10 min e centrifugados a $11000 \times g$ por 5 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado três vezes com $800\mu\text{L}$ de etanol-acetato de etila (1:1), com incubações intermediárias de 10 min à temperatura ambiente. Após este período, os tubos foram centrifugados a $15000 \times g$ por 5 min a 4°C e a absorbância do sobrenadante foi lida em 360 nm, contra a solução de guanidina 6,0 M. Para a determinação da quantidade de proteínas totais, o sobrenadante do branco foi lido em 280 nm, utilizando albumina sérica bovina como padrão. A concentração de proteínas carboniladas foi calculada, usando-se o coeficiente de absortividade molar de $22.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/mg}$.

3.6 Tratamento e análise dos dados

Os dados quantitativos estão apresentados na forma de média e desvio ou erro padrão, enquanto que os categóricos se apresentam na forma de frequência absoluta. Para a análise estatística dos parâmetros bioquímicos, primeiramente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*, sendo os quantitativos sem distribuição normal transformados em números logarítmicos. Os valores foram comparados intragrupos (efeito temporal dos tratamentos) pela análise de variância para medidas repetidas (*One Way Repeated*

Measures ANOVA) e intergrupos foram avaliados por análise de variância (ANOVA). O teste complementar de *Tukey* foi utilizado nas análises intra e inter grupos. Para a análise inter grupos foram utilizados tanto os valores absolutos quanto os de variação, em relação ao período basal e entre os tempos. Para a tabulação dos dados fez-se uso do *software* Excel, e as análises estatísticas foram efetuadas no *software* SigmaStat versão 2.03.

Título

Atividade antioxidante da erva mate (*Ilex paraguariensis*) em indivíduos dislipidêmicos

Resumo

O objetivo deste estudo foi o de avaliar a atividade antioxidante da ingestão de erva mate em indivíduos dislipidêmicos. Os voluntários foram monitorados por 30 dias (período basal) e randomizados em três grupos: dieta controle (DC), erva mate (EM) e erva mate com dieta controle (ED). Os participantes receberam intervenção por 90 dias, com avaliações após 20, 40, 60 e 90 dias. Para determinar o potencial antioxidante foram analisados FRAP, GSH, PON1, LOOH e PC e, para o perfil lipídico, foram avaliados CT, HDL-c, LDL-c, Não HDL-c e TG. Foi observado aumento significativo do FRAP e GSH nos três grupos e de PON1 no grupo ED. Não foi observada redução significativa nos valores de LOOH e PC. Houve diminuição significativa do LDL-c nos grupos EM e DC e do Não HDL-c nos três grupos. A ingestão da erva mate demonstrou efeito antioxidante e hipolipemiante em indivíduos dislipidêmicos.

Palavras chave

Ilex paraguariensis, erva mate, antioxidantes, dislipidemia, compostos fenólicos, humanos.

1. Introdução

Os danos induzidos pelo estresse oxidativo nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de artrites reumáticas, aterosclerose, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão e problemas pulmonares (Fang, Yang & Wu, 2002).

Dentre as principais doenças relacionadas ao estresse oxidativo estão as cardiovasculares (DCV), as quais são responsáveis por, aproximadamente, 30% das mortes, por ano, no mundo (WHO, 2008), sendo as doenças coronarianas e as cerebrovasculares, secundárias à aterosclerose, responsáveis por dois terços desses óbitos (Beaghole, Saracci & Panico, 2001). A hipercolesterolemia e, particularmente, os

valores plasmáticos elevados da lipoproteína de baixa densidade (LDL – do inglês *Low Density Lipoprotein*), são considerados fatores primários de risco para essas doenças (Kadar & Glasz, 2001), devido à importante participação da LDL oxidada em todos os estágios da doença aterosclerótica (Stocker & Keane, 2004). Estudos têm demonstrado, claramente, que a redução e/ou a prevenção do aumento da concentração plasmática de colesterol total e LDL-colesterol (LDL-c) reduzem o risco de eventos como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, e da mortalidade por causas cardiovasculares (Grundy, 2002; Sever et al., 2003). Da mesma forma, estudos epidemiológicos demonstraram uma associação inversa entre a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes, como as vitaminas A, C e E e os compostos fenólicos e a morbimortalidade por DCV (Geleijnse, Launer, Van der Kuip, Hofman & Witteman, 2002; Osganian, Stampfer, Rimm, Spiegelman, Manson & Willett, 2003). Assim, é crescente o interesse em tratamentos que visem à redução do estresse oxidativo, particularmente, através da utilização de antioxidantes de origem alimentar (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Os compostos fenólicos existem, naturalmente, em uma grande variedade de alimentos e bebidas de origem vegetal e fazem parte da dieta humana, sendo que o consumo de alimentos ricos nesses compostos tem sido associado a uma diminuição no risco de DCV (Geleijnse, Launer, Van der Kuip, Hofman & Witteman, 2002).

Dentre as várias espécies de plantas pesquisadas, a erva mate (*Ilex paraguariensis*), espécie vegetal encontrada na América do Sul, apresenta alguns compostos fenólicos (principalmente derivados do ácido cafeoilquínico, como o ácido clorogênico e seus isômeros), incluindo os flavonóides quercetina, rutina e luteolina (Carini, Facino, Aldini, Calloni & Colombo, 1998; Bastos, Fornari, Queiroz & Torres, 2006). O extrato aquoso de erva mate apresentou elevado potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* (Carini, Facino, Aldini, Calloni & Colombo, 1998; Filip, Lotito, Ferraro & Fraga, 2000; Schinella, Troiani, Davila, de Buschiazzo & Tournier, 2000, Chandra & De Mejia, 2004; Bastos, Ishimoto, Marques, Ferri, Torres, 2006; Matsumoto et al., 2009), e inibiu, inclusive, a oxidação *in vitro* e *ex vivo* do plasma e da LDL (Gugliucci & Stahl, 1995; Gugliucci, 1996; Bracesco et al., 2003; da Silva, Neiva, Shirai, Terao & Abdalla, 2008). Um estudo desenvolvido em nosso laboratório também demonstrou que o extrato aquoso de erva

mate inibiu a progressão da aterosclerose em coelhos alimentados com colesterol (Mosimann, Wilhelm, da Silva, 2006).

Além dos compostos fenólicos, a erva mate também apresenta outros constituintes de potencial terapêutico, como é o caso das saponinas, que são compostos que têm sido associados à diminuição dos lipídeos sanguíneos em animais e humanos (Stein et al., 2005; Pang, Choi & Park, 2008; De Moraes et al., 2009);

Diante do exposto, onde foi demonstrado que o extrato aquoso de erva mate possui atividade antioxidante *in vitro*, que aumenta a proteção do plasma e da LDL-c de seres humanos contra reações de oxidação, que apresenta capacidade para inibir a progressão da aterosclerose experimental e que possui capacidade em reduzir os lipídeos plasmáticos de humanos, resta estabelecer se o consumo prolongado de erva mate, associado ou não a uma dieta controle, aumenta a atividade antioxidante em indivíduos dislipidêmicos.

2. Material e Métodos

2.1 Casuística e critérios éticos

Os voluntários foram recrutados em Florianópolis na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), no Serviço Social do Comércio (SESC), em uma clínica cardiológica de Florianópolis e, através de e-mails. Foram incluídos no estudo voluntários com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos e que apresentassem dislipidemia. De acordo com a IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemia e Prevenção de Aterosclerose (SBC, 2007), a dislipidemia é caracterizada por colesterol total (CT) ≥ 200 mg/dL, e/ou colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) ≥ 130 mg/dL, e/ou colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL-c) ≤ 40 mg/dL ou 50 mg/dL, para homens ou mulheres, respectivamente, associada ou não ao aumento de triglicerídeos (TG) ou de LDL-c.

Os critérios de exclusão, para a participação no estudo, foram: uso de medicamento hipocolesterolemizante, presença de doenças hepáticas, renais, neoplasias, distúrbios tireoidianos, diabetes, angina, alcoolismo, tabagismo, uso de suplementos alimentares, obesidade mórbida e prática intensa de atividade física. Após o início do estudo,

foram excluídos os participantes que apresentaram anormalidades nos exames laboratoriais de controle (uréia, creatinina, glicose, ácido úrico, hemograma completo e as atividades das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase), bem como ausência de manutenção dos valores do perfil lipídico no período basal dentro de uma variação de 10%; que introduziram o uso de medicamentos; alteraram o nível de atividade física; que apresentaram intolerância à erva mate ou; que interromperam a ingestão da infusão de erva mate por três dias consecutivos ou mais.

Cento e trinta e cinco (135) indivíduos iniciaram o estudo, 38 desistiram no período basal, 21 foram excluídos por apresentarem valores de perfil lipídico inferiores aos critérios de inclusão, e 2 foram excluídos por apresentarem angina durante o período basal. Setenta e quatro voluntários participaram, efetivamente, da pesquisa, com idade média de $48,5 \pm 11,6$, sendo 17 homens e 57 mulheres.

Todos os voluntários foram orientados a não fazer qualquer alteração no seu estilo de vida habitual. Estas informações foram monitoradas todas as vezes que eles retornavam para as coletas sanguíneas. Não foram feitas modificações no tratamento dos indivíduos que recebiam medicação para a hipertensão.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina sob protocolo n^o 140/2008, e a participação dos voluntários se deu mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

2.2 Desenho do estudo

Os indivíduos foram monitorados por 30 dias, caracterizando o período basal. Após esse período, os indivíduos foram randomizados aleatoriamente em três diferentes grupos: a) dieta controle (DC) (n = 26); b) erva mate (EM) (n = 23); e c) erva mate com dieta controle (ED) (n = 25). Os participantes dos três grupos foram orientados por nutricionistas e receberam intervenção por 90 dias, sendo avaliados após 20, 40, 60 e 90 dias de tratamento.

2.3 Procedimentos antropométricos e dietéticos

Para a aferição do peso foi utilizada balança digital da marca Marte® PP180 com capacidade máxima de 180 kg e sensibilidade de

0.1 kg. Os indivíduos estavam descalços ou com meias finas e vestindo roupas leves, permanecendo de pé sobre a plataforma, com os pés unidos, com o peso igualmente distribuído em ambos os pés e os braços pendentes ao lado do corpo. A altura foi obtida através do antropômetro da marca Seca® com altura máxima de 220 cm e escala de 0.1 cm e foi utilizada para calcular o índice de massa corporal (IMC; kilogramas por metro quadrado).

