



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Regina Felippi

" Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)
na reatividade vascular: enfoque na
aterosclerose experimental"

FLORIANÓPOLIS – SC
2005



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

Regina Felippi

“Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)
na reatividade vascular: enfoque na
aterosclerose experimental”

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito para obtenção do grau de
Mestre.

Prof. Orientador: Dr. Edson Luiz da Silva
Prof^a. Co-orientadora: Dr^a Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau

FLORIANÓPOLIS –SC
2005

Felippi, Regina

Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na reatividade vascular: enfoque na aterosclerose experimental, 130p
xviii, 112 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2005.

Orientador: Edson Luiz da Silva

Co-orientadora: Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau

Bibliografia: f. 93-112

1. *Ilex paraguariensis* – 2. Extrato aquoso de erva-mate – 3. Antioxidante – 4. Erva-mate – 5. Aterosclerose – 6. Receptor LDL -/-. I. Edson Luiz da Silva. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

*“Os pequenos atos que se executam
são melhores que todos aqueles
grandes que se planejam”*

Dedico este trabalho à minha mãe, Clecy, por me inspirar com sua força, coragem e determinação.

Agradecimentos

À minha mãe, Clecy e minhas irmãs, Rosicler e Rosangela, por participarem sempre dos meus sonhos e me apoiarem para que se concretizassem, por todo carinho e atenção. Amo vocês...

Às minhas sobrinhas Amabile e Florinha e ao meu sobrinho Gustavo, por serem essa fofuras geniosas que eu amo tanto...

Ao meu orientador, Prof. Edson, que aceitou orientar uma desorientada total. Pela paciência, dedicação e pelos ensinamentos...

À minha co-orientadora, Rosa Maria, por toda a paciência, compreensão e ensinamentos desde a minha iniciação científica. Por saber elogiar, corrigir e estar sempre por perto...

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmácia, por todo o aprendizado durante o mestrado...

Aos funcionários do Departamento de Farmácia, Farmacologia e do Serviço de Patologia, Roderigo, Rita, Pedro, Diana, Goretti, Ione e, especialmente, à minha amiga Sandra, pelo auxílio sempre necessário...

Ao Professor Marcelo Maraschin, pelo auxílio na execução das análises fitoquímicas, à suas alunas Liana e Betina, pela ajuda nos experimentos e pela amizade...

Aos colegas e amigos de laboratório Jarbas e Geisson (Fucker and Sucker), Paulinho (nosso eterno teacher de Embrio), Rodrigo, Mariana e Ângela (minhas companheiras de 100,1), Sofia (minha amiga zóio) e Karina (com sua cascata celebrativa e os receptores léu), e um agradecimento especial à Sílvia (nossa

filósofa SDB), à Juliana (sempre festeira) e à Elke, pela amizade e auxílio na realização dos experimentos. A todos pelo empenho nestes anos de convívio, com certeza todos vocês transformaram os meus dias no Lab em dias muito mais divertidos...

Às minhas amigas pra toda hora e pra toda vida Juliana, Dada, Moni, Sílvia, Vá, Lisi, Moni F. que desde o começo da faculdade estiveram e ainda continuam por perto... adoro vocês.

Ao meu benzinho, Maurício, por ser esta pessoa especial e estar sempre perto dando apoio e carinho. Te adoro!

Aos amigos verdadeiros que tive a chance de fazer nesse mestrado, Csele, Fabi, Liana e Duda, sei que sempre vou poder contar com vocês...

A todos os amigos da Farmácia e Farmacologia (se eu for escrever o nome de cada um, com certeza vou esquecer de alguém!).

Aos camundongos e ratos que possibilitaram a execução deste trabalho.

A esta Universidade e a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

A Deus, por permitir que os meus sonhos se transformem em realidade...

Obrigada por tudo!!

Regina Felippi

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. APRESENTAÇÃO DO ESTUDO.....	1
1.2. ATEROSCLEROSE.....	4
1.3. PATOGÊNESE DA ATEROSCLEROSE.....	5
1.4. LDL E ATEROSCLEROSE.....	7
1.5. ENDOTÉLIO VASCULAR, ÓXIDO NÍTRICO E ATEROSCLEROSE.....	10
1.5.1. Função Endotelial.....	13
1.5.2. Disfunção Endotelial e Aterosclerose.....	15
1.6. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES FENÓLICOS NA ATEROSCLEROSE E NA FUNÇÃO ENDOTELIAL.....	19
1.7. ERVA-MATE (<i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>).....	23
1.8. MODELO EXPERIMENTAL DE ATEROSCLEROSE.....	27
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. PRINCIPAL.....	31
3.2. ESPECÍFICOS.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. MATERIAIS E REAGENTES.....	32
4.2. MÉTODOS.....	33
4.2.1. Preparação do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI).....	33
4.2.2. Análises do extrato de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI).....	33
4.2.2.1. Extração dos compostos fenólicos (Isolamento e purificação).....	34
4.2.2.2. Extração dos alcalóides (Isolamento e purificação).....	34

4.2.2.3. Análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	35
4.2.2.4. Determinação colorimétrica do conteúdo de fenóis totais do EAI.....	35
4.2.2.5. Análise de alcalóides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	36
4.2.3. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI).....	36
4.2.3.1. Determinação da capacidade seqüestradora do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pelo EAI.....	36
4.2.3.2. Determinação da Inibição da degradação da desoxirribose pelo EAI.....	37
4.2.3.3. Avaliação da inibição da peroxidação lipídica pelo EAI.....	39
4.2.4. Efeito <i>in vitro</i> do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI) na reatividade vascular de aorta torácica isolada de ratos.....	40
4.2.4.1. Protocolo experimental.....	40
4.2.4.2. Verificação do efeito vasorelaxante do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI).....	42
4.2.4.3. Verificação da influência do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI) na via NO/GMPc.....	43
4.2.5. Efeito da administração crônica do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI) na reatividade vascular de aorta de camundongos com aterosclerose.....	44
4.2.5.1. Protocolo experimental.....	44
4.2.5.2. Retirada do sangue para obtenção do soro.....	47
4.2.5.3. Determinação do colesterol total.....	48
4.2.5.4. Determinação da fração HDL.....	49
4.2.5.5. Determinação de triglicerídeos.....	49
4.2.5.6. Determinação de colesterol das lipoproteínas com apo B-	

100 (VLDL e LDL).....	50
4.2.5.7. Ensaio de reatividade vascular com aorta torácica isolada de camundongos LDLR KO.....	50
4.2.5.8. Avaliação da extensão das lesões ateroscleróticas.....	51
4.2.6. Análise estatística.....	51
5. RESULTADOS.....	53
5.1. ANÁLISE DO EXTRATO DE ERVA-MATE (<i>ILEX PARAGUARIENSIS</i> ; EAI).....	53
5.1.1. Compostos fenólicos e alcalóides determinados por cromatografia líquida de alta eficiência.....	53
5.1.2. Conteúdo de fenóis totais do EAI determinado por método colorimétrico.....	55
5.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE (<i>ILEX PARAGUARIENSIS</i> ; EAI).....	55
5.2.1. Capacidade seqüestradora do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pelo EAI.....	55
5.2.2. Inibição da degradação da desoxirribose pelo EAI.....	56
5.2.3. Inibição da peroxidação lipídica pelo EAI em homogenato de fígado de ratos.....	57
5.3. RELAXAMENTO <i>IN VITRO</i> INDUZIDO PELO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE (<i>ILEX PARAGUARIENSIS</i> ; EAI) EM AORTA TORÁCICA DE RATOS.....	58
5.3.1. Influência do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI) na via NO/GMPc em aorta torácica de ratos.....	60
5.4. EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE (<i>ILEX PARAGUARIENSIS</i> ; EAI) EM CAMUNDONGOS LDLR KO.....	62
5.4.1. Efeito do EAI na ingestão alimentar e peso dos camundongos LDLR KO.....	62
5.4.2. Avaliação do perfil lipídico.....	64
5.4.3. Efeito do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI) na reatividade vascular de camundongos LDLR KO.....	64
5.4.3.1. Efeito do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI) na capacidade contrátil.....	65

5.4.3.2. Efeito do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI) na capacidade de relaxamento arterial.....	66
5.5. EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE (<i>ILEX PARAGUARIENSIS</i> ; EAI) NAS LESÕES ATÉROSCLERÓTICAS.....	69
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÕES.....	91
7.1. Perspectivas.....	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

LISTA DE TABELAS

I. Composição da ração comercial padrão para roedores.....	47
II. Composição da ração hipercolesterolêmica.....	47
1. Compostos majoritários ($\mu\text{g/mL}$) identificados no extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI).....	53
2. Efeito da presença (E+) ou ausência (E-) de endotélio funcional no relaxamento induzido pelo EAI em aorta torácica isolada de rato.....	60
3. Efeito de diferentes drogas no relaxamento induzido pelo EAI em aorta torácica isolada de rato na presença de endotélio funcional.....	62
4. Consumo de ração e ganho de peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais durante 3 meses de tratamento.....	63
5. Efeito do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI) no perfil lipídico sérico de camundongos LDLR KO.....	64
6. Efeitos da fenilefrina ($3 \mu\text{M}$) na contração máxima (C_{max}) e da acetilcolina ($3 \mu\text{M}$) no relaxamento máximo (R_{max}) de artérias de camundongos LDLR KO	68

LISTA DE FIGURAS

I. Estágios do desenvolvimento da placa aterosclerótica.....	7
II. Reações de iniciação e propagação da peroxidação lipídica.....	10
III. Interação de oxidantes e antioxidantes com NO derivado do endotélio.....	13
IV. Efeitos protetores dos compostos fenólicos na parede arterial.....	22
V. Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>).....	26
1. Perfil cromatográfico do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI) em HPLC.....	54
2. Estruturas químicas dos compostos majoritários identificados no EAI.....	54
3. Efeito do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI) na redução do NBT.....	56
4. Efeito do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI) na degradação da desoxirribose.....	57
5. Efeito do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> ; EAI) na peroxidação lipídica.....	58
6. Efeito do EAI na reatividade vascular na presença ou ausência de endotélio funcional em anéis de aorta torácica contraídos com fenilefrina.....	59
7. Envolvimento da via NO/GMPc no relaxamento vascular ao EAI em anéis de aorta torácica de ratos com endotélio funcional contraídos com fenilefrina na ausência ou presença de L-NOARG ou L-arginina + L-NOARG.....	61
8. Efeito da hipercolesterolemia na contração vascular à fenilefrina em aortas torácicas isoladas de camundongos LDLR KO.....	65
9. Efeito do EAI, após tratamento crônico, na contração vascular à fenilefrina em aortas torácicas isoladas de camundongos LDLR KO hipercolesterolêmicos	66
10. Efeito da hipercolesterolemia no relaxamento vascular à acetilcolina em aortas torácicas isoladas de camundongos LDLR KO.....	67
11. Efeito do EAI, após tratamento crônico, no relaxamento vascular à fenilefrina em aortas torácicas isoladas de camundongos LDLR KO hipercolesterolêmicos.....	68
12. Histologia do arco aórtico (coloração HE; 10 x) de camundongo LDLR KO alimentado com colesterol mostrando as lesões ateroscleróticas iniciais.....	70

13. Histologias do arco aórtico, corados com HE (40 x), de camundongos LDLR KO alimentados com colesterol (A; grupo HC) e alimentados com colesterol e extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* 0,9 g/kg/dia (B; grupo HI 0,9)..... 70

LISTA DE ABREVIATURAS

$\dot{Y}OH$	Radical hidroxila
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
apo B-100	Apolipoproteína B-100
apo E	Apolipoproteína E
C	Grupo controle
CCR	Curva concentração resposta
CI ₅₀	Concentração inibitória que promove 50 % do efeito máximo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cmax	Contração máxima
EAI	Extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)
EDHF	Fator hiperpolarizante do endotélio
EDRF	Fator relaxante do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HC	Grupo hipercolesterolêmico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HI 0,3	Grupo hipercolesterolêmico <i>Ilex paraguariensis</i> : dose 0,3 g/kg/dia
HI 0,9	Grupo hipercolesterolêmico <i>Ilex paraguariensis</i> : dose 0,9 g/kg/dia
HI 2,7	Grupo hipercolesterolêmico <i>Ilex paraguariensis</i> : dose 2,7 g/kg/dia
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDLR KO	Camundongos “knockout” para o receptor de LDL
L-NOARG	N ^ω -nitro-L-arginina
LOO ^Y	Radical lipoperóxido
MDA	Malonaldeído
NADH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzida
NBT	“nitro blue tetrazolium”
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
Rmax	Relaxamento máximo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
<i>t</i> -BuOOH	<i>tert</i> -butilhidroperóxido
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

RESUMO

A disfunção endotelial e o envolvimento de radicais livres exercem um importante papel na patogênese da aterosclerose. A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) apresenta atividade antioxidante e vasorelaxante *in vitro*, em leito arterial mesentérico de ratos e reduz a aterosclerose experimental em coelhos. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (EAI) *i)* na confirmação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato utilizado; *ii)* no relaxamento *in vitro* de aorta torácica de ratos e; *iii)* na reatividade vascular *ex vivo* de camundongos com aterosclerose. A atividade antioxidante do EAI foi avaliada através dos ensaios de redução do NBT, degradação da desoxirribose e inibição da peroxidação lipídica. O EAI mostrou-se efetivo em todos os ensaios, de maneira dependente da sua concentração ($p < 0,01$). No relaxamento *in vitro* de aortas torácicas de ratos, previamente contraídas com fenilefrina, o EAI apresentou efeito significativo dependente da sua concentração na presença de endotélio funcional ($p < 0,01$). O relaxamento na ausência de endotélio íntegro ocorreu somente com as maiores concentrações de EAI avaliadas. Ensaios realizados com o inibidor das enzimas óxido nítrico sintases, L-NOARG, e com o substrato endógeno, L-arginina, sugeriram o envolvimento da via NO/GMPc no relaxamento dependente de endotélio induzido pelo EAI. O efeito do EAI na reatividade vascular *ex vivo* foi testado em camundongos “knockout” para o receptor de LDL (LDLR KO) administrados com 3 diferentes doses do EAI. Os animais foram distribuídos em 5 grupos ($n = 7$ por grupo): 1) controle (C), dieta padrão e água *ad libitum*; 2) hipercolesterolêmico (HC), dieta com 1,25 % de colesterol e água; 3), 4) e 5) hipercolesterolêmico-*Ilex paraguariensis* (HI), dieta com colesterol e EAI nas doses de 0,3, 0,9 e 2,7 g/kg/dia, respectivamente. Após 3 meses de tratamento, os camundongos do grupo HC apresentaram valores séricos de colesterol total e de LDL e VLDL significativamente elevados ($p < 0,001$). A administração do EAI não modificou o perfil lipídico dos animais dos grupos HI nas três doses estudadas. As artérias dos camundongos HC apresentaram estrias gordurosas e diminuição significativa na resposta de contração à fenilefrina e relaxamento à acetilcolina ($p < 0,001$). O tratamento com EAI reverteu a inibição da capacidade contrátil da aorta nos grupos HI 0,9 e HI 2,7 e de inibição do relaxamento no grupo HI 0,9 ($p < 0,05$). Em conclusão, os resultados mostraram que o EAI comercial possui atividade antioxidante e vasorelaxante *in vitro*, com envolvimento do NO endotelial. Além disso, a ingestão do EAI melhorou a reatividade vascular *ex vivo* de aortas de camundongos LDLR KO com aterosclerose, apesar da hipercolesterolemia. Tais resultados são sugestivos do potencial benéfico da erva-mate no combate à aterosclerose.

ABSTRACT

Endothelial dysfunction and free radicals play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis. “Mate” (*Ilex paraguariensis*) extract exhibits antioxidant activity and induce endothelium-dependent vasodilatation in mesenteric arterial bed *in vitro* and reduces experimental atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Therefore, this study assessed the effects of a commercial *Ilex paraguariensis* aqueous extract (IAE) on *i*) the confirmation of *in vitro* antioxidant activity of the extract used; *ii*) vasodilatation of thoracic rat aortas and *iii*) *ex vivo* vascular reactivity in atherosclerotic mice. The IAE antioxidant activity was determined through the NBT reduction assay, deoxyribose degradation and lipid peroxidation inhibition. The IAE showed to be effective in all assays, in a concentration-dependent manner ($p < 0.01$). In vasodilatation of endothelium-intact thoracic rat aorta rings, previously contracted with phenylephrine, the IAE caused a significant concentration-dependent effect ($p < 0.01$). In endothelium denuded aortic rings, the relaxation induced by the IAE occurred only at the highest tested concentrations. Pretreatment of the aortic rings with the NO synthase inhibitor, L-NOARG, and the endogenous substrate, L-arginine, confirmed the involvement of NO/GMPc pathway in the endothelium-dependent relaxation. The effect of ingesting IAE on *ex vivo* vascular reactivity was tested in LDL receptor knockout mice (LDLR KO) administered with 3 different doses of IAE. Animals were distributed in 5 groups ($n = 7$ per group): 1) control (C), normal chow and water *ad libitum*; 2) hypercholesterolemic (HC), cholesterol-rich diet (1.25 % of cholesterol) and water *ad libitum*; 3), 4), and 5) hypercholesterolemic-*Ilex paraguariensis* (HI), cholesterol-rich diet and IAE at the doses of 0.3; 0.9 and 2.7 g/kg/day, respectively. After a three-months treatment, HC mice showed serum total cholesterol, LDL-c plus VLDL-c values significantly elevated ($p < 0.001$). The IAE administration did not change the lipid profile of IAE-administered mice. HC mice aortic artery exhibited fatty streaks and showed a significant inhibition in response to phenylephrine contraction and to acetylcholine vasodilatation ($p < 0.001$). The IAE treatment reverted the reduction of contractile capacity in mice aorta in HI 0.9 and HI 2.7 groups and the inhibition of relaxation in HI 0.9 group ($p < 0.05$). In summary, the results showed that the commercial IAE have antioxidant and endothelial NO-dependent vasorelaxant properties *in vitro*. Furthermore, IAE ingestion improved *ex vivo* vascular reactivity of atherosclerotic LDLR KO mice aorta, regardless hypercholesterolaemia. Our results suggest that “mate” aqueous extract can be beneficial against atherosclerosis development.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Apresentação do Estudo

A aterosclerose continua a ser uma das principais causas de morbimortalidade nas populações das sociedades industriais. Dentre os inúmeros fatores de risco já identificados e que são alvos terapêuticos, encontra-se a disfunção endotelial. A disfunção endotelial é uma desordem sistêmica e vem sendo considerada como um elemento crítico na patogênese das doenças ateroscleróticas e suas complicações. Crescentes evidências sugerem que os fatores de risco cardiovasculares conhecidos não são, individualmente, os únicos determinantes da disfunção endotelial. A integridade endotelial depende do balanço entre todos os fatores de risco cardiovasculares e os elementos vasoprotetores em um indivíduo, incluindo as variáveis conhecidas e a predisposição genética. A disfunção endotelial pode ser considerada um marcador de risco inerente de aterosclerose. Corroborando essa hipótese, foi demonstrado que a presença de disfunção endotelial na circulação coronariana ou periférica foi um indicador precoce independente de efeitos cardiovasculares indesejáveis, fornecendo informações prognósticas adicionais àquelas derivadas dos fatores de risco convencionais (Ross, 1999; Bonetti et al., 2003).

Dessa forma, tendo em vista a importância da disfunção endotelial para o desenvolvimento e progressão das doenças cardiovasculares, parece atrativo considerar a disfunção endotelial, sem desconsiderar o tratamento dos fatores de risco cardiovasculares estabelecidos, como um alvo terapêutico primário na prevenção da doença aterosclerótica. Uma das principais características da

disfunção endotelial é a perda da propriedade vasorelaxante dependente de óxido nítrico (NO), possivelmente devido à diminuição na síntese endotelial e/ou biodisponibilidade do NO. Assim, as principais terapias têm se baseado na administração de doadores de NO, ou compostos que apresentem a capacidade de manutenção da concentração vascular de NO ativo. Nesse sentido, a utilização de compostos antioxidantes, como a vitamina C e os polifenóis, poderá ser uma medida promissora no restabelecimento da atividade vasorelaxante em pacientes com doença arterial coronariana (Cai e Harrison, 2000; Duff et al., 2001).

Na patogênese da aterosclerose existe um grande envolvimento das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, particularmente da modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL). É interessante notar que o estresse oxidativo vascular e a LDL oxidada estão intimamente associados à disfunção endotelial dependente de NO. Assim, é crescente a utilização de compostos antioxidantes, principalmente aqueles de origem dietética, na busca da prevenção da progressão da aterosclerose (Aviram e Fuhrman, 1998). Alguns estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram uma relação inversa entre o consumo de alimentos ricos em polifenóis, particularmente flavonóides, e a morbi-mortalidade por doenças cardiovasculares (Hertog et al., 1995; Knekt et al., 1996). O mecanismo sugerido para esse efeito anti-aterogênico dos compostos fenólicos tem sido a inibição das reações mediadas por radicais livres, devido à elevada atividade antioxidante *in vitro* apresentada por esses compostos. Entretanto, a melhora da disfunção endotelial, também provocada pelos compostos fenólicos, vem sendo enfatizada e sugerida como um dos principais mecanismos de ação. O aumento do relaxamento vascular endotelial pode ser decorrente do efeito

antioxidante direto dos compostos fenólicos, preservando a concentração de NO, e/ou do aumento da síntese de NO, entre outros.

No Brasil, especialmente na região sul, e noutros países da América do Sul, uma importante fonte de compostos fenólicos é a infusão de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), conhecida como chimarrão ou tererê, dependendo da região. O extrato aquoso de erva-mate é rico em polifenóis e apresenta atividade antioxidante comprovada *in vitro* (Filip et al., 2000; Schinella et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que o extrato de erva-mate também possui atividade vasorelaxante *in vitro* em artéria mesentérica de ratos, a qual foi dependente de NO (Muccilo-Baisch et al., 1998). Recentemente, resultados do nosso laboratório mostraram que o extrato de mate possui a habilidade de inibir a progressão da aterosclerose experimental em coelhos alimentados com dieta rica em colesterol. Assim, no presente estudo, questionou-se se o extrato aquoso de erva-mate poderia melhorar a reatividade vascular, i.e., contração e relaxamento, em camundongos “*knockout*” para o receptor de LDL com aterosclerose. Verificou-se, também, a atividade vasorelaxante do extrato de erva-mate em artéria aorta isolada de ratos e o envolvimento do NO nesse efeito. Além disso, a atividade antioxidante do extrato de erva-mate utilizado foi confirmada, através da realização de ensaios *in vitro*.

Os resultados do presente estudo demonstraram que, além da atividade antioxidante *in vitro*, o extrato aquoso de erva-mate apresentou atividade vasorelaxante dependente de NO em artéria aorta torácica isolada de ratos e, de particular importância, reverteu a inibição da contração induzida pela fenilefrina e do relaxamento induzido pela acetilcolina na aorta dos camundongos com

aterosclerose. Baseados nesses resultados, estudos clínicos devem ser realizados para confirmar os efeitos do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, e/ou de seus compostos constituintes, como possíveis agentes na prevenção da disfunção endotelial e da progressão das doenças cardiovasculares em seres humanos.

1.2. Aterosclerose

A aterosclerose é considerada uma das principais causas de mortalidade na população com estilo de vida ocidental. Sabe-se que a aterosclerose desempenha um papel determinante no desenvolvimento de infarto do miocárdio, derrame cerebral, falência renal, gangrena, além de estar associada à perda de função nas extremidades, fatos estes que evidenciam o grau de importância desta patologia no contexto médico atual (Ross, 1993; Glass e Witztum, 2001).

A aterosclerose consistiu-se numa das doenças mais estudadas nas últimas três décadas. No início dos anos 70, acreditava-se que o simples acúmulo de lipídios nas paredes das artérias, estreitando o lúmen das mesmas e levando ao comprometimento do fluxo sanguíneo para os órgãos alvo, poderia ser a explicação mais plausível para o subsequente aparecimento de lesões ateroscleróticas. Além disso, evidências clínicas apontavam uma relação direta entre a hipercolesterolemia e o aparecimento de ateromas nos pacientes (Kannel et al., 1971). No final da década de 70, entretanto, verificou-se que não somente os lipídios, mas também determinados fatores de crescimento, bem como a proliferação da musculatura lisa vascular propriamente dita, poderiam também desempenhar um papel coadjuvante na patogenia da aterosclerose. Por anos acreditou-se que estes fossem os principais fatores determinantes da doença. Na

última década, porém, a aterosclerose foi reconhecida como uma desordem inflamatória crônica que pode ter componentes infecciosos ou auto-imunes (Ross, 1999; Libby, 2000; Lind, 2003). Assim, além do processo aterosclerótico envolver o acúmulo de lipídios na parede das artérias, que ocasiona o estreitamento do lúmen das mesmas e compromete o fluxo sanguíneo, ocorre também uma perda progressiva da função endotelial celular (Ross, 1999).

Os primeiros indícios da aterosclerose começam a surgir muitos anos antes de qualquer manifestação clínica, o que dificulta a compreensão da natureza múltipla desse processo, que não pode ser atribuído a apenas uma causa e parece envolver fatores tão diversos quanto ambientais, alimentares, genéticos e hemodinâmicos (Kadár e Glasz, 2001).

1.3. Patogênese da Aterosclerose

São várias as teorias que tentam explicar o desenvolvimento da aterosclerose. No entanto, desde a clássica explicação de Virchow, em 1856, todas as teorias concordam que a lesão endotelial é o ponto de partida na etiologia deste processo. Inicialmente, a lesão é mínima, em geral relacionada a fatores hemodinâmicos, não havendo importantes mudanças estruturais, mas favorecem o surgimento de uma resposta inflamatória que resulta em aumento da permeabilidade endotelial aos monócitos, lipídios e plaquetas circulantes (Porto, 1998). As teorias trombogênica, descrita por Von Rokitansky em 1852, e lipídica, descrita por Aniskchow em 1913 (Porto, 1998), são as mais antigas e as mais aceitas, devendo ser analisadas dentro do conceito atual da teoria multifatorial (Fye, 1996).

