



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

ALINE MINUZZI BECKER

**ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) EM CÁPSULAS:
ESTUDOS DE TOXICIDADE CLÍNICA E EFEITOS
HIPOCOLESTEROLÊMICO E ANTIOXIDANTE EM
INDIVÍDUOS COM DISLIPIDEMIAS**

Florianópolis

2013

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

Becker, Aline Minuzzi
Erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) em cápsulas :
Estudos de toxicidade clínica e efeitos hipocolesterolêmico
e antioxidante em indivíduos com dislipidemias / Aline
Minuzzi Becker ; orientador, Edson Luiz da Silva -
Florianópolis, SC, 2013.
222 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Ilex paraguariensis*. 3. Cápsulas. 4.
Toxicidade Clínica. 5. Dislipidemias. I. Silva, Edson Luiz
da. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Aline Minuzzi Becker

**ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) EM CÁPSULAS:
ESTUDOS DE TOXICIDADE CLÍNICA E EFEITOS
HIPOCOLESTEROLÊMICO E ANTIOXIDANTE EM
INDIVÍDUOS COM DISLIPIDEMIAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmácia na Área de concentração Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz da Silva

Florianópolis

2013

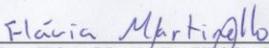
“Erva-matte (ilex paraguariensis) em cápsulas: de toxicidade clínica e efeito hipocolesterolêmico e antioxidante em indivíduos com dislipidemias”

POR

Aline Minuzzi Becker

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

Banca Examinadora:

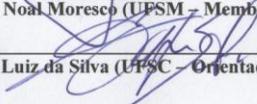


Prof. Dr. Flávia Martinello (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho (UFSC – Membro Titular)



Prof. Dr. Rafael Noal Moresco (UFSC – Membro Titular)



Prof. Dr. Edson Luiz da Silva (UFSC – Orientador)

Prof. Dr. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 11 de março de 2013.

Dedico este trabalho aos meus pais, que com o suor do trabalho, dedicação e amor pela família me proporcionaram e ensinaram condições de alcançar mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A *Deus* e *Nossa Senhora Medianeira*, pela proteção nesta caminhada, sempre guiando meus passos.

Aos meus pais *Nidolff* e *Nadir*, pela confiança, força e amor incondicional. Em vocês tive apoio emocional e financeiro, dando-me coragem para prosseguir, não medindo esforços e compreendendo minha ausência, pela distância. Meu **MUITO OBRIGADA!**

Ao meu irmão, *Cleiton* e, à minha cunhada, *Sônia*, pelo incentivo, abrigo, otimismo, expressões de carinho e coragem a todo instante. Sou *Muito Grata* a vocês!

Ao meu namorado *Álvaro*, pelas palavras de carinho e por entender que a distância era necessária. Pela tranquilidade, momentos de alegria que me proporcionou e horas intermináveis em que me acalmou. *Muito Obrigada meu amor!*

Aos meus familiares que me apoiaram, torceram e se preocuparam comigo, em especial às minhas avós *Neli* e *Natalina*, que sempre me incluíram em suas orações e bênçãos, como forma de proteção e carinho.

Ao meu orientador *Edson Luiz da Silva*, pela paciência, dedicação, confiança e ensinamentos. *Obrigada* pela oportunidade, projeto concedido e empenho ímpar na obtenção de recursos necessários para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Lipídeos, Antioxidantes Naturais e Aterosclerose, entre eles às mestrandas *Fernanda Casagrande* e *Heloísa* e aos colegas *Antônio*, *Gabriela*, *Fernanda Alves* e *Ivana* pela colaboração, amizade e por terem cooperado com um ambiente de trabalho propício para a elaboração deste trabalho.

Aos *voluntários* deste estudo que, com tamanho empenho, disponibilidade, carinho e discernimento colaboraram na realização desta obra.

À empresa Leão Júnior S.A., pelo fornecimento dos extratos secos de erva-mate.

À empresa Phytomare, pela confecção das cápsulas com extratos secos de erva-mate fornecidos aos voluntários.

Ao professor e cardiologista *Tales de Carvalho* e ao aluno de doutorado *Anderson Ulbrich*, do Centro de Ciências da Saúde e do Esporte, da Universidade do Estado de Santa Catarina, por terem cedido generosamente o aparelho de Eletrocardiograma e treinamento, respectivamente, para avaliação nos voluntários do estudo toxicológico.

Ao Químico *Paulo Leal* e ao professor *Hernán Terenzi*, pela disponibilidade de uso do Laboratório do Centro de Biologia Molecular Estrutural, da UFSC, para a realização de análises dos extratos secos de erva-mate em espectrometria de massas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, por ter me aceito no programa de mestrado, seus professores, pelos mais diversos ensinamentos e, aos funcionários, que com paciência e dedicação prestaram suas contribuições.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora *Maria Luiza Bazzo*, pela compreensão e parceria na concretização deste trabalho. Grata pelo espaço cedido no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFSC e aos técnicos de laboratório, que de forma espontânea e primorosa, auxiliaram nas coletas de sangue dos participantes, assim como as análises de eletrólitos, hemograma e urina.

Aos professores doutores *Rafael Noal Moresco*, *Flávia Martinello* e *Danilo Wilhelm Filho*, pela prontidão em aceitar o convite de constituição de banca avaliadora desta dissertação de mestrado.

A todos que, de uma maneira ou outra, auxiliaram no desenvolvimento e concretização deste trabalho, para sempre, meus sinceros agradecimentos!

Aline Minuzzi Becker

♪ *Assim meu sonho vai seguindo lentamente*
Buscando auroras onde possa amanhecer
E uma esperança me conduz sempre adiante
Pois sei que há ainda muita estrada a conhecer. ♪

(Na Estrada do Sul, Wison Paim)

RESUMO

Infusões de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil., Aquifoleacea) possuem propriedades hipocolesterolêmica e antioxidante, dentre outras. No entanto, muitas pessoas não mantêm o hábito de ingerir chás, particularmente aqueles de sabor amargo como a erva-mate, e deixam de se beneficiar dessas propriedades. Assim, idealizamos a produção de cápsulas de erva-mate e o objetivo deste estudo foi verificar a eventual toxicidade clínica da ingestão de cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde por indivíduos saudáveis, e avaliar o potencial hipocolesterolêmico e antioxidante das cápsulas de erva-mate verde (EMV) e tostada (EMT), em indivíduos dislipidêmicos (DLP), e em indivíduos com hipercolesterolemia sob tratamento com estatinas (HCE). Participaram deste estudo 77 indivíduos (n = 48/29, m/h), com idade média de 45,2 ± 1,4 anos. Inicialmente, foi realizado o estudo toxicológico agudo (sete dias) e crônico (60 dias) com indivíduos normolipidêmicos (NLP; n = 14) que ingeriram EMV. No estudo hipocolesterolêmico e antioxidante, os indivíduos DLP foram distribuídos em três grupos: i) DLP-EMV, n = 16; ii) DLP-EMT, n = 16 e; iii) placebo (DLP-PL), n = 16. Os indivíduos HCE foram distribuídos em dois grupos: i) HCE-EMV, n = 8; e ii) HCE-PL, n = 7. Todos os indivíduos ingeriram três cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, tostada ou placebo, 3 vezes/dia, durante 60 dias. Amostras de sangue foram coletadas, após jejum de 12-14 h antes e após 7, 30 e 60 dias da ingestão das cápsulas, para as avaliações toxicológicas e determinações do perfil lipídico e marcadores do estresse oxidativo. As diferenças foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, teste *t* pareado de Student, ANOVA para medidas repetidas e teste complementar de Tukey ou teste de Friedman, considerando $P < 0,05$ como significativo. Com base nos resultados das análises bioquímicas, hematológicas e do eletrocardiograma, não houve alterações toxicológicas agudas ou crônicas referentes à ingestão das cápsulas de EMV por indivíduos saudáveis. Nos indivíduos NLP, houve aumento médio de 10,4 mg/dL (20,5%) no HDL-C e diminuição de 13,5 e 17,5% nas relações CT/HDL-C e LDL-C/HDL-C, respectivamente, após 60 dias ($P < 0,05$). Nos indivíduos do grupo DLP, a ingestão de cápsulas de EMV durante 60 dias provocou aumento no HDL-C de 5,6 mg/dL (10,7%; $P < 0,001$) após 60 dias e o consumo de cápsulas de EMT provocou diminuição de TG de 30,1 e 45,7 mg/dL (-13,6 e -20,7%, respectivamente; $P < 0,05$), após 30 e 60 dias, respectivamente. Não houve variação expressiva no grupo PL. O consumo de cápsulas de

EMV pelos indivíduos HCE promoveu diminuição média de 18,8 mg/dL de LDL-C (-12,7%) após 60 dias, porém sem diferença estatística. Após 30 e 60 dias, houve redução não significativa de TG de 42,2 mg/dL (-12,0%) e 20,2 mg/dL (-7,3%), respectivamente, e sd-LDL-C de 10,0 e 9,9 mg/dL respectivamente, enquanto que as variações no grupo PL foram inexpressivas. Também houve melhora nos marcadores do estresse oxidativo, especialmente nos indivíduos que consumiram as cápsulas de EMV. Nos indivíduos NLP e DLP, foi observado aumento significativo na capacidade antioxidante sérica de 16 e 17,5%, em média, respectivamente ($P < 0,001$); diminuição na concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de 42 e 52%, respectivamente ($P < 0,001$); diminuição na concentração de hidroperóxidos lipídios (LOOH) de 35 e 47,5%, respectivamente ($P < 0,05$). Os indivíduos NLP apresentaram elevação de glutathione reduzida após 7 e 60 dias, respectivamente, do consumo de cápsulas de EMV. Houve aumento de 50%, em média, na atividade da superóxido dismutase (SOD) nos indivíduos NLP e de 42% nos indivíduos DLP após 60 dias ($P < 0,05$). A atividade da catalase aumentou 82 e 27,5%, após sete e 30 dias, respectivamente, nos indivíduos NLP e 14,7% nos indivíduos DLP após 30 dias de consumo de EMV. No entanto, não houve alteração significativa na atividade da glutathione peroxidase (GPx). A atividade da enzima paroxonase aumentou 28,7 e 17,4% nos indivíduos NLP e DLP, respectivamente, após sete dias de consumo de EMV. Nos indivíduos do grupo HCE-EMV, houve aumento de 18%, em média, na capacidade antioxidante e diminuição de 43%, em média, na concentração de LOOH e de 60% de TBARS após sete dias ($P < 0,05$). Após 30 dias, houve aumento de 26% na atividade da SOD ($P < 0,05$). Porém, não houve variação significativa para GSH, GPx e catalase. Com base nestes resultados, evidencia-se que as cápsulas de erva-mate não apresentaram toxicidade clínica e podem ser uma alternativa para o consumo de infusões. Além disso, o consumo das cápsulas de erva-mate auxiliou na melhora do perfil lipídico e antioxidante, que pode contribuir para a diminuição do risco de doença arterial coronariana.

Palavras chave: *Ilex paraguariensis*, Erva-mate, Cápsulas, Toxicidade Clínica, Dislipidemias, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Infusions of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoleacea) have hypocholesterolemic and antioxidant properties, among others. However, many people do not have the habit of drinking tea, particularly the bitter taste ones as yerba mate, and fail to take advantage of these properties. Thus, we designed the production of yerba mate capsules and the aim of this study was to investigate the possible clinical toxicity after intake of capsules containing green yerba mate dried extract by healthy subjects, and to evaluate the hypocholesterolemic and antioxidant potential of the green yerba mate (GYM) and roasted yerba mate (RYM) capsules in dyslipidemic individuals (DLP) and in hypercholesterolemic patients treated with statins (HCS). Seventy seven individuals were included in the study (n = 48/29 f/m), with an average age of 45.2 ± 1.4 years. Initially, an acute (7 days) and chronic (60 days) toxicological study was performed with normolipidemic individuals (NLP) that ingested GYM (n = 14). The hypocholesterolemic and antioxidant studies were performed in DLP patients, which were divided into three groups: i) DLP-GYM, n = 16; ii) DLP-RYM, n = 16 and iii) DLP-PL, n = 16. Hypercholesterolemic patients treated with statins were divided into two groups: i) HCS-GYM, n = 8; ii) HCS-PL, n = 7. All subjects ingested three capsules of green or roasted dried extract of yerba mate or placebo, 3 times/day for 60 days. Blood samples were collected after overnight fasting (12-14 h) at baseline and after 7, 30 and 60 days of yerba mate capsules or placebo intake, in order to perform toxicological evaluations, determine the lipid profile and oxidative stress markers. Differences were assessed by Student's paired *t*-test, ANOVA and Tukey's post-hoc test and repeated measures ANOVA or Friedman test, considering $P < 0.05$ as significant. The biochemical, hematological and electrocardiogram analyzes revealed no toxicological changes regarding the use of GYM capsules by healthy subjects. In NLP individuals, there was an average increase of 10.4 mg/dL (20.5%) in HDL-C and decrease of 13.5 and 17.5% in TC/HDL-C and LDL-C/HDL-C ratios, respectively, after 60 days ($P < 0.05$). In the DLP group, the ingestion of GYM capsules resulted in an increase of 5.6 mg/dL (10.7%, $P < 0.001$) in HDL-C after 60 days and the ingestion of RYM capsules caused a decrease of 30.1 and 45.7 mg/dL (-13.6 and -20.7%, respectively, $P < 0.05$) in TG after 30 and 60 days, respectively. There was no significant variation in the PL group. The consumption of GYM capsules by HCS patients promoted an average decrease of 18.8 mg/dL (-12.7%) in LDL-C after

60 days, however it was not significant. After 30 and 60 days, there was also a non significant reduction of TG 42.2 mg/dL (-12.0%) and 20.2 mg/dL (-7.3%), respectively, and sd-LDL-C 10.0 and 9.9 mg/dL, respectively, while the changes in the PL group were negligible. There was also improvement in oxidative stress markers, especially in individuals who consumed GYM capsules. In the NLP and DLP groups was observed a significant increase in serum antioxidant capacity of 16 and 17.5% on average, respectively ($P < 0.001$); a decrease in the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) of 42 and 52%, respectively ($P < 0.001$); and decrease in the concentration of lipid hydroperoxides (LOOH) by 35 and 47.5%, respectively ($P < 0.05$). The NLP subjects had increased reduced glutathione (GSH) after 7 and 60 days of GYM capsules intake, respectively. There was a 50% average increase in the activity of superoxide dismutase (SOD) in NLP individuals and 42% in DLP subjects after 60 days ($P < 0.05$). Catalase activity increased 82 and 27.5% after 7 and 30 days, respectively in NLP individuals and 14.7% in DLP patients after 30 days of GYM capsules intake. However, no significant changes in the activity of glutathione peroxidase (GPx) were observed. The activity of the enzyme paraoxonase increased 28.7 and 17.4% in NLP individuals and DLP patients, respectively, after 7 days of GYM capsules intake. In HCS-GYM patients, after 7 days, an average increase of 18% in the antioxidant capacity, decrease of 43% and 60%, on average, in the concentration of LOOH and TBARS respectively ($P < 0.05$). After 30 days, a 26% increase in SOD activity ($P < 0.05$) was observed. However, no significant changes in GSH, catalase and GPx were observed. Based on these results, it is clear that the yerba mate capsules intake is safe, since no clinical toxicity was shown, and may constitute an alternative to the use of infusions. Furthermore, the intake of yerba mate capsules helped to improve the lipid and antioxidant profile, which can contribute to decrease the risk of coronary artery disease.