Os participantes dos grupos EM e ED receberam a erva mate na forma tostada, acondicionada em sacos plásticos hermeticamente fechados, uma peneira e um copo graduado. Cada participante foi orientado a preparar diariamente a infusão, em uma proporção de 20 mg/mL, e ingerir aproximadamente 330 mL três vezes ao dia, junto às principais refeições, perfazendo um consumo total de aproximadamente 1 litro de infusão de erva mate por dia. A infusão de erva mate foi obtida pela adição de água quente (80 – 90°C) sobre folhas secas, moídas e tostadas de erva mate (*Ilex paraguariensis*), fornecida pela empresa Leão Júnior (Curitiba-PR). Após 10 min de infusão a bebida foi filtrada e consumida pelos participantes. A erva mate foi coletada em Irati-PR, Brasil, e a espécie foi identificada como autêntica *Ilex paraguariensis* pelo Departamento de Botânica da UFSC e uma amostra foi armazenada no mesmo local com o código FLOR 37066.

Os participantes dos grupos DC e ED receberam orientações para uma dieta hipocolesterolêmica padrão, pobre em gorduras saturadas, trans e colesterol, com base nas recomendações da IV Diretriz Brasileira para Dislipidemia e Aterosclerose (SBC, 2007). A partir do consumo dietético habitual de cada indivíduo, a dieta controle consistiu na diminuição de carnes vermelhas, ovos, manteiga e bacon e a substituição de alimentos como queijos, leite e iogurte pela versão desnatada.

2.4 Procedimentos analíticos da erva mate

2.4.1 Determinação dos fenóis e saponinas totais

O conteúdo de fenóis totais da infusão de erva mate tostada foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu segundo método descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999). Cinquenta microlitros do extrato aquoso de erva mate foram misturados

com 150 µL de etanol (95%), 800 µL de água destilada e 80 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (50%). Após 5 min, foram adicionados 150 µL de bicarbonato de sódio 5% e a mistura permaneceu à temperatura ambiente por 1 h, na ausência de luz. A leitura da absorbância do produto colorido foi realizada em comprimento de onda de 765 nm (espectrofotômetro Spectrum SP2000 – Xangai, China). O ácido clorogênico foi usado como padrão e os resultados foram expressos em mg/mL.

A quantificação das saponinas totais na infusão de erva mate tostada foi realizada por método espectrofotométrico, conforme extração descrita por Gnoatto, Schenkel e Bassani (2005) e reação com vanilina e ácido perclórico descrita por Fan e He (2006). As saponinas contidas em 10 mL das infusões foram submetidas à hidrólise com 5 mL de HCl 4N sob refluxo por 2 h. As sapogeninas foram extraídas com a adição de 6 mL de clorofórmio, num processo repetido por quatro vezes. A fração clorofórmica foi evaporada em evaporador rotativo e o resíduo foi re-suspenso em 2,5 mL de etanol. Para a quantificação, alíquotas da solução etanólica foram evaporadas e foram adicionados 300 µL de vanilina a 5%, preparada em ácido acético glacial, e 1 mL de ácido perclórico sobre o resíduo seco. A mistura foi mantida em banho-maria a 60°C por 45 min e, logo após, resfriada em banho de gelo. Por fim, acrescentou-se 1,0 mL de ácido acético glacial e a leitura da absorbância foi realizada em 548 nm. Como padrão, utilizou-se o ácido ursólico, núcleo triterpênico majoritário das saponinas de *Ilex paraguariensis*, e os resultados foram expressos em mg/mL.

2.4.2 Caracterização dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise dos compostos fenólicos via CLAE do extrato aquoso de erva mate foi realizada através da injeção de 10 µL das amostras em cromatógrafo Shimadzu LC-10 (Quioto, Japão), equipado com coluna de fase reversa (Shim-pack C18, 4,6 mm Ø X 25 cm comprimento) termostaticada a 40°C e detector UV-visível (Shimadzu SPD 10A, 280 nm e 306 nm) de acordo com método previamente descrito (Strassmann, Vieira, Pedrotti, Morais, Dias & Maraschin, 2008). A fase móvel utilizada foi composta de água:acetato de etila:n-butanol (350:1:10,

v/v/v), com fluxo de 0,8 mL/min. Os compostos foram identificados e quantificados através da utilização de padrões externos.

2.5 Procedimentos analíticos do sangue

2.5.1 Perfil lipídico e variáveis de controle

As concentrações séricas de CT e TG foram determinadas por métodos enzimáticos, automatizados e colorimétricos (reação de Trinder), usando as enzimas colesterol-oxidase e glicerol fosfato oxidase, respectivamente, e o HDL-c foi determinado por método homogêneo, em equipamento automatizado *Wiener Analyzer*, de acordo com as instruções do fabricante (Wiener Laboratórios S.A.I.C - Rosario, Argentina). O LDL-c foi calculado pela equação de Friedewald (Friedewald, Levy & Fredrickson, 1972): $LDL = (CT - (HDL + TG/5))$ e o Não HDL-c foi obtido pela diferença do CT e do HDL-c.

Para um maior controle intrapessoal das variáveis bioquímicas, foram determinadas as concentrações sanguíneas de uréia, creatinina, glicose, ácido úrico (UR), hemograma completo e as atividades das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase. Essas análises foram avaliadas pelos métodos usuais na rotina de laboratório, em equipamentos automatizados – *Wiener Analyzer* (Wiener Laboratórios S.A.I.C. - Rosario, Argentina) e Sysmex XE-2100D (Kobe, Japão), segundo as instruções dos fabricantes.

2.5.2 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante sérica foi determinada através do potencial antioxidante redutor férrico (FRAP – do inglês, *ferric reducing antioxidant potential*) de acordo com a técnica descrita por Benzie e Strain (1996). Neste ensaio, os antioxidantes presentes no soro foram avaliados como redutores do Fe^{+3} a Fe^{+2} , o qual é quelado pela 2,4,6-tri (2-pyridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ com absorvância máxima em 593 nm. Dez microlitros de plasma foram misturados a 1 mL de reagente de trabalho ($FeCl_3$ 1,7 mM preparado em acetato de sódio 300 mM, pH 3,6 e TPTZ 0,8 mM preparado em ácido clorídrico (HCl) 40 mM). As amostras foram incubadas por 15 min a 37°C e posteriormente a absorvância foi lida em

593 nm contra o branco da reação. O trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E, foi utilizado como padrão e a capacidade antioxidante foi expressa em equivalentes trolox em $\mu\text{mol/L}$.

2.5.3 Glutathiona reduzida

A glutathiona reduzida (GSH) foi determinada a partir de alíquota preparada em extrato ácido, através do método proposto por Beutler, Duron e Kelly (1963). A adição de 50 μL de ácido 3-ditionitrobenzóico 10 mM (DTNB) em tubos contendo 800 μL de Tampão fosfato 0,2 M e 50 μL da amostra, possibilita, após cerca de 3 min, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, de absorbância máxima em 412 nm. O branco foi preparado substituindo o extrato ácido por água deionizada. A concentração de GSH foi calculada utilizando-se a equação da reta com os valores da concentração e da absorbância da curva-padrão preparada com diferentes concentrações de GSH (Sigma-Aldrich, St Louis – EUA). O resultado final foi multiplicado pelo fator de diluição (2,5) durante o procedimento de obtenção do extrato ácido e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$.

2.5.4 Enzima paroxonase

A atividade da enzima paroxonase (PON1) foi determinada de acordo com o método descrito por Gan, Smolen, Eckerson e Ladu (1991). A reação foi iniciada com a adição de 20 μL de soro diluído 20 vezes em 2 mL de tampão Tris HCl 20 mmol/L, pH 8,0, contendo CaCl_2 1 mmol/L e acetato de fenila 1 mmol/L, usado como substrato. A cinética da reação de formação do fenol foi monitorada com leituras a cada minuto durante 5 min e lido a 270 nm, a 25°C. Para corrigir a hidrólise espontânea do acetato de fenila foi incluído um branco de reação. Para o cálculo da atividade, considerou-se o coeficiente de absorvidade molar de $1,31 \times 10^3 \text{ L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em U/mL, sendo que uma unidade arilesterase corresponde a 1 μmol de acetato de fenila hidrolisado por minuto, por mL de soro.

2.5.5 Hidroperóxidos lipídicos

Os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) presentes no soro foram determinados pelo método da oxidação do ferro com alaranjado de

xilenol, conforme descrito por Jiang, Hunt e Wolff (1992). O princípio do método se baseia na rápida oxidação do Fe^{+2} a Fe^{+3} em meio ácido, mediada pelos peróxidos lipídicos. O Fe^{+3} na presença de alaranjado de xilenol forma um complexo (Fe^{+3} -alaranjado de xilenol) que é quantificado espectrofotometricamente em 560 nm. Aliquotas de 90 μL de soro foram misturadas com 10 μL de trifetilfosfina (TEPP) 20 mM ou com 10 μL de metanol (branco da amostra). Os tubos foram agitados em agitador tipo vortex e mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 30 min com agitações subsequentes a cada 10 min. Após este período, 1,0 mL de reagente de trabalho, contendo alaranjado de xilenol 1 mM e sulfato de ferro e amônio 2,5 mM preparados em H_2SO_4 250 mM e BHT 4,4 mM preparado em metanol, foi adicionado aos tubos, os quais foram agitados em vortex e novamente mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 60 min, com agitações a cada 10 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 16000 x g por 10 min e as absorbâncias foram lidas em 560 nm contra um branco da reação. A concentração de LOOH foi calculada pela diferença entre as absorbâncias das amostras incubadas com metanol (branco) e com TEPP, e utilizando-se o H_2O_2 como padrão. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$.