O processo aterosclerótico é caracterizado por uma série de eventos complexos e interações celulares (Figura I). O primeiro estágio da aterosclerose é o aparecimento de estrias gordurosas (*"fatty streaks"*), as quais darão origem ao ateroma (Stary, 1990). A formação das estrias gordurosas ocorre pela da passagem da LDL através do endotélio arterial. Isto acontece em locais onde o endotélio encontra-se suscetível ou danificado. Muitos fatores podem provocar a disfunção endotelial, incluindo a LDL oxidada (LDL-ox), forças físicas e químicas e infecções virais (Ross, 1999). Os monócitos da circulação sanguínea aderem a estes sítios e penetram no espaço sub-endotelial, onde assumem a morfologia de macrófagos. Na seqüência, as LDL modificadas oxidativamente são rapidamente captadas pelos macrófagos, levando ao acúmulo de ésteres de colesterol e formação das células espumosas (*"foam cells"*) (Brown e Goldstein, 1983; Ross, 1999). As células espumosas produzem fatores de crescimento que induzem a migração de células do músculo liso da camada média para a íntima e sua subsequente proliferação, convertendo a estria gordurosa em ateroma. As LDL-ox também podem danificar diretamente as células endoteliais e induzir as mesmas a produzirem fatores quimiotáticos que irão atrair monócitos circulantes. As células musculares lisas podem dividir-se e produzir uma matriz extracelular, levando à formação da lesão fibro-gordurosa. Em estágios subsequentes, uma calcificação pode ocorrer e a fibrose continuar, formando uma cobertura fibrosa cercado um centro rico em lipídios que também pode conter células mortas ou em apoptose (Libby, 1996). Dependendo da estabilidade da lesão, a mesma pode sofrer rompimento, levando à formação de trombos, que, ao se desprenderem, podem causar oclusão total ou parcial dos vasos sanguíneos, tendo como possíveis

conseqüências clínicas o infarto do miocárdio e/ou derrame cerebral (Ross, 1993; Kadár e Glasz, 2001; Andreassi, 2003).

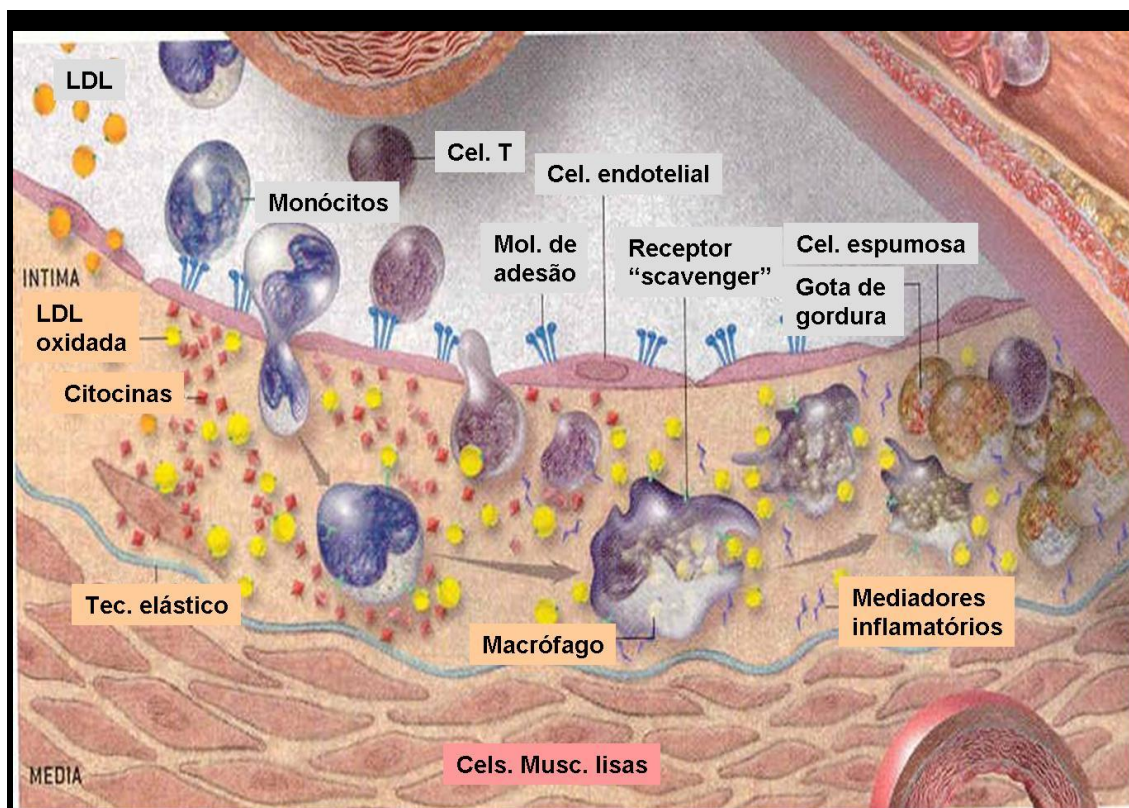


Figura I. Estágios do desenvolvimento da placa aterosclerótica. Primeiramente, a LDL penetra no endotélio e é oxidada pelos macrófagos e células musculares lisas. A liberação de fatores de crescimento e citocinas, ou as próprias LDL-ox, atraem monócitos. O acúmulo de células espumosas e a proliferação de células musculares lisas resultam no crescimento da placa (Libby, 2004).

1.4. LDL e Aterosclerose

Sabe-se há alguns anos que altas concentrações séricas de LDL estão diretamente relacionadas à doença cardiovascular. No entanto, um substancial número de evidências aponta para a LDL modificada oxidativamente como partícula responsável por estimular a migração e proliferação celular observadas

na lesão inicial, levando assim, ao dano endotelial (Berliner e Heinecke, 1996; Steinberg, 1997; Chisolm III e Chai, 2000).

Ainda não está claro como e onde se dá a modificação da LDL *in vivo*, no entanto acredita-se que ela estaria mais suscetível à oxidação em ambientes como a parede vascular, onde o balanço entre compostos antioxidantes e pró-oxidantes pode ser desfavorável, o que dificilmente ocorre no plasma, que é rico em antioxidantes e proteínas que quelam metais (Berliner e Heinecke, 1996; Steinberg, 1997). Os principais tipos celulares presentes nas lesões ateroscleróticas (células endoteliais, musculares lisas, macrófagos e linfócitos) podem oxidar a LDL, e a presença de metais de transição como o cobre e o ferro, são essenciais para estas oxidações *in vitro* (Steinbrecher et al., 1984; Leake e Rankin, 1990; Lamb et al., 1992; Proudfoot et al., 1997).

Espécies oxidantes liberadas pelas células endoteliais, células de músculo liso, monócitos, neutrófilos, macrófagos e plaquetas promovem a oxidação de lipoproteínas, as quais participam do processo aterogênico por diferentes mecanismos (Steinberg et al., 1989; Parthasarathy, 1994). A oxidação da LDL envolve a peroxidação de ácidos graxos e modificação covalente da apolipoproteína B-100 (apo B-100) por produtos da peroxidação lipídica. Assim, a LDL oxidada é rapidamente captada pelos macrófagos através dos receptores celulares chamados “*scavengers*” que, ao contrário do receptor que reconhece a LDL nativa, não sofre hiporregulação em resposta ao excesso de colesterol celular, dando origem às células espumosas. Ao que tudo indica, o reconhecimento da LDL pelos receptores “*scavengers*” está relacionado à modificação de grupos ϵ -amino no processo de modificação da porção protéica da

lipoproteína. Além disso, a LDL-ox em si é quimiotática para monócitos; inibe a motilidade tecidual dos macrófagos; é citotóxica para células endoteliais; inibe a resposta vasodilatadora dessas últimas ao óxido nítrico; é mitogênica para macrófagos e células musculares lisas; é imunogênica, e pode estimular a liberação de proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1) e fator estimulador da colônia de macrófagos (M-CSF) de células endoteliais (Steinberg, 1997).

A cadeia de reações de lipoperoxidação é, usualmente, definida como sendo um processo de deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados. O processo de lipoperoxidação está dividido em três fases: iniciação, propagação e degradação (Figura II). Iniciação é o ataque a um ácido graxo por qualquer espécie química, como o radical hidroxila, que possua reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio (H) do grupo metileno ($-\text{CH}_2-$), levando à formação de um radical centrado em carbono ($-\dot{\text{C}}\text{H}-$). Em seguida, ocorre um rearranjo molecular deste radical com formação de um produto mais estável, o dieno conjugado, que por sua vez, pode sofrer várias reações. A mais provável é a reação com o oxigênio que forma um radical peroxila ($\text{ROO}\dot{\text{O}}$). Os radicais peroxila também são capazes de abstrair átomos de hidrogênio de moléculas lipídicas, formando novos radicais peroxila e lipoperóxidos, o que é conhecido como fase de propagação. Em situações de dano celular, a peroxidação também é favorecida pela síntese enzimática de lipoperóxidos pelas cicloxigenases e lipoxigenases. Os lipoperóxidos são compostos bastante estáveis, no entanto, na presença de complexos de metais de transição, como os sais de cobre e ferro, sua decomposição é acelerada e leva à formação de radicais alcóxila ($\text{RO}\dot{\text{O}}$), pela quebra da ligação O-O, e peroxila, pela abstração de um hidrogênio. Epóxidos,

compostos carbonílicos, gases hidrocarbonetos (pentano, etano, etileno) e aldeídos como o malonaldeído (MDA) e 4-hidroxi-2,3-trans-nonenal, também são produtos da decomposição dos lipoperóxidos por metais (Halliwell e Gutteridge, 1989).

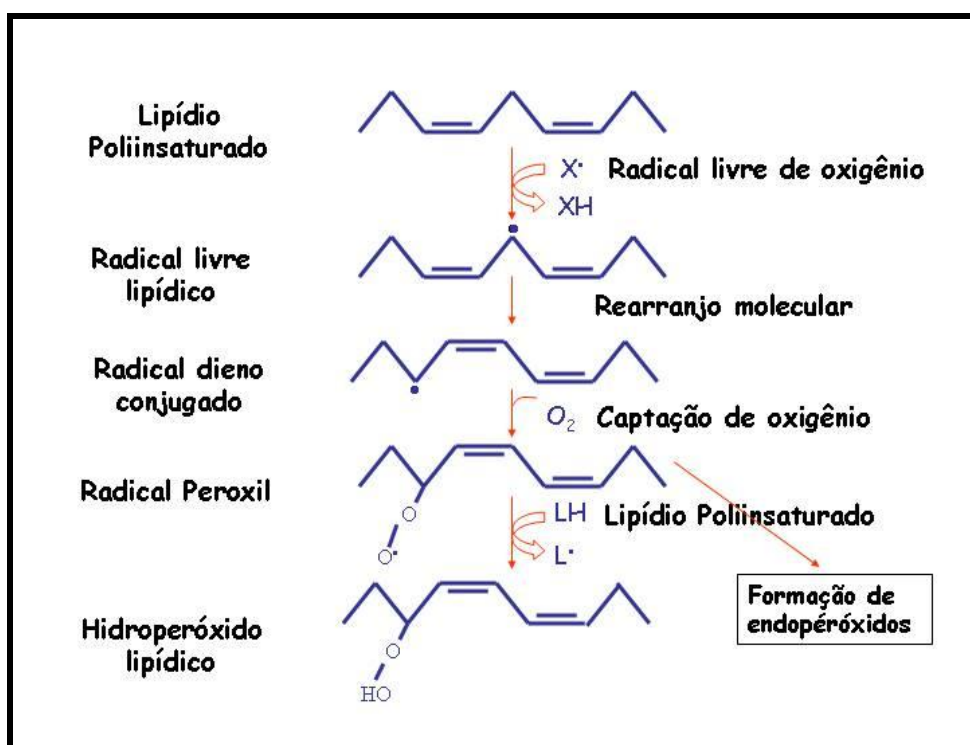


Figura II. Reações de iniciação e propagação da peroxidação lipídica (Modificado de Halliwell e Gutteridge, 1989).

1.5. Endotélio Vascular, Óxido Nítrico e Aterosclerose

Tradicionalmente, o endotélio foi considerado um componente inerte da parede dos vasos sanguíneos. No entanto, nos últimos 30 anos, a importância funcional das células endoteliais na regulação normal da homeostase vascular vem sendo enfatizada. É cada vez mais evidente que o endotélio é um órgão ativo com função parácrina, endócrina e autócrina, sendo indispensável para a

regulação do tônus vascular e manutenção da homeostase vascular. Já no século XIX, von Recklinghausen e Heidenhahn sugeriram que o endotélio não apenas fornecia um conduto físico para o fluxo do sangue aos tecidos, mas também tinha propriedades consistentes com um sistema ativo e viável de células eucarióticas (revisado por Fishman, 1982). Em 1980, Furchgott e Zawadzki descobriram um potente vasodilatador liberado das células endoteliais aórticas em resposta à acetilcolina, um agonista muscarínico. Eles chamaram essa substância de “fator relaxante derivado de endotélio” (EDRF; Furchgott e Zawadzki, 1980). Sete anos depois, Ignarro e colaboradores (1987) e Palmer e colaboradores (1987) demonstraram, independentemente, que o EDRF era equivalente ao óxido nítrico (NO) e que essa simples molécula diatômica era sintetizada pelas células endoteliais a partir do aminoácido L-arginina. O NO, gerado dessa maneira, ativa a enzima guanilato-ciclase nas células musculares lisas vasculares, levando ao seu relaxamento.

O NO é um radical livre gasoso, cujo elétron desemparelhado proporciona reações com várias moléculas biológicas (Kanner et al., 1991). Ele difunde-se livremente através das membranas e possui meia-vida de apenas poucos segundos em sistemas biológicos. O NO é sintetizado pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS), que existem sob três isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS), e induzida (iNOS). A ativação da eNOS e da nNOS depende de concentrações intracelulares de cálcio e de ligações do complexo cálcio-calmodulina, bem como da fosforilação dependente de cálcio das NO sintases (Welch e Loscalzo, 1994). Nas células endoteliais, a ativação da eNOS é estimulada por vários mediadores físicos e bioquímicos, como forças

hemodinâmicas (“*shear stress*”), trombina, bradicinina, substância P, difosfato de adenosina (ADP), acetilcolina e insulina (Naderali e Williams, 2003). Todas as isoformas das NOS descritas requerem dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzida (NADPH), L-arginina e oxigênio molecular como substratos e dinucleotídeo de flavina (FAD), mononucleotídeo de flavina (FMN) e tetrahydrobiopterina (TBH₄) como cofatores, liberando NO e L-citrulina como produtos (Schulz e Triggle, 1994).

Quando o NO difunde-se para o citoplasma das células musculares lisas subjacentes ao endotélio, liga-se ao ferro presente no grupamento heme da enzima guanilato ciclase solúvel alterando sua conformação. Esta enzima por sua vez, converte o nucleotídeo trifosfato de guanosina (GTP), formando o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), segundo mensageiro intracelular, responsável por muitas ações do NO. A atuação do GMPc sobre proteínas quinase, fosfodiesterases e canais iônicos, os quais modulam a concentração intracelular de cálcio, promove a diminuição da força de contração e o conseqüente relaxamento muscular (Milbourne e Bygrave, 1995; Marín e Rodríguez-Martínez, 1995) (Figura III). A fosfodieterase 5 (PDE5) inativa o GMPc terminando o relaxamento da musculatura lisa mediada pela via NO/GMPc (Ghalayini, 2004). Em particular, a PDE5, específica para GMPc, nas células da musculatura vascular regula os níveis de GMPc e conseqüentemente, a duração e extensão do vasorelaxamento (Koyama et al., 2001).

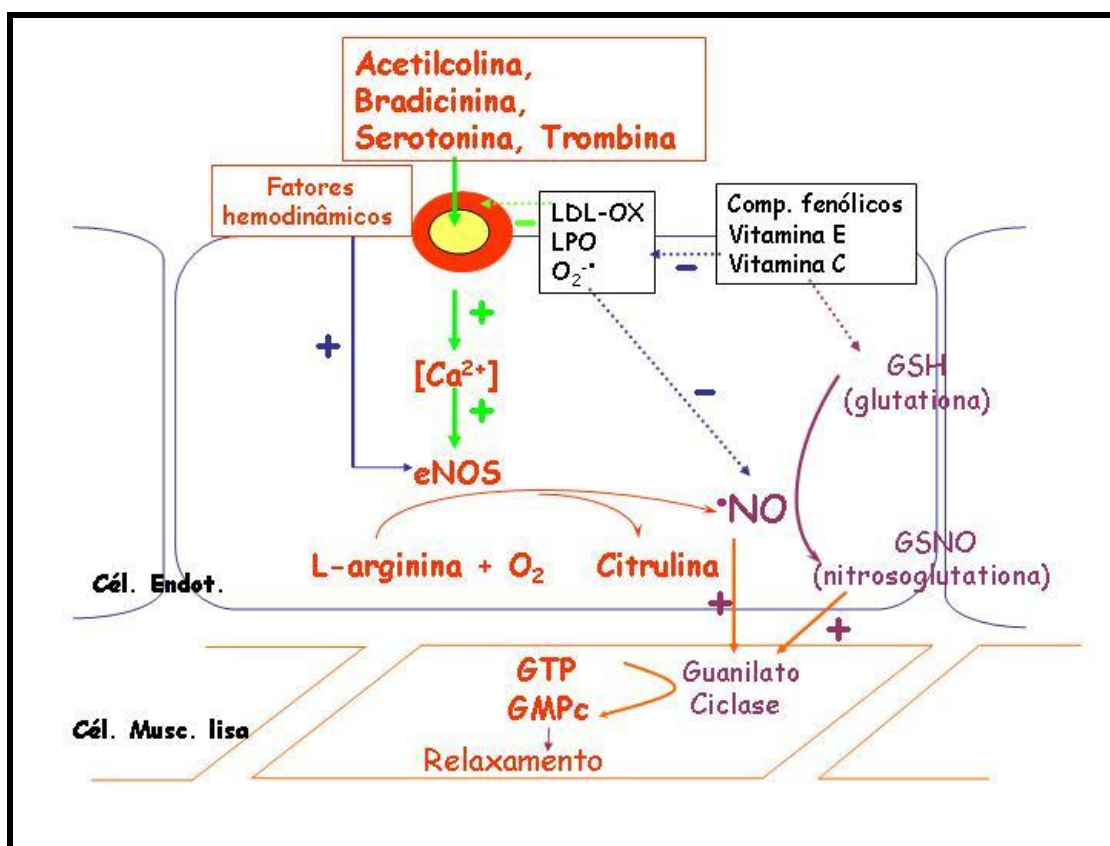


Figura III. Interação de oxidantes e antioxidantes com o óxido nítrico (NO) derivado do endotélio. A estimulação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) por fatores dinâmicos, ou agonistas mediados por receptores (acetilcolina, bradicina, serotonina e trombina) causam a conversão de L-arginina a citrulina e NO. O NO difunde-se para as células musculares lisas e estimula a guanilato ciclase, causando vasorelaxamento. A atividade biológica do NO é atenuada pela reação com o radical superóxido (O₂^{•-}) e LDL oxidadas (LDL-ox). LDL oxidadas, e possivelmente a lipoperoxidação da membrana plasmática (LPO) também podem interromper a síntese de NO induzida por agonistas. As concentrações de O₂^{•-}, LDL-ox e produtos da peroxidação lipídica podem ser diminuídos pelos compostos fenólicos e pelas vitaminas E e C. A vitamina C preserva a glutatona intracelular (GSH), a qual estabiliza o NO através da formação da NO-glutaciona biologicamente ativa (GSNO) (Modificada de Carr e Frei, 2000).

1.5.1. Função Endotelial

Em condições fisiológicas, o endotélio forma uma barreira relativamente impermeável entre os elementos da circulação sanguínea e a parede do vaso, secreta substâncias vasoativas para manter uma superfície antitrombótica, regula o tônus vascular, modula respostas inflamatórias e inibe a proliferação de células

musculares lisas vasculares (Makrides et al., 1998; Leopold e Loscalzo, 2000). O endotélio mantém um ambiente antitrombótico pela síntese de produtos celulares e expressão de moléculas de superfície que inibem a geração de trombina e a ativação de plaquetas. Endoperóxidos endoteliais são metabolizados a prostaciclina, que retardam a agregação e a deposição plaquetária pela ativação da adenilato ciclase aumentando a produção de AMPc intracelular. O NO produzido pelo endotélio difunde-se através das membranas das plaquetas para estimular a guanilato ciclase e inibir a adesão e agregação plaquetária. O endotélio aumenta os mecanismos para estimulação da prostaciclina sintetase e NOS. Além disso, as células endoteliais produzem glicosaminoglicanos semelhantes à heparina que se ligam à antitrombina III e catalisam a inativação da trombina e fator X (Esmon et al., 1982a e 1982b; Leopold e Loscalzo, 2000). O tônus vascular é modulado pelo endotélio através da síntese e liberação de substâncias vasoativas que promovem a vasodilatação, como o NO e fator hiperpolarizante derivado de endotélio (EDHF), ou a vasoconstrição; e influencia a concentração de substâncias vasoativas circulantes, incluindo a angiotensina II e a bradicinina. O EDHF é um potente vasodilatador gerado pelo endotélio em resposta à acetilcolina, bradicinina, histamina e substância P. O EDHF ativa canais de potássio sensíveis ao cálcio na musculatura lisa vascular e hiperpolariza a membrana da célula iniciando o relaxamento vascular. O tônus basal da parede vascular é mantido pela geração contínua de baixas concentrações de NO. (Cohen e Vanhoutte, 1995; Cines et al., 1998).

O endotélio equilibra as propriedades vasodilatadoras das substâncias descritas acima pela produção de peptídeos vasoconstritores, como a endotelina-1

(ET-1) e a angiotensina II. A ET-1 é secretada continuamente em concentrações fisiológicas, estimulada pelos produtos liberados das plaquetas e suprimida pelo NO. O endotélio também expressa a enzima conversora de angiotensina, que converte a angiotensina I no peptídeo vasoconstritor angiotensina II (Kifor e Dzau, 1987). Normalmente, a produção destas substâncias vasoativas é regulada a favor da vasodilatação, entretanto, sob condições patológicas associadas à função endotelial pode haver um efeito vasoconstritor predominante.

O endotélio vascular também exerce uma ação fundamental na resposta inflamatória e, dessa forma, pode influenciar a gênese da aterotrombose. Nos sítios de inflamação, o endotélio facilita a migração dos leucócitos do espaço extravascular pelo movimento direcionado das células inflamatórias através da monocamada endotelial. Na presença de endotoxinas ou citocinas, como o interferon δ , o endotélio expressa receptores que incluem moléculas de adesão intracelulares (ICAM), moléculas de adesão celular vasculares (VCAM-1) e E-selectina. Estes receptores facilitam a ligação dos leucócitos ao endotélio e a diapedese entre as células endoteliais para infiltração na camada média.

1.5.2. Disfunção Endotelial e Aterosclerose

Apenas cinco anos após a descoberta do EDRF, ficou evidente que muitas doenças cardiovasculares estão associadas ao impedimento do vasorelaxamento dependente de endotélio. Isto foi demonstrado em coelhos alimentados com colesterol (Jayakody et al., 1985; Chappell et al., 1987), em macacos hipercolesterolêmicos (Harrison et al., 1987), e em pacientes com doença arterial

coronariana estabelecida, ou pacientes apresentando fatores de risco típicos que predisõem esta condição, como hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia, hipertensão, diabetes mellitus, tabagismo e idade avançada (Creager et al., 1990; Moncada e Higgs, 1993; Keaney e Vita, 1995; Lyons, 1997; Taddei et al., 1998). Provavelmente, ocorre uma perda da produção endotelial e/ou biodisponibilidade do NO nessas desordens. O termo “disfunção endotelial” foi criado para descrever as alterações da função endotelial vascular, descritas acima. A disfunção endotelial pode ser definida como o impedimento das funções endoteliais mais importantes, como as propriedades vasorelaxantes, anticoagulantes e antiinflamatórias (Russe e Fleming, 1996).

Os mecanismos envolvidos no relaxamento vascular dependente de endotélio nas várias patologias são multifatoriais (Kojda e Harrison, 1999). Muitos fatores de risco cardiovasculares estão associados com o aumento do estresse oxidativo vascular e/ou estão acompanhados da diminuição da capacidade antioxidativa da parede vascular. Foi demonstrado, recentemente, que o grau de disfunção endotelial está associado com o risco de eventos cardiovasculares, como infarto do miocárdio (Schachinger et al., 2000), sugerindo que a atenuação da disfunção endotelial poderá reduzir a taxa desses eventos e melhorar o prognóstico da patologia.

Uma das principais características da disfunção endotelial é a diminuição da concentração de NO. Isto pode ser resultante da diminuição da síntese ou um aumento na inativação do NO pela produção aumentada de espécies reativas de oxigênio. Quando presente, a disfunção endotelial serve como um marcador precoce da aterosclerose, como demonstrado pela observação de que a

progressão de estrias gordurosas está associada com o impedimento do relaxamento vascular (Verbeuren et al., 1986).

A maioria das disfunções associadas com o aumento do estresse oxidativo, particularmente a produção elevada de radicais superóxido e de LDL oxidada, podem diminuir a atividade biológica do NO (Gryglewski et al., 1986; Rubanyi e Vanhoutte, 1986). Conforme descrito anteriormente, a interação entre as lipoproteínas oxidadas e o endotélio vascular é importante para a patofisiologia da aterosclerose, perturbando significativamente os mecanismos homeostáticos e promovendo agregação plaquetária, diapedese de células inflamatórias e vasoconstrição. O radical $O_2^{\bullet-}$ é continuamente gerado *in vivo* na mitocôndria, através da cadeia respiratória (Shigenaga et al., 1994) e pelas enzimas NADPH oxidases (Baggiolini e Wymann, 1990; Shigenaga et al., 1994). Apesar disso, a concentração de $O_2^{\bullet-}$ no interior das células é relativamente baixa devido à ação da enzima superóxido dismutase (SOD), que inativa o $O_2^{\bullet-}$ formando H_2O_2 (Gartner e Fridovich, 1991). Embora a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela SOD seja uma reação enzimática rápida (Klug et al., 1972), a velocidade de reação deste radical com o NO é duas a três vezes maior. Desta maneira, o NO compete com a SOD pelo $O_2^{\bullet-}$, podendo ocorrer a formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) (Huie e Padmaja, 1993). O ânion $ONOO^-$ é efetivamente mais reativo do que os seus precursores, além de ser mais tóxico para a célula (Beckman et al., 1990; Zhu et al., 1992), pois em pH fisiológico o $ONOO^-$ encontra-se formando o ácido peroxinitroso ($ONOOH$), o qual sofre clivagem homolítica dando origem ao $^{\bullet}OH$ e ao dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}) (Beckman et al., 1990). Assim, o $ONOO^-$ é capaz de promover inúmeros danos oxidativos como a nitração de proteínas (Ischiropoulos e Al-Mehdi, 1995), a

peroxidação lipídica (Radi et al., 1991a) e a oxidação de grupamentos tiólicos (Radi et al., 1991b).

Além do efeito vasodilatador do óxido nítrico, sabe-se que ele é um seqüestrador de radical peroxil, sendo capaz de inibir a oxidação da LDL quando promovida por metais de transição, por células em cultura ou por compostos azo iniciadores (Jessup et al., 1992; Yates et al., 1992; Padmaja e Huie, 1993). Diversos estudos *in vitro* têm demonstrado que a LDL nativa ou oxidada pode inibir a síntese ou liberação de NO pelas células endoteliais, ou atenuar seu efeito biológico, contribuindo, assim, para a disfunção endotelial (Andrews et al., 1987; Simon et al., 1990; Plane et al., 1993; Hein e Kuo, 1998).