Keywords: *Ilex paraguariensis*, Yerba Mate, Capsules, Clinical Toxicity, Dyslipidemia, Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Processo de formação do trombo plaquetário na lesão aterosclerótica. Adaptado de Lusic (2000).....	40
Figura 2.	Folhas de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>).....	48
Figura 3.	Estrutura química dos principais compostos fenólicos (modificado de HECK; de MEJIA, 2007).....	50
Figura 4.	Estrutura química das metilxantinas: 1 – Cafeína; 2 – Teobromina; 3 - Teofilina (adaptado de GNOATTO et al., 2007).....	51
Figura 5.	Estrutura química básica de saponinas isoladas de <i>Ilex paraguariensis</i> derivadas do ácido ursólico (modificado de TAKETA; BREITMAIER; SCHENKEL, 2004).....	51
Figura 6.	Cromatogramas representativos do perfil de ácidos fenólicos dos extratos secos de erva-mate verde (A) e tostada (B) em 280 nm obtidos em CLAE. Pico (1) ácido gálico.....	88
Figura 7.	Cromatogramas representativos do perfil de ácidos fenólicos dos extratos secos de erva-mate verde (A) e tostada (B) em 325 nm obtidos em CLAE. Picos: (2) ácido clorogênico; (3) ácido caféico; (4) ácido 4,5-dicafeoilquínico.....	89
Figura 8.	Cromatogramas representativos do perfil de catequinas dos extratos secos de erva-mate verde (A) e tostada (B) em 280 nm obtidos em CLAE. Picos: (5) catequina; (6) epigalocatequina; (7) epigalocatequina galato.....	91
Figura 9.	Cromatograma representativo de metilxantinas nos extratos secos de erva-mate verde (A) e tostada (B) em 280 nm, obtidos em CLAE. Picos: (8) teobromina; (9) cafeína.....	92
Figura 10.	(A) Cromatograma UV-Visível + EM de padrões de catequinas. (B-G) Íons filtrados para cada catequina: a presença de dois ou mais picos revelam a presença de isômeros.....	94
Figura 11.	(A) Cromatograma UV-Visível + EM do extrato seco de erva-mate verde. (B-F) Íons filtrados para cada catequina: a presença de dois ou mais picos revelam a presença de isômeros.....	95

Figura 12.	(A) Cromatograma UV-Visível + EM do extrato seco de erva-mate tostada. (B-F) Íons filtrados para cada catequina: a presença de dois ou mais picos revelam a presença de isômeros.....	96
Figura 13.	Perfil eletrocardiográfico representativo de um participante referente ao período basal, sem consumo de cápsulas com extrato seco de erva-mate verde.....	101
Figura 14.	Perfil eletrocardiográfico representativo de um participante após 3 dias de consumo das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde.....	101
Figura 15.	Perfil eletrocardiográfico representativo de um participante após sete dias de consumo das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde.....	102
Figura 16.	Perfil eletrocardiográfico representativo de um participante referente ao período basal, sem consumo de cápsulas com extrato seco de erva-mate verde.....	107
Figura 17.	Perfil eletrocardiográfico representativo de um participante após 30 dias de consumo das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde.....	108
Figura 18.	Perfil eletrocardiográfico representativo de um participante após 60 dias de consumo das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde.....	108
Figura 19.	Variação percentual média dos valores de parâmetros lipídicos dos indivíduos normolipidêmicos após o consumo das cápsulas com EMV por 30 e 60 dias, em relação aos respectivos valores basais.....	117
Figura 20.	Concentração de parâmetros lipídicos de indivíduos com hipercolesterolemia, sob tratamento com estatinas, que ingeriram cápsulas com EMV (n = 8) e amido (PL) (n = 7) nos parâmetros LDL-C (A), Não-HDL-C (B), sd-LDL-C (C) e Triglicerídeos (D). Os resultados estão expressos como média. LDL-C = LDL-colesterol; Não-HDL-C = Não-HDL-colesterol; sd-LDL = Fração LDL pequena e densa.....	128
Figura 21.	Variação percentual da capacidade antioxidante do soro em indivíduos dislipidêmicos após 7, 30 e 60 dias de ingestão de cápsulas de erva-mate verde (EMV) tostada (EMT) e placebo (PL) em relação aos valores basais.....	138
Figura 22.	Variação percentual dos hidroperóxidos lipídicos em indivíduos dislipidêmicos após 7, 30 e 60 dias de	

	ingestão de cápsulas de erva-mate verde (EMV) tostada (EMT) e placebo (PL) em relação aos valores basais.....	142
Figura 23.	Varição percentual das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em indivíduos dislipidêmicos após 7, 30 e 60 dias da ingestão de cápsulas de erva-mate verde (EMV), tostada (EMT) e placebo (PL) em relação aos valores basais.....	145
Figura 24.	Varição percentual na atividade da superóxido dismutase em indivíduos dislipidêmicos após 7, 30 e 60 dias da ingestão de cápsulas de erva-mate verde (EMV), tostada (EMT) e placebo (PL) em relação aos valores basais.....	152
Figura 25.	Efeito da ingestão de cápsulas com EMV ou amido (placebo) em indivíduos hipercolesterolêmicos, usuários de estatina na capacidade antioxidante do soro.....	158
Figura 26.	Efeito da ingestão de cápsulas com EMV ou amido (placebo) nos parâmetros do estresse oxidativo de indivíduos hipercolesterolêmicos usuários de estatina (HCE): (A) Hidroperóxidos Lipídicos; (B) Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.....	159
Figura 27.	Efeito da ingestão de cápsulas com EMV ou amido (placebo) em indivíduos hipercolesterolêmicos, usuários de estatina na atividade enzimática da superóxido dismutase.....	161
Figura 28.	Efeito da ingestão de cápsulas com EMV ou amido (PL, placebo) nos parâmetros do estresse oxidativo de indivíduos hipercolesterolêmicos usuários de estatina (HCE): (A) Atividade Sérica Lactonase da PON1; (B) Atividade Sérica Arilesterase da PON1; (C) Atividade Sérica Paroxonase da PON1.....	164

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Teor de saponinas, fenóis totais e medidas da capacidade antioxidante total (FRAP e TEAC) nos extratos secos de erva-mate verde e tostada em cápsulas.....	86
Tabela 2.	Concentração de compostos fenólicos nos extratos secos de erva-mate verde e tostada em cápsulas.....	87
Tabela 3.	Concentração de metilxantinas nos extratos secos de erva-mate verde e tostada em cápsulas.....	92
Tabela 4.	Características biodemográficas dos participantes no início do estudo.....	98
Tabela 5.	Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, durante três e sete dias, no peso corporal, circunferência da cintura e pressão arterial dos participantes.....	102
Tabela 6.	Parâmetros hematológicos antes e após a ingestão de cápsulas contendo EMV, durante 7 dias.....	104
Tabela 7.	Parâmetros bioquímicos antes e após a ingestão de cápsulas contendo EMV, durante 7 dias por indivíduos saudáveis.....	106
Tabela 8.	Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde no peso corporal, circunferência da cintura e pressão arterial dos participantes após 30 e 60 dias.....	109
Tabela 9.	Parâmetros hematológicos antes e após a ingestão de cápsulas contendo EMV, durante 60 dias.....	111
Tabela 10.	Parâmetros bioquímicos antes e após a ingestão de cápsulas contendo EMV, durante 60 dias.....	114
Tabela 11.	Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, por 30 e 60 dias, no perfil lipídico sérico de indivíduos normolipidêmicos.....	116
Tabela 12.	Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, por 30 e 60 dias, no perfil lipídico sérico de indivíduos normolipidêmicos.....	116
Tabela 13.	Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, tostada ou amido, no perfil lipídico sérico dos indivíduos dislipidêmicos sem uso de hipolipemiantes.....	120

Tabela 14. Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, tostada ou amido, no perfil lipídico sérico dos indivíduos dislipidêmicos sem uso de hipolipemiantes.....	121
Tabela 15. Efeito da ingestão das cápsulas com EMV nas concentrações de LDL-C, HDL-C, Não-HDL-C e nas relações CT/HDL-C e LDL-C/HDL-C entre os participantes normolipidêmicos ou dislipidêmicos sem uso de estatina.....	125
Tabela 16. Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde ou amido, no perfil lipídico sérico dos indivíduos hipercolesterolêmicos em uso de estatina.....	129
Tabela 17. Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde ou amido, no perfil lipídico sérico dos indivíduos hipercolesterolêmicos em uso de estatina.....	130
Tabela 18. Efeito da ingestão das cápsulas com EMV, EMT e PL no peso corporal e circunferência da cintura (CC) dos participantes dislipidêmicos.....	133
Tabela 19. Efeito da ingestão por 30 e 60 dias das cápsulas com EMV e PL no peso corporal e circunferência da cintura (CC) dos participantes hipercolesterolêmicos em uso de estatina.....	133
Tabela 20. Efeito da ingestão das cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde, tostada ou amido na capacidade antioxidante do soro ($\mu\text{mol/L}$) de indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos após 7, 30 e 60 dias.....	137
Tabela 21. Efeito da ingestão de cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde e tostada ou amido, por indivíduos dislipidêmicos, no ácido úrico (mg/dL).....	139
Tabela 22. Efeito da ingestão de cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde e tostada ou amido, por indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos, na concentração sérica de hidroperóxidos lipídicos ($\mu\text{mol/L}$).....	141
Tabela 23. – Efeito da ingestão de cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde e tostada ou amido na concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ($\mu\text{mol/L}$) no plasma de indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos.....	144

Tabela 24. Efeito da ingestão de cápsulas de EMV, EMT ou placebo na concentração de glutatona reduzida sanguínea ($\mu\text{mol/L}$) de indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos.....	147
Tabela 25. Efeito da ingestão de cápsulas de EMV, EMT ou placebo na atividade da glutatona peroxidase (mU/mg proteína) por indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos.....	149
Tabela 26. Efeito da ingestão por 7, 30 e 60 dias de cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde e tostada ou amido, por indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos, na atividade da superóxido dismutase (U/mg proteína).....	151
Tabela 27. Efeito da ingestão de cápsulas com EMV, EMT ou placebo na atividade da catalase (U/mg proteína) de indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos.....	154
Tabela 28. Efeito da ingestão de cápsulas de EMV, EMT ou placebo na atividade sérica da enzima paroxonase (U/mL) de indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos.....	156

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
Apo	Apolipoproteína
ADP	Adenina Difosfato
AMP	Adenina Monofosfato
ATP	Adenina Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CAT	Catalase
CC	Circunferência da Cintura
CETP	Proteína de Transferência de Éster de Colesterol
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CK	Creatina Quinase
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CT	Colesterol Total
CV	Coefficiente de Variação
DAC	Doença Arterial Coronariana
DCV	Doença Cardiovascular
DHC	Dihidrocumarina
DLP	Indivíduos Dislipidêmicos
DLP-EMT	Indivíduos Dislipidêmicos que consumiram cápsulas com extrato seco de erva-mate tostada
DLP-EMV	Indivíduos Dislipidêmicos que consumiram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde
DLP-PL	Indivíduos Dislipidêmicos que consumiram cápsulas com amido (placebo)
EDTA	Ácido Etilenoaminotetra Acético
EMT	Extrato seco de erva-mate tostada
EMV	Extrato seco de erva-mate verde
FOX-2	Oxidação do Ferro com Alaranjado de Xilenol versão 2
FRAP	Potencial Antioxidante Redutor Férrico
GT	Glutationa Transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCE	Indivíduos Hipercolesterolêmicos Usuários de estatinas
HCE-EMV	Indivíduos Hipercolesterolêmicos Usuários de estatinas que

HCE-PL	consumiram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde Indivíduos Hipercolesterolêmicos Usuários de estatinas que consumiram cápsulas com amido (placebo)
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HDL	Lipoproteína de Alta densidade
HDL-C	HDL-colesterol; Fração do colesterol associada à HDL
IDL	Lipoproteína de Densidade Intermediária
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL-C	LDL-colesterol; Fração do colesterol associada à LDL
LDL-ox	LDL oxidada
LOOH	Hidroperóxidos Lipídicos
MDA	Malondialdeído
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
Não-HDL-C	Não-HDL colesterol; Diferença entre o colesterol total e aquele associado à fração HDL
NCEP	Programa Natcional Sobre Controle de Colesterol
NLP	Indivíduos Normolipidêmicos
O ₂ ⁻	Ânion Radical Superóxido
·OH	Radical Hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR-us	Proteína C Reativa Ultrasensível
PL	Placebo
PON	Enzima paroxonase
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
sd-LDL	LDL pequena e densa
Sd-LDL-C	Concentração de colesterol associada à sd-LDL (sd-LDL-colesterol)
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
TG	Triglicérides
THP-1	Linhagem de células de Leucemia Monocítica Aguda Humana

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
TROLOX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
TPP	Trifenilfosfina
TPTZ	2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina
USOD	Unidades de SOD
VCM	Volume Corpuscular Médio
VCT	Valor Calórico Total
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
WHO	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1. Protocolo experimental do Estudo Toxicológico em Seres Humanos..... 74
- Esquema 2. Protocolo experimental do Estudo Hipocolesterolêmico e Antioxidante em voluntários dislipidêmicos sem uso de medicamentos hipolipemiantes e indivíduos hipercolesterolêmicos usuários de estatinas. Os voluntários fizeram uso de cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, tostada ou amido, três vezes ao dia..... 75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	35
1.1	Apresentação do estudo.....	35
1.2	DOENÇAS CARDIOVASCULARES	37
1.2.1	Epidemiologia.....	37
1.2.2	Fatores de risco.....	37
1.2.2.1	Dislipidemias.....	38
1.2.3	Processo Inflamatório e Oxidativo da Aterosclerose	38
1.2.4	Estresse Oxidativo e as Defesas Antioxidantes	40
1.2.4.1	Enzima Paroxonase.....	41
1.2.5	Marcadores de Estresse Oxidativo	43
1.2.6	Abordagens Terapêuticas	46
1.3	<i>Ilex paraguariensis</i>	48
2	OBJETIVOS	59
2.1	Objetivo Geral.....	59
2.2	Objetivos Específicos.....	59
3	MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.1	MATERIAIS E REAGENTES	63
3.2	MÉTODOS	64
3.2.1	Preparação do extrato seco de erva-mate.....	64
3.2.2	Preparação das cápsulas com extrato seco de erva-mate.....	64
3.2.3	Caracterização do extrato seco de erva-mate	65
3.2.3.1	Preparação dos extratos aquosos de erva-mate.....	65
3.2.3.2	Quantificação dos Fenóis Totais.....	65
3.2.3.3	Quantificação da Capacidade Antioxidante Total.....	65
3.2.3.3.1	FRAP.....	66
3.2.3.3.2	TEAC.....	66
3.2.3.3.3	Quantificação de Compostos Fenólicos.....	67
3.2.3.4	Quantificação das Saponinas Totais.....	67
3.2.3.5	Determinação de Metilxantinas.....	68
3.2.3.6	Determinação de Catequinas.....	68
3.2.3.7	Identificação de Catequinas em Espectrometria de Massa.....	69
3.3	Caracterização dos Estudos <i>In vivo</i>	70

3.4	Procedimentos Éticos da Pesquisa	71
3.5	Amostras dos estudos	71
3.6	Grupos de Estudos	72
3.6.1	Estudos Toxicológicos Clínicos das Cápsulas de Erva-Mate em Indivíduos Saudáveis	72
3.6.1.1	Estudo Toxicológico Agudo.....	72
3.6.1.2	Estudo Toxicológico Crônico.....	73
3.6.2	Estudo Hipocolesterolêmico e Antioxidante das Cápsulas de Erva-Mate	74
3.6.2.1	Indivíduos com Dislipidemias sem Uso de Hipolipemiantes.....	74
3.6.2.2	Indivíduos com Hipercolesterolemia em Uso de Estatinas	75
3.7	Avaliação Clínica e Antropométrica	76
3.8	Análises Bioquímicas	76
3.8.1	Análise Laboratorial do Perfil Lipídico Sérico.....	76
3.8.1.2	Demais Parâmetros Laboratoriais.....	77
3.8.2	Marcadores de Estresse Oxidativo	77
3.8.2.1	Capacidade Antioxidante do Soro.....	77
3.8.2.2	Hidroperóxidos Lipídicos (LOOH).....	78
3.8.2.3	Glutathiona Reduzida Sanguínea.....	78
3.8.2.4	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)....	79
3.8.2.5	Atividade das Enzimas Antioxidantes em Eritrócitos.....	79
3.8.2.5.1	Medida da Atividade da Catalase.....	80
3.8.2.5.2	Superóxido Dismutase (SOD).....	80
3.8.2.5.3	Medida da Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx).....	80
3.8.2.5.4	Determinação das Proteínas Totais nos Eritrócitos.....	81
3.8.2.6	Medida da Atividade Sérica da Enzima Antioxidante Paroxonase-1 (PON-1).....	81
3.9	Análise Estatística	82
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS SECOS DE ERVA-MATE	85
4.1.1	Teor de Saponinas, Fenóis Totais e Medidas da Capacidade Antioxidante Total.....	85
4.1.2	Caracterização dos Compostos Fenólicos por CLAE.....	86
4.1.3	Caracterização de Catequinas por CLAE.....	90
4.1.4	Caracterização de Metilxantinas por CLAE.....	91