2.5.6 Proteína carbonilada

A determinação das proteínas modificadas oxidativamente ou carboniladas (PC) foi realizada através do método proposto por Levine et al. (1990). O método consiste na reação da 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as carbonilas das proteínas formando hidrazonas que podem ser detectadas espectrofotometricamente. Aliquotas de 100 μL de plasma foram misturadas com 600 μL de DNPH 10 mM e 600 μL de ácido clorídrico (HCl) 0,2 N (branco da amostra) e os tubos mantidos em temperatura ambiente no escuro por 60 min, com agitações regulares a cada 10 min. Em seguida, 600 μL de TCA 20% foram adicionados aos tubos, os quais foram novamente agitados em vortex, mantidos em temperatura ambiente no escuro por 10 min e centrifugados a 11000 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado três vezes com 800 μL de etanol acetato de etila (1:1), com incubações intermediárias de 10 min a temperatura ambiente. Após este período, os tubos foram centrifugados a 15000 x g por 5 min a 4°C e a absorbância do sobrenadante foi lida em 360 nm, contra a solução de

guanidina 6,0 M. Para a determinação da quantidade de proteínas totais, o sobrenadante do branco foi lido em 280 nm, utilizando albumina sérica bovina como padrão. A concentração de proteínas carboniladas foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $22.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$.

2.6 Análise estatística

Os dados quantitativos estão apresentados na forma de média e desvio ou erro padrão, enquanto que os dados categóricos estão apresentados na forma de frequência absoluta. Para a análise estatística dos parâmetros bioquímicos, primeiramente os dados foram submetidos ao teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados quantitativos sem distribuição normal foram transformados em números logaritmos. Os valores foram comparados intragrupos (efeito temporal dos tratamentos) pela análise de variância para medidas repetidas (*One Way Repeated Measures ANOVA*) e intergrupos foram avaliados por análise de variância (ANOVA). O teste complementar de *Tukey* foi utilizado nas análises intra e inter grupos. Para a análise inter grupos foram utilizados tanto os valores absolutos quanto os de variação em relação ao período basal e entre os tempos. Foi utilizado o *software* SigmaStat versão 2.03 para realizar as análises estatísticas.

3. Resultados

Na Tabela 1 estão demonstrados os valores de fenóis totais, saponinas totais e compostos fenólicos presentes na erva mate.

Durante o período basal as características dos indivíduos do estudo não foram diferentes significativamente entre os grupos de intervenção (Tabela 2).

Quanto à atividade antioxidante do sangue dos indivíduos com dislipidemia (Tabela 3), o grupo EM apresentou aumento significativo de FRAP comparado ao período basal, de 13%, 12% e 11%, enquanto os indivíduos do grupo DC de 14%, 10% e 11%, após 20, 40 e 60 dias, respectivamente, retornando aos valores basais após 90 dias de tratamento. Já no grupo ED, foi observado significativo aumento de FRAP, em relação ao período basal, de 14%, 15% e 15%, após 20, 40 e

90 dias respectivamente, sem diferenças significativas após 60 dias de tratamento (Tabela 3).

Foi observado um significativo aumento nas concentrações de GSH, em relação ao período basal, após 20, 40, 60 e 90 dias de ingestão isolada de erva mate, de 13%, 12%, 15% e 21% respectivamente. O aumento não foi diferente significativamente entre 20, 40 e 60 dias de tratamento, caracterizando uma estabilização das concentrações de GSH durante esses períodos. Contudo, a concentração de GSH após 90 dias, apresentou aumento significativo de 7% e 8% quando comparada após 20 e 40 dias, respectivamente, mas não foi significativa após 60 dias. Nos grupos DC e ED, os valores de GSH também aumentaram significativamente em relação ao período basal após 20, 40, 60, e 90 dias de tratamento, sendo que o grupo DC apresentou um aumento mínimo de 11% e máximo de 15%, enquanto o grupo ED, apresentou de 16% a 19%. Não foi observada diferença significativa entre os tempos 20, 40, 60 e 90 dos dois tratamentos, demonstrando novamente uma estabilidade no aumento das concentrações de GSH nesses períodos.

O tratamento isolado com erva mate não alterou significativamente a PON1. No grupo DC, foi verificada uma diminuição de PON1 após 40 dias, sem diferença significativa, aumentando significativamente após 60 e 90 dias, comparado ao período após 40 dias, contudo ao final do tratamento os valores retornaram às concentrações basais. Quanto ao grupo ED, foi demonstrada manutenção nos valores de PON1 até os 40 dias de intervenção, aumentando significativamente após 60 dias em relação ao período basal (22%) e 40 dias (21%), retornando aos valores basais após 90 dias (Tabela 3).

Não foram observadas diferenças significativas nos valores de LOOH e PC nos diferentes períodos de intervenção de cada tratamento (Tabela 3).

Em relação ao perfil lipídico (Tabela 4), não foram observadas diferenças significativas de CT, HDL-c e TG durante o período de intervenção dos diferentes tratamentos. Contudo, no grupo EM houve uma diminuição significativa no LDL-c em 7%, 6%, 8% e 7% após 20, 40, 60 e 90 dias de tratamento, respectivamente, quando comparados ao período basal, valores esses que se mantiveram estatisticamente estabilizados durante todo o período. Por sua vez, no grupo DC houve

uma redução significativa do LDL-c em 9% após 40 dias, comparado ao período basal, porém esta diminuição não perdurou durante os demais períodos de tratamento, retornando aos valores basais após 90 dias. Quanto ao grupo ED, não foi observada diferença significativa em nenhum dos períodos de intervenção. Quanto às concentrações de Não HDL-c, foi demonstrada uma diminuição significativa o grupo EM de 9% e 11% após 40 e 60, em relação ao período basal, contudo ao final da intervenção esses valores se igualaram aos do período basal. No grupo DC, essa diminuição significativa ocorreu após 20 (10%) e 40 (10%) dias de tratamento, retornando aos valores iniciais a partir dos 60 dias de intervenção. Já no grupo ED houve uma diminuição significativa, comparada ao período basal, após 20 (10%), 40 (11%) e 60 (13%) dias de intervenção, contudo, também retornou aos valores do período basal ao final de 90 dias.

Não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos de intervenção em nenhum dos parâmetros avaliados (Tabelas 3 e 4).

4. Discussão

Vários fitoquímicos ativos têm sido identificados na erva mate que podem ser responsáveis pelos seus benefícios à saúde, dentre eles, os mais abundantes são os compostos fenólicos, onde se destacam os ácidos clorogênicos (Heck & De Mejia, 2007).

A elevada presença de compostos fenólicos na erva mate, principalmente de ácidos clorogênicos, tem sido fortemente relacionada com sua capacidade antioxidante. Os compostos fenólicos presentes na erva mate diferem significativamente dos chás verde e preto devido às altas concentrações de ácidos clorogênicos (Chandra & De Mejia, 2004). Mesmo em sua forma tostada, a erva mate apresenta maiores quantidades de ácidos clorogênicos, quando comparada a outros chás, inclusive os chás verde e preto, da espécie *Camellia sinensis* (Marques & Farah, 2009). Bastos e colaboradores (2007), através do método de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), verificaram uma maior capacidade antioxidante da erva mate ao comparar com o chá verde. A elevada atividade antioxidante dos ácidos clorogênicos presentes na erva mate pode estar relacionada à capacidade de inibir a

formação e propagação de radicais livres e espécies reativas ao quelar os íons de metais de transição (Carini, Facino, Aldini, Calloni & Colombo, 1998). Diversos estudos relataram a capacidade da erva mate em inibir a oxidação da LDL, um dos principais fatores de risco para as DCV, relacionada com o desenvolvimento e progressão da aterosclerose (Gugliucci & Stahl, 1995; Gugliucci, 1996; Filip, Lotito, Ferraro & Fraga, 2000; Gugliucci & Menini, 2002; Bracesco et al., 2003).

Outros constituintes que conferem importância terapêutica à erva mate são as saponinas, constituídas por glicosídeos de esteróides ou terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura, a qual possui uma parte da molécula com característica lipofílica (triterpeno ou esteróides) e outra parte hidrofílica (açúcares), determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e a ação detergente e emulsificante (Gnoatto, Schenkel & Bassani, 2005). O mecanismo da ação hipocolesteremiante das saponinas pode ser explicado pela diminuição da absorção intestinal do colesterol e do aumento da excreção fecal de esteróides e de ácido biliares (Malinow et al., 1981).

No presente estudo, foram observados os efeitos independentes e combinados da erva mate e dieta controle nos biomarcadores de atividade antioxidante e no perfil lipídico em indivíduos com dislipidemia. Devido à inexistência de estudos que contemplem a avaliação dos efeitos antioxidantes da erva mate em indivíduos com dislipidemia, a comparação foi realizada com outras ervas com efeitos e constituintes semelhantes.

Nos diferentes grupos de intervenção, foi verificado um aumento significativo do FRAP. Vale destacar que somente no grupo ED houve manutenção dos valores aumentados de FRAP durante todo o tratamento, sendo que quando a dieta controle e a erva mate eram administradas separadamente, houve uma tendência de retorno às concentrações do período basal. Resultados de um estudo experimental realizado em nosso laboratório mostraram que a capacidade antioxidante sérica aumentou significativamente após 1 h da ingestão de infusão de erva mate (da Silva, Neiva, Shirai, Terao & Abdalla, 2008). Em um estudo que avaliou a ingestão de chá verde em indivíduos dislipidêmicos, foi demonstrado que a infusão provocou aumento significativo na capacidade antioxidante total plasmática após 45 e 90 dias de consumo (de Santana et al., 2008). Resultados semelhantes

foram encontrados por Camargo, Daguer e Barbosa (2006) ao avaliarem a ingestão aguda de chá verde por indivíduos com dislipidemia. Por sua vez, Davies e colaboradores (2003), ao avaliarem a ingestão de chá preto por três semanas em indivíduos com hipercolesterolemia moderada, não observaram alteração significativa nos valores de FRAP. Vale lembrar que a capacidade antioxidante do plasma é consequência dos efeitos individuais e sinérgicos de inúmeros componentes, como ácido úrico, compostos fenólicos, ácido ascórbico, tocoferóis, bilirrubina, albumina, dentre outros, sendo que o ácido úrico é responsável por aproximadamente 60% da capacidade antioxidante no ensaio de FRAP utilizado no presente estudo (Wayner, Burton, Ingold, Barclay & Locke, 1987; Benzie & Strain, 1996). Assim, é interessante notar que a ingestão prolongada de erva mate não promoveu alterações importantes na concentração sérica de ácido úrico (dados não demonstrados), indicando que o aumento na capacidade antioxidante foi devido aos constituintes da erva mate ou da dieta, sendo possivelmente os compostos fenólicos, vitaminas e/ou minerais.