A disfunção endotelial é uma desordem reversível e estratégias focadas na redução dos fatores de risco para as doenças cardiovasculares ocasionaram melhora na função endotelial (Bonetti et al., 2003). Dentre as estratégias encontram-se a diminuição sérica de colesterol (Vogel, 1999), a terapia antihipertensiva (Taddei et al., 2002), a redução do tabagismo (Celermajer et al., 1993), a terapia de reposição hormonal pós-menopausa (Vita e Keaney, 2001), a suplementação com ácido fólico (Doshi et al., 2001) e o exercício físico (Hambrecht et al., 2000). Além da redução dos fatores de risco, outra meta terapêutica está apoiada na administração de doadores de NO, como S-nitrosotióis, nitrovasodilatadores orgânicos (Ignarro et al., 2002). Novos compostos farmacológicos doadores indiretos de NO, como as estatinas e estrógenos, também melhoraram a função endotelial (Getwaltig e Kojda, 2002). Devido ao fato do aumento do estresse oxidativo desempenhar um papel fundamental na patogenia da disfunção endotelial, a administração de

antioxidantes poderia ser uma estratégia racional para o tratamento desta disfunção.

1.6. Compostos Antioxidantes Fenólicos na Aterosclerose e na Função Endotelial

Os compostos fenólicos existem naturalmente numa grande variedade de alimentos e bebidas de origem vegetal, como frutas, legumes, sementes, flores e folhas, sucos, chás e vinho tinto, e fazem parte integral da dieta humana (Herrmann, 1976; Hertog et al., 1992; Hertog et al., 1993b). Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram uma correlação inversa entre o consumo de flavonóides e a mortalidade por doenças cardiovasculares (Hertog et al., 1993a; Hertog et al., 1995; Knekt et al., 1996). Vários estudos têm demonstrado que os compostos fenólicos, principalmente flavonóides, apresentam efeito antioxidante, que pode ser atribuído à sua capacidade seqüestradora das espécies reativas de oxigênio e de quelar metais (Rice-Evans et al., 1997; Soleas et al., 1997). A quercetina, um dos principais flavonóides encontrados em alimentos vegetais, é capaz de seqüestrar radicais superóxido e peróxidos lipídicos, inibindo a oxidação da LDL e os efeitos citotóxicos das LDL-ox em macrófagos (Husain et al., 1987; Negre-Salvagyre e Salvagyre, 1992; Cos et al., 1998).

Nos vegetais, os flavonóides são encontrados conjugados a vários açúcares. O cozimento não afeta os glicosídeos (Price et al., 1997; Ioku et al., 2001), mas a enzima β -glicosidase de bactérias intestinais hidrolisa a ligação glicosídica liberando a forma aglicona do flavonóide (Schneider et al., 2000). Após

a ingestão e hidrólise enzimática, os flavonóides são então absorvidos pelo intestino e aparecem na circulação sangüínea essencialmente na forma de conjugados com o ácido glicurônico, com grupamentos sulfato ou metílico (Piskula e Terao, 1998; Erlund et al., 1999; Moon et al., 2000; Wittig et al., 2001). A manutenção da atividade antioxidante desses metabólitos de flavonóides tem sido alvo de alguns estudos. Foi demonstrado que o plasma de ratos que sofreram administração intragástrica com os polifenóis quercetina e epicatequina apresentou-se mais resistente à lipoperoxidação (Silva et al., 1998a e 1998b; Fremont et al., 1999). Manach e colaboradores (1998) também verificaram resultados semelhantes em seres humanos e outros pesquisadores já haviam relatado a resistência do plasma contra a oxidação após a ingestão de chá preto e verde e vinho tinto (Whithehead et al., 1995; Serafini et al., 1996).

Uma outra classe importante de compostos fenólicos é constituída pelos ácidos hidroxicinâmicos, os quais são encontrados em quase todas as plantas (Herrmann, 1976; Kühnau, 1976). O principal representante dos ácidos hidroxicinâmicos é o ácido caféico, que está presente nos alimentos principalmente esterificado com o ácido quínico, denominando-se ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico). O café é a maior fonte de ácido clorogênico na dieta humana, sendo que outras fontes dietéticas incluem frutas, legumes, grãos (Clifford et al., 1990; Clifford, 1999) e a erva-mate (Carini et al., 1998), a qual possui particular importância para a população do sul do Brasil. Semelhante aos flavonóides, os ácidos clorogênico e caféico são ótimos antioxidantes *in vitro* (Rice-Evans et al., 1996), inclusive com capacidade de inibir a oxidação da LDL (Laranjinha et al., 1994; Nardini et al., 1995).

Além do potencial antioxidante, os compostos fenólicos possuem outras propriedades, dentre elas, atividade antiinflamatória, anti-agregação plaquetária diurética, antiviral e anticarcinogênica, sendo também benéficos ao sistema cardiovascular por sua participação na vasodilatação (Tzeng et al., 1991; Bruneton, 1993; Rice-Evans, 1996; Benavente-Garcia et al., 1997; Neiva et al., 1999; Ray et al., 1999; Schuldt et al., 2000).

O efeito vasodilatador dos compostos polifenólicos está relacionado com a liberação de NO (Palmer et al., 1987; Fitzpatrick et al., 1995; Waslawik et al., 1997; Schuldt et al., 2000). Andriambelison e colaboradores (1997) e Schuldt e colaboradores (2000) relataram que compostos polifenólicos existentes no vinho promoveram relaxamento dependente da presença do endotélio vascular em anéis de aorta torácica de ratos. Stoclet e colaboradores (1999) verificaram também que os compostos fenólicos do vinho tinto foram capazes de promover aumento na concentração de cálcio intracelular, ativando a enzima NOS e, conseqüentemente, aumentando a concentração de NO.

Em um elegante estudo de estrutura-atividade, Taubert e colaboradores (2002) avaliaram a capacidade de vários compostos fenólicos de diferentes classes em aumentar a liberação de NO de artérias coronárias de suínos e de provocar o vasorelaxamento. A quercetina e seus glicosídeos, a miricetina, as proantocianidinas e o ácido caféico, entre outros, apresentaram elevada atividade de liberação de NO e atividade vasorelaxante. Por outro lado, compostos fenólicos como o ácido clorogênico, o ácido ferúlico, a rutina, a epicatequina e o resveratrol, entre outros, estimularam a liberação de NO, porém a quantidade não foi suficiente para promover o vasorelaxamento das artérias (Taubert et al., 2002).

Os possíveis mecanismos de ação dos compostos fenólicos no efeito da proteção contra a aterosclerose foram, recentemente, revisados por Dell'Agli e colaboradores (2004). Esses compostos agem nas células musculares lisas diminuindo a expressão gênica, os receptores de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF β) e a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), promovendo diminuição da migração e proliferação das células musculares lisas (Figura IV). Os compostos fenólicos agem também nas células endoteliais aumentando a produção da eNOS, do EDHF e de prostaciclina; diminuindo a degradação do NO e a formação de endotelina-1 (ET-1), o que favorece o vasorelaxamento. Além disso, inibem a inflamação, por diminuir a expressão de moléculas de adesão (Dell'Agli et al., 2004).

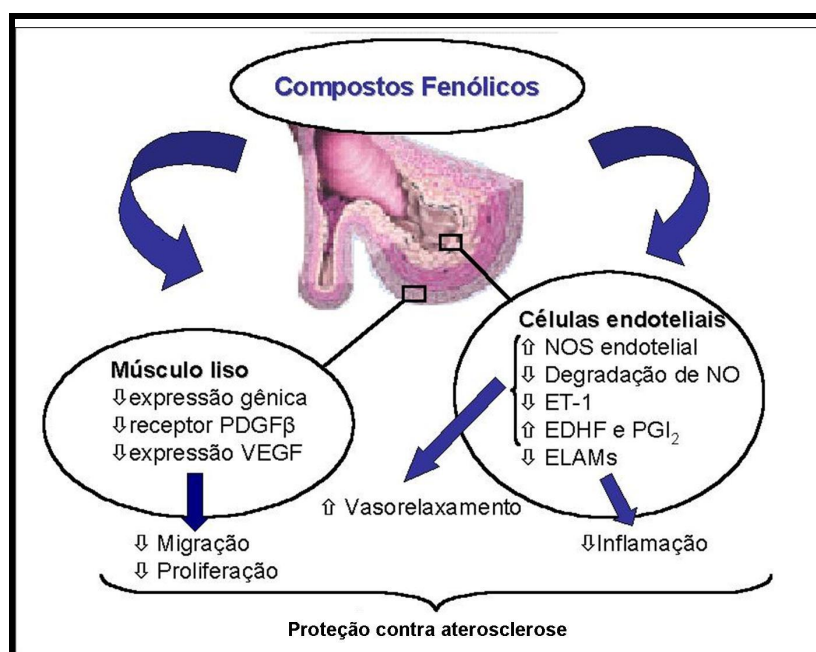


Figura IV. Efeitos protetores dos compostos fenólicos na parede arterial (Modificado de M. Dell'Agli et al., 2004).

1.7. Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*)

A *Ilex paraguariensis* (Saint-Hilaire) é conhecida popularmente como erva-mate, chá dos Jesuítas, chá Paraguaio, ou simplesmente mate. Trata-se de uma espécie pertencente à família Aquifoliaceae e gênero *Ilex*, no qual estão englobadas aproximadamente 600 espécies (Figura V).

A *Ilex paraguariensis* é uma planta economicamente importante na América do Sul. Ela cresce naturalmente e é largamente cultivada no nordeste da Argentina, sul do Brasil e leste do Paraguai (Filip et al., 2001). 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 propriedades estimulantes. O nome Mate é derivado da palavra quíchua "mate" que significa uma xícara ou vaso usado para ingerir a bebida. No Brasil também é conhecido como "chimarrão". Durante séculos, a erva-mate tem sido usada como estimulante pelos indígenas da América do Sul, especialmente os índios Guarani, e esse hábito foi incorporado pelas sociedades colonizadoras e permanece até a época atual.

Sugere-se que a *Ilex paraguariensis* apresenta ações analéptica, inotrópica e cronotrópica positivas, diurética, glicogenolítica e lipolítica (Blumenthal, 1998), colerética (Gorzalczany et al., 2001), hipocolesterolemiantes (Ferreira et al., 1997) e antioxidante (Gugliucci, 1996, Carini et al., 1998; Schinella et al., 2000; Filip et al., 2001). Além disso, a erva-mate é utilizada na medicina popular para o tratamento de artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de fluidos, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas (Pio Corrêa, 1984).

Os principais componentes químicos, considerados responsáveis pelas características do produto, são as metilxantinas, os derivados cafeoilquínicos, alguns flavonóides e as saponinas. Dentre os alcalóides purínicos, podemos citar a cafeína, a teobromina e a teofilina (Alikaridis, 1987), componentes de reconhecida ação sobre o sistema nervoso central, aos quais é atribuída a ação estimulante do mate. Outras substâncias importantes no mate são os derivados cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico e seus isômeros, aos quais se atribui a ação adstringente do produto (Clifford, 1990). Além do ácido clorogênico, os flavonóides rutina, quercetina, diglicosídeo de luteolina e a cafeoilglicose também estão presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (Ricco et al., 1991; Carini et al., 1998; Filip et al., 2001).

Estudos utilizando diversos modelos de oxidação *in vitro* e *ex vivo* já constataram que os compostos polifenólicos presentes na erva-mate têm propriedades antioxidantes. Como por exemplo, a inibição da oxidação de liposomas (Filip et al., 2000), de partículas de LDL (Gugliucci e Stahl, 1995 e Gugliucci, 1996; Bracesco et al., 2003) e como seqüestradores de radicais livres (Campos et al., 1996). Também observou-se uma correlação positiva entre o conteúdo de polifenóis, particularmente ácido clorogênico, e a atividade antioxidante de extratos de diferentes espécies de *Ilex* (Filip et al., 2000; Schinella et al., 2000). Carini e colaboradores (1998) demonstraram que os compostos polifenólicos presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* atuam como antioxidantes não só isoladamente, mas também de forma sinérgica. De particular interesse são os achados de Muccillo-Baisch e colaboradores (1998). Esses autores demonstraram o efeito vasodilatador *in vitro* do extrato aquoso de *Ilex*

paraguariensis em leito arterial mesentérico de ratos, sugerindo ainda, o envolvimento do óxido nítrico nesse efeito. Além disso, recentemente foi demonstrado em nosso laboratório, pela primeira vez, que o extrato aquoso de erva-mate tem a capacidade de inibir a progressão da aterosclerose *in vivo*, em coelhos alimentados com colesterol (Mosimann et al., 2002).

As folhas de *Ilex paraguariensis* também apresentam uma concentração alta de saponinas quando comparada com as demais espécies, que corresponde de 5 a 10% do peso seco da planta. As saponinas identificadas na *Ilex paraguariensis* são triterpênicas pentacíclicas, mono ou bidesmosídicas, tendo como aglicona o ácido ursólico ou o oleanólico e os açúcares arabinose, glicose e ramnose (Schenkel et al., 1997). Essas substâncias são responsáveis pelo amargor do mate e pela atividade antiinflamatória atribuída ao chá de erva-mate, já mencionada desde o século passado. As saponinas, por apresentarem comportamento anfifílico e capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos, apresentam inúmeras propriedades biológicas (Simões et al. 1999). Dentre estas, encontra-se a ação redutora da concentração sérica de colesterol. Em 1971, foi demonstrado que a adição de saponinas à dieta de frangos reduziu o colesterol no sangue e nos tecidos (Cheeke, 1971). Posteriormente, foi relatado que as saponinas da alfafa (*Medicago sativa*) reduziram o colesterol hepático em camundongos (Reshef et al., 1976). Efeitos semelhantes foram relatados para as saponinas de ginseng (*Panax ginseng*), de calêndula (*Calendula officinalis*) e de beterraba (*Beta vulgaris*) em coelhos (revisado por Schenkel et al., 1999). Além disso, as saponinas de soja foram capazes de inibir a lipoperoxidação *in vitro* da LDL e de fibroblastos (Yoshikoshi et

al., 1996; Li et al., 1999). Particularmente, as saponinas da *Ilex paraguariensis* inibiram a difusão passiva de ácido cólico através de membrana de celulose (Ferreira et al., 1997), mimetizando a absorção de ácidos biliares pelas células intestinais, cuja inibição é responsável pela diminuição do colesterol sérico. No entanto, ainda não existem informações sobre a atividade hipocolesteremiante das saponinas da *Ilex paraguariensis*.



Figura V. Erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

1.8. Modelo Experimental de Aterosclerose

A dificuldade de se estudar a aterosclerose em seres humanos devido à evolução lenta, envolver múltiplos fatores de difícil controle em estudos clínicos e, portanto, gerar resultados de interpretação complexa, criou a necessidade do desenvolvimento de modelos animais (Fekete, 1993). O modelo ideal deve ser de fácil manuseio e manutenção, ter baixo custo, tamanho adequado, reproduzir em laboratório, possuir características genéticas definidas, guardar semelhanças anatômicas, fisiológicas e bioquímicas com os seres humanos quanto a aspectos do processo patológico e desenvolver lesões com facilidade (Vesselinovitch, 1988). Desta maneira, os camundongos seriam o melhor modelo se levarmos em conta o custo e a facilidade de manutenção, porém, eles respondem fracamente à dieta de colesterol e desenvolvem apenas pequenas estrias gordurosas no arco aórtico (Paigen et al., 1990). O uso de técnicas de modificação genética tem resultado no desenvolvimento de camundongos “*knockout*” que não expressam o receptor para a LDL (LDLR KO). Esses animais apresentam concentração plasmática elevada de lipoproteínas e são suscetíveis à aterosclerose (Ishibashi et al., 1993; Ishibashi et al., 1994, Kowala et al., 2000).

Os camundongos LDLR KO são obtidos a partir de recombinação homóloga de células tronco (“*stem cells*”) embrionárias para produção de camundongos com perda funcional dos genes para receptores de LDL. As partículas de VLDL e LDL normalmente competem por receptores hepáticos comuns, denominados receptores de LDL ou B/E, os quais reconhecem as apolipoproteínas B e E (apoB e apoE), presentes nestas lipoproteínas (Catanozi et al., 2003). Os camundongos LDL KO passam então a apresentar moderada hipercolesterolemia devido à

ausência de receptores hepáticos para LDL, os quais prolongam a meia-vida plasmática da VLDL e LDL. Além disso, quando alimentados com uma dieta rica em colesterol, esses camundongos tornam-se severamente hipercolesterolêmicos, desenvolvendo aterosclerose aórtica e xantomas subcutâneos (Ishibashi et al., 1993; Kowala et al., 2000).

2. JUSTIFICATIVA

A aterosclerose representa, atualmente, a doença com maior índice de mortalidade, sobretudo nos países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Segundo dados do DATASUS, em 1999, a doença arterial coronariana contribuiu com 27,4 % das causas de morte. O infarto agudo do miocárdio, o acidente vascular cerebral, a insuficiência vascular crônica e inúmeras outras patologias são, comprovadamente, decorrentes da aterosclerose, fato que evidencia o grau de importância desta doença no contexto médico atual. A sociedade científica muito tem se empenhado no estudo dos fatores causadores da aterosclerose, bem como nos métodos preventivos e eficientes para o seu controle. A disfunção endotelial é uma desordem sistêmica e um evento chave na patogenia da aterosclerose e suas complicações (Bonetti et al., 2003). Assim, a produção de NO endotelial tornou-se uma das principais áreas estudadas na biologia vascular. Alguns dos principais efeitos que o óxido nítrico desempenha na parede vascular são, potencialmente, vasoprotetores, mantendo funções fisiológicas cruciais, como vasodilatação, anticoagulação, adesão leucocitária, proliferação de células musculares lisas e capacidade antioxidante (Gewaltig e Kojda, 2002). Além da aterosclerose, doenças como hipertensão, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, falência cardíaca e tabagismo também estão associadas à disfunção endotelial (Moncada e Higgs, 1993).

Sendo a disfunção endotelial de fundamental importância para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose, parece atrativo considerar o restabelecimento da função endotelial como um alvo terapêutico primário na prevenção da doença aterosclerótica, associado ao tratamento de fatores de risco

pré-estabelecidos para doenças cardiovasculares (Bonetti et al., 2003). Estudos epidemiológicos demonstraram uma relação inversa entre a ingestão de produtos ricos em compostos fenólicos e flavonóides e a mortalidade por doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, sugerindo uma importante participação desses compostos como agentes antioxidantes e vasodilatadores naturais (Hertog et al., 1995; Tijburg et al., 1997).

Na América do Sul, principalmente na região sul do Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai, é comum o consumo de infusões de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), planta rica em polifenóis hidrossolúveis. Apesar do elevado consumo de *Ilex paraguariensis* por um grande número de pessoas, poucos são os estudos acerca de suas possíveis propriedades terapêuticas, particularmente em relação ao combate das doenças cardiovasculares. Os estudos já existentes demonstraram que o extrato aquoso de erva-mate possui atividade antioxidante *in vitro* (Gugliucci e Stahl, 1995; Campos et al., 1996; Gugliucci, 1996; Carini et al., 1998; Filip et al., 2000; Schinella et al., 2000), atividade vasorelaxante *in vitro* (Muccilo-Baisch et al., 1998), e habilidade de reduzir a progressão de aterosclerose experimental *in vivo* (Mosimann et al., 2002).

Assim, tendo em vista a importância da reatividade vascular na patogênese e no desenvolvimento das doenças cardiovasculares e o possível potencial de constituintes dietéticos com propriedades antioxidantes e vasorelaxantes na prevenção da aterosclerose, é importante avaliar o efeito do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* na manutenção dessas propriedades *in vitro*, bem como verificar o efeito da ingestão do extrato de erva-mate na reatividade vascular de animais com aterosclerose.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a atividade do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (EAI), obtido a partir de erva-mate comercial, na reatividade vascular *in vitro* em artéria aorta de ratos Wistar e *ex vivo*, após ingestão crônica do extrato, em aorta de camundongos LDLR KO com aterosclerose.

3.2. Específicos

3.2.1. Identificar os principais compostos presentes no EAI através de cromatografia líquida de alta eficiência.

3.2.2. Avaliar a atividade antioxidante do EAI através dos ensaios *in vitro*.

3.2.3. Avaliar o efeito do EAI nos ensaios de reatividade vascular *in vitro* em aorta de ratos Wistar e verificar o envolvimento do óxido nítrico.

3.2.4. Avaliar o efeito do tratamento crônico com o EAI na reatividade vascular *ex vivo* de aorta de camundongos LDLR KO com aterosclerose.

3.2.5. Avaliar a extensão das lesões ateroscleróticas no arco aórtico, através de técnicas histológicas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais e Reagentes

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) foi fornecida pela empresa Moinhos Unidos Mate-Brasil S.A. (Curitiba-PR), Lote n.10/03-27. Os conjuntos de reagentes enzimáticos para as determinações do colesterol total (CT), triglicerídeos (TGL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) foram obtidos da Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, MG).

Todas as substâncias relacionadas a seguir foram adquiridas da SIGMA (Steinheim, Alemanha ou St. Louis, EUA): fenilefrina, acetilcolina, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido cinâmico, cafeína, teobromina, teofilina, ácido *p*-cumárico, ácido *t*-cumárico, ácido ferúlico, ácido caféico, epicatequina, ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido nitrilotriacético (NTA), hidroxitolueno-butilado (BHT), *tert*-butilhidroperóxido (t-BuOOH), β -nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), desoxirribose, cloreto férrico, reagente de Folin-Ciocalteau, metassulfato de fenazina, “*nitro blue tetrazolium*” (NBT), L-arginina, L-NOARG, salina tamponada (PBS),

O ácido clorídrico (HCl), cloreto de sódio (NaCl), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e manitol, foram adquiridos da empresa NUCLEAR (Diadema, SP). O Cloreto de potássio (KCl) e o ácido tricloroacético (TCA) foram adquiridos da VETEC (Rio de Janeiro, RJ). A glicose (C₆H₁₂O₆), cloreto de cálcio diidratado (CaCl₂.2H₂O) e cloreto de magnésio (MgCl₂.6H₂O) foram adquiridos da MERCK

(Rio de Janeiro, RJ). O peróxido de hidrogênio, acetato de etila, diclorometano, hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de ferro (FeCl₃), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), carbonato de sódio (NaCO₃), cloreto de cálcio (CaCl₃), carbonato de cálcio (CaCO₃), metanol, etanol e os demais reagentes foram adquiridos de outras marcas nacionais. Todas as soluções foram preparadas com água destilada ou deionizada, com sais de pureza analítica.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparação do Extrato Aquoso de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI)

O extrato aquoso de erva-mate foi obtido pela adição de água deionizada quente (aprox. 100 °C) sobre a amostra comercial (folhas secas e moídas) de *Ilex paraguariensis*, na proporção de 100 mg/mL. Após 20 min de extração, a mistura foi filtrada em quitassato e, então, colocada em placas de Petri para evaporação em estufa (50 °C). O extrato seco resultante (aproximadamente 30 mg/mL, rendimento de aproximadamente 30%) foi utilizado na preparação do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (EAI), através da solubilização em água deionizada nas concentrações desejadas e utilizado nos protocolos descritos abaixo, com exceção do item 4.2.2, onde foi necessário uma extração específica.

4.2.2. Análises do Extrato de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI)

A análise fitoquímica do extrato de erva-mate foi realizada no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal – Centro de Ciências Agrárias, da

Universidade Federal de Santa Catarina, sob supervisão do Prof. Dr. Marcelo Maraschin.

4.2.2.1. Extração dos Compostos Fenólicos (Isolamento e Purificação)

Às folhas secas (2 g) e moídas de erva-mate foram adicionados 15 mL de solução de carbonato de cálcio (4,7 %). Em seguida, a solução foi transferida para aparato de “*soxhlet*” e mantida sob refluxo por 20 min. Após este período, a solução foi resfriada em temperatura ambiente e filtrada a vácuo. O extrato aquoso foi coletado e transferido para funil de separação, adicionou-se 60 mL de acetato de etila e 1 mL de carbonato de sódio (5 %) e a mistura permaneceu a 4 °C por uma noite. O extrato orgânico contendo a fração fenólica foi coletado, concentrado em evaporador rotativo, ressolubilizado em 3 mL de acetato de etila e armazenado a -18 °C.

4.2.2.2. Extração dos Alcalóides (Isolamento e Purificação)

Às folhas secas (2 g) e moídas de erva-mate foram adicionados 15 mL de solução de carbonato de cálcio (4,7 %). Em seguida, a solução foi transferida para aparato de “*soxhlet*” e mantida sob refluxo por 20 min. Após este período, a solução foi resfriada em temperatura ambiente e filtrada a vácuo. O extrato aquoso foi coletado e transferido para um funil de separação, adicionou-se 60 mL de diclorometano e esta mistura permaneceu em temperatura ambiente por 3 h. O extrato diclorometânico contendo a fração alcaloidal foi coletado, concentrado em

evaporador rotativo, ressolubilizado em 3 mL de diclorometano e armazenado a -18 °C.

4.2.2.3. Análise de Compostos Fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise dos compostos fenólicos via CLAE foi realizada através da injeção de 10 µL da amostra 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 10^A, 280 nm e 306 nm). 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 (ácidos clorogênico, cinâmico, gálico, *p*-cumárico, *t*-cumárico, ferúlico e caféico).

4.2.2.4. Determinação Colorimétrica do Conteúdo de Fenóis Totais do EAI

O teor de fenóis totais do extrato aquoso de erva-mate foi determinado segundo metodologia descrita por Maraschin e colaboradores (2002). A 1,0 mL do extrato aquoso de erva-mate (100 mg/mL) foram adicionados 1,0 mL de etanol (95 %), 5,0 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (50 %). Esta mistura permaneceu em repouso por 5 min e, então, foi adicionado 1,0 mL de bicarbonato de sódio 5 % (Na₂CO₃). Após o período de 1 h à temperatura ambiente e na ausência de luz, a absorbância foi determinada em 757 nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão.

4.2.2.5. Análise de Alcalóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise de alcalóides via CLAE foi realizada através da injeção de 10 µL da amostra em cromatógrafo Shimadzu LC-10, 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 SP-1, 275 nm e 313 nm). A fase móvel utilizada foi fosfato de sódio (0,05 M, pH 3,9):acetonitrila:2-metoxi-etanol (80:15:5, v/v/v), com fluxo de 2,0 mL/min. Os compostos foram identificados e quantificados utilizando-se os padrões teobromina, teofilina e cafeína.