4.1.5	Identificação de Catequinas por CLAE/EM.....	93
4.2	Estudos <i>In vivo</i>	96
4.2.1	CARACTERÍSTICAS BIODEMOGRÁFICAS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO	96
4.2.2	AVALIAÇÃO DA EVENTUAL TOXICIDADE CLÍNICA DO EXTRATO SECO DE ERVA-MATE VERDE EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS	100
4.2.2.1	Estudo Toxicológico Agudo.....	100
4.2.2.2	Estudo Toxicológico Crônico.....	107
4.2.3	ESTUDO HIPOCOLESTEROLÊMICO DAS CÁPSULAS DE ERVA-MATE EM INDIVÍDUOS NORMOLIPIDÊMICOS E DISLIPIDÊMICOS SEM USO DE HIPOLIPEMIANTES	115
4.2.4	ESTUDO HIPOCOLESTEROLÊMICO DAS CÁPSULAS DE ERVA-MATE EM INDIVÍDUOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS EM USO DE ESTATINAS	126
4.2.5	Índices Antropométricos	132
4.2.6	EFEITO DO CONSUMO DAS CÁPSULAS COM EXTRATO SECO DE ERVA-MATE NOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	134
4.2.6.1	Indivíduos Normolipidêmicos ou Dislipidêmicos sem Uso de Estatina	134
4.2.6.1.1	Capacidade Antioxidante do Soro.....	134
4.2.6.1.2	Hidroperóxidos Lipídicos.....	140
4.2.6.1.3	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.....	142
4.2.6.1.4	Glutaciona Reduzida Sanguínea.....	145
4.2.6.1.5	Atividade da Glutaciona Peroxidase.....	148
4.2.6.1.6	Superóxido Dismutase (SOD).....	150
4.2.6.1.7	Atividade de Catalase.....	152
4.2.6.1.8	Atividade Sérica da Enzima Paroxonase.....	155
4.2.6.2	Indivíduos Hipercolesterolêmicos em Uso de Estatina	157
4.3	Considerações Finais	164
5	CONCLUSÕES	171
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	213

APÊNDICE B - Parecer do comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.....	216
APÊNDICE C – Questionário Avaliação Clínica.....	218

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do estudo

Estima-se que as doenças cardiovasculares (DCV) serão responsáveis pela morte de mais de 24 milhões de pessoas por ano, até 2030 (SMITH et al., 2004). A hipercolesterolemia e, particularmente, os valores plasmáticos elevados da lipoproteína de baixa densidade (LDL – do inglês, *Low-Density Lipoprotein*) (NCEP, 1991) e a diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL – do inglês, *High-Density Lipoprotein*) (SHARRET et al., 2001) são fatores primários de risco para a doença arterial coronariana (DAC). Além disso, evidências bioquímicas apontam o envolvimento do estresse oxidativo na gênese e progressão das DCV (revisado por Lakshmi et al. 2009). Dessa forma, a prevenção desses fatores torna-se a melhor estratégia terapêutica para a prevenção da aterosclerose. Nesse sentido, estudos epidemiológicos mostram uma associação inversa entre a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes, como as vitaminas A, C e E e os compostos fenólicos, e a morbi-mortalidade por DCV (GELEIJNSE et al., 2002; HUXLEY e NEIL, 2003; STOCKER, 2007).

Dentre as potenciais espécies vegetais com essas propriedades e normalmente consumidas no Brasil, encontra-se a erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil., Aquifoleacea). A erva-mate possui muitos componentes bioativos, como os ácidos fenólicos, principalmente o ácido clorogênico, metilxantinas (cafeína e teobromina), saponinas triterpênicas, aminoácidos, minerais e vitaminas (revisado por BASTOS et al., 2007a; BRACESCO et al., 2011; revisado por HECK; de MEJIA, 2007; SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2000; SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2002).

Vários estudos *in vitro* e em modelos animais já relataram a elevada atividade antioxidante da erva-mate e a propriedade de reduzir o colesterol sanguíneo (revisado por BASTOS et al., 2007a; HECK, d.0e MEJIA, 2007; BRACESCO, et al., 2011). Em estudos realizados por nosso grupo de estudo, confirmamos que a ingestão da infusão de erva-mate reduziu significativamente o LDL-colesterol e aumentou o HDL-colesterol em indivíduos normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos, particularmente naqueles sob terapia com estatinas (MORAIS et al., 2009; STEFANUTO, 2010); reduziu a glicemia de jejum e a hemoglobina glicada em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (KLEIN et al., 2011); aumentou a capacidade antioxidante e a atividade sérica da

enzima antioxidante paroxonase-1 (PON1) em indivíduos normolipidêmicos (FERNANDES et al., 2012) e dislipidêmicos (MORAIS, 2009; BOAVENTURA, 2010; BOAVENTURA et al., 2012b), aumentou a expressão gênica e a atividade da enzima paroxonase-2 (PON2) em leucócitos de mulheres saudáveis (FERNANDES et al., 2012), diminuiu a oxidação do plasma e da LDL em indivíduos saudáveis (SILVA et al., 2008) e aumentou a proteção antioxidante plasmática, a concentração de glutathiona reduzida (GSH) eritrocitária e diminuiu os hidroperóxidos lipídicos no plasma de indivíduos dislipidêmicos (BOAVENTURA et al., 2012b). Gugliucci (1996) e Matsumoto et al. (2009) já haviam relatado a propriedade da erva-mate diminuir a peroxidação lipídica plasmática e o aumento da proteção antioxidante do plasma e aumento da expressão gênica das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) em leucócitos de indivíduos saudáveis.

No entanto, nestes estudos verificamos que o sabor amargo característico das infusões de erva-mate, embora apreciado por muitos, foi o responsável pela desistência do consumo da erva-mate por alguns indivíduos, refletindo o que deve acontecer na população em geral. Dessa forma, cápsulas com extrato seco de erva-mate poderia ser uma alternativa para a ingestão da erva-mate, não necessitando de qualquer preparo prévio pelo consumidor, não apresentando sabor amargo e podendo aumentar, assim, a adesão ao seu consumo e, conseqüentemente, os seus benefícios à saúde. Em estudo toxicológico pré-clínico, prévio e obrigatório, de acordo com as normas preconizadas pela ANVISA (2004), mostramos que o extrato seco de erva-mate não apresentou toxicidade aguda ou crônica em ratos e coelhos, de acordo com as normas preconizadas pela ANVISA (ANDRADE et al., 2012). Além disso, cápsulas com extrato seco de mate mantiveram-se estáveis durante o período avaliado de 12 meses (ANDRADE., 2012).

Dessa forma, no presente trabalho foi possível dar seguimento a esta linha de pesquisa com o estudo de toxicidade clínica em indivíduos saudáveis e verificação das propriedades hipocolesterolêmica e antioxidante das cápsulas de erva-mate em indivíduos com dislipidemias e em indivíduos hipercolesterolêmicos sob tratamento com estatinas.

1.2 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

1.2.1 Epidemiologia

As DCV são responsáveis por aproximadamente 30% das mortes por ano no mundo (WHO, 2008a), sendo as doenças coronarianas e as doenças cerebrovasculares, secundárias à aterosclerose, responsáveis por dois terços desses óbitos (BEAGHOLE et al., 2001). Países em desenvolvimento contribuem com parcela maior da taxa global de mortalidade pela doença que os países desenvolvidos (KANITZ et al., 1996; LEVI et al., 2002; REDDY; YUSUF, 1998; WHO, 2008b). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO - *World Health Organization*), estima-se que 17 milhões de pessoas morrem de DCV a cada ano (WHO, 2009). No Brasil, as DCV são responsáveis por 28,8% de todas as causas de internações para indivíduos com idade maior ou igual a 50 anos (BRASIL, 2007) e por 33% dos óbitos com causas conhecidas (BARRETO et al., 2003; PASSOS et al., 2006), figurando como a principal causa de mortalidade no país (ISHITANE et al., 2006). Após cinco décadas de entendimento dos fatores de risco relacionados à gênese das doenças do coração, tem sido observado melhor controle dos mesmos e, conseqüentemente, redução da mortalidade por DCV em alguns países desenvolvidos (POLANCZYK, 2005).

1.2.2 Fatores de risco

Existem múltiplos fatores de risco para as DCV, os quais atuam independentemente ou em combinação, destacando-se o tabagismo, a hipertensão arterial, as dislipidemias e o diabetes *mellitus* (GRUNDY et al., 1998). Segundo o *National Cholesterol Education Program* (NCEP), a concentração elevada de LDL-colesterol é considerada o principal fator de risco para as DCV (NCEP, 1991). Além desta lipoproteína, estudos epidemiológicos mostraram que os valores aumentados de triglicérides (TG) plasmáticos, isoladamente ou em combinação com a baixa concentração de HDL-colesterol (HDL-C) são fatores de risco independentes para as DCV (KANNEL, 2002; SHARRET et al., 2001). Da mesma forma, a Sociedade Européia de Cardiologia e a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) têm assinalado, consistentemente, a implicação da obesidade, da dieta e da

inatividade física no risco cardiovascular (KRAUSS et al., 2000; NCEP, 2001).

1.2.2.1 Dislipidemias

As dislipidemias podem ser definidas como alterações metabólicas lipídicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo lipídico, que ocasionam repercussões nos valores séricos das lipoproteínas. Do ponto de vista laboratorial, podem ser classificadas em hipercolesterolemia isolada (aumento do LDL-C > 160 mg/dL), hipertrigliceridemia isolada (aumento de TG > 150 mg/dL), hiperlipidemia mista (LDL-C > 160 mg/dL e TG > 150 mg/dL) e diminuição isolada do HDL-C (< 40 mg/dL para homens e < 50 mg/dL para mulheres) associada ou não ao aumento de TG ou LDL-C (SPOSITO, 2007). Em relação à etiologia, as dislipidemias são classificadas em primárias e secundárias (SPOSITO, 2007). A associação entre LDL e o aumento da incidência de doença cardiovascular está bem estabelecida, conforme demonstrado pelos estudos longitudinais MRFIT (*Multiple Risk Factor Intervention Trial*) e PROCAM (*The Munster Heart Study*), os quais relataram associação importante e direta entre o aumento da concentração plasmática de LDL-C e o risco de eventos coronarianos (ASSMANN et al., 1998; NEATON et al., 1992). Além disso, estudos epidemiológicos mostraram que valores aumentados de TG plasmáticos, isoladamente ou em combinação com HDL-C diminuído, podem ser considerados fatores de risco independentes para DCV (KANNEL, 2002; SHARRETT et al., 2001). Muitos estudos têm demonstrado claramente que a redução e/ou a prevenção do aumento da concentração plasmática de colesterol total e LDL-colesterol reduzem o risco de eventos, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, e da mortalidade por causas cardiovasculares (ANDREWS et al., 2001; BROWN et al., 2001; GRUNDY, 2002; SEVER et al., 2003).

1.2.3 Processo Inflamatório e Oxidativo da Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. Os dados disponíveis sugerem que as dislipidemias, o processo inflamatório vascular e o estresse oxidativo são os principais mecanismos relacionados ao desenvolvimento da aterosclerose e suas

complicações (RIZZO et al., 2009). Os principais eventos incluem o aumento de lipoproteínas aterogênicas no plasma (LDL; IDL – Lipoproteína de densidade intermediária, incluindo remanescentes de quilomícrons e de VLDL – Lipoproteína de densidade muito baixa), ocorrendo agressão ao endotélio vascular de artérias de médio e grande calibre. Como consequência, ocorre aumento da permeabilidade da camada endotelial favorecendo a entrada das lipoproteínas do plasma para o espaço subendotelial e, em seguida, a oxidação das partículas de LDL por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. O depósito de lipoproteínas na parede arterial é o processo-chave para o início da aterosclerose, o qual ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma. Além de aumentar a permeabilidade vascular, ocorre o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial e processo inflamatório estimulado pela presença de LDL oxidada. As moléculas de adesão são responsáveis pela aderência de monócitos e linfócitos na parede arterial. Na sequência, induzidos por proteínas quimiotáticas, os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, os quais, por sua vez, captam as LDL oxidadas de maneira não controlada. Os macrófagos repletos de lipídios são chamados *células espumosas*, as quais são o principal componente das lesões ateroscleróticas (SPOSITO, 2007). Além disso, os próprios macrófagos estimulam a formação de LDL oxidada (FUHRMAN et al., 2002; ROSENBLAT; AVIRAM, 2002). Em pacientes com hipercolesterolemia, foi demonstrado que o estresse oxidativo aumenta o risco de desenvolvimento da aterosclerose (SMITH et al., 1992; DAVI et al., 1997). As placas ateroscleróticas podem se calcificar, diminuir a luz do vaso sanguíneo e nas lesões avançadas após rompimento, promover a formação de trombo plaquetário, que obstrui a luz do vaso causando complicações clínicas, como o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral (Figura 1) (LUSIS, 2000).

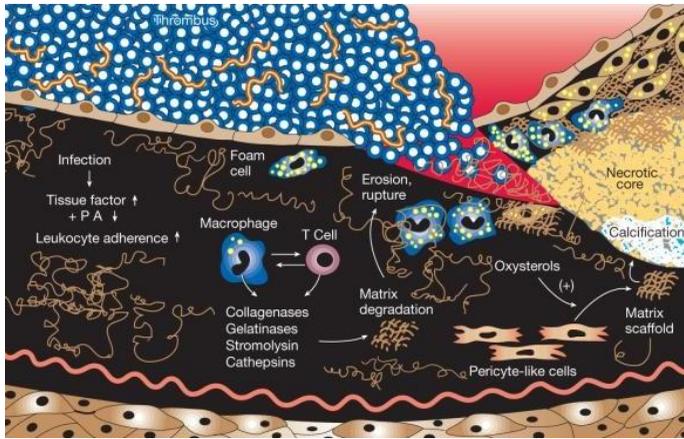


Figura 1. Processo de formação do trombo plaquetário na lesão aterosclerótica. Adaptado de Lusis (2000).

1.2.4 Estresse Oxidativo e as Defesas Antioxidantes

O desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes leva à condição de estresse oxidativo (SIES, 1986). Os agentes pró-oxidantes podem ser espécies reativas, como o peróxido de hidrogênio, e/ou radicais livres, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila (HO^{\cdot}), dentre outros. Radicais livres são átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente (HALLIWELL, 1994), com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativos. Eles podem ser gerados *in vivo*, em condições fisiológicas, como no metabolismo mitocondrial, nas situações em que há a necessidade de ativação do sistema imunológico, na desintoxicação de drogas e na produção de óxido nítrico (revisado por VALKO et al., 2007), bem como em condições patológicas, como câncer, diabetes *mellitus*, doença de Parkinson, Alzheimer e aterosclerose (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Antioxidantes podem ser amplamente definidos como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada ao substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES; STAHL, 1995). Ou seja, os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos, os quais são produzidos pelo próprio organismo ou provindos de fontes exógenas (dietéticas), como as vitaminas E e C, os

carotenóides, alguns minerais como, cobre, zinco e selênio, e os compostos fenólicos, incluindo os flavonoides (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Na primeira classificação, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas de oxigênio, como superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase, redutase e transferase. Os antioxidantes não-enzimáticos, na segunda classe, são moléculas que interagem com as espécies radiculares e são consumidas durante a reação, como por exemplo, as proteínas ligadoras de metais (ceruloplasmina, metalotioneína, albumina, transferrina e mioglobina), ubiquinona (Coenzima Q10), ácido úrico, bilirrubina, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH). Nesta classificação, incluem-se também os antioxidantes naturais de origem dietética, como as vitaminas E e C, carotenoides, minerais (cobre, zinco e selênio) e os compostos fenólicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Outra importante molécula antioxidante é a glutatona reduzida (GSH, L- γ -glutamil-L-cistetilglicina), que consiste em um tripeptídeo contendo cisteína e é o tiol não proteico mais abundante nas células de todos os organismos aeróbios, a qual é considerada um antioxidante endógeno e exógeno, uma vez que pode ser sintetizada tanto pelo próprio organismo quanto proveniente da dieta (FANG; YANG; WU, 2002).