Os dados apresentados também sugerem um aumento significativo no parâmetro GSH independentemente da ingestão de erva mate, contudo, foi verificada uma otimização dos resultados na presença da infusão de erva mate, sendo que após 90 dias o aumento no grupo EM se tornou mais pronunciado quando comparado aos demais grupos. A GSH é o maior composto tiol de baixo peso molecular em vegetais e animais, constituindo-se num importante antioxidante natural. Ela pode ser proveniente da dieta ou também pode ser sintetizada no organismo humano (Fang, Yang & Wu, 2002). Seu grupo tiol reativo confere efetiva propriedade redutora, permitindo interagir com diversas moléculas reativas, tais como LOOH, H_2O_2 , ONOO⁻, $O_2^{\bullet-}$ e OH[•] (Halliwell & Gutteridge, 1999). Portanto, a manutenção de concentrações elevadas de GSH é importante para a defesa do plasma sanguíneo e dos tecidos contra o estresse oxidativo. Em um estudo realizado com mulheres saudáveis que ingeriram infusão de erva mate por uma semana, foi observado um aumento significativo na modulação da enzima antioxidante glutatona peroxidase, a qual catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos em H_2O e seus respectivos alcoóis a partir da oxidação da GSH à glutatona oxidada (Matsumoto et al., 2009).

A partir da determinação da atividade sérica da PON1, foi verificado que esta enzima teve um aumento significativo após 60 dias de intervenção no grupo ED, porém, ao final dos 90 dias de intervenção, as concentrações de PON1 retornaram aos níveis basais. A PON1 está associada à HDL o que implica em uma contribuição anti-inflamatória e antioxidante para esta lipoproteína (Mackness & Mackness, 2004). É também atribuída à PON-1 a propriedade de catalisar a hidrólise dos hidroperóxidos lipídicos na LDL, bem como a de outros substratos (Mackness, Mackness, Arrol, Turkie & Durrington, 1998). Foi demonstrado que a PON1 age na inibição da oxidação de LDL (Mackness, Quarck, Verreth, Mackness & Holvoet, 2006) e é capaz de hidrolisar peróxidos lipídicos presentes em lesões ateroscleróticas humanas (Aviram et al., 2000).

No presente estudo foi avaliada a peroxidação lipídica através dos LOOH, porém não foram encontrados resultados significativos em nenhum dos grupos de intervenção. Corroborando estes achados, Camargo, Daguer e Barbosa (2006) e De Santana e colaboradores (2008), ao avaliarem a ingestão aguda ou prolongada de chá verde em indivíduos dislipidêmicos, respectivamente, não observaram redução significativa nos valores de LOOH. Contudo, diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, que utilizaram outros métodos de avaliação de oxidação de lipídeos, como as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, através de indução à oxidação, demonstraram inibição da oxidação da LDL a partir da administração de infusão de erva mate (Gugliucci & Stahl, 1995; Gugliucci, 1996; Filip, Lotito, Ferraro & Fraga, 2000; Gugliucci & Menini, 2002; Bracesco et al., 2003). Além disso, a ingestão de erva mate, associada ou não a uma dieta controle, não promoveu diminuição significativa das concentrações de proteínas oxidadas no plasma.

Em relação ao perfil lipídico, foi verificada uma diminuição significativa nos valores de LDL-c nos grupos EM e DC, contudo, somente no grupo com ingestão isolada de erva mate esses valores permaneceram até o final do estudo. Um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento das complicações cardiovasculares, inclusive da aterosclerose, é a elevação de lipoproteínas aterogênicas, tais como as LDL, as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). As partículas de LDL no organismo estão associadas intimamente com a iniciação do processo

aterosclerótico a partir da oxidação pelos radicais livres ou espécies de oxigênio/nitrogênio. A utilização do parâmetro Não HDL-c tem como finalidade melhorar a quantificação das lipoproteínas aterogênicas circulantes no plasma de indivíduos que apresentam hipertrigliceridemia (SBC, 2007). No presente estudo foi observada uma significativa diminuição nos valores de Não HDL-c em todos os grupos de intervenção, porém não perduraram ao final dos 90 dias de tratamento. De Moraes e colaboradores (2009), verificaram diminuição significativa nos valores de LDL-c e Não HDL-c de indivíduos com dislipidemia após 20 e 40 dias de ingestão de erva mate, demonstrando, inclusive, uma diminuição significativa nos parâmetros de CT e HDL. A propriedade que promove a redução de LDL-c e de Não HDL-c da erva mate pode ser devida à presença de saponinas, as quais apresentam capacidade de formar complexos com ácidos biliares e colesterol. Saponinas isoladas de *Ilex paraguariensis*, bem como o extrato aquoso da planta, inibiram *in vitro* a difusão passiva de ácido cólico através de membrana de celulose, indicando a formação desses complexos (Ferreira, Vazquez, Guntner & Moyna, 1997).

Não foram evidenciadas modificações nos parâmetro CT, HDL-c e TG nos diferentes grupos de intervenção. Por outro lado, estudos anteriores demonstraram que o extrato aquoso de erva mate diminuiu a concentração sérica de colesterol total, dos TG, da VLDL e da LDL-c em ratos (Stein et al., 2005; Pang, Choi & Park, 2008). Corroborando os achado do presente estudo, Camargo, Daguer e Barbosa (2006) e De Santana et al. (2008) ao analisarem a ingestão de forma aguda ou prolongada de chá verde, respectivamente, não observaram melhora nos parâmetros CT, HDL-c, LDL-c e TG de indivíduos com dislipidemia.

Em resumo, o presente estudo verificou que a erva mate, associada ou não a uma dieta controle, apresentou aumento da concentração antioxidante, observada através do GSH e FRAP, e quanto à PON1, elevou-se apenas quando a erva mate foi associada a uma dieta controlada em gorduras. A ingestão de erva mate, acompanhada ou não por uma dieta controle, não influenciou na oxidação de lipídeos e proteínas. A infusão de erva mate ingerida isoladamente promoveu diminuição significativa nos valores de LDL-c em todos os tempos do estudo, e no grupo que teve apenas a intervenção dietética, houve redução somente após 40 dias de tratamento. Além disso, foi observada

diminuição nas concentrações de Não HDL-c nos três grupos de intervenção. Diante do exposto, a ingestão prolongada da erva mate, associada ou não a uma dieta controle, apresentou potencial antioxidante e hipolipemiante em indivíduos com dislipidemia.

Agradecimentos

À empresa Leão Júnior (Curitiba-PR/Brasil) por fornecer a erva mate e à CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Referências

- Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions - PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation*. 2000;101(21):2510-7.
- Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Torres E. Bioactive compounds content of Chimarrao infusions related to the moisture of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2006;49(3):399-404.
- Bastos DHM, Ishimoto EY, Marques MOM, Ferri AF, Torres E. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006;19(6-7):538-43.
- Bastos DHM, Oliveira DM, Matsumoto RLT, Carvalho PO, Ribeiro ML. Yerba maté: pharmacological properties, research and biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 2007; 1:37-46.
- Beaglehole R, Saracci R, Panico S. Cardiovascular diseases: causes, surveillance and prevention. *International Journal of Epidemiology*. 2001;30:S1-S4.
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996;239(1):70-6.
- Beutler E, Kelly BM, Duron O. Improved method for determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1963;61(5):882-&.

- Bracesco N, Dell M, Rocha A, Behtash S, Menini T, Gugliucci A, et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: Prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2003;9(3):379-87.
- Camargo AEI, Dagher DA, Barbosa DS. Green tea exerts antioxidant action in vitro and its consumption increases total serum antioxidant potential in normal and dyslipidemic subjects. *Nutrition Research*. 2006;26(12):626-31.
- Carini M, Facino RM, Aldini G, Calloni M, Colombo L. Characterization of phenolic antioxidants from mate (*Ilex paraguayensis*) by liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1998;12(22):1813-9.
- Chandra S, de Mejia EG. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(11):3583-9.
- da Silva EL, Neiva TJC, Shirai M, Terao J, Abdalla DSP. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. *Food Research International*. 2008;41(10):973-9.
- Davies MJ, Judd JT, Baer DJ, Clevidence BA, Paul DR, Edwards AJ, et al. Black tea consumption reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolemic adults. *Journal of Nutrition*. 2003;133(10):3298S-302S.
- de Moraes EC, Stefanuto A, Klein GA, Boaventura BCB, de Andrade F, Wazlawik E, et al. Consumption of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Improves Serum Lipid Parameters in Healthy Dyslipidemic Subjects and Provides an Additional LDL-Cholesterol Reduction in Individuals on Statin Therapy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(18):8316-24.
- de Santana MB, Mandarino MG, Cardoso JR, Dichi I, Dichi JB, Camargo AEI, et al. Association between soy and green tea (*Camellia sinensis*) diminishes hypercholesterolemia and increases

- total plasma antioxidant potential in dyslipidemic subjects. *Nutrition*. 2008;24(6):562-8.
- Fan JP, He CH. Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006;41(3):950-6.
- Fang YZ, Yang S, Wu GY. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002;18(10):872-9.
- Ferreira F, Vazquez A, Guntner C, Moyna P. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by the *Ilex paraguariensis* St Hil saponins. *Phytotherapy Research*. 1997;11(1):79-81.
- Filip R, Lotito SB, Ferraro G, Fraga CG. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*. 2000;20(10):1437-46.
- Friedewald WT, Fredrick DS, Levy RI. Estimation of concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 1972;18(6):499-502.
- Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, Ladu BN. Purification of human serum paraoxonase arylesterase - evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metabolism and Disposition*. 1991;19(1):100-6.
- Geleijnse JM, Launer LJ, van der Kuip DAM, Hofman A, Witteman JCM. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2002;75(5):880-6.
- Gnoatto SCB, Schenkel EP, Bassani VL. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2005;16(4):723-6.
- Grundy SM. Low-density lipoprotein, non-high-density lipoprotein, and apolipoprotein B as targets of lipid-lowering therapy. *Circulation*. 2002;106(20):2526-9.
- Gugliucci A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996;224(2):338-44.
- Gugliucci A, Menini T. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced

- inhibition of plasminogen and antithrombin III. *Life Sciences*. 2002;72(3):279-92.
- Gugliucci A, Stahl AJC. Low-density-lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *ilex paraguariensis*. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 1995;35(1):47-56.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in biology and medicine*. Oxford University Press, 1999.
- Heck CI, De Mejia EG. Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*. 2007;72(9):R138-R51.
- Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low-density-lipoprotein. *Analytical Biochemistry*. 1992;202(2):384-9.
- Kadar A, Glasz T. Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovascular Surgery*. 2001;9(2):109-21.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 1990;186:464-78.
- Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *Febs Letters*. 1998;423(1):57-60.
- Mackness B, Quarck R, Verreth W, Mackness M, Holvoet P. Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2006;26(7):1545-50.
- Mackness M, Mackness B. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: Is the gene or the protein more important? *Free Radical Biology and Medicine*. 2004;37(9):1317-23.
- Malinow MR, Connor WE, McLaughlin P, Stafford C, Lin DS, Livingston AL, et al. Cholesterol and bile-acid balance in *macaca fascicularis* - effects of alfalfa saponins. *Journal of Clinical Investigation*. 1981;67(1):156-62.