4.2.3. Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro* do Extrato de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI)

4.2.3.1. Determinação da Capacidade Seqüestradora do Radical Ânion Superóxido (O₂^{•-}) pelo EAI

Para avaliar a capacidade seqüestradora do O₂^{•-} foi utilizado o sistema fenazina-metasulfato-NADH para geração deste radical, segundo Robak e Gryglewski (1988). O meio de reação consistiu de metasulfato de fenazina, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e “nitro blue tetrazolium” (NBT) em tampão fosfato. Nesse sistema, o O₂^{•-} gerado reduz o NBT produzindo o cromóforo formazan, com absorvância máxima em 560 nm. Em tubos tipo “Eppendorf” foram adicionados 50 µL de solução de NBT (600 µM), 50 µL de solução de NADH (100 µM), 50 µL de H₂O (controle) ou 50 µL de concentrações

crescentes do EAI (3; 10; 30; 100 µg/mL, concentração final) e 240 µL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,8), antes da adição de 10 µL de metassulfato de fenazina (10 µM). Após 2 min à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de solução de HCl (0,01 N). A absorbância do tubo controle foi medida a 560 nm contra o branco da reação, o qual não continha a solução de metassulfato de fenazina e a absorbância dos tubos com EAI foi medida contra um branco específico, contendo a mesma concentração de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, porém sem o metassulfato de fenazina. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) das porcentagens de redução do NBT, sendo considerado 100 % da redução a reação controle na ausência do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*.

4.2.3.2. Determinação da Inibição da Degradação da Desoxirribose pelo EAI

O sistema gerador do radical $\cdot\text{OH}$ utilizado para a detecção de danos oxidativos à desoxirribose foi realizado de acordo com o método descrito por Nishida e colaboradores (1991). A detecção dos produtos de oxidação da desoxirribose foi realizada como descrita por Halliwell e Gutteridge (1981). Neste ensaio, o radical $\cdot\text{OH}$, gerado através da reação do Fe^{3+} com o ácido nitrilotriacético (NTA) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Reação de Fenton), é capaz de oxidar a desoxirribose. O produto dessa oxidação (MDA) reage prontamente com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um produto corado, que é medido espectrofotometricamente (Halliwell e Gutteridge, 1981).

Os ensaios foram realizados em triplicata, num volume final de 1,2 mL, em tubos de 10 mL. Inicialmente, para a formação do quelato, foram adicionados 25 μ L de solução de FeCl_3 (25 μ M) e 100 μ L da solução estoque de NTA (100 μ M), permanecendo por 10 min à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 605 μ L de água deionizada, 150 μ L de tampão fosfato (0,01 M, pH 7,4), 100 μ L de solução de desoxirribose (2,8 mM), 120 μ L de H_2O (controle) ou 120 μ L de concentrações crescentes do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (0,01; 0,1; 1 e 10 μ g/mL, concentração final), e por último 100 μ L de H_2O_2 (1,4 mM). Os tubos foram mantidos por 20 min em banho-maria a 37 °C. A reação para quantificação dos produtos de oxidação foi realizada pela adição de 1 mL de TBA (1 %) e 1 mL de ácido tricloroacético (TCA, 2,8 %). Os tubos foram mantidos por mais 15 min à temperatura de 100 °C para a formação do produto corado e ao final do tempo, resfriados imediatamente em banho de gelo. A absorbância do tubo controle foi medida a 532 nm contra um branco contendo todos os reagentes, com exceção da desoxirribose. A absorbância de cada tubo com EAI foi medida contra um branco específico, contendo a mesma concentração de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. Os resultados foram expressos como média \pm EPM das porcentagens da degradação da desoxirribose, considerando-se os valores médios da absorbância do controle, sem a presença do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, como 100 % da degradação.

4.2.3.3. Avaliação da Inibição da Peroxidação Lipídica pelo EAI

A inibição da peroxidação lipídica foi testada usando-se homogenato de fígado de ratos, segundo o método de Chen e Tappel (1996) com modificações. Ratos Wistar machos foram sacrificados por deslocamento cervical, após aprofundamento da anestesia com mistura de quetamina (Francotar®) e cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompum®). A cavidade abdominal foi aberta e o fígado foi retirado após ser perfundido com solução salina (NaCl 0,9 %). Aproximadamente 3,0 g de fígado foram homogeneizadas em 9 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 em KCl 140 mM. O homogenato obtido foi centrifugado durante 15 min a 1500 X g a 4 °C. O sobrenadante foi congelado a -20 °C e utilizado posteriormente para os ensaios de peroxidação lipídica.

Neste ensaio, o agente oxidante é o *tert*-butilhidroperóxido que abstrai o átomo de hidrogênio dos ácidos graxos mono e poliinsaturados dando início ao processo de peroxidação lipídica. Os ensaios foram realizados em triplicata, num volume final de 1,0 mL. Em tubos de ensaio, foram adicionados seqüencialmente 125 µL de tampão fosfato (80 mM, pH 7,4), 150 µL de homogenato de fígado de ratos, 100 µL de H₂O ou 100 µL de concentrações crescentes do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (30; 10, 100; 300; 1000 µg/mL, concentração final), 100 µL de *tert*-butilhidroperóxido (0,1 mM) e água deionizada (volume necessário para completar 1,0 mL). Os tubos foram mantidos sob agitação por 2 h a 37 °C. A reação de quantificação dos produtos de peroxidação lipídica foi realizada pela adição de 1 mL de TBA (1 %) e 1 mL de ácido tricloroacético (TCA, 2,8 %). Os tubos foram mantidos por mais 15 min à temperatura de 100 °C para a formação

do cromóforo e ao final do tempo, resfriados imediatamente em banho de gelo e centrifugados por 5 min a 3500 rpm. A absorbância do tubo controle foi medida em 532 nm contra o branco contendo todos os reagentes, com exceção do homogenato de fígado de ratos. A absorbância dos tubos com EAI foi medida contra um branco específico, contendo a mesma concentração de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. Os resultados foram expressos como média \pm EPM das porcentagens de inibição da peroxidação lipídica, considerando-se os valores médios da absorbância do controle sem a presença do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* como 100 % peroxidação lipídica.

4.2.4. Efeito *in vitro* do Extrato Aquoso de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) na Reatividade Vascular de Aorta Torácica Isolada de Ratos

4.2.4.1. Protocolo Experimental

Ratos machos Wistar (10 - 12 semanas de idade), pesando entre 180 - 220 g, provindos do Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da UFSC, foram alojados em grupos de cinco animais e mantidos em caixas plásticas com serragem, à temperatura de 22 ± 2 °C com ciclo claro/escuro de 12 h no Biotério do Laboratório de Produtos Naturais – Departamento de Farmacologia/CCB. A água e a ração foram fornecidas *ad libitum*.

Após aprofundamento da anestesia com mistura de quetamina (Francotar®) e cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompum®), os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical, seguido de exsanguinação feita pela

secção da artéria carótida. Após a abertura da cavidade torácica, a aorta foi delicadamente removida e transferida para placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit (NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; CaCl₂ 2,5 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,9 mM; NaHCO₃ 25 mM; glicose 11,0 mM; pH 7,4). Os tecidos adiposo e conjuntivo adjacente foram retirados conforme descrito por Andriambeloson e colaboradores (1997).

A artéria foi seccionada na forma de anéis de 3 - 4 mm de comprimento, os quais foram transferidos para cubas de vidro com volume total de 5 mL de solução nutritiva de Krebs-Henseleit. A solução nutriente foi mantida a 37 °C e recebeu um fluxo contínuo de oxigênio e gás carbônico (95 % de O₂ e 5 % de CO₂). Duas hastes metálicas foram, então, inseridas na luz do vaso, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados SOFT and SOLUTIONS (KitCad 8 – São Paulo, SP). A tensão de repouso das preparações correspondeu a 1,0 g e a solução nutriente foi substituída a cada 15 min.

Após o período de equilíbrio (60 min), os anéis de aorta foram contraídos com fenilefrina (0,1 – 1 μM). A presença do endotélio funcional foi avaliada pela capacidade da acetilcolina (1 μM) induzir o relaxamento das preparações contraídas previamente com fenilefrina. Somente as preparações que apresentaram relaxamento igual ou superior a 75 % foram consideradas com endotélio íntegro e utilizadas nos ensaios (Andriambeloson et al., 1997).

Nos experimentos em que se pretendia investigar a relevância do endotélio vascular na capacidade vasorelaxante, foi realizada a remoção da camada de

células endoteliais (Corrêa et al., 1991). Para este procedimento, uma das hastes utilizadas na montagem dos vasos ao sistema foi levemente friccionada contra a superfície interna da aorta. A lesão do endotélio vascular foi considerada satisfatória após a verificação da ausência total de relaxamento induzido pela acetilcolina (1 μ M) nos vasos contraídos previamente com fenilefrina.

Após a avaliação do efeito do EAI, foi verificada a viabilidade dos anéis de aorta pela capacidade de contração com fenilefrina (0,1 – 1 μ M). Em anéis com presença de endotélio funcional a viabilidade foi avaliada pela capacidade da acetilcolina (1 μ M) induzir o relaxamento das preparações contraídas previamente com fenilefrina.

Os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas de cuidados com animais de laboratório. Além disso, todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso e Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, e está cadastrado sob os números 330/CEUA e 23080.002728/2005-41/UFSC.

4.2.4.2. Verificação do Efeito Vasorelaxante do Extrato Aquoso de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI)

Após ter sido avaliada a presença ou ausência do endotélio vascular, os anéis de aorta foram lavados com solução nutriente em intervalos de 15 min sendo aguardados 30 min para o retorno da tensão à linha de base. Em seguida, foram realizados ensaios com quantidades crescentes cumulativas do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (10 – 3000 μ g/mL) em anéis de aorta, com ou sem

endotélio, previamente contraídas com fenilefrina (0,1 – 1 μ M), segundo adaptação de Corrêa e colaboradores (1991).

Os resultados foram apresentados como percentagem de relaxamento induzido pelo EAI em relação à contração máxima com fenilefrina. As concentrações inibitórias que promoveram 50 % dos relaxamentos máximos obtidos (CI50) foram apresentadas como médias geométricas, acompanhadas de seus respectivos limites de confiança (IC) para 95 % (Fleming et al., 1972). Os resultados do relaxamento máximo (Rmax) foram apresentados como média \pm EPM.

4.2.4.3. Verificação da Influência do Extrato Aquoso de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) na Via NO/GMPc

Para avaliar o efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na via do NO, foram realizados ensaios de relaxamento arterial na presença de quantidades crescentes cumulativas do extrato e de inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Moore et al., 1990). Os anéis de aorta de ratos foram mantidos com 10 μ M de N^o-nitro-L-arginina (L-NOARG), inibidor irreversível da NOS constitutiva e inibidor reversível da NOS indutível, 20 min antes da realização dos ensaios com o EAI. O efeito do L-NOARG no relaxamento induzido pelo EAI também foi avaliado na presença de excesso de L-arginina, substrato endógeno para formação de NO, na concentração de 1 mM, adicionado ao meio 10 min antes do L-NOARG.

Os resultados dos relaxamentos induzidos pelo EAI foram apresentados como percentagem de relaxamento em relação à contração máxima de fenilefrina. As concentrações inibitórias que promoveram 50 % dos relaxamentos máximos obtidos (CI50) foram apresentadas como médias geométricas, acompanhadas de seus respectivos limites de confiança para 95 % (Fleming et al., 1972). Os relaxamentos máximos (Rmax) foram apresentados como média \pm EPM.

4.2.5. Efeito da Administração Crônica do Extrato Aquoso de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) na Reatividade Vascular de Aorta de Camundongos com Aterosclerose

4.2.5.1. Protocolo Experimental

Camundongos machos C57BL/6 LDLR KO (n = 35) foram separados em cinco grupos experimentais (n = 7 por grupo) e submetidos a diferentes tratamentos dietéticos por um período de três meses, como descrito a seguir:

- Grupo Controle (C): consistiu de um grupo de animais que recebeu dieta comercial padrão (ração para roedores), água *ad libitum* e uma dose de água deionizada de 10 μ L para cada grama de peso (aproximadamente 200 μ L), via gavagem.
- Grupo Hipercolesterolêmico (HC): recebeu dieta rica em colesterol (descrição na tabela 1), água *ad libitum* e uma dose de água deionizada de 10 μ L para cada grama de peso (aproximadamente 200 μ L), via gavagem.

- Grupo Hipercolesterolêmico *Ilex paraguariensis* 0,3 g/kg/dia (HI 0,3): recebeu a dieta rica em colesterol, água *ad libitum* e o tratamento com uma dose do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* via gavagem, numa dose final de 0,3 g/kg de peso por dia.
- Grupo Hipercolesterolêmico *Ilex paraguariensis* 0,9 g/kg/dia (HI 0,9): recebeu a dieta rica em colesterol, água *ad libitum* e o tratamento com uma dose do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* via gavagem, numa dose final de 0,9 g/kg de peso por dia.
- Grupo Hipercolesterolêmico *Ilex paraguariensis* 2,7 g/kg/dia (HI 2,7): recebeu a dieta rica em colesterol, água *ad libitum* e o tratamento com uma dose do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* via gavagem, numa dose final de 2,7 g/kg de peso por dia.

O tratamento dos animais com o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* ou água via gavagem foi efetuado diariamente, bem como a avaliação da ração ingerida. O peso dos animais foi aferido uma vez por semana.

As doses do EAI foram calculadas com base na quantidade de erva-mate usada em uma cuia de chimarrão, tendo-se como parâmetro uma pessoa de 70 kg e adaptado para o metabolismo do camundongo e para a via de administração (Harkness e Wagner, 1995). Segundo o fabricante, utiliza-se, normalmente, cerca de 100 g de erva-mate para cada litro de água. Considerando-se o volume de 200 mL de uma cuia média (portanto, 20 g de erva-mate) e o resíduo seco formado a partir desse extrato aquoso (aproximadamente 30 mg/mL), uma pessoa de 70 kg

consome, aproximadamente 6 g de resíduo seco de erva-mate por coia, ou aproximadamente 0,09 g por kg de peso. Levando-se em conta o metabolismo específico do camundongo, que é aproximadamente 10 vezes mais elevado que o do ser humano (Harkness e Wagner, 1995), chegou-se a uma dose de 0,9 g/kg de camundongo. Para efeito de avaliação do tratamento extrapolou-se uma dose acima (2,7 g/kg) e uma dose abaixo (0,3 g/kg) num volume ajustado à via de administração (gavagem).

A ração hipercolesterolêmica foi desenvolvida pelo ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos – da Unicamp/SP, sob supervisão da Dr^a Nádia Fátima G. P. Dias. A dieta, fornecida pelo ITAL na forma liofilizada, foi misturada com água destilada em quantidade suficiente para a confecção manual de “*pellets*”, os quais foram devidamente armazenados no interior de caixas plásticas sob temperatura de -20 °C.

A ração comercial padrão para roedores, marca Supra Lab – Avisul Alimentos S.A. – RS, foi fornecida pelo Biotério Central da UFSC sendo composta de proteína bruta; cálcio; fósforo; extrato etéreo; mistura de fibras e mistura de minerais, enriquecida com vitaminas.

Os camundongos LDLR KO foram gentilmente cedidos pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob a interveniência do Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza. Os animais foram originalmente adquiridos da empresa The Jackson Laboratory (Maine, EUA).

Os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas de cuidados com animais de laboratório. Além disso, todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso e

Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina e está cadastrado sob os números 264/CEUA e 23080.003548/2004-04/UFSC.

Tabela I: Composição da ração comercial padrão para roedores.

Ingredientes	%
Proteína bruta	22,0
Extrato etéreo	2,5
Matéria fibrosa	6,0
Matéria mineral	10,0
Cálcio	1,2
Fósforo	0,7
Umidade máxima	12,0

*Enriquecida com Vitamina E: 15,0 mg/kg de ração.

Tabela II: Composição da ração hipercolesterolêmica (1,25% de colesterol).

Ingredientes	%
Carboidrato	54,95
Proteína	17,0
Mistura de vitaminas **	1,0
Mistura de minerais	3,5
L-cistina	0,3
Bitartarato de colina	0,25
Fibras	5,0
Colesterol	1,25
Ácidos graxos *	18,0

*Ácidos graxos: saturados, 60,8 % ; monoinsaturados, 10,6 % e poliinsaturados, 16,3 % (Ewin, 1997). ** Vitaminas: vitamina E, 15,0; vitamina A, 0,8; vitamina K, 0,075; colecalciferol, 0,25; ácido nicotínico, 3,0; pantotenato de cálcio, 1,6; piridoxina 0,7; tiamina, 0,6; riboflavina, 0,6; ácido fólico, 0,2; D-biotina, 0,02; cianocobalamina, 2,5 (g/kg de ração).

4.2.5.2. Retirada do Sangue para Obtenção do Soro

Após o tratamento crônico, os animais foram levados para o Laboratório de Produtos Naturais – Departamento de Farmacologia/CCB, para a execução dos experimentos. Após um período de jejum de 12 a 15 h, os animais foram anestesiados com mistura de quetamina (Francotar®) e cloridrato de 2-(2,6-

xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompum®) e, em seguida, foi realizada a laparotomia e a veia cava inferior localizada. O sangue foi coletado utilizando-se seringa de 1,0 mL adaptada com agulha 13 X 7 (curvada em ângulo de 45 °). A agulha foi cuidadosamente introduzida na luz do vaso e o sangue do animal foi retirado e transferido para tubos tipo “Eppendorf”. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 min para obtenção do soro, o qual foi posteriormente utilizado para as determinações bioquímicas de colesterol total, triglicerídeos e fração HDL.

4.2.5.3. Determinação do Colesterol Total

A determinação do colesterol total no soro dos camundongos foi realizada utilizando-se reagentes comerciais (LABTEST DIAGNÓSTICA®, Lagoa Santa, MG). O princípio do método baseia-se na hidrólise dos ésteres de colesterol pela colesterol-esterase para produzir colesterol livre que, junto com o colesterol livre preexistente, é oxidado em uma reação catalisada pela enzima colesterol oxidase para formar o colest-4-en-ona e o peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados e complexados formando a antipirilquinonimina que tem absorvidade máxima em 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração de colesterol total na amostra.

4.2.5.4. Determinação da Fração HDL

A determinação do colesterol da fração HDL no soro dos camundongos foi realizada utilizando-se reagentes comerciais (LABTEST DIAGNÓSTICA®, Lagoa Santa, MG). As lipoproteínas contendo apo B-100 (VLDL e LDL) foram seletiva e quantitativamente precipitadas através do ácido fosfotúngstico (0,4 mmol/L) e cloreto de magnésio (20 mmol/L). Após centrifugação (15 min, 1200 x g), o colesterol na HDL foi determinado no sobrenadante por um sistema enzimático idêntico ao descrito anteriormente para o colesterol total.

4.2.5.5. Determinação de Triglicerídeos

A determinação dos triglicerídeos no soro dos camundongos foi realizada utilizando-se reagentes comerciais (LABTEST DIAGNÓSTICA®, Lagoa Santa, MG). O princípio do método baseia-se na ação da enzima lipase que hidrolisa os triglicerídeos, formando glicerol e ácidos graxos. O glicerol reage com o trifosfato de adenosina por ação da glicerolquinase formando glicerol-3-fosfato, que por ação da enzima glicerol-3-fosfato oxidase forma dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio irá reagir com a 4-aminoantipirina e o clorofenol, numa reação catalisada pela peroxidase, produzindo a quinoneimina, com absorvância máxima em 540 nm. A intensidade da cor vermelha é diretamente proporcional à concentração de triglicerídeos na amostra.

4.2.5.6. Determinação do Colesterol das Lipoproteínas com Apo B-100 (VLDL e LDL)

A determinação do colesterol das VLDL e LDL foi realizada indiretamente, através da diferença entre colesterol total e fração HDL, pela equação:

$$\text{Colesterol das Lipoproteínas com Apo B-100} = \text{Colesterol Total} - \text{Fração HDL}$$

4.2.5.7. Ensaio de Reatividade Vascular com Aorta Torácica Isolada de Camundongos LDLR KO

Após a retirada do sangue, a cavidade torácica dos animais foi aberta e a aorta foi delicadamente removida e transferida para placa de Petri contendo solução nutriente de Krebs-Henseleit. Após a retirada dos tecidos adiposo e conjuntivo adjacentes (Andriambeloson et al., 1997), o vaso foi seccionado obtendo-se dois anéis de aorta torácica para cada animal. A solução nutriente foi mantida a 37 °C e recebeu um fluxo contínuo de oxigênio e gás carbônico (95 % de O₂ e 5 % de CO₂). Duas hastas metálicas foram, então, inseridas na luz do vaso, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado ao sistema de aquisição de dados "SOFT and SOLUTIONS" (KitCad 8). A tensão de repouso das preparações correspondeu a 0,5 g e a solução nutriente foi substituída a cada 15 min. Após o período de equilíbrio (90 min), os anéis de aorta foram contraídos com concentrações crescentes cumulativas do agonista α -adrenérgico fenilefrina (1 nM a 3 μ M). Em seguida, com uma contração submáxima (70 - 80 % da contração máxima) da aorta à fenilefrina, foi verificada a capacidade de relaxamento a partir de concentrações crescentes cumulativas de

acetilcolina (1 nM a 3 μ M). Os efeitos de contração e relaxamento (em g), induzidos pela fenilefrina e pela acetilcolina, respectivamente, foram avaliados na aorta dos camundongos dos diferentes grupos experimentais.

4.2.5.8. Avaliação da Extensão das Lesões Ateroscleróticas

Para a visualização da extensão das lesões ateroscleróticas por microscopia ótica, o arco aórtico das artérias dos camundongos hipercolesterolêmicos foi imerso por 24 h em formaldeído a 10 % tamponado (pH 7,4). Em seguida, as amostras foram incluídas em parafina para a obtenção dos cortes histológicos longitudinais, os quais foram corados com hematoxilina e eosina. Esses procedimentos foram realizados no serviço de Patologia do Hospital Universitário da UFSC.

4.2.6. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados da atividade antioxidante do EAI bem como do peso dos animais, do consumo da ração e dos valores do perfil lipídico foi realizada utilizando-se a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelos testes de Tukey-Kramer como ANOVA-*post tests*.

Nos ensaios de reatividade vascular *in vitro* os resultados dos relaxamentos induzidos pelo EAI foram apresentados como percentagem de relaxamento em relação à contração máxima da fenilefrina e CI50, enquanto que nos ensaios de reatividade vascular de aorta de camundongos LDLR KO os efeitos induzidos pela fenilefrina e pela acetilcolina, foram expressos pelos respectivos valores de

contração e relaxamento promovidos pelos agonistas, em gramas. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o teste *t* de Student para amostras não pareadas ou a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey-Kramer como ANOVA-*post tests*, para comparações com mais de dois grupos. A normalidade de todos os dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnorff (Snedecor e Cochran, 1967) e as diferenças entre os valores experimentais obtidos nos diferentes grupos que apresentaram níveis de probabilidade menores do que 5 % ($p < 0,05$ %) foram consideradas estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1. Análise do Extrato de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI)

5.1.1. Compostos Fenólicos e Alcalóides do EAI determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os compostos fenólicos e os alcalóides identificados no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e suas respectivas concentrações estão apresentados na Tabela 1. O principal componente fenólico no extrato, detectado por CLAE, foi o ácido clorogênico (78,50 µg/mL), seguido dos ácidos gálico e cinâmico (52,3 e 3,8 µg/mL, respectivamente). Os ácidos *p*-cumárico, *t*-cumárico, ferúlico e cafeico estão presentes em pequena concentração (traços) no EAI. Na análise para alcalóides, foi detectada a presença de cafeína numa concentração de 10,06 µg/mL e traços de teobromina (Tabela 1).

Tabela 1: Compostos majoritários (µg/mL) identificados no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (EAI).

Compostos	Concentração (µg/mL)
Ácido clorogênico	78,50 ± 2,35
Ácido gálico	52,29 ± 1,72
Ácido cinâmico	3,76 ± 0,07
Ácido <i>p</i> - cumárico	traços
Ácido <i>t</i> -cumárico	traços
Ácido ferúlico	traços
Ácido cafeico	traços
Cafeína	10,06 ± 1,11
Teobromina	traços

Dados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme descrito na seção "Material e Métodos". Os resultados representam a média de três determinações independentes.

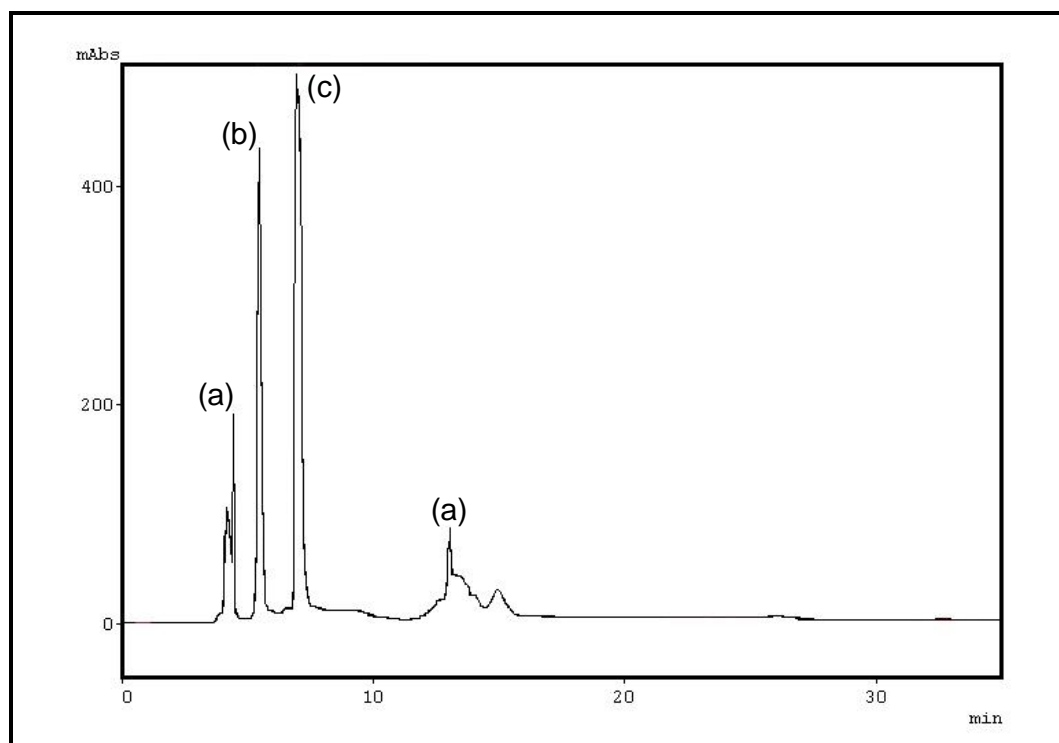


Figura 1: Perfil cromatográfico do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) em HPLC (a) ácido gálico, (b) ácido cinâmico, (c) ácido clorogênico.