1.2.4.1 Enzima Paroxonase

A enzima paroxonase (PON; EC 3.1.8.1. arildialquilfosfatase) está distribuída em vários órgãos, como fígado, rins e intestino, bem como no plasma, onde se encontra associada às partículas de HDL (TOMÁS et al., 2004). Foi demonstrado que a atividade da PON está inversamente associada ao risco de DAC (ASSMANN; NOFER, 2003).

A PON é uma glicoproteína com 354 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 45 kDa. É uma esterase dependente de cálcio, cujo mecanismo de ação não está totalmente elucidado (DRAGANOV; LA DU, 2004; VAN LENTEN et al., 2001). Existem três isoformas da enzima paroxonase, chamadas de PON1, PON2 e PON3 (AVIRAM et al., 2004). A PON1, isoforma mais estudada, encontra-se distribuída em vários órgãos, como fígado, rins e intestino, bem como no plasma, onde se encontra ligada à HDL (TOMÁS et al., 2004). Pacientes com hipercolesterolemia e/ou diabetes *mellitus*

apresentam atividade diminuída da PON1 (MACKNESS et al., 1991; MACKNESS et al., 2000). Redução da atividade da PON1 também foi demonstrada em pacientes com doença renal (DANTOINE et al., 1998), hipertireoidismo (RAISZADEH et al., 2004), doenças hepáticas, cirrose (FERRÈ et al., 2002) e doenças cardiovasculares, como a aterosclerose (MACKNESS et al., 2000). Neste último caso, a diminuição da atividade da PON1 ocorreu, provavelmente, devido ao aumento do estresse oxidativo e da elevação do colesterol plasmático (AVIRAM; ROSENBLAT, 2005). De fato, Kabaroglu et al. (2004) observaram diminuição na atividade da PON1 associada com o aumento do estresse oxidativo em pacientes com síndrome coronariana aguda e Tsuzura et al. (2004) associaram a atividade diminuída da PON1 em pacientes com diabetes tipo 2 com a concentração elevada de LDL oxidada no plasma e complicações vasculares.

A PON2 é a isoforma presente em vários tecidos e células humanas (NG et al., 2001), incluindo células endoteliais (HORKE et al., 2007), monócitos e macrófagos (SHINER et al., 2004). Porém, ao contrário da PON1, a PON2 não é encontrada no plasma sanguíneo e atua como antioxidante intracelular (NG et al., 2001; AVIRAM et al., 2004; ROSENBLAT et al., 2003). Tem sido sugerido que a PON2 pode proteger os macrófagos contra o estresse oxidativo e formação das células espumosas, contribuindo, assim, para a prevenção da aterogênese (NG et al., 2006). É interessante notar que a expressão da PON2 está diminuída em pacientes com hipercolesterolemia ou durante a progressão da aterosclerose (ROSENBLAT et al., 2004; FORTUNATO et al., 2008), sendo normalizada pela terapia com atorvastatina, um tipo de estatina (ROSENBLAT et al., 2004). A PON3 é pouco investigada e estudos com animais demonstraram que ela está associada não somente com as DCV mas também com a obesidade (SHIH et al., 2007).

A expressão gênica e a atividade da PON podem ser moduladas por diversos fatores, como ingestão de álcool, tabagismo, medicamentos, exercício físico, idade, certas condições fisiopatológicas e dieta (revisado por COSTA et al., 2005), assim como, compostos bioativos de alimentos, plantas e extratos vegetais (SCHRADER et al., 2010). Nesse contexto, o consumo de antioxidantes dietéticos, como as vitaminas C e E, os polifenóis, ou o azeite de oliva extra-virgem e o ácido graxo ômega-3 aumentaram a atividade da PON1 em seres humanos (WALLACE, et al., 2001; AVIRAM; FUHRMAN, 2002; JARVIK et al., 2002; ROSENBLAT et al., 2008).

Foi demonstrado aumento da expressão gênica da PON1, *in vitro*, em linhagem de células hepáticas, por suco de romã (KHATEEB et al., 2010), resveratrol (GOUÉDARD; BAROUKI; MOREL, 2004a; CURTIN et al., 2008) e quercetina (GOUÉDARD; BAROUKI; MOREL, 2004b). Além disso, o suco de romã (SHINER; FUHRMAN; AVIRAM, 2007) e a quercetina (BOESCH-SAADATMANDI et al., 2009) elevaram a atividade e a expressão gênica da PON2 em macrófagos.

Em relação ao potencial efeito da erva-mate na enzima paroxonase, Menini et al. (2007) relataram aumento na atividade sérica da PON1 após a ingestão de 500 mL de infusão de *Ilex paraguariensis* por indivíduos saudáveis. Mais recentemente, Gugliucci e Bastos (2009) descreveram que o ácido clorogênico – principal constituinte fenólico na erva-mate – preservou a PON1 contra degradações oxidativas *in vitro*. Com base em resultados de nosso grupo de estudo, a ingestão prolongada de infusões de erva-mate verde (tipo chimarrão) ou tostada aumentou a atividade da PON1 no plasma de indivíduos dislipidêmicos (MORAIS, 2009; BOAVENTURA, 2010). Além disso, a ingestão aguda e por sete dias das infusões de erva-mate aumentou a expressão gênica e a atividade da PON2, isoforma intra-celular, nos monócitos e macrófagos derivados de monócitos de mulheres saudáveis (FERNANDES et al., 2012). A erva-mate verde e tostada e o ácido clorogênico também aumentaram a expressão e a atividade enzimática da PON2 *in vitro*, em macrófagos THP-1 (FERNANDES et al., 2012). Assim, a erva-mate verde ou tostada pode exercer proteção contra o estresse oxidativo celular.

1.2.5 Marcadores de Estresse Oxidativo

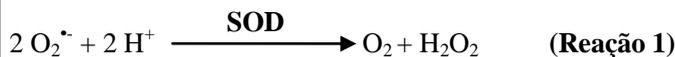
Há diversos e complexos métodos para avaliar o estado de estresse oxidativo. Porém, devido à falta de um método padrão-ouro para a detecção dos danos oxidativos causados pelas espécies reativas, existem diferentes metodologias amplamente empregadas para a determinação de indicadores indiretos da atividade das espécies reativas, como produtos derivados da oxidação de macromoléculas e a determinação da concentração de antioxidantes (JACKSON, 1999). Em relação aos primeiros, destaca-se a utilização de indicadores da peroxidação lipídica, tais como hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (JACKSON, 1999) e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Indivíduos com complicações de doença cardiovascular ou

fatores de risco a ela associados apresentam valores plasmáticos aumentados de parâmetros de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDG, 1989). No trabalho realizado por Serdar et al. (2006) foi observado aumento da peroxidação lipídica em indivíduos com DAC. Araújo et al. (1995) relataram que indivíduos hiperlipidêmicos apresentaram estado de estresse oxidativo elevado, avaliado pelo monitoramento de espécies reativas de oxigênio liberadas por leucócitos. Outros pesquisadores mostraram que pacientes com diagnóstico de AVC agudo apresentaram concentrações elevadas de produtos de peroxidação lipídica, como o MDA (BIR et al., 2006; BOLOKADSE et al., 2004; DEMIRKAYA et al., 2001; POLIDORI et al., 2002).

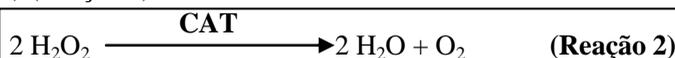
Em relação aos antioxidantes individuais, tem sido avaliada a concentração de substâncias antioxidantes sanguíneas e teciduais e determinada a atividade de enzimas antioxidantes em células. Nesse contexto, as vitaminas antioxidantes, A, E e C, são, normalmente, as mais quantificadas no plasma sanguíneo (DUSTING; TRIGGLE, 2005; RODRIGO; GUICHARD; CHARLES, 2007; WILLCOX; CURB; RODRIGUEZ, 2008), bem como as principais enzimas antioxidantes, SOD, catalase e GPx (revisado por FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Além disso, outros compostos antioxidantes de mais fácil determinação laboratorial são utilizados, como a GSH e a atividade das enzimas paroxonase. A concentração de GSH plasmática encontra-se diminuída em indivíduos com doença vascular (SHIMIZU et al., 2004). Da mesma forma, pacientes com hipercolesterolemia e/ou *diabetes mellitus* apresentam atividade reduzida da PON1 (MACKNESS et al., 2000; MACKNESS et al., 1991) e da expressão da PON2 (ROSENBLAT et al., 2004; FORTUNATO et al., 2008).

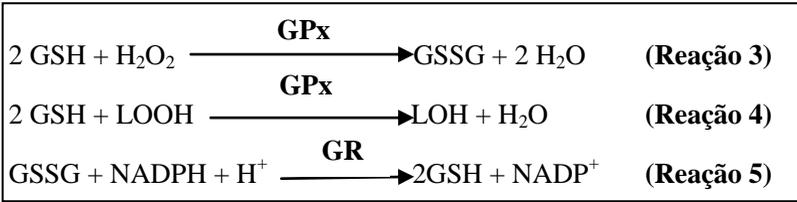
Em relação às principais enzimas antioxidantes, a SOD é caracterizada como uma das enzimas mais importantes e atua como antioxidante celular, sob duas formas distintas, de acordo com a presença do cofator metálico no sítio ativo. A primeira contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como cofator no sítio ativo e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. A segunda forma da SOD contém Mn^{2+} como cofator, está presente na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo. A SOD catalisa a dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$, convertendo-o em O_2 e H_2O_2 (HALLIWELL, 1996a; DIPLOCK et al., 1998) (Reação 1).



O segundo sistema de prevenção é constituído pela enzima catalase (CAT). Controla os processos de oxidação em tecidos quando ocorre aumento na concentração de H_2O_2 celular. A catalase atua na conversão do H_2O_2 em O_2 e H_2O (HALLIWELL, 1996a; DIPLOCK et al., 1998) (Reação 2).



O terceiro sistema de defesa antioxidante pode ser representado pela GPx e glutathiona redutase (GR) e atuam em conjunto com a GSH, co-substrato e antioxidante não enzimático. A GPx catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos em H_2O e seus correspondentes alcoóis, respectivamente, a partir da oxidação da GSH à glutathiona oxidada (GSSG) (Reações 3 e 4). A GPx está presente no organismo sob duas formas, dependente e independente de selênio. A presença de selênio na enzima explica a importância desse metal e sua atuação como antioxidante nos organismos. A GR, uma flavoproteína dependente de NADPH, tem a função de regenerar a GSH (Reação 5). O processo de regeneração da GSH favorece a manutenção da concentração intracelular elevada de GSH em relação à GSSG (HALLIWELL, 1996b; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; FANG; YANG; WU, 2002; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). A GSH é o maior composto tiol de baixo peso molecular em vegetais, animais, fungos, líquens e bactérias aeróbias, constituindo-se num importante antioxidante natural. Ela pode ser proveniente da dieta ou também ser sintetizada no organismo humano, portanto é considerada um antioxidante endógeno e exógeno (FANG; YANG; WU, 2002). Seu grupo tiol reativo confere efetiva propriedade redutora, permitindo interagir com diversas moléculas reativas, tais como LOOH, H_2O_2 , peroxinitrito (ONOO^{\bullet}), $\text{O}_2^{\bullet -}$ e OH^{\bullet} . Além disso, a GSH tem importante participação no processo de regeneração da vitamina C (BIANCHI; ANTUNES, 1999; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).



Em virtude da dificuldade de se avaliar todos os antioxidantes conhecidos separadamente e devido às interações entre os outros tipos de antioxidantes que não estão sendo levados em consideração nas análises específicas, várias técnicas laboratoriais têm sido propostas para a avaliação do conjunto dos diferentes antioxidantes nos fluídos biológicos, denominadas genericamente de “capacidade antioxidante” (BENZIE; STRAIN, 1996; EVELSON et al., 2001; GHISELLI et al., 2000). Serdar et al. (2006) demonstraram que a capacidade antioxidante do plasma está diminuída em pacientes com DAC. Esses autores também relataram diminuição plasmática de enzimas e vitaminas antioxidantes.

1.2.6 Abordagens Terapêuticas

Muitos estudos têm demonstrado claramente que as manifestações clínicas das DCV e a mortalidade a elas associadas podem ser minimizadas pelas terapias que diminuem a concentração plasmática de LDL-C e/ou aumentam o HDL-C. Os estudos de meta-análise realizados por Cheung et al. (2004) e Baigent et al. (2005) confirmaram que o tratamento hipolipemiante com estatinas reduziu a incidência de DAC e os eventos coronarianos, os quais foram melhor preditos pela diminuição absoluta da concentração de LDL-C. Embora o efeito anti-aterosclerótico da estatina seja atribuído ao efeito hipolipemiante, por inibir a enzima-chave na síntese endógena do colesterol (HMG-CoA redutase), outros estudos sugerem que alguns benefícios da estatina são mediados por efeitos pleiotrópicos independentes da diminuição do colesterol (CAMPO; CARVALHO, 2007; SACKS et al., 1996; SHEPHERD et al., 1995). Neste contexto, existem relatos das propriedades anti-inflamatória *in vivo* em modelos animais (KITAMOTO et al., 2004; MONETTI et al., 2007; SCALIA et al., 2001); em indivíduos hipercolesterolêmicos (LEE et al., 2008); da ativação da via do óxido nítrico *in vivo*, em pacientes com doença arterial coronariana (MASUMOTO et al., 2001); da atividade anti-

trombótica *in vivo*, em camundongos deficientes de apo-E (MONETTI et al., 2007); e do potencial antioxidante das estatinas, tanto *in vitro* (FRANZONI et al., 2003) como *in vivo* em seres humanos (TRAVIDOU et al., 2006).

Normalmente, a abordagem terapêutica e preventiva é feita pelo uso de medicamentos. No entanto, as diretrizes americanas e brasileiras sobre dislipidemia e aterosclerose recomendam que o tratamento seja iniciado em indivíduos com dislipidemias leve ou moderada pela prática de exercícios físicos e mudanças nos hábitos alimentares, particularmente pela redução da ingestão de ácidos graxos saturados e colesterol, aumento do consumo de ácidos graxos polinsaturados e pelo uso de alimentos vegetais, ricos em compostos antioxidantes e que possuem potencial hipocolesterolêmico. Nesse contexto enquadram-se os alimentos funcionais que, além das funções nutricionais básicas, apresentam efeitos benéficos para a saúde, quando consumidos como parte da dieta habitual, reduzindo o risco de algumas doenças e auxiliando nas funções fisiológicas do organismo (STARK e MADAR, 1994). Sendo assim, considera-se o encapsulamento de extratos vegetais, uma das técnicas usadas para o desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos (BORGOGNA et al., 2010).

Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram associação inversa entre o consumo de alimentos ricos em antioxidantes, particularmente compostos fenólicos e flavonóides, e a mortalidade por doenças cardiovasculares (ERDMAN JUNIOR et al., 2008; GELEIJNSE et al., 2002; HERTOOG et al., 1995; HERTOOG et al., 1993; HUXLEY; NEIL, 2003; KNEKT et al., 1996). Os compostos fenólicos existem naturalmente numa grande variedade de alimentos e bebidas de origem vegetal e fazem parte integral da dieta humana (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; HERTOOG; HOLLMAN; van de PUTTE, 1993; HERTOOG; HOLLMAN; KATTAN, 1992; NIJVELDT et al., 2001).

A propriedade anti-aterosclerótica dos compostos fenólicos pode ser devida, pelo menos em parte, ao efeito antioxidante, o qual é atribuído à capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio e/ou de formar complexos com metais (AFANAS'EV et al., 1989; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Os compostos fenólicos e os flavonóides inibem a peroxidação lipídica, a agregação plaquetária e a atividade das enzimas fosfolipase A₂, ciclooxigenase e lipoxigenase (revisado por WILHELM FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001). Ainda, são inibidores da oxidação da LDL pelo cobre (MANGIAPANE et al.,

1992), por macrófagos (De WHALLEY et al., 1990; WITTIG et al., 2001) ou pela enzima 15-lipoxigenase (SILVA et al., 1998).