- Marques V, Farah A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*. 2009;113(4):1370-6.
- Matsumoto RLT, Bastos DHM, Mendonça S, Nunes VS, Bartchewsky W, Ribeiro Jr ML, Carvalho PO. Effects of Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Ingestion on mRNA Expression of Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation, and Total Antioxidant Status in Healthy Young Women. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(5):1775-80.
- Mosimann ALP, Wilhelm D, da Silva EL. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Biofactors*. 2006;26(1):59-70.
- Osganian SK, Stampfer MJ, Rimm E, Spiegelman D, Manson JE, Willett WC. Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003;77(6):1390-9.
- Pang J, Choi Y, Park T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008;476(2):178-85.
- Schinella GR, Troiani G, Davila V, de Buschiazzo PM, Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;269(2):357-60.
- Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2003;361(9364):1149-58.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants, Pt A*. 1999;299:152-78.
- SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose. Departamento de

- Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2007; 88 (1): 3-19.
- Stein FLP, Schmidt B, Furlong EB, Soares LAS, Soares MCF, Vaz MRC, et al. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biological Research for Nursing*. 2005;7(2):146-56.
- Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Reviews*. 2004;84(4):1381-478.
- Strassmann BB, Vieira AR, Pedrotti EL, Morais HNF, Dias PF, Maraschin M. Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(18):8348-53.
- Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC, Locke SJ. The relative contributions of vitamin-e, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human-blood plasma. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1987;924(3):408-19.
- WHO - World Health Organization. Cardiovascular Diseases [Internet]. Acesso em 2008 nov 30. Disponível em: www.who.int/cardiovascular_diseases/en/.

Tabela 1 Conteúdo de fenóis totais, saponinas totais e compostos fenólicos da infusão de erva mate tostada.

Conteúdo	mg/mL	mg/g
Fenóis totais	1,74 ± 0,01	87,2 ± 1,3
Saponinas totais	0,13 ± 0,007	6,6 ± 0,3

Conteúdo	µg/mL	mg/g
Ácido clorogênico	170,0 ± 4,5	8,5 ± 0,2
Ácido 4,5-dicafeoilquínico	51,8 ± 3,1	2,6 ± 0,1
Ácido cafeico	4,8 ± 0,07	0,2 ± 0,003
Ácido gálico	59,1 ± 2,0	3,0 ± 0,1
Ácido p-cumárico	1,2 ± 0,04	0,06 ± 0,002
Ácido protocatecuico	9,3 ± 0,07	0,5 ± 0,003
Ácido ferúlico	Tr	Tr

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão; Os ensaios foram realizados em triplicata. Tr, traços.

Tabela 2 Características dos diferentes grupos de intervenção durante o período basal do estudo.

Característica	Grupo erva mate	Grupo dieta controle	Grupo erva mate com dieta controle
Nº de indivíduos (m/h)	15/8	21/5	21/4
Idade (anos)	51,8 ± 2,6	47,8 ± 2,3	46,2 ± 2,0
Peso (kg)	71,9 ± 2,8	71,2 ± 2,6	69,8 ± 3,0
IMC (kg/m ²)	27,5 ± 0,8	27,1 ± 0,7	27,4 ± 0,8
Atividade física (h/sem)	1,9 ± 0,4	2,1 ± 0,4	2,0 ± 0,4
CT (mg/dL)	233,1 ± 5,8	232,2 ± 8,0	231,4 ± 8,0
LDL-c (mg/dL)	160,2 ± 5,7	156,5 ± 5,2	153,2 ± 6,0
HDL-c (mg/dL)	52,2 ± 2,8	50,9 ± 1,7	49,1 ± 1,6
Não HDL-c (mg/dL)	187,09 ± 4,84	183,70 ± 4,81	184,98 ± 4,49
TG (mg/dL)	131,1 ± 12,0	126,3 ± 10,0	146,4 ± 14,6
GSH (µmol/L)	83,8 ± 2,1	84,9 ± 2,4	80,7 ± 2,9
FRAP (µmol/L)	580,1 ± 18,4	529,6 ± 16,0	568,8 ± 21,2
PON1 (U/mL)	91,78 ± 4,76	93,93 ± 5,59	88,47 ± 3,35
LOOH (µmol/L)	8,85 ± 0,61	9,52 ± 0,68	8,85 ± 0,51
PC (µmol/mg)	0,90 ± 0,05	0,87 ± 0,04	0,80 ± 0,03

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão; Os valores na mesma linha não apresentam diferenças estatisticamente significantes (p<0,05) – ANOVA.

Abreviações: m/h, mulheres/homens; IMC, índice de massa corporal; h/sem, horas por semana; CT, colesterol total; LDL-c, colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade; HDL-c, colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade; GSH, glutatona reduzida; TG, triglicérides; FRAP, potencial antioxidante redutor férrico; PON1, atividade sérica da enzima paroxonase; LOOH, hidroperóxidos lipídicos; PC, proteína carbonilada.

Tabela 3 Concentrações de GSH, FRAP, PON1, LOOH e PC sanguíneos dos indivíduos dos grupos de intervenção durante o período basal e após 20, 40, 60 e 90 dias.

Período	Grupo erva mate n (m/h) = 23 (15/8)	Grupo dieta controle n (m/h) = 26 (21/5)	Grupo erva mate com dieta controle n (m/h) = 25 (21/4)
FRAP ($\mu\text{mol/L}$)			
Basal	580,17 \pm 18,47 ^a	529,60 \pm 16,04 ^a	568,79 \pm 21,28 ^a
20 d	657,83 \pm 22,81 ^b	603,81 \pm 16,67 ^b	648,66 \pm 16,45 ^b
40 d	651,79 \pm 26,46 ^b	584,28 \pm 21,39 ^b	655,79 \pm 19,71 ^b
60 d	646,67 \pm 32,79 ^b	587,58 \pm 13,47 ^b	594,20 \pm 18,52 ^{ab}
90 d	590,43 \pm 18,99 ^{ab}	574,86 \pm 15,89 ^{ab}	652,91 \pm 21,87 ^b
GSH ($\mu\text{mol/L}$)			
Basal	83,82 \pm 2,11 ^a	84,94 \pm 2,40 ^a	80,75 \pm 2,98 ^a
20 d	94,95 \pm 2,20 ^b	94,25 \pm 2,77 ^b	94,16 \pm 2,26 ^b
40 d	93,92 \pm 2,32 ^b	96,93 \pm 2,47 ^b	94,16 \pm 1,65 ^b
60 d	96,56 \pm 2,82 ^{bc}	98,24 \pm 2,49 ^b	96,32 \pm 2,90 ^b
90 d	102,05 \pm 3,14 ^c	98,24 \pm 2,72 ^b	96,50 \pm 3,60 ^b
PON1 (U/mL)			
Basal	91,78 \pm 4,76 ^a	93,93 \pm 5,59 ^{abc}	88,47 \pm 3,35 ^a
20 d	91,90 \pm 5,39 ^a	90,59 \pm 5,55 ^{ac}	93,35 \pm 7,75 ^{ab}
40 d	80,32 \pm 4,14 ^a	84,45 \pm 6,37 ^a	88,95 \pm 6,94 ^a
60 d	101,34 \pm 10,35 ^a	112,86 \pm 7,85 ^{bc}	113,36 \pm 7,56 ^b
90 d	90,43 \pm 8,55 ^a	108,36 \pm 6,97 ^c	96,62 \pm 10,85 ^{ab}
LOOH ($\mu\text{mol/L}$)			
Basal	8,85 \pm 0,61 ^a	9,52 \pm 0,68 ^a	8,85 \pm 0,51 ^a
20 d	8,04 \pm 0,87 ^a	8,79 \pm 0,89 ^a	8,04 \pm 0,72 ^a
40 d	8,47 \pm 0,79 ^a	7,94 \pm 0,94 ^a	8,39 \pm 0,74 ^a

60 d	$8,52 \pm 1,06^a$	$9,46 \pm 1,19^a$	$9,67 \pm 1,28^a$
90 d	$8,86 \pm 0,87^a$	$9,50 \pm 1,03^a$	$9,42 \pm 1,22^a$
PC ($\mu\text{mol/mg}$)			
Basal	$0,90 \pm 0,05^a$	$0,87 \pm 0,04^a$	$0,80 \pm 0,03^a$
20 d	$0,93 \pm 0,04^a$	$0,83 \pm 0,03^a$	$0,87 \pm 0,03^a$
40 d	$0,99 \pm 0,03^a$	$0,92 \pm 0,03^a$	$0,97 \pm 0,03^a$
60 d	$0,84 \pm 0,05^a$	$0,82 \pm 0,04^a$	$0,82 \pm 0,06^a$
90 d	$0,91 \pm 0,06^a$	$0,87 \pm 0,06^a$	$0,83 \pm 0,08^a$

Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão; Os valores na mesma coluna com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) – ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey. Os valores na mesma linha não apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) – ANOVA.