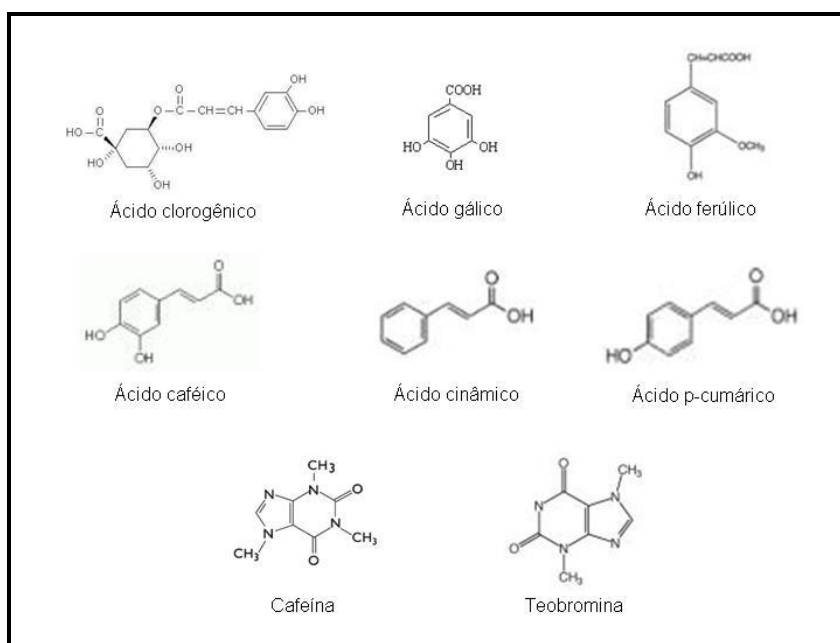


Figura 2: Estruturas químicas dos compostos majoritários identificados no EAI.

5.1.2. Conteúdo de Fenóis Totais do EAI Determinados por Método Colorimétrico

O teor de fenóis totais do extrato aquoso de erva-mate foi de $154,5 \pm 5,0$ mg/L de ácido gálico equivalentes, obtido a partir de três determinações de diferentes extrações.

5.2. Atividade Antioxidante *in vitro* do Extrato Aquoso de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI)

5.2.1. Capacidade Seqüestradora do Radical Ânion Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pelo EAI

A capacidade seqüestradora do $O_2^{\cdot-}$ pelo EAI está expressa como percentuais de redução do NBT, representados na figura 3. O EAI na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou ser efetivo como seqüestrador do $O_2^{\cdot-}$ ($p < 0,01$). Maior atividade seqüestradora foi observada nos ensaios em que o EAI foi utilizado em concentrações de 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$, figura 3). A concentração que promoveu 50 % de inibição da redução do NBT (CI50) foi de 27,1 (IC 95 %: 17,2 – 42,7) $\mu\text{g/mL}$. A inibição máxima da redução do NBT obtida foi de aproximadamente 72,3 % com a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de EAI.

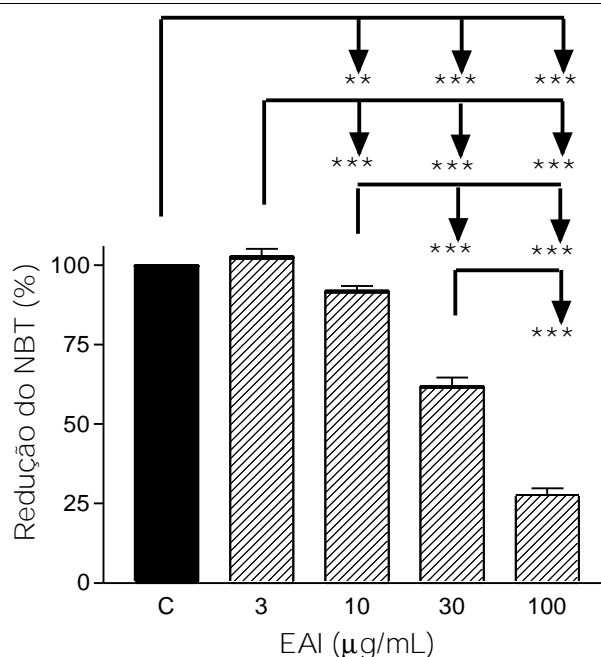


Figura 3: Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) na redução do NBT. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de três determinações em triplicata. A primeira coluna (C) representa o controle da reação sem a presença do EAI, considerado como 100 % da redução do NBT. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA/Tukey).

5.2.2. Inibição da Degradação da Desoxirribose pelo EAI

Na figura 4 estão representados os resultados da atividade do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na capacidade seqüestradora do radical $\dot{Y}OH$. Pode ser verificado que a inibição da degradação da desoxirribose foi dependente da concentração de EAI, sendo evidenciada de maneira significativa já nas menores concentrações avaliadas.

O EAI na concentração de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ foi efetivo no seqüestro do radical $\dot{Y}OH$ ($p < 0,05$). Nas concentrações de 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$, uma maior atividade seqüestradora foi observada ($p < 0,001$; figura 4). A CI50 da degradação da desoxirribose foi de 0,07 (IC 95 %: 0,011 – 0,433) $\mu\text{g/mL}$. A inibição máxima da

degradação da desoxirribose obtida foi de aproximadamente 83,0 % com a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$.

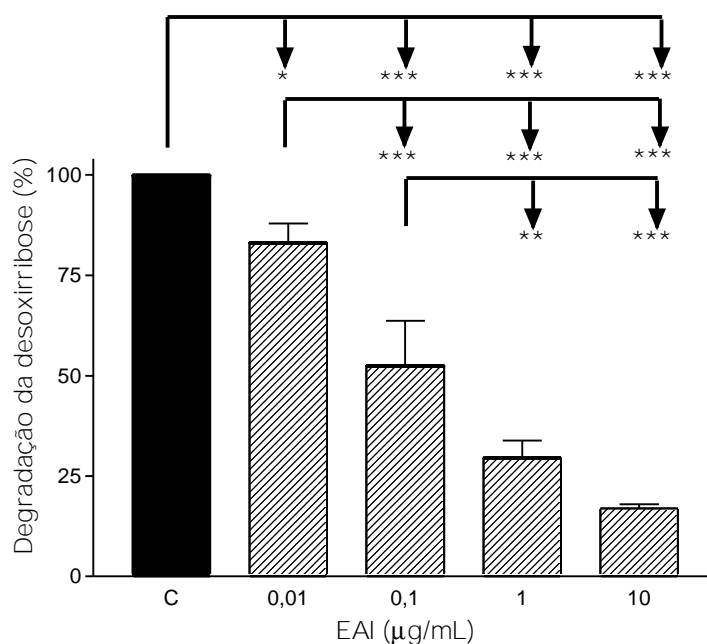


Figura 4: Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) na degradação da desoxirribose. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de três determinações em triplicata. A primeira coluna (C) representa o controle da reação sem a presença do EAI, considerado como 100 % da degradação da desoxirribose. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA/Tukey).

5.2.3. Inibição da Peroxidação Lipídica pelo EAI em Homogenato de Fígado de Ratos

A capacidade de inibição da peroxidação lipídica pelo extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) está expressa como percentuais de peroxidação lipídica, representados na figura 5. Nas concentrações de 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$ o EAI não inibiu a peroxidação lipídica ($p > 0,05$). Apenas a partir da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ o EAI mostrou habilidade em inibir a peroxidação lipídica ($p < 0,05$). A inibição máxima da peroxidação lipídica obtida foi de

aproximadamente 60,0 % com a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. A CI50 da peroxidação lipídica foi de 122,2 (IC 95 %: 41,9 – 356,4) $\mu\text{g/mL}$.

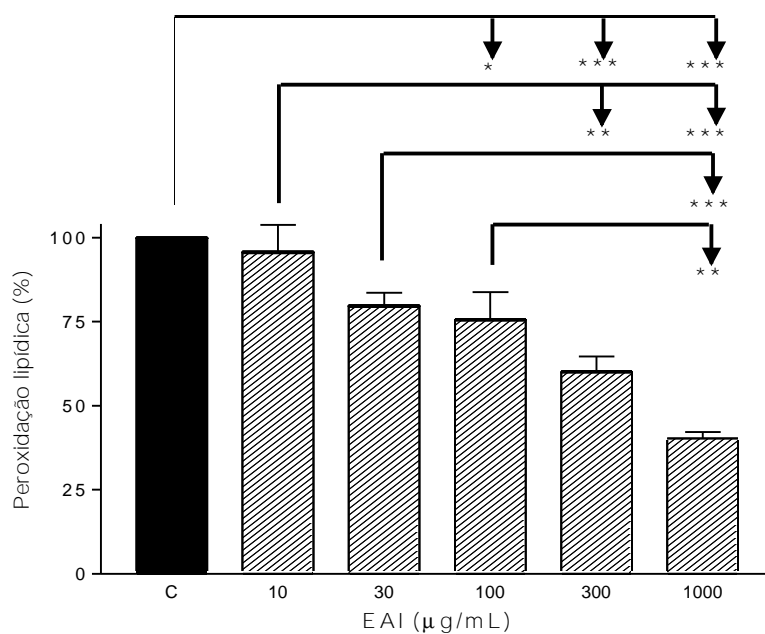


Figura 5: Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) EAI na peroxidação lipídica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de quatro determinações em triplicata. A primeira coluna (C) representa o controle da reação sem a presença do EAI, considerado como 100 % de peroxidação lipídica. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA/Tukey).

5.3. Relaxamento *In Vitro* Induzido pelo Extrato Aquoso de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) em Aorta Torácica de Ratos

Para avaliar o efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) na musculatura lisa vascular, foram realizadas curvas concentração-resposta (CCR) cumulativas em anéis de aorta torácica de ratos na presença e ausência de endotélio funcional.

Os resultados do EAI na reatividade vascular podem ser vistos na figura 6. O extrato aquoso de erva-mate foi capaz de promover o relaxamento das aortas

tanto na presença (E+) quanto na ausência (E-) de endotélio funcional, de maneira dependente da concentração do extrato. O EAI na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ provocou relaxamento de $17,9 \pm 2,7$ % (média \pm EPM) na presença de endotélio, enquanto que na ausência de endotélio o relaxamento foi de $2,0 \pm 0,6$ % (média \pm EPM). Assim, o relaxamento provocado pelo EAI nas aortas com endotélio funcional foi mais efetivo, visto que o relaxamento nas aortas sem endotélio só ocorreu na maior concentração avaliada. Esta diferença entre os relaxamentos pode ser também verificada através dos valores de CI50 acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança (95 %) (Tabela 2). A CI50 foi significativamente maior ($p < 0,001$) na ausência de endotélio.

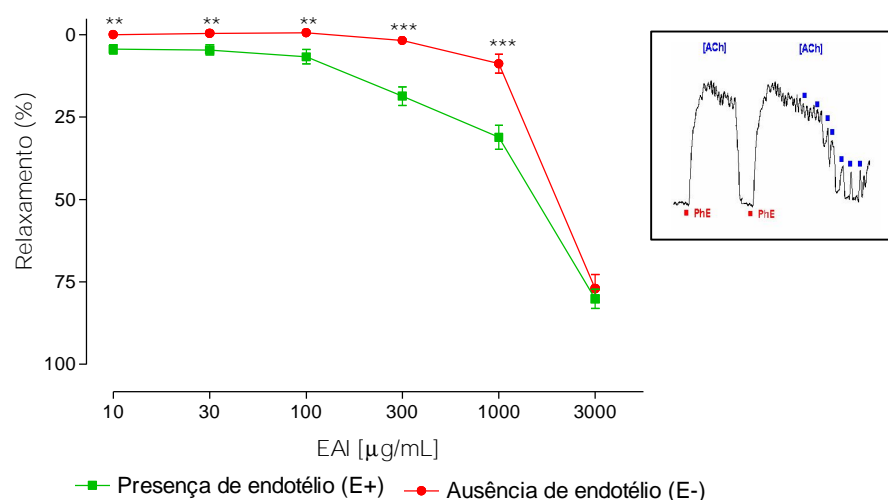


Figura 6: Efeito do EAI na reatividade vascular na presença (■, E+) ou ausência (●, E-) de endotélio funcional em anéis de aorta torácica contraídos com fenilefrina (0,1 – 1 μM). Valores representados como média \pm EPM de seis a oito ensaios, inclusive nos pontos sem a representação gráfica do EPM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparados com o relaxamento na presença de endotélio. (Teste t de Student não pareado). Acompanhado de um registro típico (quadro à direita).

Tabela 2: Efeito da presença (E+) ou ausência (E-) de endotélio funcional no relaxamento induzido pelo EAI em aorta torácica isolada de rato.

	CI50 ($\mu\text{g/mL}$) ^a	Rmax (%) ^b
E+	1146 (993 – 1321)	80,1 \pm 2,9
E-	1627 (1540 – 1720)***	77,0 \pm 4,2

^aCI50 é apresentada como média geométrica acompanhada do intervalo de confiança (IC95%).

^bRmax é apresentado como média \pm EPM, referente à % do efeito máximo do relaxamento avaliado. *** $p < 0,001$ comparado com o relaxamento na presença de endotélio funcional (E+), teste *t* de Student não pareado.

5.3.1. Influência do Extrato Aquoso de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) na Via NO/GMPc em Aorta Torácica de Ratos

Para confirmar a relevância do endotélio no relaxamento induzido pelo EAI e avaliar o envolvimento na via do NO/GMPc, procurou-se determinar a influência de drogas atuantes nessa via, durante o relaxamento promovido pelo EAI em aortas com endotélio funcional. Para isso, foram realizadas CCR cumulativas ao EAI na presença de L-NOARG, inibidor da enzima NOS constitutiva e inibidor reversível da NOS induzida.

A figura 7 mostra os resultados do efeito vasorelaxante do EAI, na ausência e na presença de L-NOARG (10 μM). O L-NOARG promoveu deslocamento das CCR cumulativas de EAI para a direita, demonstrando uma inibição no relaxamento induzido pelo EAI o que evidencia o envolvimento do NO no relaxamento promovido pelo extrato.

Para investigar a reversão do efeito promovido pelo L-NOARG, foram realizadas CCR cumulativas ao EAI na presença do aminoácido L-arginina,

substrato endógeno para a formação do NO. Na figura 7 observa-se que a adição de 1 mM de L-arginina reverteu parcialmente, o efeito inibitório do L-NOARG na resposta relaxante induzida pelo EAI.

Na tabela 3 estão expressos os valores de CI50 e Rmax do relaxamento em anéis de aorta de ratos promovido pelo EAI na presença de L-NOARG ou de L-NOARG + L-arginina.

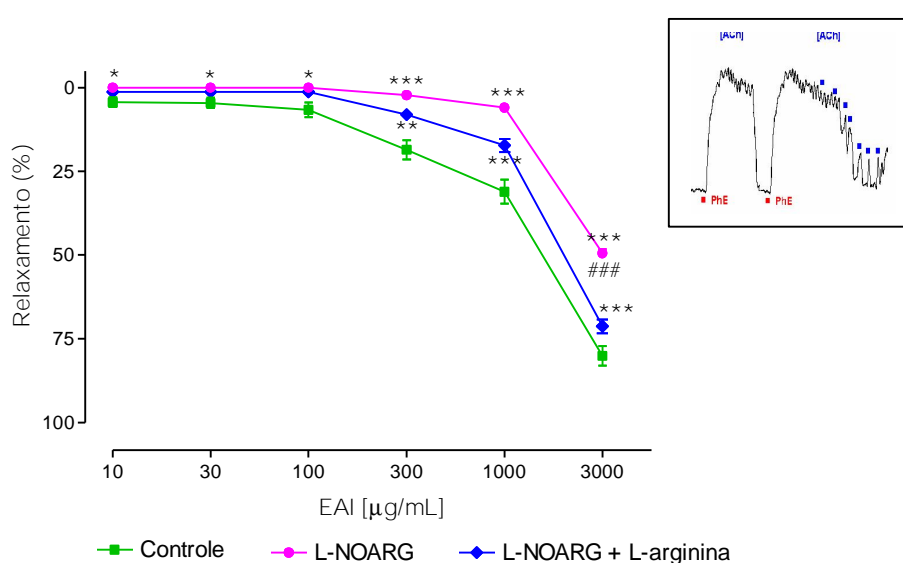


Figura 7: Envolvimento da via NO/GMPc no relaxamento vascular ao EAI em anéis de aorta torácica de ratos com endotélio funcional contraídos com fenilefrina (0,1 – 1 µM) na ausência (§, controle) ou presença de N^o-nitro-L-arginina (L-NOARG; ●, 10 µM) ou L-arginina + L-NOARG (◐, 1mM + 10 µM, respectivamente). Valores representados como média ± EPM de seis a oito ensaios, inclusive nos pontos sem a representação gráfica do EPM. * p < 0,05; ** p < 0.01; *** p < 0,001 comparados ao controle; ### p < 0,001 comparado ao L-NOARG + L-arginina (ANOVA/Tukey). Acompanhado de um registro típico (quadro à direita).

Tabela 3: Efeito de diferentes drogas no relaxamento induzido pelo EAI em aorta torácica isolada de rato na presença de endotélio funcional.

Droga	CI50 ($\mu\text{g/mL}$) ^a	Rmax (%) ^b
Controle	1146 (993 – 1321)	80,1 \pm 2,9
L-NOARG	1611 (1577 – 1645) ^{***, ###}	49,5 \pm 1,2 ^{***, ###}
L-NOARG + L-arginina	1449 (1365 – 1537) ^{**}	71,3 \pm 2,1 [*]

^aCI50 é apresentada como média geométrica acompanhada do intervalo de confiança (IC95%).

^bRmax é apresentado como média \pm EPM, referente à % do efeito máximo do relaxamento avaliado. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 comparado ao controle (E+). ### p < 0,001 comparado ao L-NOARG + L-arginina (ANOVA/Tukey).

5.4. Efeito do Tratamento Crônico com Extrato Aquoso de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) em Camundongos LDLR KO

5.4.1. Efeito do EAI na Ingestão Alimentar e Peso dos Camundongos LDLR KO

Os resultados de ingestão alimentar e a variação de peso dos animais no período do tratamento crônico estão expressos na tabela 4. Após avaliações diárias e semanais do consumo de ração e aferição do peso, respectivamente, durante os três meses de tratamento, observou-se que a ração hipercolesterolêmica e o extrato de erva-mate provocaram modificações significativas entre os grupos de camundongos. Ocorreu diminuição na ingestão da ração rica em colesterol (grupo HC), em comparação com a ingestão da ração comercial padrão (grupo C; p < 0,001). Apesar da menor ingestão de ração, os camundongos do grupo HC apresentaram maior ganho de peso em relação aos animais controles (Tabela 4; p < 0,001). O tratamento com as diferentes doses do

EAI (grupos HI 0,3; 0,9 e 2,7) provocou diminuição significativa na ingestão da ração hipercolesterolêmica em relação aos animais do grupo HC ($p < 0,001$). Nesses animais que receberam o EAI, a menor ingestão alimentar provocou redução significativa no ganho de peso, quando comparado aos camundongos do grupo HC ($p < 0,001$). Além disso, foi possível observar um efeito dependente da dose do EAI na redução do ganho de peso ($p < 0,05$; Tabela 4).

Tabela 4: Consumo de ração e ganho de peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais (camundongos LDLR KO) durante 3 meses de tratamento.

Grupos	Ração ingerida (g/dia)	Ganho de Peso (g)
C	3,64 ± 0,4	1,52 ± 0,19
HC	2,98 ± 0,6 *	7,48 ± 0,54 *
HI 0,3	2,82 ± 0,6 **	5,84 ± 0,57
HI 0,9	2,52 ± 0,5 **	3,21 ± 0,72 **, #
HI 2,7	2,71 ± 0,5 **	2,43 ± 0,45 **, ##

Os resultados estão expressos como média ± EPM de 7 animais em cada grupo. A variação do peso, em gramas, é a diferença do peso dos animais no início e no final do tratamento. C, controle; HC, hipercolesterolêmico; HI, hipercolesterolêmico mais *Ilex paraguariensis* 0,3; 0,9 ou 2,7 g/kg/dia. * $p < 0,001$ comparado ao grupo controle; ** $p < 0,001$ comparado ao grupo HC; # $p < 0,05$ comparado ao grupo HI 0,3; ## $p < 0,001$ comparado ao grupo HI 0,3 (ANOVA/Tukey).

5.4.2. Avaliação do Perfil Lipídico

A administração da dieta hipercolesterolêmica resultou em aumento significativo da concentração sérica de colesterol total, VLDL e LDL-colesterol (aproximadamente 2 vezes) nos animais do grupo hipercolesterolêmico (HC, $p < 0,001$) em relação ao grupo controle (C) (Tabela 5), porém não alterou os valores de HDL e triglicerídeos. O tratamento com o EAI, independente da dose administrada, não modificou o perfil lipídico dos camundongos hipercolesterolêmicos.

Tabela 5: Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) no perfil lipídico sérico dos camundongos LDLR KO.

Grupos	Colesterol (mg/dL)			Triglicerídeos (mg/dL)
	Total	VLDL + LDL	HDL	
C	256 ± 14	192 ± 11	64 ± 6	177 ± 13
HC	504 ± 63 *	431 ± 57 *	73 ± 5	150 ± 11
HI 0,3	515 ± 30	452 ± 30	63 ± 6	187 ± 17
HI 0,9	507 ± 44	436 ± 42	71 ± 11	119 ± 7
HI 2,7	488 ± 28	424 ± 22	64 ± 7	162 ± 15

Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). Grupos: Controle (C); Hipercolesterolêmico (HC); Hipercolesterolêmico *Ilex paraguariensis* – 0,3 g/kg/dia (HI 0,3); Hipercolesterolêmico *Ilex paraguariensis* – 0,9 g/kg/dia (HI 0,9) e Hipercolesterolêmico *Ilex paraguariensis* – 2,7 g/kg/dia (HI 2,7). * $p < 0,001$ comparado ao grupo C (ANOVA/Tukey).

5.4.3. Efeito do Extrato Aquoso de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) na Reatividade Vascular de Aorta de Camundongos LDLR KO

Para avaliar o efeito do tratamento crônico com EAI em camundongos deficientes para o receptor de LDL (LDLR KO), foram realizados ensaios de reatividade vascular em aorta torácica isolada de camundongos.

5.4.3.1. Efeito do Extrato Aquoso de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) na Capacidade Contrátil Arterial

A administração da dieta hipercolesterolêmica inibiu significativamente a capacidade contrátil à fenilefrina nos anéis de aorta torácica de camundongos LDLR KO do grupo HC em relação ao grupo C (Figura 8). A contração máxima obtida com a fenilefrina foi reduzida em aproximadamente 55 % nas artérias dos animais hipercolesterolêmicos (Tabela 6).

A administração do EAI nas doses de 0,9 e 2,7 g/kg/dia aumentou significativamente a capacidade contrátil da aorta torácica dos camundongos dos grupos HI 0,9 e HI 2,7 em relação ao grupo HC ($p < 0,05$; Figura 9 e Tabela 6).

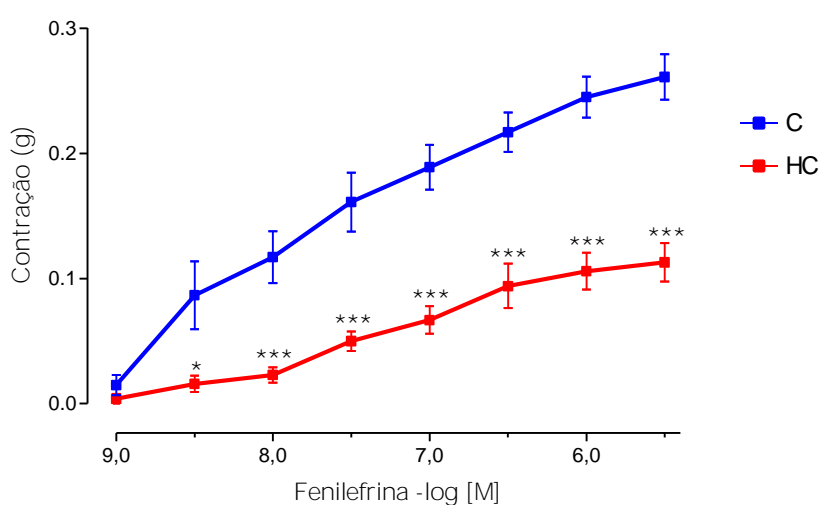


Figura 8: Efeito da hipercolesterolemia na contração vascular à fenilefrina em aortas torácicas isoladas de camundongos LDLR KO. Resultados expressos como média \pm EPM de 10-13 ensaios por grupo, inclusive nos pontos sem a representação gráfica do EPM. Controle (C); Hipercolesterolêmico (HC). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo C (Teste t de Student não pareado).

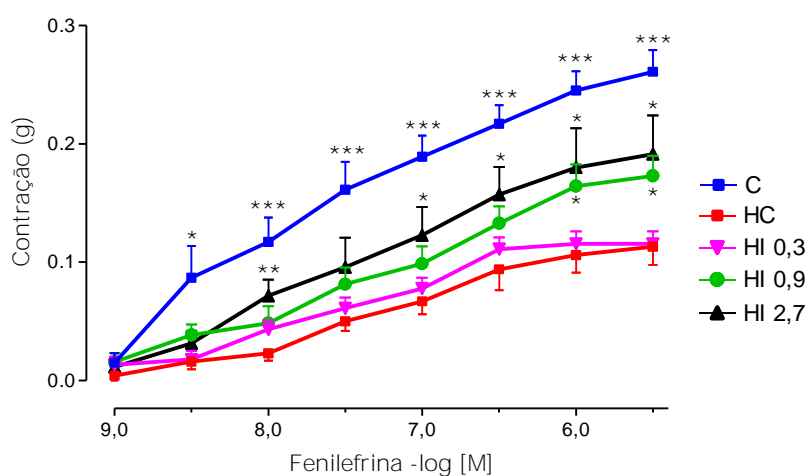


Figura 9: Efeito do EAI, após tratamento crônico, na contração vascular à fenilefrina em aortas torácicas isoladas de camundongos LDLR KO hipercolesterolêmicos. Resultados expressos como média \pm EPM de 10-13 ensaios, inclusive nos pontos sem a representação gráfica do EPM. Grupos: Controle (C); Hipercolesterolêmico (HC); Hipercolesterolêmico *Ilex paraguariensis* – 0,3 g/kg/dia (HI 0,3); Hipercolesterolêmico *Ilex paraguariensis* – 0,9 g/kg/dia (HI 0,9) e Hipercolesterolêmico *Ilex paraguariensis* – 2,7 g/kg/dia (HI 2,7). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo HC (ANOVA/Tukey).

5.4.3.2. Efeito do Extrato Aquoso de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) na Capacidade de Relaxamento Arterial

Logo após a verificação da capacidade contrátil à fenilefrina, foram realizadas CCR cumulativas à acetilcolina para avaliação da capacidade de relaxamento da aorta dos camundongos.

O relaxamento vascular foi inibido significativamente nos animais hipercolesterolêmicos (grupo HC) em relação ao grupo controle ($p < 0,001$; Figura 10). O relaxamento máximo (Rmax) observado para os animais do grupo controle foi de $0,193 \pm 0,015$ g (média \pm EPM), enquanto que nos animais hipercolesterolêmicos o Rmax foi de $0,110 \pm 0,013$ g ($p < 0,001$; Tabela 6).