Desta forma, considerando a participação das espécies reativas de oxigênio na patogênese da aterosclerose, os compostos polifenólicos, como antioxidantes dietéticos, podem ser importantes na prevenção das doenças cardiovasculares pela proteção das lipoproteínas contra os eventos oxidativos no sistema vascular e/ou pelo aumento geral da proteção antioxidante.

1.3 *Ilex paraguariensis*

Dentre as espécies vegetais de importância, com propriedades antioxidante e hipocolesterolêmica, encontra-se a erva-mate (*Ilex paraguariensis*), a qual é encontrada na região subtropical da América do sul e está presente no Brasil, principalmente nos estados da região Sul e no Mato Grosso do Sul, na Argentina, no Paraguai e no Uruguai (USDA, ARS, National Genetic Resources Program, 2009). As partes aéreas da planta são utilizadas para o preparo de uma bebida muito apreciada pelo seu sabor amargo peculiar e propriedades estimulantes (Figura 2).



Figura 2. Folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

A infusão de erva-mate já era consumida pelos índios nativos da América do Sul quando o novo mundo foi descoberto pelos europeus. Nos dias de hoje, a infusão de erva-mate é consumida em torno de um a dois litros por dia por milhões de pessoas e constitui a principal alternativa para o café e o chá preto.

As bebidas à base de erva-mate são conhecidas como *chimarrão*, *mate cozido* (*cocido*, em espanhol), *tererê* e *chá mate*. O

chimarrão e o *tererê* são preparados com folhas verdes, secas e moídas de erva-mate, utilizando água quente e água fria, respectivamente. O *chimarrão* é consumido no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Paraguai (MAZZAFERA, 1997), enquanto o *tererê* é mais consumido no centro-oeste do Brasil e no Paraguai. O *mate cozido* refere-se ao mate de folhas secas e moídas preparado na forma de infusão de ervas, usualmente comercializado em sachês, semelhante a muitos outros chás, sendo consumido principalmente na Argentina e no Uruguai. O chá *mate* é preparado com folhas secas e moídas de erva-mate tostada e consumido especialmente no Brasil e Argentina. Utilizada há séculos como bebida estimulante, a erva-mate vem ganhando rápida aceitação nos mercados de vários países fora da América do Sul, incluindo EUA e países Europeus, tanto na forma de chá, como ingredientes na formulação de alimentos, suplementos dietéticos e cosméticos (revisado por BASTOS et al., 2007a; HECK, de MEJIA, 2007). A erva-mate também pode ser encontrada em supermercados na forma de bebidas energéticas na Califórnia-EUA e está sendo vendida na Europa em combinação com outras ervas como chá energético ou como auxiliar na redução de peso (BRACESCO, et al., 2011). Vale destacar que alguns estudos estão sendo desenvolvidos com o intuito de modificar a forma de consumo da erva-mate. Deladino et al. (2008) encapsularam o extrato liofilizado de erva-mate com alginato de cálcio isolado, ou adicionado de quitosana, demonstrando que o processo pode ser uma alternativa promissora para a suplementação alimentar com antioxidantes naturais ou mesmo para a aplicação na indústria alimentícia. Nesse contexto também, Andersen e Fogh (2001) demonstraram que o uso de cápsulas contendo uma mistura de erva-mate, guaraná (*Paullinia cupana*) e damiana (*Turnera diffusa* var. *aphrodisiaca*) prolongou o esvaziamento gástrico, reduziu o tempo de percepção de saciedade e induziu significativa perda de peso (5,1 kg) após 45 dias em indivíduos com sobrepeso.

Vários componentes fitoquímicos têm sido identificados no extrato de erva-mate. Os principais componentes pertencem à classe dos ácidos fenólicos (ácido clorogênico e seus isômeros; 3,4-ácido dicafeoilquínico; 3,5-ácido dicafeoilquínico; 4,5-ácido dicafeoilquínico), com diferença apenas na substituição do anel benzênico (Figura 3). Estes compostos são amplamente distribuídos como conjugados na planta. Os mais comuns são os ácidos caféico, ferúlico, sinápico e *p*-cumárico (revisado por BASTOS et al., 2007a). O teor de compostos fenólicos no extrato aquoso de erva-mate é maior do que no chá verde ou no vinho tinto (BIXBY et al., 2005). Porém, os compostos fenólicos

encontrados na erva-mate apresentam diferença estrutural daqueles do chá verde, pois na erva-mate é maior a concentração de ácido clorogênico e não de catequinas (CHANDRA; de MEJIA, 2004).

Os principais alcaloides purínicos (xantinas) da erva-mate são a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e a teobromina (3,7-dimetilxantina), sendo que a teofilina (1,3-dimetilxantina) (Figura 4) está presente em menor quantidade (HECK; de MEJIA, 2007). Isso pode ser devido ao fato de a teofilina ser um intermediário no catabolismo da cafeína na planta (ITO; CROZIER; ASHIHARA, 1997). A concentração de cafeína na erva-mate é semelhante àquela presente no café. Ou seja, um copo de 150 mL de chimarrão contém 78 mg de cafeína e a mesma quantidade de café apresenta em torno de 85 mg de cafeína (MAZZAFERA, 1997).

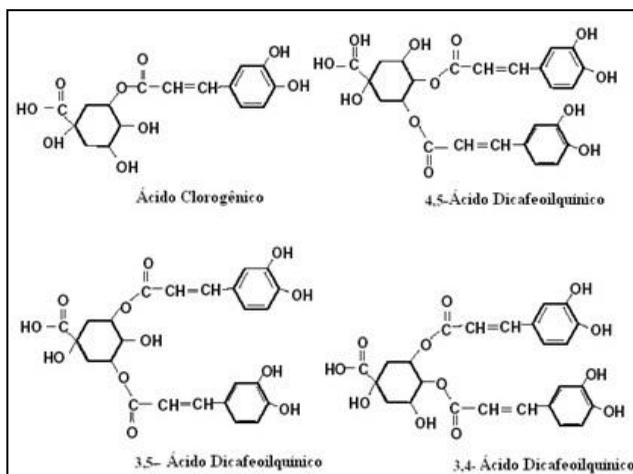


Figura 3 – Estrutura química dos principais compostos fenólicos (modificado de Heck; de Mejia, 2007).

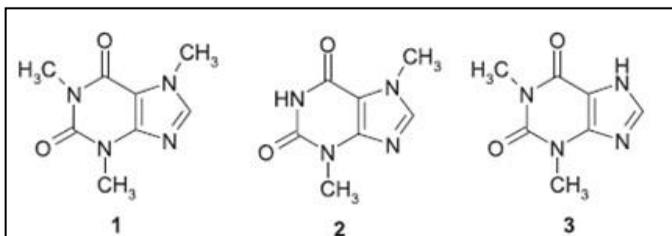


Figura 4 – Estrutura química das metilxantinas: 1 – Cafeína; 2 – Teobromina; 3 - Teofilina (adaptado de GNOATTO et al., 2007).

O sabor amargo e a formação de espuma, característicos do chimarrão, são devidos à presença de saponinas. Saponinas são substâncias pertencentes ao grande grupo de glicosídeos amplamente distribuídos em plantas superiores. Várias saponinas triterpênicas contendo o ácido ursólico foram isoladas das folhas do mate (Figura 5) (GOSMANN et al., 1995; KRAEMER et al., 1996). Elas se dissolvem facilmente em água para formar soluções coloidais que, sob agitação, formam espuma.

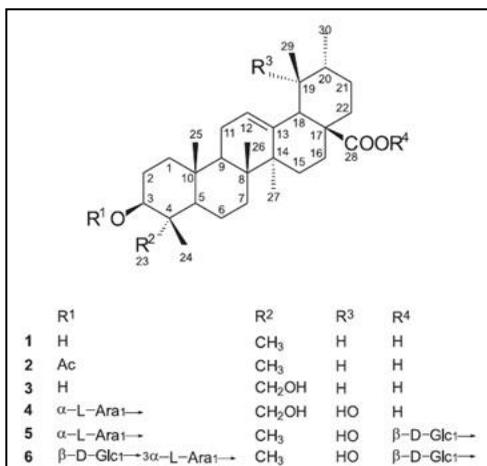


Figura 5 – Estrutura química básica de saponinas isoladas de *Ilex paraguariensis* derivadas do ácido ursólico (modificado de TAKETA; BREITMAIER; SCHENKEL, 2004).

A erva-mate apresenta, ainda, uma pequena quantidade de flavonóides (quercetina, kaempferol e rutina), cerca de 15 aminoácidos,

diversos minerais (alumínio, cálcio, cromo, cobre, ferro, fósforo, manganês, níquel, potássio e zinco) e vitaminas (C, B₁ e B₂) (revisado por BASTOS et al, 2007a; HECK; de MEJIA, 2007; SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2002).

Na medicina popular a erva-mate é indicada para o tratamento de inúmeras desordens, tais como artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorroidas, obesidade, fadiga, retenção de fluidos, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas. Inúmeros pesquisadores, inclusive o nosso grupo de pesquisa, têm comprovado, e contribuído cientificamente através de trabalhos publicados, alguns efeitos que podem explicar muitas das propriedades farmacológicas atribuídas à erva-mate. O extrato aquoso de erva-mate tem propriedades hipocolesterolêmica, antioxidante e hepatoprotetora, antiviral, estimulante do sistema nervoso central, diurética, efeito colerético e de propulsão intestinal, anti-inflamatória, hipoglicêmica, emagrecedora, vasodilatadora e inibidora das reações de glicação *in vitro* (revisado por BASTOS et al., 2007a; HECK; de MEJIA., 2007).

Com base nos resultados de pesquisas realizadas em nosso laboratório, foi evidenciada a eficácia da erva-mate como inibidor da oxidação da LDL *in vitro* e *ex vivo* em seres humanos, a propriedade anti-aterosclerótica e vasorrelaxante em modelos animais e os efeitos benéficos para a melhora do perfil glicêmico e lipídico sérico em pacientes diabéticos e hipercolesterolêmicos. Por exemplo, o extrato aquoso de erva-mate teve o potencial de inibir a progressão da aterosclerose *in vivo*, em coelhos alimentados com colesterol (MOSIMANN et al., 2006). A quantidade de lesões ateroscleróticas na artéria aorta dos animais que consumiram o extrato aquoso de erva-mate durante dois meses foi cerca de 50% inferior em comparação aos coelhos controles. Além disso, em camundongos com aterosclerose, os quais apresentam disfunção endotelial semelhante aos pacientes com DCV, verificou-se que a administração prolongada do extrato de erva-mate melhorou de forma significativa a reatividade vascular *ex vivo* (FELIPPI et al., 2006). Ou seja, a erva-mate reverteu a inibição da contração e do relaxamento vascular verificada nos animais com aterosclerose. Muccillo-Baisch et al. (1998) já haviam demonstrado o efeito vasodilatador *in vitro* para o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em artéria mesentérica de ratos, o qual foi confirmado em nosso laboratório, utilizando-se anéis isolados de artéria aorta de ratos (FELIPPI et al., 2005).

Dentre as inúmeras propriedades biológicas da erva-mate, a atividade antioxidante tem sido amplamente estudada e está associada ao conteúdo de compostos fenólicos do mate, particularmente os derivados cafeoilquínicos (FILIP et al., 2000; SCHINELLA et al., 2000). Gugliucci e Stahl (1995) demonstraram, pela primeira vez, que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* inibiu a oxidação da LDL *in vitro* e que esta inibição foi dependente da concentração de mate. Subsequentemente, Gugliucci (1996) estendeu essas observações para uma situação *ex vivo*, demonstrando que os antioxidantes presentes na infusão de mate foram absorvidos e alcançaram concentração suficientemente elevadas no plasma de indivíduos saudáveis para inibir a oxidação *ex vivo* do plasma induzida pelo cobre. Estudos de nosso laboratório confirmaram os resultados de Gugliucci (1996) e os ampliou, demonstrando que a ingestão de infusão de erva-mate pode inibir a oxidação *ex vivo* das partículas de LDL, diminuindo, inclusive, a formação de óxidos de colesterol. Isto significa que alguns compostos antioxidantes do mate, que atingiram o plasma após a absorção, permaneceram aderidos às partículas de LDL isoladas e, conseqüentemente, podem inibir as modificações oxidativas da LDL que ocorrem em locais específicos, como por exemplo, no espaço subendotelial das artérias durante a formação e progressão da aterosclerose.

A ingestão aguda ou por curto prazo de infusão de erva-mate também promoveu aumento na atividade da enzima PON1 (MENINI et al., 2007). Em nosso laboratório, também verificamos que a ingestão das infusões de erva-mate verde ou tostada, por indivíduos saudáveis, de forma aguda ou por sete dias, aumentou a atividade da PON1 no plasma (FERNANDES et al., 2012), confirmando, assim, os achados prévios de Menini et al. (2007). Também mostramos que a ingestão prolongada de infusão de erva-mate verde (tipo chimarrão) ou tostada aumentou a atividade da PON1 no plasma de indivíduos dislipidêmicos (MORAIS, 2009; BOAVENTURA, 2010). Assim, a ingestão da erva-mate aumentou a capacidade antioxidante do plasma e a atividade da enzima PON1 e diminuiu a oxidação do plasma e da LDL. Dessa forma, é plausível pensar que a elevação na atividade da PON1 contribua, pelo menos em parte, para esses achados. Em estudo recente de nosso laboratório, verificou-se que a ingestão aguda e por sete dias das infusões de erva-mate aumentou a expressão gênica e a atividade da PON2 nos monócitos e macrófagos derivados de monócitos de mulheres saudáveis, bem como *in vitro*, em cultura de macrófagos THP-1 (FERNANDES et

al., 2012). Assim, a erva-mate verde ou tostada pode exercer proteção contra o estresse oxidativo celular.

Em relação à propriedade hipocolesterolêmica da erva-mate, estudos em nosso laboratório demonstraram, pela primeira vez, que a ingestão de infusão de erva-mate (chimarrão ou chá mate tostado) durante 20 ou 40 dias reduziu significativamente o LDL-C em pacientes com hipercolesterolemia (MORAIS et al., 2009). Esse efeito foi particularmente efetivo quando associado às estatinas (MORAIS et al., 2009), particularmente em conjunto com orientação nutricional qualitativa (STEFANUTO, 2010) mostrando claramente que a ingestão de erva-mate pode ser considerada abordagem interessante como adjuvante e complementar às estatinas na terapia hipocolesterolêmica. Vale salientar que a ingestão de três doses diárias de mate por 40 dias ou chá mate por 40 ou 60 dias por indivíduos saudáveis, não promoveu alterações nos parâmetros hematológicos, nos marcadores renais e hepáticos (BOAVENTURA, 2010; KLEIN, 2010; MORAIS et al., 2009; STEFANUTO, 2010). Em estudo clínico piloto com pacientes diabéticos também verificou-se que, além da redução de LDL-C, a ingestão da infusão de chá mate diminuiu significativamente a concentração da glicemia de jejum e da hemoglobina glicada (KLEIN et al., 2011), sugerindo, assim, um possível efeito anti-diabetes.

No entanto, em nossos estudos, observamos que muitos indivíduos participantes, que não possuíam o hábito de ingerir chás, particularmente aqueles de sabor amargo e sem adição de açúcar como a erva-mate, tiveram dificuldade em manter o consumo prolongado das infusões de mate, particularmente do chimarrão, sugerindo que o mesmo pode acontecer com uma parcela significativa da população. Dessa forma, com o intuito de fazer com que mais pessoas se beneficiem das propriedades da erva-mate, sem sentir o seu sabor amargo característico, idealizamos o desenvolvimento de cápsulas contendo o extrato seco (sólidos solúveis) de erva-mate.