Abreviações: m/h, mulheres/homens; GSH, glutatona reduzida; FRAP, potencial antioxidante redutor férrico; PON1, atividade da enzima paroxonase; LOOH, hidroperóxidos lipídicos; PC, proteína carbonilada.

Tabela 4 Determinações de CT, LDL-c, HDL-c, não HDL-c e TG sanguíneos dos indivíduos dos grupos de intervenção durante o período basal e após 20, 40, 60 e 90 dias.

Período	Grupo erva mate n (m/h) = 23 (15/8)	Grupo dieta controle n (m/h) = 26 (21/5)	Grupo erva mate com dieta controle n (m/h) = 25 (21/4)
CT (mg/dL)			
Basal	233,06 ± 5,77 ^a	232,26 ± 8,04 ^a	231,42 ± 7,92 ^a
20 d	235,60 ± 6,21 ^a	234,52 ± 8,61 ^a	234,52 ± 8,61 ^a
40 d	228,66 ± 6,83 ^a	234,17 ± 9,90 ^a	234,17 ± 9,90 ^a
60 d	232,28 ± 8,47 ^a	232,64 ± 9,72 ^a	232,64 ± 9,72 ^a
90 d	237,76 ± 9,72 ^a	236,54 ± 8,55 ^a	236,54 ± 8,55 ^a
LDL-c (mg/dL)			
Basal	160,18 ± 5,70 ^a	156,51 ± 5,18 ^a	153,21 ± 6,04 ^a
20 d	148,60 ± 6,21 ^b	147,59 ± 5,80 ^{ab}	147,42 ± 7,24 ^a
40 d	150,77 ± 6,31 ^b	142,36 ± 5,11 ^b	152,07 ± 8,45 ^a
60 d	146,47 ± 8,70 ^b	148,40 ± 6,08 ^{ab}	150,37 ± 7,35 ^a
90 d	148,53 ± 7,26 ^b	148,69 ± 8,88 ^{ab}	149,09 ± 5,71 ^a
HDL-c (mg/dL)			
Basal	52,24 ± 2,80 ^a	50,94 ± 1,76 ^a	49,05 ± 1,59 ^a
20 d	53,30 ± 3,13 ^a	52,03 ± 1,65 ^a	52,16 ± 1,79 ^a
40 d	57,10 ± 3,20 ^a	50,36 ± 1,62 ^a	53,70 ± 2,54 ^a
60 d	60,85 ± 3,99 ^a	52,72 ± 2,04 ^a	51,71 ± 2,39 ^a
90 d	57,61 ± 3,56 ^a	52,50 ± 3,49 ^a	48,45 ± 2,44 ^a
Não HDL-c (mg/dL)			
Basal	187,09 ± 4,84 ^a	183,70 ± 4,81 ^a	184,98 ± 4,49 ^a
20 d	180,18 ± 6,59 ^{ab}	164,50 ± 5,66 ^b	166,29 ± 4,50 ^b
40 d	169,52 ± 6,98 ^b	164,61 ± 5,22 ^b	164,46 ± 5,60 ^b

60 d	165,84 ± 8,01 ^b	175,47 ± 4,85 ^{ab}	160,90 ± 5,49 ^b
90 d	170,72 ± 6,45 ^{ab}	175,00 ± 9,87 ^{ab}	172,50 ± 4,39 ^{ab}
TG (mg/dL)			
Basal	131,14 ± 11,91 ^a	126,26 ± 10,04 ^a	146,37 ± 14,62 ^a
20 d	127,68 ± 10,01 ^a	119,28 ± 10,94 ^a	156,60 ± 14,79 ^a
40 d	113,94 ± 12,59 ^a	125,90 ± 14,30 ^a	139,23 ± 15,72 ^a
60 d	112,21 ± 14,66 ^a	126,77 ± 13,87 ^a	141,57 ± 13,73 ^a
90 d	103,30 ± 14,26 ^a	131,56 ± 15,53 ^a	156,10 ± 18,87 ^a

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão; Os valores na mesma coluna com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) – ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey. Os valores na mesma linha não apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) – ANOVA.

Abreviações: m/h, mulheres/homens; CT, colesterol total; LDL-c, colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade; HDL-c, colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade; TG, triglicerídeos.

CAPÍTULO 5
CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da análise das variáveis deste estudo foi possível observar nos diferentes grupos de intervenção as seguintes considerações:

- A ingestão isolada de erva mate aumentou os valores de GSH e FRAP após 20 dias de intervenção. O aumento do GSH se prolongou e foi mais efetivo após 90 dias. O FRAP foi mantido aumentado até os 60 dias de tratamento, porém retornou aos valores basais no final dos 90 dias. No perfil lipídico, as concentrações de LDL-c mantiveram-se reduzidas durante todo o tratamento e os valores de Não HDL-c reduziram após 40 dias de intervenção, mantiveram-se baixos após 60 dias, porém voltaram aos valores basais após 90 dias. Não houve variação nos valores de PON1, LOOH, CT, HDL-c e TG.
- Ao associar a ingestão de erva mate com uma dieta controlada em gorduras, houve aumento dos valores de GSH e FRAP após 20 dias de tratamento, os quais permaneceram ao final de 90 dias. A PON1 mostrou uma elevação após 60 dias de intervenção, porém retornou aos valores basais no final do estudo. As concentrações de Não HDL-c diminuíram após 20 dias de tratamento, se mantiveram até 60 dias, porém se igualaram aos valores basais após 90 dias. Não foram apresentadas modificações nos parâmetros LOOH, PC, CT, HDL-c e TG.
- No grupo que recebeu apenas dieta controle, pobre em gorduras, os parâmetros antioxidantes GSH e FRAP se mantiveram aumentados durante todo o tratamento, contudo os valores de FRAP retornaram aos valores basais no final da intervenção. Quanto ao perfil lipídico, os valores de LDL-c reduziram após 40 dias e os valores de Não HDL-c após 20 dias, contudo ambos voltaram aos valores basais após 60 dias de intervenção. Não foram encontradas alterações nas concentrações de PON1, LOOH, PC, CT, HDL-c e TG.
- Não foi demonstrada diferença expressiva entre os diferentes grupos de intervenção, contudo a erva mate isolada ou associada à dieta controle parece interferir positivamente nas concentrações de FRAP, GSH, PON1, LDL-c e Não HDL-c.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, T.C. et al. Achieving and maintaining national cholesterol education program low-density lipoprotein cholesterol goals with five statins. **The American Journal of Medicine**, v. 111, p. 185-191, 2001.
- AVIRAM, M.; HARDAK, E.; VAYA, J. et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. **Circulation**, v. 101, n. 21, p. 2510-2517, 2000.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BASTOS, D.H.M. et al. The chlorogenic acid and caffeine content of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) beverages. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p. 91-95, 2005.
- BASTOS, D.H.M. et al. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 24, p. 91-95, 2006a.
- BASTOS, D.H.M. et al. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 538-543, 2006b.
- BASTOS, D. H. M. et al. Yerba maté: pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 1, p.37-46, 2007.
- BAZZANO L.A. et al. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, p.93-99, 2002.
- BECKMAN, J. S. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. **Chemical research in toxicology**, v. 9, p. 836-844, 1996.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BERLINER, J. A., HEINECKE, J. W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 5, p. 707-727, 1996.

- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-90, 1963.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.
- BRACESCO, N. et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: Prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, p. 379-387, 2003.
- BRIGELIUS-FLOHÉ R.; TRABER, M. Vitamin E: function and metabolism. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**. v. 13, p. 1145-55, 1999.
- BROWN, B.G. et al. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 1583-1592, 2001.
- CALLAWAY, C.W. Circumferences. In: Lohman T.G, Roche A.F, Martorell R, editors. **Anthropometric standardization reference manual**. Champaign: Human Kinetics Books, p. 44-5, 1991
- CAMPOS, A.M., ESCOBAR, J., LISSI, E.A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguariensis* extracts and red wine. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 7, p. 43-49, 1996.
- CAO, G.; PRIOR, R. L.; Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 1309-1315, 1998.
- CARINI, M. et al. Characterization of phenolic antioxidants from maté (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, p. 1813-1819, 1998.
- CASTRO, L. C. V.; FRANCESCHINI, S. C. C.; PRIORE, S. E. ; PELÚZIO, M. C. G. Nutrição e doenças cardiovasculares: os marcadores de risco em adultos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n.3, p.369-377, jul/set. 2004.
- CHANDRA, S., DE MEJIA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia*

- compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.
- CHISOLM, G.M., STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1815-1826, 2000.
- CLIFFORD, M.N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J.R. Chlorogenic acids and purine contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, p.13-21, 1990.
- CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1033-1043,2000.
- COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Annals of internal medicine**, v. 111, p. 918-931, 1989.
- COS, P. et al. Structure-activity relationships and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 71-76, 1998.
- CREN-OLIVÉ, C. et al, Effect of catechin O-methylated metabolites and analogues on human LDL oxidation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.34, p.850-855, 2003.
- D'ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanità**, v.43, p.348-361, 2007
- DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.10, p.389-406, 2006.
- DE GROOT, H. Reactive oxygen species in tissue injury. **Hepato-gastroenterology**, v. 41, p. 328-332, 1994.
- DEBOER, S. W. ; THOMAS, R. J. ; BREKKE, M. J.; HOFFMAN, R. S.; MENZEL, P. A.; AASE, L. A.; HAYES, S. N.; KOTTKE, T.E. Dietary Intakes of fruits, vegetables, and fat in Olmsted County, Minnesota. **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, v. 78, n. 2, p. 161-166, 2003.
- DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v.55, n.11, p.396-407, 1997.

- DIPLOCK, A. T. et al. Functional food science and defense against reactive oxidative species. **The British Journal of Nutrition**, v. 80, p. 77S-112S, 1998.
- DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 200-227, 2004.
- DURRINGTON P. N; MACKNESS B; MACKNESS M. I. Paraoxonase and atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 4, p.473-480, 2001.
- DUSTING G. J.; TRIGGLE C. Are we over oxidized? Oxidative stress, cardiovascular disease, and the future of intervention studies with antioxidants. **Journal of Vascular Health and Risk Management**, v.2, p.93-97, 2005.
- EVANS, P.; HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **The British journal of nutrition**, v. 85, suppl 2, p. S67-S74, 2001.
- EVELSON, P. et al. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 388, p. 261-266, 2001.
- FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.
- FENTON, H.J.H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal of the Chemical Society**. v. 65, p. 899-910, 1894.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.
- FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.
- FILIP, R. et al. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 774-778, 2001.
- FIRUZI, O. et al. Parameters of oxidative stress status in healthy subjects: their correlations and stability after sample collection. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 20, p. 139-148, 2006.
- FORD E.S.; GILES W.H. Serum vitamins, carotenoids, and angina pectoris: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey III. **Annals of Epidemiology**, v.10, p.106-116, 2000.