O tratamento com EAI ocasionou um aumento significativo da capacidade de relaxamento da aorta dos camundongos do grupo HI 0,9 (Rmax: $0,161 \pm 0,015$ g) em relação ao grupo HC (Rmax: $0,110 \pm 0,010$ g; $p < 0,05$). Porém, não provocou alterações significativas nos grupos HI 0,3 e 2,7 quando comparadas ao grupo HC (Figura 11 e Tabela 6).

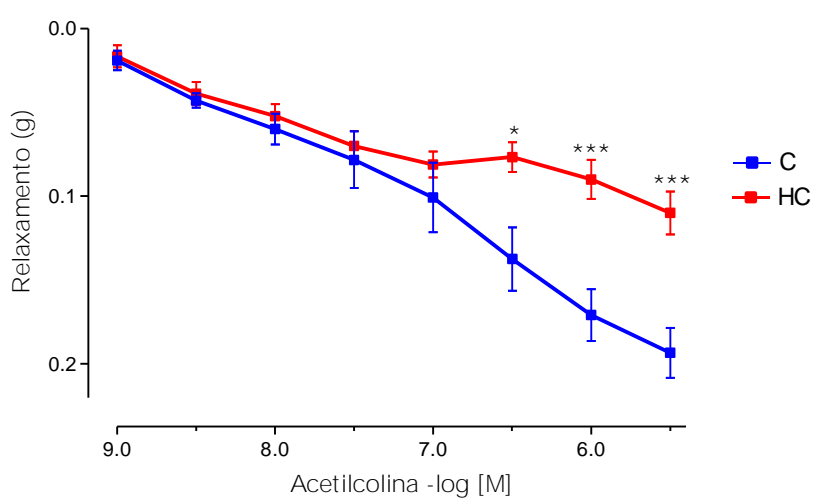


Figura 10: Efeito da hipercolesterolemia no relaxamento vascular à acetilcolina em aortas torácicas isoladas de camundongos LDLR KO. Resultados expressos como média \pm EPM de 10-13 ensaios por grupo, inclusive nos pontos sem a representação gráfica do EPM. Controle (C); Hipercolesterolêmico (HC). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo C (Teste t de Student não pareado).

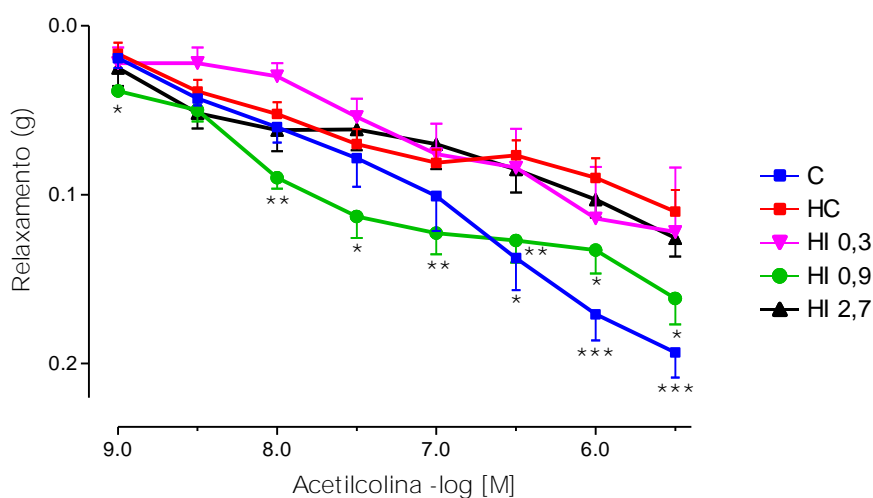


Figura 11: Efeito do EAI, após tratamento crônico, no relaxamento vascular à fenilefrina em aortas torácicas isoladas de camundongos LDLR KO hipercolesterolêmicos. Resultados expressos como média \pm EPM de 10-13 ensaios, inclusive nos pontos sem a representação gráfica do EPM. Grupos: Controle (C); Hipercolesterolêmico (HC); Hipercolesterolêmico *Ilex paraguariensis* – 0,3 g/kg/dia (HI 0,3); Hipercolesterolêmico *Ilex paraguariensis* – 0,9 g/kg/dia (HI 0,9) e Hipercolesterolêmico *Ilex paraguariensis* – 2,7 g/kg/dia (HI 2,7). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo HC (ANOVA/Tukey).

Tabela 6: Efeitos da fenilefrina (3 μ M) na contração máxima (Cmax) e da acetilcolina (3 μ M) no relaxamento máximo (Rmax) de artérias de camundongos LDLR KO.

Grupos	Cmax (g)	Rmax (g)
C	0,261 \pm 0,018	0,193 \pm 0,015
HC	0,113 \pm 0,015 *	0,110 \pm 0,013 *
HI 0,3	0,115 \pm 0,011	0,122 \pm 0,038
HI 0,9	0,173 \pm 0,017 **	0,161 \pm 0,015 **
HI 2,7	0,191 \pm 0,032 **	0,126 \pm 0,011

Grupos: C, controle; HC, hipercolesterolêmico; HI, hipercolesterolêmico *Ilex paraguariensis* 0,3; 0,9 ou 2,7 g/kg/dia. * $p < 0,001$ comparado ao grupo controle (C); ** $p < 0,001$ comparado ao grupo hipercolesterolêmico (HC). (ANOVA/Tukey).

5.5. Efeito do Extrato Aquoso de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*; EAI) na Extensão das Lesões Ateroscleróticas

As artérias aorta dos camundongos hipercolesterolêmicos dos grupos HC e HI foram retiradas e cortes histológicos foram realizados na região do arco aórtico. A Figura 12 mostra a estrutura do arco aórtico com as lesões ateroscleróticas iniciais (estrias gordurosas) corada com Hematoxilina-Eosina (HE). Após 3 meses de tratamento com a dieta enriquecida com 1,25 % de colesterol, o arco aórtico apresentou a existência de macrófagos com alto conteúdo de lipídios no espaço intimal.

Dois cortes histológicos representativos de cada grupo de animais (HC e HI 0,9) são mostrados na Figura 13 A e B, respectivamente. Por problemas técnicos, muitos cortes histológicos foram danificados, impossibilitando a quantificação da extensão das lesões ateroscleróticas nos diferentes grupos de estudo. No entanto, foi possível observar que a quantidade de lesões foi, aparentemente, semelhante nos arcos aórticos dos camundongos dos vários grupos, independente da dose de extrato de erva-mate administrada.

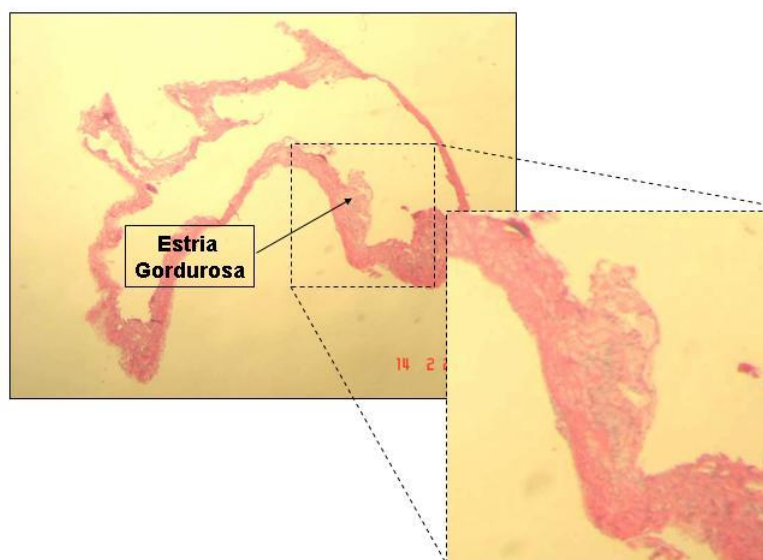


Figura 12. Histologia do arco aórtico (coloração HE; 10 x) de camundongo LDLR KO alimentado com colesterol mostrando as lesões ateroscleróticas iniciais. No detalhe a estria gordurosa.

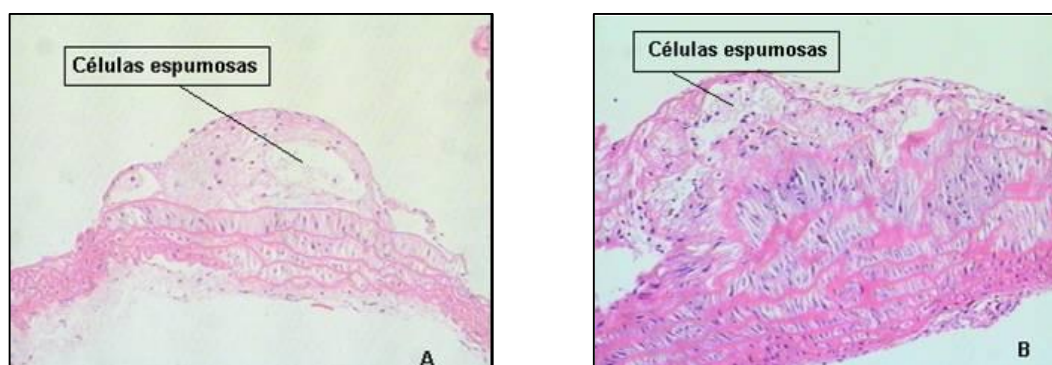


Figura 13: Histologias do arco aórtico, corados com HE (40 x), de camundongos LDLR KO alimentados com colesterol (A; grupo HC) e alimentados com colesterol e extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* 0,9 g/kg/dia (B; grupo HI 0,9). As células espumosas compoendo a estria gordurosa estão indicadas.

6. DISCUSSÃO

A aterosclerose é uma doença crônica, influenciada pela interação de fatores ambientais e genéticos, e envolve uma relação complexa de componentes da parede arterial e do sangue, sendo caracterizada por reações oxidativas e inflamatórias (Glass e Witztum, 2001). Estudos epidemiológicos indicaram uma relação inversa entre a ingestão de compostos fenólicos e a incidência de doenças cardiovasculares (Knekt et al., 1996; Hertog et al., 1993a; Hertog et al., 1995). Embora os compostos polifenólicos possam atuar diretamente como agentes antioxidantes, eles também podem estar agindo por outros mecanismos antiaterogênicos, como inibição da expressão de moléculas de adesão (Murase et al., 1999), inibição da agregação plaquetária (Neiva et al., 1999) e promoção do vasorelaxamento dependente do endotélio através da síntese de NO (Fitzpatrick et al., 1995; Andriambelason et al., 1997; Schuldt et al., 2000). No Brasil, dentre as espécies vegetais ricas em polifenóis com importância dietética, destaca-se a erva-mate (*Ilex paraguariensis*), que possui polifenóis hidrossolúveis, como os derivados cafeoilquínicos, principalmente o ácido clorogênico e seus isômeros, bem como saponinas e uma pequena quantidade de flavonóides (Schenkel et al., 1997; Carini et al., 1998), os quais apresentam elevada atividade antioxidante e podem contribuir para as defesas do organismo. Até o momento, poucos estudos foram realizados com a erva-mate. Já foi demonstrado que o extrato aquoso da planta possui atividade antioxidante *in vitro* (Campos et al., 1996; Müller et al., 1998; Filip et al., 2000; Schinella et al., 2000), potencial inibitório contra a lipoperoxidação plasmática da LDL (Gugliucci e Stahl, 1995; Gugliucci, 1996; Bracesco et al., 2003), e efeito vasorelaxante em artéria mesentérica de ratos

(Muccillo-Baisch et al., 1998). Recentemente, foi demonstrado em nosso laboratório que o extrato aquoso de erva-mate possui também a capacidade de reduzir significativamente a progressão da aterosclerose em coelhos (Mosimann et al., 2002).

Considerando que a disfunção endotelial é um dos principais fatores que contribuem para o processo da aterosclerose e que os compostos fenólicos, particularmente da erva-mate, apresentam atividade vasorelaxante dependente do endotélio, foi investigada a atividade do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* nos ensaios farmacológicos de reatividade vascular *in vitro*, em anéis de aorta de ratos, e *ex vivo*, em aorta de camundongos com aterosclerose. Nos ensaios *in vitro*, o EAI promoveu um significativo relaxamento, o qual foi dependente da concentração do extrato. O relaxamento na presença de endotélio funcional foi mais efetivo, enquanto que o relaxamento independente do endotélio só ocorreu de forma significativa com as maiores concentrações de EAI avaliadas (Figura 6).

Para investigar o possível envolvimento do óxido nítrico no relaxamento induzido pelo EAI, foram utilizados o L-NOARG, inibidor irreversível da NOS constitutiva e inibidor reversível da NOS indutível, e o aminoácido L-arginina, substrato para a formação do NO (Moore et al., 1990; Frew et al., 1993). Nos ensaios realizados somente com o L-NOARG, verificou-se que o relaxamento induzido pelo EAI foi significativamente abolido (Figura 7). O L-NOARG promove o bloqueio da atividade enzimática por ser análogo do substrato L-arginina, competindo com o aminoácido pelo sítio ativo da enzima (Aoki, 1995). Em outros ensaios, nos quais, além do L-NOARG foi adicionada também a L-arginina, foi

observada uma reversão do efeito inibitório promovido pelo L-NOARG sobre o relaxamento induzido pelo EAI (Figura 7).

Assim, em conjunto, considerando que na ausência do endotélio vascular foram necessárias concentrações maiores do EAI para promover o relaxamento; que o relaxamento foi reduzido significativamente pelo inibidor da NOS, e que essa inibição induzida pelo L-NOARG foi revertida com a L-arginina, os resultados sugerem o envolvimento da via NO/GMPc no relaxamento vascular em aorta induzido pelo EAI. Além disso, quando o endotélio foi removido, foram necessárias concentrações 10 vezes maiores do EAI para promover o relaxamento dos anéis de aorta de ratos (Figura 6), conforme também descrito por Andriambelison e colaboradores (1997) e Schuldt e colaboradores (2000), em estudos com outros extratos vegetais. Esses autores demonstraram que foram necessárias concentrações significativamente maiores de polifenóis do vinho e de *Cuphea cartagenensis*, respectivamente, para promover o vasorelaxamento na ausência de endotélio. Vários outros estudos evidenciaram o papel fundamental da via do NO nos relaxamentos promovidos por extratos de plantas (Fitzpatrick et al., 1995; Odigie et al., 2003). Os resultados de Muccillo-Baisch e colaboradores (1998) são de particular importância, pois também demonstraram que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* promoveu relaxamento dependente de endotélio funcional em artéria mesentérica de ratos. Além disso, no presente estudo, o grau de relaxamento provocado pelo EAI na presença de endotélio funcional (Figura 6) foi equivalente aos valores relatados por Muccillo-Baisch e colaboradores (1998) em artéria mesentérica de ratos. Isto é, com a concentração de 1000 µg/mL de EAI,

observou-se um relaxamento de $32,0 \pm 3,4$ %, semelhante a 33,5 % de relaxamento provocado por 900 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de *Ilex paraguariensis* (Muccillo-Baisch et al., 1998).

Dentre os principais compostos constituintes do extrato aquoso de erva-mate, descritos na literatura ou identificados neste trabalho, os prováveis candidatos para exercerem o vasorelaxamento seriam, à primeira vista as metilxantinas, as saponinas, os flavonóides, o ácido gálico e o ácido clorogênico. As metilxantinas causam relaxamento do músculo vascular por mecanismos dependentes e independentes do endotélio. Segundo Hatano e colaboradores (1995), a cafeína promove relaxamento, em aorta de ratos, pela síntese de NO no endotélio através da liberação de cálcio do retículo endoplasmático e pela supressão da degradação de GMPc de maneira dependente do endotélio, além de agir como inibidor de fosfodiesterase no mecanismo independente do endotélio. No entanto, as saponinas de *Ilex paraguariensis* não promoveram o vasorelaxamento de artéria isolada de rato (Maas et al., 1991); assim, elas não devem participar do efeito relaxante observado. Os flavonóides encontram-se presentes no extrato aquoso de erva-mate em pequena concentração (Carini et al., 1998; Filip et al., 2000), parecendo pouco provável que, isoladamente, eles exerçam tal efeito. O ácido gálico é o segundo composto fenólico em concentração presente no extrato de erva-mate, mas Sanae e colaboradores (2002) demonstraram que eles não apresentam atividade vasorelaxante, podendo, inclusive, ter atividade vasoconstritora (Andriambelason et al., 1998). O principal constituinte fenólico do mate foi o ácido clorogênico (Tabela 1; Carini et al., 1998;

Filip et al., 2000). Todavia, o ácido clorogênico, apesar de liberar NO em quantidade suficiente em artéria isolada, não foi efetivo para promover o vasorelaxamento (Taubert et al., 2002). No entanto, resultados preliminares de nosso laboratório mostraram que o ácido clorogênico provocou vasorelaxamento em artéria de ratos, em grau semelhante ao EAI. Por exemplo, o relaxamento máximo obtido com o ácido clorogênico foi de 69,0 % com a concentração de 3000 µg/mL e CI50 de 1343 µg/mL (n = 2; resultados não apresentados), enquanto que o Rmax com o EAI foi de 80,1 % e CI50 de 1146 µg/mL (Tabela 2). Considerando os achados de Taubert e colaboradores (2002), estes resultados com o ácido clorogênico necessitam ser confirmados. Independentemente, o efeito vasorelaxante provocado pelo extrato aquoso de erva-mate parece ser devido ao efeito sinérgico dos vários constituintes conhecidos, bem como daqueles ainda não identificados.

Taubert e colaboradores (2002) também relataram que diversas classes de compostos fenólicos estimularam a liberação de NO em artérias coronarianas de suínos e que esta liberação estaria associada à extensão do efeito vasorelaxante observado. Assim sendo, apenas os compostos fenólicos que liberaram NO em concentração superior a 5 nM, valor do *K_m* da guanilato ciclase solúvel (Ignarro, 1990), como a quercetina e seus glicosídeos, a miricetina, as proantocianidinas e o ácido caféico, entre outros, promoveram vasorelaxamento significativo (Taubert et al., 2002). Alguns autores demonstraram que o efeito vasorelaxante dos flavonóides dependente do endotélio ocorre em concentrações menores do que 30 µM de fenóis (Chan et al., 2000). Segundo Ajay e colaboradores (2003), isto

implica que, em baixas concentrações, o efeito relaxante dos flavonóides seja mediado, provavelmente, pela liberação de óxido nítrico e prostaciclina do endotélio, enquanto que em concentrações mais elevadas, os flavonóides exercem seus efeitos através de outros mecanismos, como por exemplo, pela inibição de proteínas contráteis, como a proteína quinase C (Duarte et al., 1993); inibição de enzimas, como a AMPc-fosfodiesterase (Beretz et al., 1980) e/ou inibição da liberação de cálcio dos estoques intracelulares (Chan et al., 2000). Desta maneira, a atividade de relaxamento verificada com as maiores concentrações testadas em nossos ensaios, deve envolver outro tipo de mecanismo, não relacionado com a via NO/GMPc. As metilxantinas, presentes no extrato aquoso de erva-mate como por exemplo, a cafeína (Tabela 1), também podem estar envolvidas no vasorelaxamento independente do endotélio pelo seu mecanismo de ação que envolve a indução do acúmulo de GMPc e AMPc, através da inibição da atividade da enzima fosfodiesterase e a mobilização do cálcio intracelular (Borstel, 1983; Stefanovich, 1989; Hatano et al., 1995; Sawynok, 1995).

Além desses mecanismos propostos para o efeito vasorelaxante dos compostos fenólicos, deve-se considerar também o mecanismo baseado na sua atividade antioxidante, a qual pode auxiliar na manutenção da concentração de NO ativo. Neste sentido, foram desenvolvidos ensaios bioquímicos, através dos quais ficou demonstrado que o extrato aquoso de erva-mate utilizado no presente estudo apresentou atividade antioxidante *in vitro*. O EAI diminuiu o percentual de redução do NBT, no sistema NADH/metassulfato de fenazina proporcional à sua concentração (Figura 3), com CI50 de 27,1 µg/mL de extrato. Valores semelhantes

foram encontrados por Schinella e colaboradores (2000). A inibição da redução do NBT reflete, de maneira indireta, a capacidade do extrato em seqüestrar o radical ânion superóxido. Diversos flavonóides e outros compostos fenólicos são considerados antioxidantes, não apenas porque eles agem como seqüestradores de $O_2^{\cdot-}$, mas também como inibidores da enzima xantina oxidase (Cos et al., 1998), considerada uma importante fonte de radicais superóxido, pois durante a oxidação da xantina, radicais ânion superóxido e peróxido de hidrogênio são formados (Britigan et al., 1990). Em sistemas fisiológicos, o radical superóxido reage com o NO formando o peroxinitrito (Darley-Usmar et al., 1995), que está implicado na fisiopatologia de várias doenças inflamatórias, como aterosclerose e artrite (Persinger et al., 2002). Dessa forma, substâncias que reduzem a quantidade de $O_2^{\cdot-}$ são de grande importância para a preservação da biodisponibilidade do NO e do conseqüente efeito vasorelaxante.

Para investigar o efeito do EAI contra os radicais hidroxila ($^{\cdot}OH$) e peroxila (LOO^{\cdot}), foram realizados dois tipos de ensaio: o ensaio da desoxirribose, para verificar se o EAI seria capaz de proteger o carboidrato desoxirribose contra a oxidação promovida pelo radical $^{\cdot}OH$ gerado no sistema, e o ensaio envolvendo homogenato de fígado de ratos, realizado para verificar o efeito do EAI contra a lipoperoxidação. De acordo com os resultados, o EAI promoveu uma inibição da degradação da desoxirribose de maneira dependente da concentração com valores inferiores a 0,01 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4). O radical $^{\cdot}OH$ é a espécie de oxigênio mais reativa encontrada em meio biológico, reagem no próprio sítio onde foram gerados e são responsáveis por grande parte dos danos celulares promovidos

pelas espécies reativas de oxigênio, causando quebras nas fitas do DNA, promovendo peroxidação lipídica, além de oxidar proteínas (Halliwell e Gutteridge, 1989). Os resultados sugerem que os componentes ativos presentes no EAI exerçam sua atividade protetora da degradação da desoxirribose, possivelmente pelo seqüestro de $\cdot\text{OH}$. Os flavonóides e outros compostos polifenólicos são potentes seqüestradores clássicos deste radical (Husain et al., 1987). Vale a pena salientar que o EAI foi extremamente efetivo no seu efeito seqüestrador do $\cdot\text{OH}$, com CI50 de aproximadamente 0,07 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 4). O EAI também inibiu a peroxidação lipídica em homogenato de fígado de rato, induzida pelo *tert*-butilhidroperóxido (Figura 5). Vários estudos demonstraram que a inibição da peroxidação lipídica verificada na presença de determinados flavonóides se deve às propriedades seqüestradoras de radicais $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou LOO^{\cdot} (Husain et al., 1987; Takahama, 1993; Terao et al., 1994).

Segundo Burns e colaboradores (2000), a atividade antioxidante *in vitro* de extratos não-alcoólicos de vinho tinto esteve significativamente correlacionada ao conteúdo de fenóis totais e à atividade vasorelaxante dependente de NO. No entanto, isoladamente, apenas as antocianinas correlacionaram-se com a vasodilatação, sugerindo um efeito sinérgico dos compostos fenólicos. Mullen e colaboradores (2002) também relataram uma correlação positiva entre o conteúdo de fenóis totais do extrato de amora vermelha (*Rubus idaeus*), a atividade antioxidante, e o efeito vasorelaxante em aorta de coelhos. Entretanto, ao contrário dos resultados de Burns e colaboradores (2000), o efeito vasodilatador não esteve associado às antocianinas, indicando que diferentes espécies vegetais

possuem antocianinas com atividades diversas. Além disso, nem todas as frações isoladas do extrato de *Rubus idaeus* com atividade antioxidante foram efetivas no vasorelaxamento (Mullen et al., 2002). Conforme também salientado por Taubert e colaboradores (2002), compostos fenólicos com conhecido potencial antioxidante *in vitro* não promoveram vasorelaxamento derivado de NO, indicando que o efeito antioxidante não deve ser o mecanismo principal da ação vasodilatadora de determinados compostos fenólicos.

Considerando os resultados encontrados nos ensaios de atividade antioxidante e de vasorelaxamento em aorta de ratos, ambos *in vitro*, foi avaliado o efeito do extrato de erva-mate comercial na reatividade vascular em modelo animal com aterosclerose. Camundongos LDLR KO foram utilizados no tratamento crônico e o efeito da administração do EAI em três concentrações foi igualmente avaliado. Os animais foram alimentados com dieta hipercolesterolêmica por três meses para a indução das lesões ateroscleróticas (Cyrus et al., 2003). Após esse período de tempo, observou-se alteração na ingestão da ração comercial padrão (grupo C) e ração hipercolesterolêmica (grupo HC), bem como na ingestão da ração com colesterol nos grupos, os quais receberam concomitantemente o extrato de erva-mate (grupos HI 0,3, HI 0,9 e HI 2,7). Os animais do grupo HC, que receberam a dieta rica em colesterol, ingeriram menos ração em comparação com o grupo controle (Tabela 4). Apesar disso, esses camundongos apresentaram maior ganho de peso. A administração do EAI aos animais hipercolesterolêmicos ocasionou uma diminuição na ingestão da ração e no ganho de peso, proporcional à concentração do extrato. As metilxantinas presentes no EAI (Tabela 1) poderiam estar interferindo no ganho de peso, pois apresentam atividade na diurese, pelo

aumento do débito sanguíneo renal e da filtração glomerular, ou ainda por agir sobre o metabolismo de carboidratos e lipídios, estimulando a lipólise no tecido adiposo (Sawynok, 1995).

Conforme esperado, a administração da dieta hipercolesterolêmica aumentou significativamente a concentração sérica de colesterol total e das lipoproteínas LDL e VLDL; mas não alterou a concentração sérica da HDL e dos triglicerídeos (Tabela 5). Resultados semelhantes foram relatados anteriormente (Ishibashi et al., 1993; Kowala et al., 2000). O fornecimento de colesterol e ácidos graxos saturados na dieta dos camundongos favorece a absorção intestinal e liberação de colesterol ao fígado na forma de remanescentes de quilomícrons (Hui et al., 1986). O aumento de colesterol hepático promove a síntese e secreção de colesterol para o plasma na forma de partículas de VLDL, as quais são transformadas em LDL através da ação catalítica da enzima lipase lipoprotéica. As VLDL e LDL, em número aumentado no plasma, não são removidas da circulação devido à deficiência dos receptores de LDL nesses animais. Assim, os camundongos LDLR KO apresentam elevada concentração plasmática de LDL e VLDL, e são suscetíveis à aterosclerose quando alimentados com dieta rica em colesterol (Ishibashi et al., 1993; Kowala et al., 2000).