De acordo com a legislação brasileira, antes da aplicação e uso em seres humanos de qualquer produto natural, novo ou cuja forma de apresentação tenha sido modificada, é necessário um processo de comprovação de segurança de uso do produto natural (toxicologia pré-clínica em animais). Assim, foi realizado estudo em ratos e coelhos para avaliar eventuais efeitos tóxicos do extrato seco de erva-mate após administração aguda e por doses repetidas, seguindo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, RES 90, 2004). De acordo com os resultados, a administração intra-gástrica aguda de 2 g/kg

do extrato seco de erva-mate a ratos Wistar machos e fêmeas, não provocou sinais de toxicidade, incluindo-se modificações comportamentais, alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorreia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade e contorções abdominais, alteração no peso corpóreo ou mortes entre os animais acompanhados por 14 dias (ANDRADE et al., 2012). Além disso, não foram encontradas alterações macroscópicas nos órgãos dos animais administrados com mate. Portanto, não foi possível determinar a dose que promove a morte de 50% dos animais (DL50). Dessa forma, concluiu-se como ausência de toxicidade aguda do extrato seco de erva-mate na dose utilizada de 2,0 g/kg, a qual é considerada máxima pela legislação vigente (RES 90, ANVISA, 2004, RES 116, 1996; OGA, 2003).

No estudo crônico, o extrato seco de erva-mate foi administrado a ratos *Wistar* e coelhos *New Zealand*, machos e fêmeas, por 12 semanas (RES 90, ANVISA, 2004). Não houve mortes, diferenças na evolução do peso corpóreo, nem alterações comportamentais entre os animais que consumiram a erva-mate. Além disso, as análises bioquímicas e hematológicas revelaram ausência de alterações significativas associadas à toxicidade (ANDRADE et al., 2012). Resultados semelhantes foram observados em nossos estudos realizados anteriormente com seres humanos, após ingestão diária de 1 litro de infusão de mate verde ou chá mate tostado durante 40, 60 ou 90 dias (BOAVENTURA, 2010; MORAIS et al., 2009; KLEIN, 2010, STEFANUTO, 2010).

Em relação às análises histopatológicas dos principais órgãos dos animais que eventualmente poderiam ser afetados pela administração prolongada do extrato seco de erva-mate, não foram observadas alterações histopatológicas celulares e/ou teciduais indicadoras de atipias decorrentes de toxicidade nos animais (ANDRADE et al., 2012). Com base nestes resultados e de acordo com a legislação vigente, i.e., ausência de alterações indicadoras de toxicidade em duas espécies de mamíferos, ratos e coelhos, podemos concluir que o extrato seco de erva-mate pode ser utilizado com segurança para a realização futura de estudos de toxicidade em seres humanos saudáveis.

No presente estudo em seres humanos, os ensaios clínicos foram realizados empregando-se a forma farmacêutica em que poderá ser comercializado. Para isto foi utilizado extrato seco de erva-mate obtido por secagem *spray drying*, metodologia que já vem sendo utilizada na indústria alimentícia há mais de 50 anos para

encapsulamento (DESAI; PARK, 2005). Assim, essa técnica proporciona a formação de partículas com forma esférica uniforme e rápida dissolução, baixo custo de operação, aplicação em produtos termossensíveis, podendo assim ser empregado com sucesso na produção de fitomedicamentos, apresentando estabilidade química, físico-química e microbiológica, maior concentração de compostos ativos e elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas (MASTERS, 1985; SHAW, 1997; AULTON, 2002). Em geral, os extratos secos de origem vegetal encontram emprego como produtos finais ou intermediários, sobretudo em formas farmacêuticas sólidas, visto que no Brasil encontram-se registrados 512 medicamentos fitoterápicos, dos quais mais de 70% apresentam-se como formas farmacêuticas sólidas (CARVALHO et al., 2008).

Nesse contexto, foram realizados estudos de estabilidade das cápsulas com extrato seco de erva-mate, seguindo a legislação vigente (ANVISA, Resolução nº 1, 2005). O extrato seco de erva-mate em cápsulas mantidas a 30 °C, no estudo de longa duração por 12 meses, ou a 40 °C, no estudo acelerado por seis meses, em frascos impermeáveis, apresentou estabilidade química satisfatória e aceitável, com variações inferiores a 10% nos principais constituintes, como compostos fenólicos totais, ácidos clorogênico, gálico e dicafeoilquínico, cafeína, teobromina, saponinas totais e capacidade antioxidante total, independente da presença do adjuvante dióxido de silício (ANDRADE, 2011 - Dissertação). Além disso, não houve crescimento de microrganismos, como fungos e bactérias, no extrato seco de erva-mate encapsulado e armazenado a 30 ou 40 °C, durante seis ou 12 meses.

Sendo assim, resta estabelecer, através de estudos de toxicidade clínica em indivíduos saudáveis, se as cápsulas de erva-mate demonstram realmente ausência de efeitos colaterais, através de exames clínicos e determinações bioquímicas e hematológicas. Após verificação da ausência de toxicidade, o estudo foi ampliado para verificar as propriedades hipocolesterolêmica e antioxidante das cápsulas de erva-mate em indivíduos com dislipidemias ou e com hipercolesterolemia sob tratamento com estatinas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi verificar a eventual toxicidade clínica da ingestão de cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde por indivíduos saudáveis, e avaliar se a ingestão de cápsulas com extrato seco de erva-mate verde ou tostada, durante 30 e 60 dias, apresenta propriedades hipocolesterolêmica e antioxidante *in vivo*, em indivíduos dislipidêmicos, usuários ou não de estatina.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o teor de compostos fenólicos, metilxantinas, fenóis totais, saponinas, bem como avaliar a capacidade antioxidante total, dos extratos secos de erva-mate verde e tostada utilizados neste estudo;
- Avaliar a eventual toxicidade do extrato seco de erva-mate verde em seres humanos sadios em estudo clínico agudo e crônico, por meio de exame clínico completo, eletrocardiograma de cinco derivações, hemograma completo e contagem de plaquetas, exame de urina tipo I e exames bioquímicos séricos de rotina;
- Avaliar o efeito do extrato seco de erva-mate verde nos parâmetros lipídicos de indivíduos normolipidêmicos;
- Verificar o efeito da ingestão das cápsulas de erva-mate verde e tostada nas concentrações séricas de colesterol total, LDL-C, HDL-C, Não-HDL-C, triglicerídeos e na fração pequena e densa da LDL e nas relações LDL-C/HDL-C e CT/HDL-C em indivíduos com dislipidemias sem uso de medicamentos hipolipemiantes, durante 60 dias;
- Verificar o efeito da ingestão das cápsulas de erva-mate verde no perfil lipídico de indivíduos hipercolesterolêmicos sob terapia com estatinas, durante 60 dias;
- Analisar os marcadores do estresse oxidativo, como capacidade antioxidante, LOOH, GSH, TBARS, e a atividade das enzimas SOD, CAT, GPx e PON1 nos eritrócitos ou no soro de indivíduos normolipidêmicos, dislipidêmicos e hipercolesterolêmicos usuários de estatinas; avaliados antes e

após 7, 30 e 60 dias da ingestão das cápsulas de extrato seco de erva-mate verde e tostada;

- Verificar o efeito da ingestão das cápsulas de erva-mate verde ou tostada no peso corpóreo e na circunferência da cintura após 30 e 60 dias.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os extratos secos de erva-mate verde e tostada foram fornecidos pela empresa Leão Júnior S.A. - Curitiba-PR (lotes 12179967 e 11296504, ano 2012, respectivamente). Os conjuntos de reagentes para as determinações do colesterol total e fração HDL-C, triglicerídeos, glicose, ácido úrico, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT), creatinina, creatina quinase (CK), bilirrubina total e direta foram obtidos da empresa Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa – MG). Os eletrólitos sódio e potássio foram quantificados por meio de eletrodos íons seletivos em equipamento automatizado Siemens® (Newark, NJ, Estados Unidos) e as demais análises bioquímicas foram realizadas em equipamento automatizado Cobas Mira Plus® (Roche Diagnósticos, Basel, Suíça). As análises hematológicas foram realizadas em equipamentos automatizados *Wiener Analyzer* (Wiener Laboratórios S.A.I.C. - Rosario, Argentina) e Sysmex XE-2100i Roche (Kobe, Japão). As análises de urina foram realizadas em analisador automatizado com microfotografia de urina IG 200 IRIS Diagnostics (Los Angeles, CA, Estados Unidos) e Combostik R-700 (Gyung-Nam, Coréia). A avaliação do eletrocardiograma foi feita utilizando-se o eletrocardiógrafo ECG 6 Ecafix (São Paulo, SP).

Os reagentes relacionados a seguir foram adquiridos da Sigma (Steinheim, Alemanha ou St. Louis, EUA): reagente de Folin-Ciocalteu, 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), trifetilfosfina (TEPP), paroxon (*O,O* dietil-*O*-paranitrofenol fosfato), butil-hidroxi-tolueno (BHT), bicarbonato de sódio, ácido tiobarbitúrico (TBA), albumina sérica bovina, ácido 5,5-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB), glutationa reduzida (GSH), acetato de fenila, dihidrocumarina (DHC), glicina, soluções ácido fórmico, ácido acético e *n*-butanol grau HPLC, fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), β-nicotinamida adenina dinucleotídeo 2-fosfato reduzido (NADH), ácido tricloroacético (TCA), glutationa redutase, 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), epinefrina, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido caféico, ácido 4,5-dicafeoilquinico, ácido ursólico, epicatequina, epigallocatequina, catequina, epigallocatequina galato, teobromina e cafeína.

Ácido acético, etanol, acetato de sódio e cloreto férrico foram obtidos da empresa Labsynth (Diadema, SP) e acetonitrila e metanol, grau HPLC, foram comprados da empresa Tedia Co. (Phoenix, AZ, Estados Unidos). Vanilina, persulfato de potássio, metanol, alaranjado de xilenol, sulfato de ferro II e amônio, cloreto de magnésio ($MgCl_2$), hidróxido de sódio, ácido clorídrico, butanol, clorofórmio, ácido ortofosfórico, ácido metafosfórico, peróxido de hidrogênio e fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) foram adquiridos da empresa VETEC (Rio de Janeiro, RJ); ácido perclórico, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), hidroperóxido de tert-butil, ácido sulfúrico (H_2SO_4), cloreto de cálcio ($CaCl_2$), acetato de etila, TRIS, azida sódica, cianeto de potássio, citrato de sódio, cianeto de potássio, heparina sódica, corante *coumassie blue*, fosfato de sódio monobásico ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e os demais reagentes foram adquiridos de outras marcas nacionais. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q Direct-Q 3 UV-R, Millipore - Billerica, MA, Estados Unidos), com sais de pureza analítica.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação dos extratos secos de erva-mate

O extrato seco de erva-mate verde foi obtido a partir do extrato aquoso de erva-mate verde (tipo chimarrão), o qual foi preparado pela adição de água quente (aproximadamente 90 °C) sobre folhas secas e moídas de *Ilex paraguariensis* comercial na proporção de 1,0 kg/14,0 L. Após 4 h de extração, a solução foi filtrada em tamis de malha 60 mesh e concentrada em temperatura controlada. O extrato aquoso foi nebulizado em torre de secagem *Spray Dryer* por atomização (Niro Production Minor Atomizer - GEA, Copenhague, Dinamarca), usando as seguintes condições de operação: temperatura interna de 175-180 °C e temperatura externa de 80-85 °C. O extrato seco de erva-mate tostada possui patente industrial e a sua produção não foi fornecida pela empresa Leão Júnior.

3.2.2 Preparação das cápsulas com extrato seco de erva-mate

Os resíduos sólidos de erva-mate verde e tostada (extratos secos nebulizados) foram encapsulados em cápsulas opacas, número 00, na empresa Phytomare, de Florianópolis-SC. Cada cápsula continha 250

mg e 300 mg de resíduo sólido de erva-mate verde e tostada, respectivamente, equivalente a aproximadamente 15 e 65 mL de infusão de erva-mate (tipo chimarrão) e mate solúvel, respectivamente, conforme proporção normalmente usada pela população. As cápsulas foram consumidas inteiras pelos participantes do estudo, com auxílio de água, apenas.

3.2.3 Caracterização do extrato seco de erva-mate

3.2.3.1 Preparação dos extratos aquosos de erva-mate

Os extratos secos de erva-mate, verde ou tostada, contidos nas cápsulas foram resuspenso em água deionizada, na proporção de 5,0 mg/mL para a erva mate verde e 4,6 mg/mL para a erva mate tostada. Estas concentrações correspondem à máxima solubilidade em água.

3.2.3.2 Quantificação dos Fenóis Totais

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

3.2.3.3 Quantificação da Capacidade Antioxidante Total

A capacidade antioxidante dos extratos aquosos de erva-mate foi verificada por meio de dois métodos, FRAP (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Potential*) e TEAC (do inglês, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) (BENZIE; STRAIN, 1996, PELLEGRINI et al.,

2001). Todas as análises foram realizadas em triplicata de três amostras de extratos de erva-mate verde ou tostada.

3.2.3.3.1 FRAP

O ensaio FRAP baseia-se no potencial redutor férrico de compostos antioxidantes presentes no extrato. Os antioxidantes reduzem o Fe^{+3} a Fe^{+2} , o qual é quelado pela 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ, com absorção máxima em 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996). Resumidamente, 10 μL de extrato aquoso de erva-mate foram adicionadas a 1 mL da solução de trabalho, que contém cloreto férrico (FeCl_3), TPTZ e tampão acetato de sódio. A mistura foi incubada por 15 min a 37 °C e, posteriormente, realizou-se a leitura da absorbância do produto colorido em 593 nm em espectrofotômetro semi-automatizado (Bioplus BIO 2000 – Barueri, SP). A concentração da capacidade antioxidante foi calculada a partir da curva padrão preparada com diferentes concentrações de Trolox ($y = 0,00042x + 0,00748$, $r^2 = 0,99975$), um análogo hidrossolúvel da vitamina E, e os resultados foram expressos em mmol/g equivalentes Trolox.

3.2.3.3.2 TEAC

O método conhecido por TEAC e descrito por Pellegrini et al. (2001), baseia-se na habilidade dos antioxidantes presentes no extrato de erva-mate sequestrarem o cátion radical estável ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), um cromóforo azul-esverdeado com absorção máxima em 734 nm. A solução ABTS 7,0 mM, preparada em persulfato de potássio 2,45 mM, foi diluída em água para fornecer absorbância de aproximadamente 0,70 em 734 nm. A concentração da capacidade antioxidante foi calculada a partir da curva padrão preparada com diferentes concentrações de Trolox ($y = 0,12538x + 0,66048$, $r^2 = 0,99657$).

Após a adição de alíquotas dos extratos aquosos de erva-mate ou de Trolox em 1 mL da solução de ABTS diluída, a absorbância foi medida imediatamente após homogeneização, a 30 °C, em espectrofotômetro semi-automatizado (Bioplus BIO 2000 – Barueri, SP). Os resultados foram expressos em mmol/g equivalentes Trolox.

3.2.3.3.3 Quantificação de Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos nos extratos aquosos de erva-mate foram quantificados de acordo com metodologia descrita por Strassmann et al. (2008) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em equipamento com injetor manual, conectado ao degaseificador DGU 20A5 com integrador CBM 20A e detector UV-Visível DAD SPD-M20A (Schimadzu, Kyoto, Japan). As separações cromatográficas foram realizadas em coluna de fase reversa Shimpack C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e pré-coluna Shimpack C₁₈ (4 mm x 10 mm, 5µm). A fase móvel isocrática foi constituída de água/ácido acético/*n*-butanol (97,0:0,28:2,72; v/v/v), e foi utilizado fluxo de 0,8 mL/min. Para a determinação dos compostos fenólicos, os extratos aquosos de mate foram centrifugados (2.300 g, 10 min), filtrados (0,45 µm), diluídos e alíquotas foram injetadas na coluna termostatisada a 40 °C, com detecção em 280 e 325 nm. As soluções padrão de ácido clorogênico, ácido gálico, ácido caféico e ácido 4,5-dicafeoilquínico foram preparadas usando metanol como solvente. A identificação e determinação quantitativa basearam-se no método de padrões externos por comparação com o tempo de retenção dos compostos fenólicos puros. Foram obtidas as seguintes curvas de calibração com diferentes concentrações dos padrões: ácido clorogênico (6,25, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL; $y = 28886,7x - 109,41$, $r^2 = 0,9967$), ácido gálico (10, 20, 40, 60, 80 µg/mL; $y = 9836,37x - 32,59$, $r^2 = 0,9919$), ácido caféico (1,25, 2,5, 5, 10, 20 µg/mL; $y = 56919,67x - 14,317$, $r^2 = 0,9989$) e ácido 4,5-dicafeoilquínico (10, 20, 40, 80, 100 µg/mL; $y = 48476,5x - 242,92$, $r^2 = 0,9960$). Para todas as análises, a concentração dos compostos fenólicos foi calculada utilizando-se a média dos resultados de três amostras em triplicata.