FREIDOVICH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 893, p. 13-18, 1999.

FRIEDWALD, W.T., LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S. Estimation of concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifugation. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.18, n.6, p.499-502, 1972.

GAN K.N.; SMOLEN A.; ECKERSON H. W.; LA DU B.N. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. **Drug Metabolism and Disposition**, v.19, p.100-6, 1991.

GAZIANO J. M. et al. A prospective study of consumption of carotenoids in fruits and vegetables and decreased cardiovascular mortality in the elderly. **Annals of Epidemiology**, v.5, p.255-260, 1995.

GELEIJNSE. J.M. et al. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, p. 880-886, 2002.

GHISELLI, A. et al. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 1106-1114, 2000.

GRACY, R.W. et al. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? **Mutation Research**, v.428, n.1-2, p. 17-22, 1999.

GRUNDY, S.M. Low-density lipoprotein, non-high-density lipoprotein, and apolipoprotein B as targets of lipid-lowering therapy. **Circulation**, v. 106, p. 2526-2529, 2002.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Annals of Epidemiology**, v. 224, p.338-344, 1996.

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

HABER, F., WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proceedings of the Royal Society of London**. Series A, p. 147-332, 1934.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996a.

- HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Research**, v. 25, p. 57-74, 1996b.
- HALLIWELL B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relations to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 246, p.501-14, 1986.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1-85, 1990.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v.72, p.R138-151, 2007.
- HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoid of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p.2379-2383, 1992.
- HERTOG, M.G.L. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. **Lancet**, v. 342, p. 1007-1011, 1993a.
- HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VAN DE PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p.1242-1246, 1993b.
- HERTOG, M. G. J. et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. **Archives of Internal Medicine**, v.155, p.381-386, 1995.
- HU F. B. Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p.544S-51S, 2003.
- HU F.B.; WILLET W. C. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. **JAMA**, v.288, p.2569-78, 2002.
- HUXLEY, R.R., NEIL, H.A.W. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of

prospective cohort studies. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 904-908, 2003.

JACKSON, M. J. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, p 1001-1006, 1999.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. J.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical biochemistry**, v. 202, p. 384-389, 1992.

JIANG, Q. et al. γ -tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 74, p. 714-22, 2001.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.8, p. 1865-1879, 2006.

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

KAMAL-EDIN, A.; APPELQVIST, L.A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. **Lipids**. v. 31, p. 671-701, 1996.

KLIPSTEIN-GROBUSCH K. et al. Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.261-266, 1999.

KNEKT, P. et al. Flavonoid intake, coronary mortality in Finland: a cohort study. **British Medical Journal**, v. 312, p. 478-481, 1996.

KUSHI L.H.; LENART E.B.; WILLETT W.C. Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary knowledge, I: plant foods and dairy products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.61, p.1407S-15S, 1995.

LANDER, H. M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. **The FASEB journal**, v. 11, p. 118-124, 1997.

LARANJINHA, J.A., ALMEIDA, L.M., MADEIRA, V.M. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, p. 487-494, 1994.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

- LI H. L.; LIU, D. P.; LIANG, C. C. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. **Journal of Molecular Medicine**, v.12, p.766-779, 2003.
- MACKNESS M. I; ARROL S; DURRINGTON P. N. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in lowdensity lipoprotein. **FEBS Lett**, v.286, p152-154, 1991.
- MACKNESS, B.; MACKNESS, M.I.; ARROL, S. et al. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. **FEBS Letters**, v. 423, n. 1, p. 57-60, 1998.
- MACKNESS M, MACKNESS B. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? **Free Radical Biology & Medicine** , v.37, p.1317-1323, 2004
- MADAMANCHI N.R.; VENDROV A.; RUNGE M.S. Oxidative stress and vascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.25, p. 29-38, 2005.
- MANACH et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p. 727-747, 2004.
- MAZZAFERA P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chemistry**, v. 60, p.67-71, 1997.
- MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 108, p. 652-659, 2000.
- MONTEIRO M. C.; TRUGO L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, v.28, p. 637-641, 2005.
- MOSIMANN, A.L.P., WILHELM-FILHO, D., SILVA, E.L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* (mate) attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors**, v. 26, p. 59-70, 2006.
- NARDINI et al. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide induced oxidative stress in U937. **Free Radical Biology & Medicine** , v. 25, p.1098-1105, 1998.
- NEGRE-SALVAGYRE, A.; SALVAGYRE, R. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized low-density lipoproteins by macrophages. **Free Radical Biology & Medicine** , v. 12, p. 101-106, 1992.

- NEIVA, T. J. et al. Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation. **Phytotherapy Research**, v.13, p. 597-600, 1999.
- NICKLAS, T.A.; DWYER, J.; FELDMAN, H.A.; LUEPKER, R.V.; KELDER, S.H.; NADER, P.R. Serum cholesterol levels in children are associated with dietary fat and fatty acid intake. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 102, p. 511-17, 2002.
- NIJVELDT, R.J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 74, n. 4, Oct., p. 418-425, 2001.
- NOOROZI, M., ANGERSON, W.J., LEAN, M.E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage in human lymphocytes. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.67, n.6, p.1210-1218, 1998.
- O'KEEFE, J.H.; GHEEWALA, N.M.; O'KEEFE, J.O. Dietary strategies for improving post-prandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 3, p. 249-55, 2008.
- ODONTUYA G.; HOULT, J.R.; HOUGHTON, P.J. Structure-activity relationship for antiinflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. **Phytotherapy Research**, v.19, p.782-786, 2005.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Obesity: preventing and manging the global epidemic**. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva: WHO, 2000.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Physical Status: the use and interpretation of anthropometry**. WHO technical report series 854. Geneva: WHO, 1995.
- OSADA, K. et al. Tea catechins inhibit cholesterol oxidation accompanying oxidation of low density lipoprotein in vitro. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.128, p. 153-164, 2001.
- OSGANIAN S. K. et al. Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.1390-1399, 2003.
- PACHER, P; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 87, n.1, p.315-424, 2007

- PAPAHARALAMBUS, C.A.; GRIENGLING, K.K. Basic mechanism of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 17, p.48-54, 2007.
- PATEU, I. et al. Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 68, n. 6, Dec., p. 1187-1195, 1998.
- RAO, A.V. Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. **Experimental Biology and Medicine**. v. 227, n. 10, Nov., p. 908-913, 2002.
- RICE-EVANS C. A.; MILLER N. J.; PAGANGA G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, p. 933-956, 1996.
- RICE-EVANS, C. Flavonoid antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, v.8, p.797-807, 2001.
- SALAH et al. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.322, p.339-346, 1995.
- SCHINELLA, G.R. et al. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 357-360, 2000.
- SEN, C.K.; PACKER, L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 72, n. 2, Aug., p. 653S-669S, 2000.
- SEVER, P. S. et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial—Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. **Lancet**, v. 361, p. 1149-1158, 2003.
- SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie (International ed. In English)**, v. 25, p. 1058-1071, 1986.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-19, 1993.
- SILVA, E.L.; ABDALLA, D.S.; TERAJO, J. Inhibitory effect of flavonoids on low-density lipoprotein peroxidation catalyzed by mammalian 15-lipoxygenase. **IUBMB Life**, v.49, n.4, p.289-295, 2000.

SILVA, E.L. et al. Ilex paraguariensis extract inhibits ex vivo lipid peroxidation of human plasma and LDL. **Free Radical Research**, v. 40, n. 1, p. S101, 2006.

SILVA, E.L. et al. Acute ingestion of yerba mate infusion (Ilex paraguariensis) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v.41, p.973-979, 2008.

SIMON J.A.; HUDES E.S. Serum ascorbic acid and cardiovascular disease prevalence in U.S. adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). **Annals of Epidemiology**, v.9, p.358-365, 1999

SINGH U.; JIALAL I. Oxidative stress and atherosclerosis. **Pathophysiology**, v. 13, p.129-42, 2006.

SMITH, S.C. et al. Principles for national and regional guidelines on cardiovascular disease prevention. A scientific statement from the world heart and stroke forum. **Circulation.**, v. 109, p. 3112-3121, 2004.

SOARES S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição - Campinas**, v.15, p. 71-81, 2002.

SBC - SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 88 (I): 3-19, abril 2007.

SOWELL, J.; FREI, B.; STEVENS, J. F. Vitamin C conjugates of genotoxic lipid peroxidation products: structural characterization and detection in human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 52, 17964-17969, 2004.

STEIN, F.L.P. et al. Vascular responses to extractable fractions of ilex paraguariensis in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biological Research For Nursing**, v. 7, n. 2, p. 146-156, 2005.

STEINBERG D.; LEWIS, A. Conner Memorial Lecture: oxidative modification of LDL and atherogenesis. **Circulation**, v.95, p.1062-1071, 1997.

STEINBERG D.; WITZTUM, J. L. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? **Circulation**, v.105, p.2107-2111, 2002.

STOCKER R. Vitamin E. **Novartis Foundation Symposium**, v.282, p.77-87, 2007.