A administração do EAI concomitante ao tratamento com ração rica em colesterol não modificou a concentração sérica de colesterol total e das lipoproteínas nos camundongos hipercolesterolêmicos (HI 0,3; HI 0,9 e HI 2,7; tabela 5). Assim, apesar da ingestão reduzida de ração rica em colesterol por esses animais, a concentração de colesterol na circulação sanguínea permaneceu inalterada. Em estudo anterior e de forma semelhante, o extrato aquoso de erva-

mate também não reduziu os lipídios séricos em coelhos alimentados com colesterol (Mosimann et al., 2002). Em geral, extratos vegetais ricos em polifenóis não conseguem diminuir a hipercolesterolemia severa presente em animais alimentados com colesterol. Miura e colaboradores (2001) demonstraram que os compostos fenólicos do chá verde não alteraram as concentrações plasmáticas de colesterol e triglicérides em camundongos deficientes para o receptor de apolipoproteína E. Outros autores, utilizando coelhos alimentados com colesterol como modelo de aterosclerose e estudando o efeito de compostos fenólicos presentes no extrato de semente de uva (Yamakoshi et al., 1999), no vinho tinto (Luz et al., 1999) e no chá verde e chá preto (Tijburg et al., 1997), também não observaram diminuição na concentração de colesterol sérico. Apenas quando a hipercolesterolemia foi considerada moderada - em coelhos alimentados com dieta sem colesterol e rica em caseína - foi possível verificar o efeito hipocolesteremiante dos flavonóides presentes no suco de laranja (Kurowska et al., 2000).

Os camundongos LDLR KO, após três meses de tratamento com a dieta hipercolesterolêmica, apresentaram lesões ateroscleróticas (estrias gordurosas) na região do arco aórtico (Figura 12). Devido a problemas técnicos, ocasionados pelo pequeno tamanho do arco aórtico dos camundongos, ocorreram perdas das peças anatômicas durante a preparação dos cortes histológicos, impossibilitando, assim, a avaliação da extensão das lesões nos animais. Conseqüentemente, não foi possível determinar o efeito do EAI na redução das lesões ateroscleróticas nos camundongos LDLR KO. Todavia, o extrato aquoso de erva-mate reduziu significativamente a progressão da aterosclerose em coelhos alimentados com

colesterol (Mosimann et al., 2002). Outros autores demonstraram que a aterosclerose nos camundongos LDLR KO pode ser reduzida por vários agentes. Por exemplo, compostos fenólicos presentes no chá verde (Miura et al., 2001; Chyu et al., 2004), antioxidantes e agentes hipolipidêmicos (Benson et al., 1998; Crawford et al., 1998; Witting et al., 1999) e complexos de aspirina-óxido nítrico (Napoli et al., 2002), reduziram a aterosclerose experimental nesse modelo animal.

Além da hipercolesterolemia e da formação de estrias gordurosas na artéria dos camundongos LDLR KO, o tratamento com a dieta rica em colesterol também provocou nesses animais uma inibição significativa da capacidade contrátil à fenilefrina e do relaxamento à acetilcolina (Figuras 8 e 10, respectivamente, $p < 0,001$). Animais hipercolesterolêmicos com artérias ateromatosas, como coelhos e camundongos deficientes de apo E, também apresentaram inibição da contração induzida pelos agentes vasoconstritores, potássio e serotonina (Dusting et al., 1990; Galle et al., 1991; Sobey et al., 1991; Jiang et al., 2001).

A disfunção endotelial, particularmente a diminuição da vasodilatação dependente de endotélio, em animais e seres humanos com aterosclerose, é conhecida há longo tempo (Verbeuren et al., 1986; Meredith et al., 1993). Recentemente, Rabelo e colaboradores (2003) relataram que camundongos LDLR KO alimentados com colesterol apresentaram diminuição do relaxamento dependente de endotélio. Essa disfunção endotelial é caracterizada pela redução da disponibilidade de compostos vasodilatadores, principalmente do NO, enquanto fatores contráteis derivados do endotélio estão aumentados (Russe e Fleming, 1996). O desequilíbrio resultante leva ao impedimento da vasodilatação

dependente de endotélio, a qual representa a característica principal da disfunção endotelial. Por outro lado, a disfunção endotelial também inclui um estado específico de “ativação endotelial”, o qual é caracterizado por um ambiente pró-inflamatório, proliferativo e pró-coagulante, que favorecem todos os estágios da aterogênese (Anderson, 1999).

Os fatores de risco relacionados à aterosclerose estão associados com a disfunção endotelial. Muitos desses fatores de risco, como hiperlipidemia, hipertensão, diabetes mellitus e tabagismo, estão associados a uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (Cai e Harrison, 2000). Através da reação com o NO, essas espécies reativas de oxigênio podem reduzir a disponibilidade do NO vascular e promover o dano celular, com a conseqüente diminuição da vasodilatação. Nesse sentido, é possível que no presente estudo, as artérias dos camundongos LDLR KO com aterosclerose apresentem concentrações elevadas de $O_2^{\bullet-}$, conforme descrito anteriormente para artérias ateromatosas de coelhos hipercolesterolêmicos (Ohara et al., 1993). Uma vez formado, o $O_2^{\bullet-}$ reage rapidamente com o NO para formar o peroxinitrito, consumindo, dessa maneira, o NO e prejudicando a reatividade vascular (Huie e Padmaja, 1993). Além disso, não se pode descartar a possibilidade de uma diminuição da concentração de NO, pela presença de inibidores da síntese de NO, conforme revisado por Russo e colaboradores (2002).

O resultado mais relevante do presente trabalho foi a demonstração de que, após a ingestão crônica, o extrato aquoso de erva-mate apresentou potencial de reverter a redução da reatividade vascular *ex vivo* provocada pela aterosclerose experimental nos camundongos LDLR KO (Figuras 9 e 11). Ou seja, os compostos

constituintes do EAI, os quais apresentaram atividade vasorelaxante *in vitro* (Figura 6), foram absorvidos e atingiram a circulação sanguínea e a parede arterial em quantidade suficiente para promover o efeito protetor na reatividade vascular. O efeito de reversão da inibição da contração vascular foi dependente da dose do extrato de erva-mate administrado (Figura 9). Os eventos sinalizadores que ativam a contração incluem o aumento da concentração de cálcio intracelular, ativação da miosina-quinase e a fosforilação dependente de cálcio da miosina de cadeia leve, conforme revisado por Woodrum e Brophy (2001). Assim, esse mecanismo de contração encontra-se alterado na aterosclerose experimental, e o efeito benéfico promovido pelo extrato aquoso de erva-mate poderia ocorrer através da modulação da concentração de cálcio intracelular, restabelecendo a contração.

Enquanto a melhora na contração vascular foi dependente da dose do extrato administrado, a reversão da inibição do relaxamento vascular foi obtida apenas com a dose intermediária do extrato (0,9 g/kg/dia). É interessante notar que a menor dose de EAI administrada foi claramente insuficiente para promover o efeito benéfico na contração e relaxamento, enquanto que a dose maior foi efetiva apenas na resposta contrátil à fenilefrina. Esses resultados sugerem que o mecanismo de ação dos componentes do extrato de erva-mate é diferente na contração e no relaxamento. O mecanismo de ação desses componentes nas diferentes concentrações utilizadas deverá ser tema de trabalhos futuros.

Vale salientar que o extrato aquoso de erva-mate aumentou a reatividade vascular nos camundongos com aterosclerose, apesar da hipercolesterolemia presente nesses animais (Tabela 5). Valores elevados de colesterol plasmático estão implicados na disfunção arterial. Em pacientes hipercolesterolêmicos com

doença arterial coronariana estabelecida, a diminuição do colesterol plasmático pelo uso de estatinas melhorou o vasorelaxamento dependente de endotélio nas artérias coronárias (Treasure et al., 1995). Assim, podemos concluir que o mecanismo de ação do extrato de erva-mate na reatividade vascular de camundongos LDLR KO com aterosclerose, não está relacionado com a diminuição do colesterol plasmático.

É possível que o EAI, após sua ingestão, esteja restabelecendo a contração e o relaxamento vascular pela manutenção das concentrações de NO, e a conseqüente melhora da função endotelial, conforme demonstrado nos ensaios de reatividade vascular *in vitro* (Figuras 6 e 7). Esse efeito na reatividade vascular envolvendo o NO é comum a vários extratos de plantas ricos em compostos fenólicos, sendo que os mais estudados até o momento são os do vinho tinto (Dell'Agli et al., 2004). Inclusive, conforme relatado previamente, o efeito vasorelaxante do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* também parece ser mediado pelo NO (Muccillo-Baish et al., 1998). O mecanismo envolvido na manutenção das concentrações de NO vascular pelo extrato de erva-mate poderia ser devido ao seu potencial antioxidante, através do efeito seqüestrador de radical superóxido (Figura 3). No entanto, essa conclusão estaria sendo baseada em resultados indiretos e, assim, não é possível afirmar se tal mecanismo ocorreu *in vivo*, ou mesmo descartar a possibilidade de atuação do EAI também no aumento da síntese do NO.

Igualmente importante aos achados do efeito benéfico da ingestão do extrato aquoso de erva-mate na reatividade vascular, aqui apresentados, é o fato dos constituintes do mate apresentarem atividade após a sua transformação

metabólica. Embora não se tenha isolado e testado os componentes presentes no extrato de erva-mate, é possível fazer conjecturas sobre os possíveis componentes que, após a absorção e transformação metabólica, ainda estejam ativos. Conforme já mencionado, os principais componentes do extrato aquoso de erva-mate são as metilxantinas – principalmente a cafeína (Tabela 1), as saponinas (Schenkel et al., 1997) e os compostos fenólicos – principalmente o ácido gálico e o ácido clorogênico (Tabela 1), e uma pequena parcela composta por flavonóides (Ricco et al., 1991; Carini et al., 1998; Filip et al., 2001).

No sistema circulatório, as metilxantinas, particularmente a cafeína, apresentam efeitos complexos e antagônicos *in vivo*, dependendo das condições experimentais e da localização de atuação (Rall, 1991). As saponinas poderiam participar do efeito na reatividade vascular, mas até o momento não existem informações sobre a absorção e metabolismo das mesmas. Além disso, conforme comentado anteriormente, as saponinas do mate não foram efetivas em promover o vasorelaxamento *in vitro* (Maas et al., 1991). Da mesma forma, o ácido gálico não apresentou atividade vasorelaxante *in vitro* (Andriambeloson et al., 1998; Sanae et al., 2002).

Todos os compostos fenólicos do mate, como os flavonóides e, inclusive, o ácido clorogênico, possuem elevada atividade antioxidante *in vitro* (Laranjinha et al., 1994; Nardini et al., 1995; Rice-Evans et al., 1996). Após a ingestão e hidrólise enzimática, os flavonóides são absorvidos pelo intestino e aparecem na circulação sangüínea essencialmente na forma de conjugados com o ácido glicurônico e/ou com grupamentos sulfato ou metílico (Piskula e Terao, 1998; Erlund et al., 1999; Moon et al., 2000; Wittig et al., 2001). Esses metabólitos plasmáticos ainda

mantêm a atividade antioxidante de seus precursores (Manach et al., 1998; Silva et al., 1998a e 1998b). Vários metabólitos já foram identificados em relação à posição das ligações de conjugação na molécula de flavonóide (Day et al., 2001), e foi comprovado que a quercetina-3-glicuronídeo retém o potencial antioxidante da forma aglicona (Moon et al., 2001). Considera-se que esses metabólitos podem, também, permanecer com o seu potencial vasorelaxante, pois Stein e colaboradores (1999) demonstraram uma melhora do relaxamento dependente do endotélio em pacientes com doença arterial coronariana após a ingestão de extrato contendo compostos fenólicos. No entanto, é questionável se a quantidade de flavonóides existente no extrato de erva-mate é suficiente para, após a absorção e transformação metabólica, exercerem tal atividade vasorelaxante.

Enquanto existe um número crescente de informações sobre a absorção, metabolismo, excreção e atividade antioxidante dos flavonóides *in vivo* e *ex vivo*, apenas alguns poucos estudos têm sido realizados focalizando a absorção e metabolismo dos ácidos clorogênico e caféico. Entretanto, sugere-se que o ácido clorogênico possa sofrer hidrólise pelas enzimas bacterianas intestinais liberando o ácido caféico (Gumbinger et al., 1993; Chesson et al., 1999; Azuma et al., 2000; Olthof et al., 2001; Rechner et al., 2001). O ácido clorogênico parece não ser absorvido em ratos, enquanto que, semelhante aos flavonóides, o ácido caféico foi totalmente absorvido, surgindo no plasma metabólitos conjugados com ácido glicurônico e com sulfato, além do ácido ferúlico (ácido caféico metilado) (Azuma et al., 2000). Olthof e colaboradores (2001) relataram que, em seres humanos ileostomizados, o ácido clorogênico foi absorvido em 33% e o ácido caféico em quase 100%. Compostos fenólicos metilados, como os ácidos ferúlico, isoferúlico,

dihidroferúlico e vanílico, foram detectados na urina de indivíduos após a ingestão de ácido caféico (Rechner et al., 2001), indicando a sua absorção, metabolismo e excreção.

Posteriormente, Nardini e colaboradores (2002) relataram a presença de ácido caféico conjugado com sulfato e glicuronato e ausência de ácido clorogênico, ou seus metabólitos, no plasma de indivíduos após a ingestão de café. Considerando que no café o ácido caféico encontra-se, principalmente, na forma de ácido clorogênico, os autores sugeriram que o ácido caféico encontrado foi derivado da hidrólise do ácido clorogênico no trato gastrointestinal. Assim, parece pouco provável que o ácido clorogênico ou seus isômeros presentes no extrato de erva-mate sejam absorvidos e seus metabólitos conjugados sejam os responsáveis pelo efeito benéfico na reatividade vascular dos camundongos. Vale lembrar que o ácido clorogênico não promoveu o vasorelaxamento *in vitro* (Taubert et al., 2002).

No entanto, é possível que o ácido clorogênico origine o ácido caféico no intestino dos camundongos e o ácido caféico, o qual possui atividade vasorelaxante (Taubert et al., 2002), após absorção e transformação metabólica, exerça o efeito vasorelaxante observado na artéria dos camundongos. Todavia, o ácido ferúlico, um dos metabólitos do ácido caféico, não apresentou atividade vasorelaxante (Taubert et al., 2002). Assim, o efeito vasorelaxante observado no presente estudo ficaria restrito aos outros metabólitos do ácido caféico, embora ainda necessite de comprovação. A demonstração do aumento de proteção antioxidante no plasma e na LDL após a ingestão de café (Yukawa et al., 2004) e de extrato aquoso de erva-mate (Gugliucci, 1996; Silva et al., 2004) é altamente

sugestiva de que os metabólitos dos compostos constituintes desses extratos, ácidos caféico e/ou clorogênico - entre outros ainda desconhecidos - apresentem atividade antioxidante. Assim, conforme demonstrado no presente estudo, os metabólitos dos constituintes do EAI também apresentaram atividade na resposta de contração vascular à fenilefrina e resposta de relaxamento à acetilcolina. Enquanto os principais agentes ativos no mate não são identificados, é plausível considerar que o efeito na reatividade vascular seja provocado pela ação conjunta dos vários componentes e, conseqüentemente, pelo sinergismo dos diferentes metabólitos plasmáticos.

Independente de quais sejam os compostos constituintes do mate, ou seus metabólitos, responsáveis pelo efeito na reatividade vascular, os presentes resultados demonstraram, pela primeira vez, que o extrato aquoso de erva-mate apresentou atividade vasorelaxante dependente de endotélio *in vitro* em aorta de ratos e, de particular importância, melhorou a contração e o relaxamento *ex vivo* em aorta de camundongos LDLR KO com aterosclerose. O aumento da vasodilatação dependente de endotélio poderia ser o mecanismo potencial pelo qual o extrato aquoso de erva-mate preveniu a progressão da aterosclerose experimental em coelhos (Mosimann et al., 2002). Considerando a importância da reatividade vascular na patogênese da aterosclerose e as inúmeras evidências de estudos clínicos, as quais mostraram melhora do sistema cardiovascular em pacientes sob risco de complicações vasculares, através de estratégias medicamentosas que reestabelecem a função endotelial dependente de NO (Revisado por Bonetti et al., 2003), sugere-se que a ingestão do extrato aquoso de

erva-mate pode apresentar efeitos benéficos aos pacientes com risco de desenvolver doenças cardiovasculares.

7. CONCLUSÕES

- No extrato aquoso de erva-mate utilizado foram identificados como compostos majoritários os fenóis, ácido clorogênico e ácido gálico, e a cafeína;
 - O EAI apresentou atividade antioxidante *in vitro* de maneira dependente de sua concentração;
 - O EAI apresentou efeito vasorelaxante *in vitro* dependente da presença de endotélio funcional. Tal efeito foi dependente da concentração de EAI;
 - Através da adição do inibidor das enzimas óxido nítrico-sintases, L-NOARG, e do substrato para a formação do NO, L-arginina, observou-se o envolvimento da via NO/GMPc no relaxamento induzido pelo EAI;
 - O relaxamento independente do endotélio funcional ocorreu somente com as maiores concentrações de EAI avaliadas;
 - O tratamento com a dieta rica em colesterol aumentou as concentrações séricas de colesterol total, VLDL-colesterol e LDL-colesterol nos camundongos;
 - A administração do EAI não modificou o perfil lipídico nos camundongos hipercolesterolêmicos;
 - Os camundongos LDLR KO com aterosclerose apresentaram inibição da reatividade vascular, i.e., contração e relaxamento;
 - A administração do EAI reverteu significativamente a inibição da contração e do relaxamento vascular nas artérias dos camundongos hipercolesterolêmicos.
-

7.1. PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, podemos sugerir a realização dos seguintes estudos:

- Isolamento, caracterização, quantificação e atividade biológica (p.ex., atividades vasorelaxante e antioxidante *in vitro* e *ex vivo*) dos compostos constituintes do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*);
- Identificação dos mecanismos envolvidos no relaxamento vascular, dependente e independente de óxido nítrico, promovido pelo extrato aquoso de erva-mate, p.ex., a via de preservação do NO vascular;
- Verificação do potencial benéfico da ingestão do extrato aquoso de erva-mate na reatividade vascular em pacientes com risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, com a possibilidade de transformação do extrato de erva-mate em fitofármaco ou classificá-lo como alimento funcional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, E.; TAKEUCHI, I.K.; SHOJI, R. Nitric oxide: an attractive signaling molecule. *Acta Histochem. Cytochem.*, v. 28, p. 97-106, 1995.

AJAY, M.; GILANI, A.U.; MUSTAFA, M.R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.*, v. 74, p. 603-612, 2003.

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

ANDERSON, T.J. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v. 34, p. 631-638, 1999.

ANDREASSI, M.G. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. *Rev. Mutat. Res.*, v. 543, p. 67-86, 2003.

ANDREWS, H.E.; BRUCKDORFER, K.R.; DUNN, R.C.; JACOBS, M. Low-density lipoproteins inhibit endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Nature*, v. 327, p. 237-239, 1987.

ANDRIAMBELOSON, E.; KLESCHYOV, A. L.; MULLER, B.; BERETZ, A.; STOCLET, J.C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Nitric Oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.*, v. 120, p. 1053-1058, 1997.

ANDRIAMBELOSON, E.; MAGNIER, C.; HAAN-ACHIPOFF, G.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R.; BERETZ, A.; STOCLET, J.C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Natural dietary polyphenolic compound cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J. Nutr.*, v. 128, p. 2324-2333, 1998.

AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *Atheroscler.*, v. 137, p. 45-50, 1998.

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

BAGGIOLINI, M.; WYMAN, M.P. Turning on the respiratory burst. *Trends Biochem. Sci.*, v. 15, p. 69-72, 1990.

BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A.; FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite; implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.87, p.1620-1624, 1990.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F.R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, A. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, p. 4505-4515, 1997.

BENSON, G.M.; SCHIFFELERS, R.; NICOLS, C.; LATCHAM, J.; VIDGEON-HART, M.; TOSELAND, C.D.N.; SUCKLING, K.E.; GROOT, P.H.E. Effect of probucol on serum lipids, atherosclerosis and toxicology in fat-fed LDL receptor deficient mice. *Atheroscler.*, v. 141, p. 237-247, 1998.

BERETZ, A.; STOCLET, J.; ANTON, R. Inhibition of isolated rat aorta contraction by flavonoids. Possible correlation with cAMP-phosphodiesterase inhibition. *Planta Medica*, v. 39, p. 236, 1980.

BERLINER, J. A.; HEINECKE, J. W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 20, p. 707-727, 1996.

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

BONETTI, P.O.; LERMAN, L.O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction – a marker of atherosclerotic risk. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 22, p. 1065-1074, 2003.

BORSTEL, R.W. Biological effects of caffeine. *Metabolism. Food Technol.*, p. 40-47, 1983.

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

BRITIGAN, B.E.; POU, S.; ROSEN, G.M.; LILLEG, D.M.; BUETTNER, G.R. Hydroxyl radical is not a product of the reaction of xanthine oxidase and xanthine. *J. Biol. Chem.*, v. 29, p. 17533-17538, 1990.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 52, p. 223-261, 1983.

BRUNETON, J. Composés Phénoliques. In: *PHARMACOGNOSIE LAVOISIER*. New York: p. 200-291, 1993.

BURNS, J.; GARDNER, P. T.; O'NEIL, J.; CRAWFORD, S.; MORECROFT, I.; MCPHAIL, D. B.; LISTER, C.; MATTHEWS, D.; MACLEAN, M. R.; LEAN, M. E. J.; DUTHIE, G. G.; CROZIER, A. Relationship among antioxidant activity,

vasodilatation capacity, and phenolic content of red wines. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 220-230, 2000.

CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.*, v. 87, p. 840-844, 2000.

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. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 7, p. 43-49, 1996.

CARINI, M.; FACINO, R.M.; ALDINI, G.; CALLONI, M.; COLOMBO, L. Characterization of phenolic antioxidants from maté (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectr.*, v. 12, p. 1813-1819, 1998.

CARR, A.; FREI, B. The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 28, p. 1806-1814, 2000.

CATANOZI, S.; ROCHA, J.C.; PASSARELI, M.; GUZZO, M.L.; ALVES, C.; FURUKAWA, L.N.S.; NUNES, V.S.; NAKANDAKARE, E.R.; HEIMANN, J.C.; QUINTÃO, E.R.C. Dietary sodium chloride restriction enhances aortic wall lipid storage and raises plasma lipid concentration in LDL receptor knockout mice. *J. Lip. Res.*, v. 44, p. 727-732, 2003.

CELERMAJER, D.S.; SORENSEN, K.E.; GEORGAKOPOULOS, D.; BULL, C.; THOMAS, O.; ROBINSON, J.; DEANFIELD, J.E. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*, v. 88, p. 2149-55, 1993.

CHAN, E.C.; PANNANGPETCH, P.; WOODMAN, O.L. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 35, p. 326-33, 2000.

CHAPPELL, S.P.; LEWIS, M.J.; HENDERSON, A.H. Effect of lipid feeding on endothelium dependent relaxation in rabbit aortic preparations. *Cardiovasc. Res.*, v. 21, p. 34-38, 1987.

CHEEKE, P.B.; Nutritional and physiological properties of saponins: a review. *Can. J. Anim. Sci.*, v. 51, p. 621, 1971.

CHEN, H.; TAPPEL, A. Protection by multiple antioxidants against lipid peroxidation in rat liver homogenate. *Lipids*, v. 31; p. 47-50, 1996.

CHESSON, A.; PROVAN, G.J.; RUSSEL, W.R.; SCOBIE, L.; RICHARDSON, A.J.; STEWART, C. Hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *J. Sci. Food Agric.*, v. 79, p. 373-378, 1999.

CHISOLM III, G.M.; CHAI, Y. Regulation of cell growth by oxidized LDL. *Free Rad. Biol. Med.*, v.28, p.1697-1707, 2000.

CHYU, K.Y.; BABBIDGE, S.M.; ZHAO, X.; DANDILLAYA, R.; RIETVELD, A.G.; YANO, J.; DIMAYUGA, P.; CERCEK, B.; SHAH, P.K. Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation*, v. 109, p. 2448-53, 2004.

CINES, D.B.; POLLAK, E.S.; BUCK, C.A.; LOSCALZO, J.; ZIMMERMAN, G.A.; McEVER, R.P.; POBER, J.S.; WICK, T.M.; KONKLE, B.A.; SCHWATZ, B.S.; BARNATHAN, E.S.; McCRAE, K.R.; HUG, B.A.; SCHMIDT, A.M.; STERN, D.M. Endothelial cells in physiology and in pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, v. 91, p. 3527–3561, 1998.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, v. 79, p. 362-372, 1999.

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

COHEN, R.A.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*, v. 92, p. 3337-3349, 1995.

CORRÊA, D. S.; RABETTI, A. C.; ERA, G .A. ATP-sensitive potassium channels do not mediate vasorelaxation by acetylcholine or iloprost. *Braz. J. Med. Res.*, v. 24, p. 729-734, 1991.

COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; VAN POEL, B.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V. Structure-activity relationships and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.*, v. 61, p. 71-76, 1998.

CRAWFORD, R.S.; KIRK, E.A.; ROSENFELD, M.E.; LEBOEUF, R.C.; CHAIT, A. Dietary antioxidants inhibit development of fatty streak lesions in the LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 18, p. 1506-1513, 1998.

CREAGER, M.A.; COOKE, J.P.; MENDELSON, M.E.; GALLAGHER, S.J.; COLEMAN, S.M.; LOSCALZO, J.; DZAU, V.J. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J. Clin. Invest.*, v. 86, p. 228-234, 1990.

CYRUS, T.; YAO, Y.; ROKACH, J.; TANG, L.X.; PRATICÒ, D. Vitamin E reduces progression of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice with established vascular lesions. *Circulation*, v. 107, p. 521-523, 2003.

DARLEY-USMAR, V.M.; MASON, R.P.; CHAMULITRAT, W.; HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Immunopharmacology of free radical species, in: Blake, D. and Winyard, P.G. eds. Lipid peroxidation and cardiovascular disease, Academic Press, p. 24, 1995.

DAY, A.J.; MELLON, F.; BARRON, D.; SARRAZIN, G.; MORGAN, M.R.A.; WILLIAMSON, G. Human metabolism of dietary flavonoids: Identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic. Res.*, v. 35, p. 941-952, 2001.

DELL'AGLI, M.; BUSCIALÀ, A.; BOSISIO, E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiov. Res.*, v. 63, p. 593-602, 2004.

DOSHI, S.N.; MCDOWELL, I.F.; MOAT, S.J.; LANG, D.; NEWCOMBE, R.G.; KREDAN, M.B.; LEWIS, M.J.; GOODFELLOW, J. Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 21, p. 1196-1202, 2001.

DUARTE, J.; PEREZ-VIZCAINO, F.; ZARZUELO, A.; JIMENEZ, J.; TAMARGO, J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 239, p. 1-7, 1993.