3.2.3.4 Quantificação das Saponinas Totais

A quantificação das saponinas totais foi realizada por método espectrofotométrico, conforme extração descrita por Gnoatto, Schenkel e Bassani (2005) e reação com vanilina e ácido perclórico descrita por Fan e He (2006). As saponinas contidas em 10 mL dos extratos aquosos de mate verde ou tostado foram submetidas à hidrólise com 5 mL de HCl 12 N, durante 2 h sob refluxo. As sapogeninas foram extraídas com 6 mL de clorofórmio, em processo repetido por quatro vezes. As frações

clorofórmicas foram combinadas e evaporadas em evaporador rotativo e o resíduo foi resuspenso em 10 mL de etanol. Para a quantificação, alíquotas da solução etanólica foram evaporadas e 150 µL de vanilina a 5%, preparada em ácido acético glacial, e 500 µL de ácido perclórico foram adicionados sobre o resíduo seco. A mistura foi incubada a 60 °C por 45 min. Após resfriamento em banho de gelo, acrescentou-se ácido acético glacial e a absorbância foi lida em 548 nm (espectrofotômetro Spectrum SP2000 – Xangai, China). Como padrão, utilizou-se o ácido ursólico ($y = 0,000671106x - 0,02896$, $r^2 = 0,99841$), núcleo triterpênico majoritário das saponinas de *Ilex paraguariensis*, e os resultados foram expressos em mg/g equivalentes ácido ursólico.

3.2.3.5 Determinação de Metilxantinas

As metilxantinas presentes nos extratos aquosos de erva-mate foram quantificadas de acordo com metodologia descrita por Reginatto et al. (1999), por CLAE, em equipamento com injetor manual, conectado ao degaseificador DGU 20A 5 com integrador CBM 20A, detector UV-Visível DAD SPD-M20A, bomba LC-20AD, controlado pelo software LC Solution 1.2 (Schimadzu, Kyoto, Japan). A separação cromatográfica foi realizada usando coluna de fase reversa Tosoh C₈ (4,6 mm diâmetro x 150 mm comprimento, 5 µm). Para a determinação de cafeína e teobromina, as soluções foram centrifugadas (2.300 x g, 10 min), filtradas (0,45 µm), diluídas e alíquotas foram injetadas na coluna, com detecção em 280 nm à temperatura ambiente. A fase móvel isocrática foi constituída de metanol/água (25:75, v/v), e foi utilizado fluxo de 0,5 mL/min. As soluções padrão de cafeína e teobromina foram preparadas usando a fase móvel como solvente. A identificação e determinação quantitativa foram realizadas usando o tempo de retenção e as concentrações das curvas de calibração dos padrões de cafeína (6,25, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL; $y = 101148,0x + 156,815$, $r^2 = 0,9985$) e teobromina (6,25, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL; $y = 108644,0x + 100,23$, $r^2 = 0,9994$). Para todas as análises, a concentração de metilxantinas foi calculada utilizando-se a média dos resultados de três amostras em triplicata.

3.2.3.6 Determinação de Catequinas

A determinação de catequina, epigalocatequina e epigalocatequina galato foi realizada por CLAE, em equipamento com

injetor manual, conectado ao degaseificador DGU 20A5 com integrador CBM 20A, bomba LC-20AD, detector UV-Visível DAD SPD-M20A (Shimadzu, Kyoto, Japan). As separações cromatográficas foram realizadas em coluna de fase reversa Shimpack C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e pré-coluna Shimpack C₁₈ (4 mm x 10 mm, 5µm). As fases móveis consistiram de água/ácido fórmico (99,7:0,3 v/v) (Fase A) e metanol/ácido fórmico (99,7:0,3 v/v) (Fase B). O gradiente foi iniciado com 70-50% da fase A em 10 min e 50-30% da fase A em 20 min, em gradiente linear. O fluxo foi de 1,0 mL/min e o volume de amostra injetado foi de 20 µL. Para a determinação de catequinas, as soluções foram centrifugadas (2.300 g, 10 min), filtradas (0,45 µm), diluídas e alíquotas foram injetadas na coluna, com detecção em 280 nm, à temperatura ambiente, conforme descrito por Pereira et al. (2012). Para a identificação e quantificação dos compostos foram utilizadas soluções padrão de catequina (3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 µg/mL; $y = 21136,80x + 265,92$, $r^2 = 0,9995$), epigalocatequina galato (6,25, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL; $y = 43111,2x + 16,587$, $r^2 = 0,9996$) e epigalocatequina (12,5, 25, 50, 100, 200 µg/mL; $y = 5540,64x + 12,50$, $r^2 = 0,9984$).

3.2.3.7 Identificação de Catequinas por Espectrometria de Massas

Para a confirmação da presença de catequinas nos extratos de erva-mate em estudo, foi feita análise qualitativa com Cromatógrafo Líquido Ultra Rápido (do inglês *Ultra Fast Liquid Chromatography* – UFLC) Prominence conectado ao degaseificador DGU 20A3, com integrador CBM 20A, bomba LC-20AD, injetor automático SIL-AC HT, detector UV-Visível DAD SPD-M20A (Shimadzu, Kyoto, Japan). acoplada em espectrometria de massas, utilizando espectrômetro de massa MicrOTOF – QII (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), equipado com bomba de seringa automática (KD *Scientific* – Holliston, MA, Estados Unidos) para injeção de amostra. Foram utilizadas as mesmas condições que para a CLAE apenas diferindo no gradiente de eluição, o qual foi iniciado com 70-50% da fase A em 20 min e 50-30% da fase A em 40 min, em gradiente linear e fluxo de 0,5 mL/min. Utilizou-se os padrões de catequina, epicatequina, epigalocatequina e epigalocatequina galato para as análises qualitativas.

O espectrômetro de massa, manteve-se com fonte e temperatura de dessolvatação em 180°C. A voltagem do capilar e de colisão foi de 4500 V e 150 Vpp, respectivamente. As amostras foram injetadas utilizando constante caudal de 3µL/minuto. O solvente utilizado foi

mistura de acetonitrila e metanol. O espectro de massa foi adquirido no modo íon positivo ($[M+H]^+$). O monitoramento de íons seletivos foi usado para detectar fragmentos de íons específicos. Espectros de massa foram feitos para íons moleculares de (+)-catequina (m/z 291), (-)-epicatequina (m/z 291), (-)-epigalocatequina galato (m/z 459), (-)-epigalocatequina (m/z 307) e fragmentos de íons característicos. Foi feita calibração de busca de massas de 50 m/z a 3000 m/z , utilizando calibração interna (Agilent Technologies, Waldrom, Alemanha). Os dados foram processados através de software Bruker *Data Analysis* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) versão 4.0.

3.3 Caracterização dos Estudos *In Vivo*

O presente estudo caracterizou-se como ensaio clínico, randomizado, controlado com placebo, cego e de intervenção e teve duração de 60 dias. O estudo foi dividido em:

i) Estudo toxicológico clínico agudo com a ingestão de três cápsulas de extrato seco de erva-mate verde, por indivíduos saudáveis, três vezes ao dia, por sete dias consecutivos;

ii) Estudo toxicológico crônico, com a ingestão de três cápsulas de extrato seco de erva-mate verde, por indivíduos saudáveis, três vezes ao dia, durante oito semanas;

iii) Estudo hipocolesterolêmico e antioxidante em indivíduos dislipidêmicos (DLP) com a ingestão de três cápsulas de extrato seco de erva-mate verde, tostada ou amido (placebo) três vezes ao dia, durante oito semanas;

iv) Estudo hipocolesterolêmico e antioxidante em indivíduos hipercolesterolêmicos, usuários de estatina (HCE), com a ingestão de três cápsulas de extrato seco de erva-mate verde ou amido (placebo), três vezes ao dia, durante oito semanas.

Os estudos toxicológicos foram realizados apenas com as cápsulas de erva-mate verde, pois o extrato nebulizado de erva-mate tostada já existe no mercado (mate solúvel[®]), sendo normalmente consumido pela população.

O estudo hipocolesterolêmico e antioxidante foi realizado somente após a confirmação da ausência de toxicidade das cápsulas de erva-mate verde de acordo com os resultados dos estudos toxicológicos.

3.4 Procedimentos Éticos da Pesquisa

O estudo foi realizado de acordo com as diretrizes e normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde (CNS/MS), da Declaração de Helsinki (2000) da *World Health Association* e da Resolução 116/1996 (ANVISA, 1996). Os voluntários participaram do estudo somente após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A) e concordância com o protocolo experimental, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos da UFSC (CAAE: 00560512.7.0000.0121) (Apêndice B).

3.5 Amostras dos Estudos

Oitenta e seis potenciais participantes foram recrutados para participar da pesquisa. Destes, seis indivíduos desistiram da participação por motivos particulares. Além disso, três participantes foram excluídos após o início do consumo das cápsulas, sendo que dois destes participantes apresentaram efeitos colaterais, como irritação gástrica e intestinal; e um modificou a posologia da medicação em uso e começou a usar novos medicamentos. Assim, foram incluídos no estudo 77 voluntários, de ambos os sexos, com idade entre 18-60 anos, com normolipidemia ($n = 14$), dislipidemia sem uso de medicamentos hipolipemínicos ($n = 48$) e hipercolesterolemia com uso de medicamentos hipolipemínicos ($n = 15$). Os participantes foram recrutados na comunidade da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), através de enquete, via correio eletrônico, cartazes fixados nos murais do Hospital Universitário (HU) da UFSC, mídia eletrônica de divulgação local e estadual. Para a verificação do estado de saúde, os voluntários responderam a um questionário padrão (Apêndice C) e foram realizados exames laboratoriais bioquímicos e hematológicos de rotina.

Foram utilizados os seguintes critérios de exclusão: obesidade (Índice de Massa Corporal (IMC) $= 30 \text{ kg/m}^2$), presença de doenças hepáticas, renais, gastrointestinais, neoplasias, hipo e hipertireoidismo, diabetes *mellitus*, alcoolismo, tabagismo, mulheres grávidas ou em período de lactação, mulheres em estado pós-menopausa, atletas com atividade física intensa ou, ainda, qualquer anormalidade nos resultados dos exames laboratoriais de rotina que estivessem fora dos valores de referência e que pudessem indicar a presença das desordens acima.

Após o início do estudo, foram excluídos, por sua vez, os voluntários que introduziram ou modificaram o uso de medicamentos ou suplementos, que apresentaram intolerância à erva-mate ou que interromperam a ingestão das cápsulas por três dias consecutivos ou mais. Durante todo o período do estudo, os participantes foram instruídos a manter os seus hábitos regulares de vida, como a prática moderada de exercícios físicos e a alimentação de costume.

De acordo com os valores dos lipídeos séricos, os participantes foram classificados em normolipidêmicos (NLP) ou DLP ($\text{LDL-C} \geq 160$ mg/dL; $\text{TG} \geq 150$ mg/dL; $\text{HDL-C} < 50$ e 40 mg/dL, para mulheres e homens, respectivamente; ou relação $\text{LDL-C}/\text{HDL-C} \geq 2,5$), conforme critérios estabelecidos na IV Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose (SPOSITO et al., 2007).

Os critérios de inclusão para os indivíduos hipercolesterolêmicos em terapia com estatinas foram dose de estatina estável por mais de três meses, $\text{LDL-C} \geq 90$ mg/dL e triglicérides < 300 mg/dL.

3.6 Grupos de estudos

3.6.1 Estudos Toxicológicos Clínicos das Cápsulas de Erva-Mate em Indivíduos Saudáveis

Os estudos foram desenvolvidos em condições médicas controladas com 14 voluntários saudáveis, os quais foram submetidos a exames clínicos e/ou complementares (verificação da pressão arterial e do eletrocardiograma) e exames laboratoriais, segundo a Resolução 116/1996 (ANVISA, 1996).

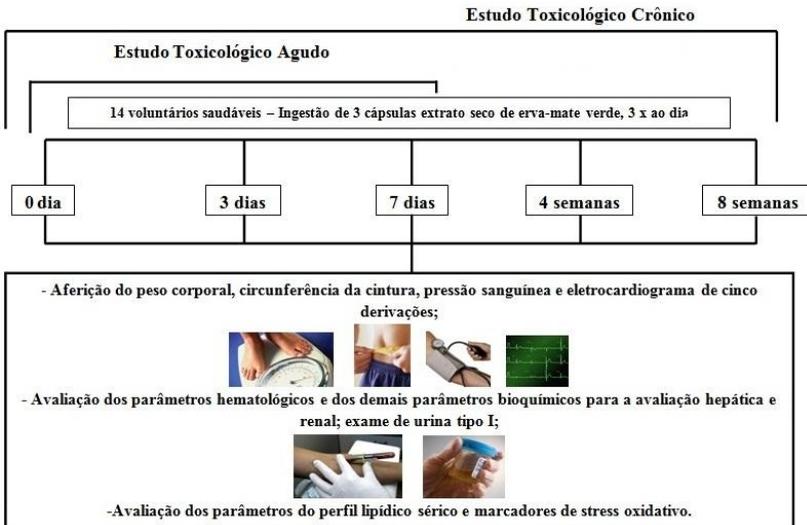
3.6.1.1 Estudo Toxicológico Agudo

Os voluntários consumiram três cápsulas de extrato seco de erva-mate verde, três vezes ao dia, durante sete dias consecutivos. Antes do início do estudo (período basal) e após três e sete dias da ingestão das cápsulas de erva-mate, foram aferidos o peso corporal (Balança Marte® PP180 - Santa Rita do Sapucaí, MG), a circunferência da cintura com fita métrica não extensível e a pressão sanguínea (esfigmomanômetro Embramac – Campinas, SP). A pressão sanguínea foi verificada após o participante permanecer por, pelo menos, 15 min sentado. A altura dos voluntários foi medida somente no início do estudo, para o cálculo do IMC ($\text{peso}/\text{altura}^2$), com o uso de antropômetro (Seca® - Frankfurt,

Alemanha). Foram realizados exame clínico completo e eletrocardiograma de cinco derivações, (Eletrocardiógrafo ECG 6 Ecafix São Paulo, SP), sob a avaliação do Prof. Dr. Tales de Carvalho – UDESC. Além disso, amostras de 20 mL de sangue foram coletadas, através da punção da veia intermédica do antebraço, com sistema a vácuo (Vacutainer-BD, São Paulo, SP), em tubos seco, com ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) para avaliação do hemograma completo e contagem de plaquetas, também foram feitos testes bioquímicos, como glicemia, triglicérides, colesterol total, bilirrubina total e frações, creatinina, ácido úrico, sódio, potássio, enzimas CK, AST, ALT e GGT, e marcadores do estresse oxidativo. Também foram feitos exames de rotina de urina, conhecidos como elementos anormais e sedimentares. Foram fornecidos aos voluntários coletores esterilizados de boca larga e orientações sobre a coleta de urina (primeira urina da manhã, desprezando-se a parte inicial da micção e coletando-se a fração média, após rigorosa higiene).

3.6.1.2 Estudo Toxicológico Crônico

Os mesmos voluntários do estudo agudo ($n = 14$) continuaram a consumir as cápsulas de extrato seco de erva-mate, três vezes ao dia durante oito semanas. Após quatro e oito semanas de ingestão diária, o estado clínico dos voluntários foi avaliado e foram feitas coletas de sangue. Os exames realizados foram os mesmos descritos para o estudo agudo (Esquema 1).



Esquema 1: Protocolo experimental do Estudo Toxicológico em Seres Humanos.