- STOCKER R.; KEANEY-JR J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v. 84, p.1381-478, 2004.
- STOHS, S. J. The role free radicals in toxicity and disease. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 6, p. 205-28, 1996.
- SUOMALAINEN, K. et al. Hypochlorous acid induced activation of human neutrophil and gingival crevicular fluid collagenase can be inhibited by ascorbate. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 99, p. 397-**The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 1, p.454-461, 1990
- THOMAS, J.A. Estresse oxidativo e defesa contra antioxidantes. In.: TOMÁS, M.; LATORRE, G.; SENTÍ, M. et al. Función antioxidante de las lipoproteínas de alta densidad: un nuevo paradigma em la arteriosclerosis. **Revista Española de Cardiología**, v. 57, n. 6, p.557-569, 2004.
- SHILS, M. E. et al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na d** 405, 1991.
- TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA-UNICAMP.** – Versão II. – 2. ed. – Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2006. 113p.
- THOMAS, P. et al. Protective action of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. **oença**. v. 1, 9 ed, São Paulo: Manole, 2003. 1026 p.
- TRABER, M.G.; ATKINSON, J. Vitamin E, Antioxidant and Nothing More. **Free Radical Biology & Medicine** , v.43, n.1, p.4-15, 2007.
- VALKO, M. J. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.
- VALKO M. J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.
- VAN ACKER, S. A. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.
- WAYNER, D. D. M. et al. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled per-oxidation. **FEBS letters**, v. 187, p. 33-37, 1985.

- WILLERSON, J.T.; RIDKER, P.M. Inflammation as a cardiovascular risk factor. **Circulation**, v. 109, suppl.II, p. 2-10, 2004.
- WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.305, p. 729-736, 2003.
- YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**. v. 74, n. 1, jan. p. 139–162, 1994.
- ZABOTTO, C. B. Registro fotográfico para inquéritos dietéticos. Campinas: Unicamp, 1996.
- ZHAO R.; SHEN G. X. Functional modulation of antioxidant enzymes in vascular endothelial cells by glycated LDL. **Atherosclerosis**, v.179, p.277-284, 2005.

APÊNDICE A Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA
CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NUTRIÇÃO
CEP: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS - SC**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

O(A) Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada “**EFEITO HIPOCOLESTEROLÊMICO, HIPOGLICÊMICO, ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DA ERVA MATE (*Ilex paraguariensis*) EM SERES HUMANOS**”, de responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Edson Luiz da Silva. Neste estudo, pretende-se avaliar se a erva mate tostada (chá mate) apresenta algumas propriedades consideradas benéficas à saúde humana. Este estudo é necessário porque se acredita que algumas substâncias químicas que estão presentes na erva mate podem proteger os indivíduos contra a doença aterosclerótica, particularmente pela diminuição dos fatores de risco, como o colesterol alto, contra o diabetes e o estresse oxidativo, conforme já demonstrado em alguns estudos de laboratório utilizando-se animais e/ou tubos de ensaio.

Para a demonstração desse possível potencial benéfico da erva mate precisamos de sua colaboração para a ingestão de 330 mL de chá de erva mate tostada, 3 vezes ao dia, imediatamente antes ou depois das três principais refeições (independente do horário das mesmas) ou ainda adesão ao aconselhamento nutricional, durante 90 dias. É importante que o consumo da erva mate não seja interrompido por mais de 3 dias seguidos. Além disso, o(a) senhor(a) deve manter os seus hábitos de vida regulares durante o período de tempo do estudo, como por exemplo, consumir o mesmo tipo de alimentação (se não for do grupo da dieta), praticar ou não exercícios físicos e, principalmente, não introduzir medicamentos de uso crônico. Caso o(a) senhor(a) já esteja usando algum medicamento, a dose do mesmo não deverá ser mudada durante o período do estudo. Precisamos, também, da sua autorização

para a realização sete coletas sanguíneas de 15-20 mL de sangue (4-5 tubos), em jejum de 10-12 horas, antes e após o período de intervenção, bem como a medida da pressão arterial e aferição do peso e da altura. O chá de erva mate (infusão) será preparado pelo(a) senhor(a) na hora de uso, pela adição de 330 mL de água quente (cerca de 85 °C – quando a chaleira começar a “chiar”) sobre 21 g de folhas secas e moídas de erva mate tostada, as quais serão fornecidas por nós em pacotes plásticos. Deixar a erva em infusão por, no mínimo, 5-10 min antes de filtrar, sendo que essa infusão pode ser preparada pela manhã para posterior consumo, quente ou fria.

Esse protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (nº 140/2008) e trará apenas o desconforto das coletas de sangue. Porém, pessoas sensíveis à cafeína (um dos componentes da erva mate) poderão sentir irritação gástrica, tremores, excitabilidade ou insônia. Caso ocorra algum desses efeitos colaterais com o(a) senhor(a), favor interromper o consumo da erva-m e entrar em contato com os pesquisadores. Esperamos, entretanto, que esse estudo traga benefícios, tais como a possibilidade de conhecimento das propriedades benéficas da erva mate à saúde humana, que poderá ser utilizado para a transformação da erva mate em fitoterápico ou em alimento especial. Esta pesquisa não oferece riscos maiores do que os citados acima, não tem fins lucrativos, é confidencial e o seu nome será usado apenas no primeiro momento de coleta das amostras de sangue. Em seguida, as amostras serão identificadas pelo número do seu cadastro. Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas científicas, apresentados em congressos ou eventos científicos ou às autoridades sanitárias, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

O(A) Sr.(a) receberá os resultados obtidos no final do estudo. Sua participação é voluntária, podendo desistir desta pesquisa em qualquer de suas fases. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelos telefones 3721-80.53 ou 9154-6002. Se você estiver de acordo em participar, garantimos que as informações obtidas e o material coletado serão confidenciais e só serão utilizados neste trabalho.

Eu, abaixo assinado, concordo em participar deste estudo.

APÊNDICE B Questionário Clínico**Projeto de Pesquisa – Erva Mate - Questionário – Avaliação Clínica**

Participante N° ____

Identificação:

Nome: _____

Sexo: masculino feminino

Estado civil: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Raça: branco pardo amarelo negroEscolaridade: analfabeto 1º grau incompleto 1º grau completo 2º grau incompleto 2º grau completo superior incompleto superior completo pós-graduação

Endereço: _____ N°: _____

Dados Complementares: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Estado: _____ Cep: _____ Telefone: (____) _____

E-mail: _____

Ocupação profissional: _____

Fatores de Risco:1. Hipertensão arterial sim não2. Diabetes sim não

3. Se sim para Diabetes, há quanto tempo? _____

4. Histórico Familiar de Diabetes sim não Parentesco: ____5. Colesterol alterado sim não

Último Colesterol Total: _____

Último LDL: _____

6. Triglicérides alterado sim não

Último Triglicérides: _____

7. Tabagista sim não N°

cigarros/dia: _____

 Eventualmente Ex-fumante

Parou há: _____

8. Antecedentes Familiares de DAC sim não9. Problema respiratório: sim não Quais: _____

10. Problema hepático: sim não Quais:_____
11. Problema renal: sim não Quais:_____
12. Hipertireoidismo: sim não 12. Hipotireoidismo: sim não
- Antecedentes de Morbidades (não cardiovasculares): _____
- Processo infeccioso ou inflamatório recente: sim Qual?_____ não

Hábitos:

1. Atividade Física sim não Frequência: _____
Tipo:_____
2. Bebida Alcoólica sim não Frequente sim não Raramente sim não
3. Estresse sim não
4. Medicação em uso
 Nenhum Diurético Estatinas Fibratos Anti-Hipertensivo Extratos Vegetais
 Vit. A Vit. C Vit. E Multivitaminas Óleo de peixe
 Antiinflamatórios não esteroidais
 Anticoncepcional Oral Injetável Intradérmico
 Outras medicações regulares Qual (is): _____
5. Infarto do Miocárdio sim não Data:_____
6. Alterações Gastrointestinais
 Pirose Obstipação Distensão Flatulência Diarréia
 Outros Não
7. Evacuações: Diária Altern. > 2 dias >4
8. Água: _____
9. Alergia alimentar: _____

APÊNDICE C Avaliação antropométrica e pressão arterial

AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

MEDIDA	<i>1^a Avaliação</i>	<i>Retorno</i>	<i>Retorno</i>	<i>Retorno</i>	<i>Retorno</i>	<i>Retorno</i>	<i>Retorno</i>
<i>DATA</i>	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /
Peso Atual							
Estatura							

OBS: _____

PRESSÃO ARTERIAL

MEDIDA	<i>1^a Avaliação</i>	<i>Retorno</i>	<i>Retorno</i>	<i>Retorno</i>	<i>Retorno</i>	<i>Retorno</i>	<i>Retorno</i>
<i>DATA</i>	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /
Pressão mm/Hg							

OBS: _____

APÊNDICE E Registro alimentar de 3 dias

Laboratório de Lipídeos, Antioxidantes e Aterosclerose

Pesquisa Erva mate

REGISTRO ALIMENTAR - 3 DIAS

Como fazer: Anotar tudo o que comer e beber durante 3 dias.

Atividades necessárias:

- 1) Marque o horário que recebeu o alimento;
- 2) Marque o tipo de refeição (café da manhã, lanche, almoço, jantar);
- 3) Marque a quantidade que você comeu. Só o que engoliu, o que ficou no prato não deve ser marcado.
 - Frutas, pães, bolachas, doces duros (quantas fatias, pedaços ou unidades);
 - Arroz, macarrão, saladas, legumes, purês, carne picada ou moída, doce mole e outros (quantas colheres de sopa ou escumadeiras);
 - feijão, sopas (quantas colheres de sopa ou conchas)
- 4) Marque o tipo de preparação (frito, cozido, assado ou ensopado);
- 5) Marque qual o pedaço de frango consumido (peito, coxa, asa, sobrecoxa);
- 6) Marque todo alimento que foi consumido fora do horário das refeições - BELISCOS

ATENÇÃO

Este registro é muito importante para o sucesso do seu atendimento, portanto procure ser o mais sincero e preciso possível.

ANEXO A Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos

CERTIFICADO N° 109

O Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º0584/GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o conteúdo do Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

APROVADO

PROCESSO: 140/08 FR- 199809

TÍTULO: Efeito hipocolesterolêmico, hipoglicêmico, anti-inflamatório e antioxidante da erva-mate (Ilex paraguariensis) em seres humanos.

AUTORES: Edson Luiz da Silva, Elizabeth Wazlawik, Patrícia Faria Di Pietro, Aliny Stefanuto, Graziela A. Klein e Bruna C. B. Boaventura, Elayne Cristina de Moraes.

DEPARTAMENTOS: Análises Clínicas e Nutrição/CCS/UFSC.

FLORIANÓPOLIS, 30 de junho de 2008.


Coordenador do CEPSH/UFSC - Prof.º Washington Portela de Souza