DUFF, S.J.; GOKCE, N.; HOLBROOK, M.; HUNTER, L.M.; BIEGELSEN, E.S.; HUANG, A.; KEANEY, J.F.Jr.; VITA, J.A. Effect of ascorbic acid treatment on conduit vessel endothelial dysfunction in patients with hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v.280, p. 528-534, 2001.

DUSTING, G.J.; CURCIO, A.; HARRIS, P.J.; LIMA, B.; ZAMBETIS, M.; MARTIN, J.F. Supersensitivity to vasoconstrictor action of serotonin precedes the development of atheroma-like lesions in the rabbit. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* v. 16, p. 667-674, 1990.

ERLUND, I.; ALFTHAN, G.; SIREN, H.; ARINIEMI, K.; ARO, A. Validated method for the quantitation of quercetin from human plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B.*, v. 727, p. 179-189, 1999.

ESMON, C.T.; ESMON, N.L.; HARRIS, K.W. Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 7944-7947, 1982a.

ESMON, N.L.; OWEN, W.G.; ESMON, C.T. Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 859-864, 1982b.

EWIN, J. O Lado Sadio das Gorduras. Ed Campus, Rio de Janeiro/RJ. p. 142, 1997.

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

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

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

FILIP, R.; LOTITO, S. B.; FERRARO, G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Res.*, v. 20, p.1437-1446, 2000.

FISHMAN, A.P. Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 401, p. 1-8, 1982.

FITZPATRICK, D.F.; HIRSCHFIELD, S.L.; RICCI, T.; COFFEY, R.G. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 26, p. 90-95; 1995.

FLEMING, W.W.; WESTPHALL, D.P.; DE LANDE, I.S.; JELLET, L.B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, v. 181, p. 339-345, 1972.

FORSTERMANN, U.; LI, H. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J. Pathol.*, v. 190, p. 244-254, 2000.

FREMONT, L.; BELGUENDOZ, L.; DELPAL, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci.*, v. 64, p. 2511-2521, 1999.

FREW, J.D.; PAISLEY, K.; MARTIN, W. Selective inhibition of basal but not agonist-stimulated activity of nitric oxide in rat aorta by NG-monomethyl-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.*, v. 110, p. 1003-1008, 1993.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v. 288, p. 373-376, 1980.

FYE, W.B. A historical perspective on Atherosclerosis and Coronary Artery Disease. In: Fuster, V.; Ross, R.; Topol, E.J. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 569-584, 1996.

GALLE, J.; BUSSE, R.; BASSENGE, E. Hypercholesterolemia and atherosclerosis change vascular reactivity in rabbits by different mechanisms. *Arterioscler. Thromb.*, v. 11, p. 1712-1718, 1991.

GARTNER, P.R.; FRIDOVICH, I. Superoxide sensitivity of the *E.coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J. Biol. Chem.*, v. 266, p. 1478-1483, 1991.

GEWALTIG, M.T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiov. Res.*, v. 55, p. 250-260, 2002.

GHALAYINI, I.F. Nitric oxide-cyclic GMP pathway with some emphasis on cavernosal contractility. *Int. J. Impot. Res.*, v.16, p. 459-469, 2004.

GLASS, C.K.; WITZTUM, J.L. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell*, v. 16, p. 104-503, 2001.

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

GRYGLEWSKI, R.J.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, v. 320, p. 454-456, 1986.

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

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

GUMBINGER, H.G.; VAHLENSIECK, U.; WINTERHOFF, H. Metabolism of caffeic acid in the isolated perfused rat liver. *Planta Med.*, v. 59, p. 491-493, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radical Biology Medicine*, 2^a ed. NY: Oxford University Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. *FEBS Let.*, v. 182, p. 347-358, 1981.

HAMBRECHT, R.; WOLF, A.; GIELEN, S.; LINKE, A.; HOFER, J.; ERBS, S.; SCHOENE, N.; SCHULER, G. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.*, v. 342, p. 454-460, 2000.

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. *The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents*. Ed. Willians and Wilkins, 4^a. ed, p. 58-64, 1995.

HARRISON, D.G.; ARMSTRONG, M.L.; FREIMAN, P.C.; HEISTAD, D.D. Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. *J. Clin. Invest.*, v. 80, p. 1808-1811, 1987.

HATANO, Y.; MIZUMOTO, K.; YOSHIYAMA, T.; YAMAMOTO, M.; IRANAMI, H. Endothelium-dependent and -independent vasodilation of isolated rat aorta induced by caffeine. *AJP – Heart and Circulat. Physiol.*, v. 269, p. 1679-1684, 1995.

HEIN, T.W.; KUO, L. LDLs impair vasomotor function of the coronary microcirculation: role of superoxide anions. *Circ Res.*, v. 83, p. 404-414, 1998.

HERRMANN, K. Flavonols and flavones in food plants: a review. *J. Food Technol.*, v. 11, p. 433-448, 1976.

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

HERTOG, M.G.L.; FESKENS, E.J.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. 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.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoid of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J. Agric. Food Chem.*, v. 40, p. 2379-2383, 1992.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VAN DE PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.*, v. 41, p. 1242-1246, 1993b.

HUI, D.Y.; BRECHT, W.J.; HALL, E.A.; FRIEDMAN, G.; INNERARITY, T.L.; MAHLEY, R.W. Isolation and characterization of the apolipoprotein E receptor from canine and human liver. *J. Biol. Chem.*, v. 261, p. 4256-4257, 1986.

HUIE, R. E.; PADMAJA, S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.*, v. 18, p. 195-199, 1993.

HUSAIN, S.R.; CILLARD J.; CILLARD P. Hydroxy radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem.*, v. 26, p. 2489-2492, 1987.

IGNARRO, L.J. Haeme-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 67, p. 1-7, 1990.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 84, p. 9265-9269, 1987.

IGNARRO, L.J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 53, p. 503-514, 2002.

IOKU, K.; AOYAMA, Y.; TOKUNO, A.; TERAO, J.; NAKATANI, N.; TAKEI, Y. Various cooking methods and the flavonoid content in onion. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v. 47, p. 78-83, 2001.

ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A. B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett.*, v. 364, p. 279-282, 1995.

ISHIBASHI, S.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L.; GERARD, R.D.; HAMMER, R.E.; HERZ, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.*, v. 5, p. 123-127, 1993.

ISHIBASHI, S.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S.; BURNS, D.K. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J. Clin. Invest.*, v. 93, p. 1885-1893, 1994.

JAYAKODY, R.L.; SENARATNE, M.P.J.; THOMSON, A.B.R.; KAPPAGODA, C.T. Cholesterol feeding impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 63, p. 1206-1209, 1985.

JESSUP, W.; MOHR, D.; GIESEG, S.P.; DEAN, R.T.; STOCKER, R. The participation of nitric oxide in cell free and its restriction of macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1180, p. 73-82, 1992.

JIANG, F.; GIBSON, A.P.; DUSTING, G.J. Endothelial dysfunction induced by oxidized low-density lipoproteins in isolated mouse aorta: a comparison with apolipoprotein-E deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 424, p. 141-149, 2001.

KADÁR, A.; GLASZ, T. Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiov. Surg.*, v. 9, p. 109-121, 2001.

KANNEL, W.B.; CASTELLI, W.P.; GORDON, T.; MCNAMARA, P.M. Serum cholesterol, lipoproteins and the risk of coronary heart disease. *Ann. Intern. Med.*, v. 74, p. 1-22, 1971.

KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 289, p. 130-136, 1991.

KEANEY, J.F. JR; VITA, J.A. Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, v. 38, p. 129-54, 1995.

KIFOR, I.; DZAU, V.J. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ. Res.*, v. 60, p. 422-428, 1987.

KLUG, D.; RABANI, J.; FRIDOVICH, I. A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.*, v. 247, p. 4839-4842, 1972.

KNEKT, P.; JARVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake, coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br. J. Med.*, v. 312, p. 478-481, 1996.

KOJDA, G.; HARRISON, D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiov. Res.*, v. 43, p. 562-571, 1999.

KOWALA, M.C.; RECCE, R.; BEYER, S.; GU, C.; VALENTINE, M. Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE. *Atherosclerosis*, v. 149, p. 323-330, 2000.

KOYAMA, H.; BORNFELDT, K.E.; FUKUMOTO, S. et al. Molecular pathways of cyclic nucleotide-induced inhibition of arterial smooth muscle cell proliferation. *J. Cell Physiol.*, v.186, p. 1-10, 2001.

KÜHNEAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *Wld. Rev. Nutr. Diet*, v. 24, p. 117-191, 1976.

KUROWSKA, E.M.; SPENCE, D.; JORDAN, J.; WETMORE, S.; FREEMAN, D.J.; PICHE, L.A.; SERRATERE, P. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 72, p.1095–1100, 2000.

LAMB, D.J.; WILKINS, G.M.; LEAKE, D.S. The oxidative modification of low density lipoprotein by human lymphocytes. *Atherosclerosis*, v. 92, p. 187-192, 1992.

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

LEAKE, D.S.; RANKIN, S.M. The oxidative modification of low density lipoprotein by macrophages. *Biochim. J.*, v. 270, p. 741-748, 1990.

LEOPOLD, J.A.; LOSCALZO, J. Clinical importance of understanding vascular biology. *Cardiol. Ver.*, v. 8, p. 115-123, 2000.

LI J.; HUANG M.; TEOH H.; MAN R.Y. *Panax quinquefolium* saponins protects low density lipoprotein oxidation. *Life Sci.*, v. 64, p. 53-62, 1999.

LIBBY, P. Aterosclerose: o novo ponto de vista. *Sci. Am. Brasil*, n. 7, p. 25-33, 2004.

LIBBY, P. Changing concepts of atherogenesis. *J. Intern. Med.*, v. 58, p. 247-349, 2000.

LIBBY, P.; GENG, Y.J.; AIKAWA, M.; SCHOENBECK, U.; MACH, F.; CLINTON, S.; SUKHOVA, G.; LEE, R. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 7, p. 330-335, 1996.

LIND, L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v. 169, p. 203-214, 2003.

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

LYONS, D. Impairment and restoration of nitric oxide-dependent vasodilation in cardiovascular disease. *Int. J. Cardiol.*, v. 62, p. 101-109, 1997.

MAAS, J.; RIBEIRO-DO-VALE, R.M.N.; DOMINGOS, I.; NICOLAU, M.; MONTANHA, J.; SCHENKEL, E.P. Efeitos do extrato bruto aquoso (EBA) e da fração purificada de saponinas (FPS) triterpênicas de *Ilex paraguariensis* (erva-mate) sobre o sistema cardiovascular. *Cad. Farm.*, v. 7, p. J38-J40, 1991.

MAKRIDES, S.; RYAN, U. In: LOSCALZO, J., SCHAFFER, A. (Eds.), *Thrombosis and Hemorrhage*. William and Wilkins, Baltimore, p. 295-306, 1998.

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

MARASCHIN, R.P.; IANSSEN, C.; ARSEGO, J.L.; CAPEL, L.S.; CIMADON, A.M.A.; ZANOS, C.; CARO, M.S.B.; MARASCHIN, M. Solid fase extraction and H-MNR analysis of Brazilian Cabernet Sauvignon wine – a chemycal composition correlation study. In: 6th International Proceedings International Conference on Applications of Magnetic Ressonance in Food Science - Cambridge, Royal Society of Chemistry, p. 79, 2002.

MARÍN, J.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, M. A. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J. Auton. Pharmacol.*, v. 15, p. 279-307, 1995.

MEREDITH, I.T.; ANDERSON, T.J.; UEHATA, A.; YEUNG, A.C.; SELWYN, A.P.; GANZ, P. Role of endothelium in ischemic coronary syndromes. *Am. J. Cardiol.*, v. 72, p. 27C-32C, 1993.

MILBOURNE, E.A.; BYGRAVE, F.L. Do nitric oxide and GMPc play a role in calcium cycling? *Cell calcium*, v. 18, p. 207-213, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. Morbidade hospitalar por local de internação e mortalidade geral, <<http://tabnet.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm>>.

MIURA, Y.; CHIBA, T.; TOMITA, I.; KOIZUMI, H.; MIURA, S.; UMEGAKI, K.; HARA, Y.; IKEDA, M.; TOMITA, T. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Nutr.*, v. 131, p. 27-32, 2001.

MONCADA, S.; HIGGS, A. Mechanisms of disease: the L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, v. 329, p. 2002-2012, 1993.

MOON, J.-H.; NAKATA, R.; OSHIMA, S.; INAKUMA, T.; TERAO, J. Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after short-term ingestion of onion by women. *Am. J. Physiol.*, v. 279, p. R461-R467, 2000.

MOON, J.-K.; TSUSHIDA, T.; NAKAHARA, K.; TERAO, J. Identification of quercetin 3-O- β -D-glucuronide as an antioxidative metabolites in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 30, p. 1274-1285, 2001.

MOORE, P.K.; al-SWAYEH, O.A.; CHONG, N.W.; EVANS, A.; GIBSON, A. L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, v. 99, p. 408-412, 1990.

MOSIMANN, A.L.P.; MANTOVANI, C.L.; BORDIGNON, J.C.; SILVA, E.L. Reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by *Ilex paraguariensis* extract (mate). *Free Radic. Biol. Med.*, v. 33, p. S244, 2002.

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

MULLEN, W.; MCGINN, J.; LEAN, M.E.J.; MACLEAN, M.R.; GARDNER, P.; DUTHIE, G.G.; YOKOTA, T.; CROZIER, A. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 5191-5196, 2002.

MÜLLER, K.; ZIEREIS, K.; PAPER, D.H. *Ilex aquifolium*: Protection against enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. *Planta Medica*, v. 64, p. 536-540, 1998.

MURASE, T.; KUME, N.; HASE, T.; SHIBUYA, Y.; NISHIZAWA, Y.; TOKIMITSU, I.; KITA, T. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 19, p. 1412-1420, 1999.

NADERALI, E.; WILLIAMS, G. Prolonged endothelial-dependent and independent arterial dysfunction induced in the rat by short-term feeding with a high-fat, high sucrose diet. *Atherosclerosis*, v. 166, p. 253-259, 2003.

NAPOLI, C.; ACKAH, E.; DE NIGRIS, F.; DEL SOLDATO, P.; DÁRMIENTO, F.P.; CRIMI, E.; CONDORELLI, M.; SESSA, W.C. Chronic treatment with nitric oxide-releasing aspirin reduces plasma low-density lipoprotein oxidation and oxidative stress, arterial oxidation-specific epitopes, and atherogenesis in hypercholesterolemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, p. 12467-12470, 2002.

NARDINI, M.; CIRILO, E.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 5735-5741, 2002.

NARDINI, M.; DÁQUINO, M.; TOMASSI, G.; GENTILI, V.; DI-FELICE, M.; SCACCINI, C. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 19, p. 541-552, 1995.

NEGRE-SALVAGYRE, A.; SALVAGYRE, R. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized low-density lipoproteins by macrophages. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 12, p. 101-106, 1992.

NEIVA, T.J.C.; MORAIS, L.; POLACK, M.; SIMÕES, C.M.O.; D'AMICO, E.A. Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation. *Phytother. Res.*, v. 13, p. 597-600, 1999.

NISHIDA, Y.; YOSHIZAWA, K.; AKAMATSU, T. Preparation of iron (III) complex with nitrilotricacetic acid and origin of its unique reactivity. *Chem. Let.*, p. 1521-1524, 1991.

ODIGIE, I.P.; ETTARTH, R.R.; ADIGUM, S.A. Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.*, v. 86, p. 181-185, 2003.

OHARA, Y.; PETERSON, T.E.; HARRISON, D.G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.*, v. 91, p. 2546-2551, 1993.

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

PADMAJA, S.; HUIE, R.E. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 195, p. 539-544, 1993.

PAIGEN, B.; ISHIDA, B.Y.; VERSTUYFT, J.; WINTERS, R.B.; ALBEE, D. Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Artherosclerosis*, v. 10, p. 316-323, 1990.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v. 327, p. 524-526, 1987.

PARTHASARATHY, S. Modified Lipoprotein in the Pathogenesis of Atherosclerosis. RG Landes Co, Austin. 1994.

PERSINGER, R.L.; POYNTER, M.E.; CKLESS, K.; JANSSEN-HEININGER, Y.M.W. Molecular mechanisms of nitrogen dioxide induced epithelial injury in the lung. *Mol. Cell Biochem.*, v. 234/235, p. 71-80, 2002.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro, p. 138-143, 1984.

PISKULA, M.K.; TERAQ, J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.*, v. 128, p. 1172-1178, 1998.

PLANE, F.; JACOBS, M.; MCMANUS, D.; BRUCKDORFER, K.R. Probucol and other antioxidants prevent the inhibition of endothelium-dependent relaxation by low density lipoproteins. *Atherosclerosis*, v. 103, p. 73-79, 1993.

PORTO, C.C. Doenças do Coração: prevenção e tratamento. Guanabara Koogan-Rio de Janeiro, 9 ed., cap. 113, p. 568, 1998.

PRICE, K.R.; BACON, J.R.; RHODES, M.J.C. Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*). *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, p. 938-942, 1997.

PROUDFOOT, J.M.; CROFT, K.D.; PUDDEY, I.B., BEILIN, L.J. The role of copper reduction by α -tocopherol in low-density lipoprotein oxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 23, p. 720-728, 1997.

RABELO, L.A.; CORTES, S.F.; ALVAREZ-LEITA, J.I.; LEMOS, V.S. Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H₂O₂. *Br. J. Pharmacol.*, v. 138, p. 1215-1220, 2003.

RADI, R.; BECKMAN, J.S.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulphhydryls. *J. Biol. Chem.*, v. 266, p. 4244-4250, 1991b.

RADI, R.; BECKMAN, J.S.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 288, p. 481-487, 1991a.

RALL, T.W. Drogas usadas no tratamento da asma – As metilxantinas, cromolin sódico e outros agentes. In: Goodman & Gilman, Ed. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 8^a. Edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, p. 408-420, 1991.

RAY, P.S.; MAULIK, G.; CORDIS, G.A.; BERTELLI, A.A.; BERTELLI, A.; DAS, D.K. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 27, p. 160-169, 1999.

RECHNER, A.R.; PANNALA, A.S.; RICE-EVANS, C.A. Caffeic acid derivatives in artichoke extract are metabolized to phenolic acids in vivo. *Free Radic. Res.*, v. 35, p. 195-202, 2001.

RESHEF, G.; GESTETNER, B.; BIRK, Y.; BONDI, A. Effect of alfafa saponins on the growth and some aspects of lipid metabolism of mice and quails. *J. Sci. Food Agric.*, v. 27, p. 63-72, 1976.

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

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Elsev. Sci.*, v. 20, p. 933-956, 1997.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROBAK, J.; GRIGLEWISKI, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, v. 37, p. 837-841, 1988.

ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N. Eng. J. Med.*, v. 340, p. 115-126, 1999.

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

RUBANYI, G.M.; VANHOUTE, P.M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v. 320, p. 454-456, 1986.

RUSSE, R.; FLEMING, I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J. Vasc. Res.*, v. 33, p. 181-194, 1996.

RUSSO, G.; LEOPOLD, J.A.; LOSCALZO, J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vasc. Pharmacol.*, v. 38, p. 259-269, 2002.

SANAE, F.; MIYAICHI, Y.; HAYASHI, H. Potentiation of vasoconstrictor response and inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by gallic acid in rat aorta. *Planta Med.*, v. 68, p. 690-693, 2002.

SAWYNOK, J.; Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine. *Drugs*, v. 49, p. 37-50, 1995.

SCHACHINGER, V.; BRITTEN, M. B.; ZEIHNER, A. M. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*, v. 101, p. 1899-1906, 2000.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas in: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*, Ed. UFSC, p. 597-622, 1999.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MONTANHA, J.A.; HEIZMANN, B.M.; ATHAYDE, M.L.; TAKETA, A.T.C.; PIRES, V.S.; GUILLAUME, D. Saponins from maté (*Ilex paraguariensis*) and other South American *Ilex* species: ten years research on *Ilex* saponins. *J. Braz. Ass. Advanc. Sci.*, v. 49, p. 359-363, 1997.

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P.M. de; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex Paraguariensis*. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, v. 269, p. 357-360, 2000.

SCHNEIDER, H.; SIMMERING, R.; HARTMANN, L.; PFORTE, H.; BLAUT, M. Degradation of quercetin-3-glucoside in gnotobiotic rats associated with human intestinal bacteria. *J. Applied Microbiol.*, v. 89, p. 1027-1037, 2000.

SCHULDT, E.Z.; CKLESS, K.; SIMAS, M.E.; FARIAS, M.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Butanolic fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq McBride relaxes rat thoracic aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent mechanisms. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 35, p. 234-239, 2000.

SCHULZ, R.; TRIGGLE, C.R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 15, p. 255-259, 1994.

SERAFINI, M.; GHISELLI, A.; FERRO-LUZZI, A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v. 50, p. 28-32, 1996.

SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M.; AMES, B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 91, p. 10771-10778, 1994.

SILVA, E.L.; NEIVA, T.J.C.; ABDALLA, D.S.P. Avaliação da inibição da lipoperoxidação plasmática e da agregação plaquetária em seres humanos após ingestão de extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) In. 38º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, Florianópolis, SC, CD Room, v. 38, 2004.

SILVA, E.L.; PISKULA, M.; TERAQ, J. Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 24, p. 1209-1216, 1998a.

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

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. Ed. UFSC, cap. 27, p. 597-622, 1999.

SIMON, B.C.; CUNNINGHAM, LD.; COHEN, R.A. Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery. *J. Clin. Invest.*, v. 86, p. 75-79, 1990.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. *Statistical Methods*, Ames, Iowa State University Press, 1967.

SOBEY, C.G.; DUSTING, G.J.; WOODMAN, O.L. Enhanced vasoconstriction by serotonin in rabbit carotid arteries with atheroma-like lesions in vivo. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v. 18, p. 367-370, 1991.

SOLEAS, G.J.; DIAMANDIS, E.P.; GOLDBERG, D.M. Wine as biological fluid: history, production and role in disease prevention. *J. Clin. Lab. Anal.*, v. 11, p. 287-313, 1997.

STARY, H.C. Changes in the cells of atherosclerotic lesions as advanced lesions evolve in coronary arteries of children and young adults, in: S. GLAGOV, S.; NEWMAN, W.P. SCAFFER, S.A. (Eds.), *Pathobiol. Human Atheroscl. Plaque*, Springer, New York, p. 93-106, 1990.

STEFANOVICH, V. The xanthines. *Drug News Perspec.*, v. 2, p. 82-88, 1989.

STEIN, J.H.; KEEVIL, J.G.; WIEBE, D.A.; AESCHLIMANN, S.; FOLTS, J.D. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation*, v. 100, p. 1050-1055, 1999.

STEINBERG, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 20963-20966, 1997.

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

STEINBRECHER, U.P.; PARTHASARATHY, S.; LEAKE, D.S.; WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of LDL phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 81, p. 3883-3887, 1984.

STOCLET, J.C.; MULLER, B.; GYÖRGY, K.; ANDRIANTSIOTHAINA, R.; KLESCHYOV, A.L. The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 30, p. 139-155, 1999.

TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SUDANO, I.; SALVETTI, A. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. *Drugs*, v. 62, p. 265-284, 2002.

TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SALVETTI, A. Endothelial dysfunction in hypertension: fact or fancy? *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 32, p. S41-S47, 1998.

TAKAHAMA, U. Hydrogen peroxide-dependent generation of singlet molecular oxygen by human saliva: its detection by chemiluminescence from a Cypridina luciferin analog. *Photochem. Photobiol.*, v. 57, p. 376-379, 1993.

TAUBERT, D.; BERKELS, R.; KLAUS, W.; ROESEN, R. Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols: essential structural features. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 40, p. 701-713, 2002.

TERAO, J.; PISKULA, M.; YAO, Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 308, p. 278-284, 1994.

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

TREASURE, C. B.; KLEIN, J. L.; WEINTRAUB, W. S.; TALLEY, J. D.; STILLABOWER, M. E.; KOSINSKI, A. S.; ZHANG, J.; BOCCUZZI, S.J.;

CEDARHOLM, J. C.; ALEXANDER, R. W. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.*, v. 332, p. 481-487, 1995.

TZENG, S.H.; KO, F.-N.; TENG, C.-M. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb. Res.*, v. 64, p. 91-100, 1991.

VERBEUREN, T.J.; JORDAENS, F.H.; ZONNEKEYN, L.L.; VAN HOVE, C.E.; COENE, M.C.; HERMAN, A.G. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circ. Res.*, v. 58, p. 552-564, 1986.

VESSELINOVITCH, D. Animal models and the study of atherosclerosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 112, p. 1011-1017, 1998.

VITA, J.A.; KEANEY, J.F. Hormone replacement therapy and endothelial function: the exception that proves the rule? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 21, p. 1867-1869, 2001.

VOGEL, R.A. Cholesterol lowering and endothelial function. *Am. J. Med.*, v. 107, p. 479-487, 1999.

WAZLAWIK, E.; SILVA, M. A.; PETERS, R. R.; CORREIA, J.F.G.; FARIAS, M.R.; CALIXTO, J.B.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 49, p. 433-437, 1997.

WELCH, G.; LOSCALZO, J. Nitric oxide and the cardiovascular system. *J. Card. Surg.*, v. 9, p. 361-367, 1994.

WHITEHEAD, T.P.; ROBINSON, D.; ALLAWAY, S.; SYMS, J.; HALE, A. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin. Chem.*, v. 41, p. 32-35, 1995.

WITTIG, J.; HERDERICH, M.; GRAEFE, E.U.; VEIT, M. Identification of quercetin glucuronides in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, v. 753, p. 237-243, 2001.

WITTING, P.K.; MOHR, D.; STOCKER, R. Assessment of prooxidant activity of vitamin E in human low-density lipoprotein and plasma. *Method. Enzymol.*, v. 299, p. 362-375, 1999.

WOODRUM, D.A.; BROPHY, C.M. The paradox of smooth muscle physiology. *Moll. Cell. Endocrinol.*, v. 177, p. 135-143, 2001.

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

YATES, M. T.; LAMBERT, L.E.; WHITTEN, J.P.; McDONALD, I.; MANO, M.; KU, G.; MAO, S.J.T. A protective role for nitric oxide in the oxidative modification of low density lipoproteins by mouse macrophages. *FEBS Let.*, v. 309, p. 135-138, 1992.

YOSHIKOSHI, M.; YOSHIKI, Y.; OKUBO, K.; SETO, J.; SASAKI, Y. Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins fibroblasts. *Planta Med.*, v. 62, p. 252-255, 1996.

YUKAWA, G.S.; MUNE, M.; OTANI, H.; TONE, Y.; LINAG, X.M.; IWAHASHI, H.; SAKAMOTO, W. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. *Biochemistry*, v. 69, p. 70-74, 2004.

ZHU, L.; GUNN, C.; BECKMAN, J.S. Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* v.298, p.452-457, 1992.