3.6.2 Estudo Hipocolesterolêmico e Antioxidante das Cápsulas de Erva-Mate

Tendo em vista a ausência de toxicidade clínica evidenciada nos estudos toxicológicos agudo e crônico (descrita no item Resultados, abaixo), deu-se prosseguimento aos estudos de avaliação dos efeitos hipocolesterolêmico e antioxidante das cápsulas de erva-mate, segundo organograma (Esquema 2).

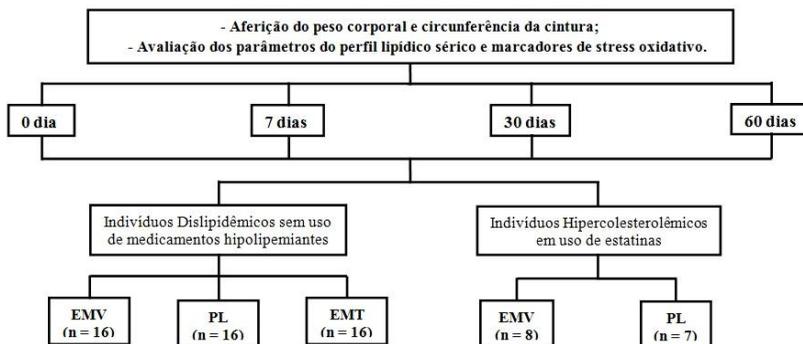
3.6.2.1 Indivíduos com Dislipidemias sem Uso de Hipolipemiantes

Neste estudo, a amostra foi composta por 48 indivíduos com dislipidemia sem uso de medicamentos hipolipemiantes. Os indivíduos DLP foram distribuídos aleatoriamente (Software *Research Randomizer* Versão 3.0, Urbaniak e Plous, 2011) em três grupos: *i*) Cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde (EMV; $n = 16$); *ii*) Cápsulas contendo extrato seco de erva-mate tostada (EMT; $n = 16$) e; *iii*) Cápsulas contendo amido (Placebo) (PL; $n = 16$).

3.6.2.2 Indivíduos com Hipercolesterolemia em Uso de Estatinas

Os indivíduos hipercolesterolêmicos em uso de estatina (HCE) foram distribuídos aleatoriamente (Software *Research Randomizer* Versão 3.0, Urbaniak e Plous, 2011) em dois grupos: *i*) EMV (n = 8) e; *ii*) Placebo (amido) (PL; n = 7).

Todos os participantes receberam dois frascos âmbar e livres de umidade contendo 270 cápsulas de extrato seco de erva-mate verde, tostada ou amido. Sem saber que tipo de cápsulas eles estavam recebendo, os participantes foram instruídos a ingerir as cápsulas inteiras e com água apenas, até 30 min antes, durante ou até 10 min após as três principais refeições diárias, durante 60 dias. A dose de três cápsulas, três vezes ao dia, foi considerada máxima para a ingestão rotineira, sem a perda de adesão ao estudo. Antes e após 7, 30 e 60 dias, foram realizadas coletas sanguíneas, após jejum de 12-14 h, para as determinações bioquímicas do perfil lipídico e dos marcadores do estresse oxidativo. Durante todo o estudo, foi feito monitoramento do peso corporal e da medida da circunferência da cintura dos participantes.



Esquema 2: Protocolo experimental do Estudo Hipocolesterolêmico e Antioxidante em voluntários dislipidêmicos sem uso de medicamentos hipolipemiantes e indivíduos hipercolesterolêmicos usuários de estatinas. Os voluntários fizeram uso de cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, tostada ou amido, três vezes ao dia.

3.7 Avaliação Clínica e Antropométrica

Inicialmente, os participantes responderam a questionário com dados sócio-demográficos, história clínica, história familiar, uso de medicamentos e atividade física. Nos períodos de tempo definidos para as avaliações clínicas e coletas de sangue, os participantes visitaram o laboratório e também foram aferidos os parâmetros antropométricos (peso, altura e circunferência da cintura). Para a aferição do peso corporal, os indivíduos estavam descalços ou usando meias finas e vestindo roupas leves, permanecendo de pé sobre a balança, com os pés unidos, o peso igualmente distribuído em ambos os pés e os braços pendentes ao lado do corpo (OMS, 1995).

Para a aferição da altura, os participantes permaneceram de pé, com os braços pendentes ao lado do corpo, colocando as superfícies posteriores dos calcanhares, as nádegas e a região occipital em contato com a parede. A cabeça posicionada de modo que a linha da visão ficasse perpendicular ao corpo. Posicionou-se a régua até o ponto mais alto da cabeça com uma pressão suficiente para comprimir o cabelo (OMS, 1995). O IMC foi calculado através da razão peso (kg) e altura (m) ao quadrado e classificado de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2000).

A circunferência da cintura foi medida com fita métrica não extensível, com comprimento máximo de 2 m e escala de 0,1 cm. Os indivíduos permaneceram em posição ortostática, posicionados de perfil, com abdômen relaxado, braços descontraídos ao longo do corpo. A medida foi obtida através do posicionamento firme, sem comprimir os tecidos, da fita métrica ao nível da cicatriz umbilical no final do movimento expiratório (CALLAWAY, 1991).

3.8 Análises Bioquímicas

3.8.1 Análise Laboratorial do Perfil Lipídico Sérico

As concentrações séricas de colesterol total (CT) e dos triglicerídeos (TG) foram determinadas pelos métodos automatizados e colorimétricos (reação de Trinder; Labtest, Lagoa Santa-MG), e o HDL-colesterol foi determinado por método homogêneo (Labtest, Lagoa Santa-MG). O LDL-colesterol foi estimado pela equação de Friedewald [$LDL-C = CT - (HDL + TG/5)$] (FRIEDEWALD; LEVY;

FREDRICKSON, 1972) ou quantificado pelo método homogêneo (Labtest, Lagoa Santa-MG) quando o participante apresentava valores de TG igual ou acima de 400 mg/dL. A fração de sd-LDL-c foi determinada por meio do reagente de LDL-c homogêneo (Labtest, Lagoa Santa-MG) após a precipitação seletiva das demais lipoproteínas com heparina e magnésio, conforme procedimento descrito previamente por Hirano et al. (2003) e modificado por Cavalcante e Silva (2012). O controle de qualidade foi realizado com soros controle Siemens Healthcare Diagnostics Moni-Trol níveis 1 e 2 (São Paulo, SP). Foram feitas 30 determinações com os dois níveis de soro controle para os diferentes analitos bioquímicos e os coeficientes de variação (CVs) interensaios encontrados foram inferiores a 6%. Todas as medidas foram realizadas no equipamento automatizado Cobas-Mira Plus[®] (Roche Diagnóstica, Basel, BS, Suíça).

3.8.1.2 Demais Parâmetros Laboratoriais

As concentrações dos parâmetros bioquímicos creatinina (método picrato alcalino por reação de ponto final), glicose (oxidase/peroxidase), ácido úrico (oxidase/peroxidase) e as atividades das enzimas AST, ALT e CK (métodos cinéticos com monitoramento do NADH em 340 nm) e GGT (monitoramento de formação de p-nitroanilina em 405 nm) foram determinadas em equipamento automatizado (Cobas Mira Plus Roche - Basel, Suíça). Os parâmetros hematológicos (hemograma completo) foram avaliados pelos métodos usuais na rotina de laboratório, em equipamentos automatizados (*Wiener Analyzer* - Wiener Laboratórios S.A.I.C. - Rosario, Argentina, e *Sysmex XE-2100D* - Kobe, Japão, respectivamente), segundo as instruções dos fabricantes. Os eletrólitos sódio e potássio foram quantificados utilizando-se eletrodos íons seletivos em equipamento automatizado (Siemens - Newark, NJ, Estados Unidos). As análises de urina foram realizadas em analisador automatizado microfotografia de urina IG 200 IRIS Diagnostics (Los Angeles, CA, Estados Unidos) e Combostik R-700 (Gyung-Nam, Coreia).

3.8.2 Marcadores de Estresse Oxidativo

3.8.2.1 Capacidade Antioxidante do Soro

A capacidade antioxidante sérica foi determinada através do potencial antioxidante redutor férrico de acordo com a técnica descrita por Benzie e Strain (1996). Dez microlitros de soro foram misturados com o reagente de trabalho (FeCl_3 , TPTZ e tampão acetato de sódio) e a mistura foi incubada por 15 min a 37 °C. A absorbância do produto colorido foi lida em 513 nm em espectrofotômetro semi-automatizado (Bioplus BIO 2000 – Barueri, SP) e o trolox foi usado como padrão. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ equivalentes trolox.

3.8.2.2 Hidroperóxidos Lipídicos (LOOH)

Os LOOH presentes no soro foram quantificados pelo método de oxidação do ferro com alaranjado de xilenol, conhecido como método FOX-2 (do inglês, *Ferrous Oxidation in Xylenol Orange, version 2*), conforme descrito por Nourooz-Zadeh et al. (1994). O princípio do método se baseia na rápida oxidação do Fe^{+2} a Fe^{+3} em meio ácido, mediada pelos peróxidos lipídicos. O Fe^{+3} na presença de alaranjado de xilenol forma um complexo (Fe^{+3} -alaranjado de xilenol) que é quantificado em 560 nm (espectrofotômetro Spectrum SP-2000, Xangai, China). Alíquotas de 90 μL de soro foram misturadas com 10 μL de trifetilfosfina 20 mM (TPP), para a redução dos hidroperóxidos lipídicos, ou com 10 μL de metanol. Os tubos foram agitados em agitador tipo vortex e mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 30 min, com agitação a cada 10 min. Após este período, 900 μL de reagente de trabalho FOX2, contendo alaranjado de xilenol 1,0 mM e sulfato de ferro e amônio 2,5 mM, preparados em H_2SO_4 250 mM, e BHT 4,4 mM, foram adicionados aos tubos. Em seguida, os tubos foram agitados em vortex e mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 60 min, com agitações subsequentes a cada 10 min. Após centrifugação (1600 g, 10 min), a absorbância do sobrenadante foi lida em 560 nm contra o branco composto por água deionizada. A concentração de LOOH foi calculada pela diferença entre as absorbâncias das amostras com metanol (hidroperóxidos totais) e com TPP (hidroperóxidos não lipídicos), utilizando-se o peróxido de hidrogênio como padrão. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ equivalentes peróxidos de hidrogênio.

3.8.2.3 Glutationa Reduzida Sanguínea

A GSH, forma majoritária de tióis de baixo peso molecular, foi

quantificada no sangue total de acordo com o método descrito por Beutler, Kelly e Duron (1963). Alíquotas de sangue-EDTA (600 μL) foram submetidas à precipitação com o ácido tricloroacético (TCA) a 20%. Após centrifugação (5000 g, 4 °C, 10 min), 50 μL do sobrenadante foi misturado com 50 μL de ditionitrobenzóiico (DTNB) e 800 μL de tampão fosfato 0,2 M pH 8.0. A absorbância do ânion tiolato, formado após 3 min à temperatura ambiente, foi medida em 412 nm em espectrofotômetro semi-automatizado (Bioplus BIO 2000 – Barueri, SP) contra o branco da reação. A concentração de GSH sanguínea foi calculada utilizando-se GSH comercial como padrão. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$.

3.8.2.4 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação da peroxidação lipídica no plasma foi realizada através da detecção dos derivados dos produtos de oxidação, substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, destacando-se o malondialdeído (MDA), conforme procedimento descrito previamente por Esterbauer e Cheeseman (1990). Alíquotas de 250 μL de plasma-EDTA foram misturadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético 20% em HCl 0,5 N e com 50 μL de BHT 10 mM. Ácido tiobarbitúrico 1,0% (500 μL), recém-preparado, foi adicionado e a mistura foi incubada a 100 °C, por 60 min. Após resfriamento em água com gelo, adicionou-se 1,5 mL de butanol, os tubos foram agitados em vortex por 30 s e centrifugados a 1000 g por 5 min. As absorbâncias do sobrenadante foram lidas em 532 nm (espectrofotômetro Spectrum SP-2000, Xangai, China). Como padrão de MDA foi usado o 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) recentemente preparado. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ equivalentes TMP.

3.8.2.5 Atividade das Enzimas Antioxidantes em Eritrócitos

A atividade das enzimas antioxidantes catalase, SOD e GPx foram quantificadas em eritrócitos. Alíquotas de sangue (1 mL) foram centrifugadas (700 g, 4 °C, 10 min) e as hemácias foram separadas do plasma. Às hemácias foi adicionado igual volume de solução fisiológica, os tubos foram homogeneizados e centrifugados (700 g, 4°C, 10 min). Este procedimento foi repetido por três vezes. Em seguida, 100 μL de eritrócitos foram misturados com 1 mL de solução hemolizante (sulfato de magnésio 4 nM e ácido acético 1 nM) e o

hemolizado foi armazenado por no máximo 10 dias a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para as análises. Para a medida da atividade da SOD, alíquotas do hemolisado foram misturadas com solução de clorofórmio:etanol (3:5, v/v) e água deionizada, na proporção de 1:3:1 (v/v/v). Após centrifugação (700 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 min), 200 μL do sobrenadante foram removidos e misturados com 600 μL de clorofórmio:etanol (3:5) e com 200 μL de água deionizada. A mistura foi novamente centrifugada e o sobrenadante límpido foi usado para a medida da atividade da SOD (McCORD; FRIDOVICH, 1969).

3.8.2.5.1 Medida da Atividade da Catalase

A atividade da catalase foi quantificada através do monitoramento da decomposição do H_2O_2 durante 2 min em 240 nm (AEBI, 1984). O sistema de reação continha 955 μL de tampão fosfato 50 mM pH 7,0, 35 μL de H_2O_2 0,3 M e 10 μL de amostra. Uma unidade de catalase equivale à quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de substrato por minuto e por miligrama de proteína de eritrócitos. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

3.8.2.5.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada com base na inibição da reação do radical superóxido com adrenalina (BOVERIS et al., 1983). A oxidação da adrenalina leva à formação de produto colorido, o adenocromo, detectado espectrofotometricamente. A atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do adenocromo em 480 nm, em meio de reação contendo glicina-NaOH e adrenalina. Uma unidade de enzima equivale à quantidade de enzima que inibe em 50% a oxidação da adrenalina por minuto e por miligrama de proteína. Os resultados foram expressos em Unidade SOD/mg de proteína.

3.8.2.5.3 Medida da Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada pelo método de Wendel (1981) que utiliza o peróxido de *tert*-butila como substrato da reação, ocorrendo a oxidação da GSH pela GPx e gerando GSSG, a qual é convertida em GSH pela glutathiona redutase, consumindo nessa reação uma molécula de NADPH. A cinética da reação foi acompanhada em 340 nm e para o cálculo da atividade foi utilizado o coeficiente de

absortividade molar do NAPH em 340 nm, $6,22 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Uma unidade de GPx equivale à quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de substrato por minuto por mg de proteína. Os resultados foram expressos em mU/mg de proteína.

3.8.2.5.4 Determinação das Proteínas Totais nos Eritrócitos

As proteínas totais foram determinadas segundo o método de Bradford (1976), utilizando a albumina bovina como padrão. Alíquotas dos hemolisados (50 μL) foram adicionados em 2 mL de azul de Coomassie e mantidas em ambiente escuro, à temperatura ambiente, por 5 min e a leitura da absorbância foi realizada em 595 nm (Spectrum SP-2000, Xangai, China).

3.8.2.6 Medida da Atividade Sérica da Enzima Antioxidante Paroxonase-1 (PON-1)

A atividade da enzima PON1 foi avaliada por meio de reações com três diferentes substratos, os quais geram as terminologias de atividade lactonase, arilesterase e paroxonase.

A atividade lactonase da PON-1 foi determinada de acordo com o método descrito por Rock et al. (2008). A reação foi iniciada com a adição de 60 μL de soro diluído 10 vezes em 1,0 mL de tampão Tris HCl 50 mmol/L, pH 8,0, contendo CaCl_2 1 mmol/L e dihidrocoumarina (DHC) 1 mmol/L, usado como substrato. A reação de hidrólise foi monitorada com leituras a cada minuto durante três minutos, em comprimento de onda de 270 nm, a 25 °C. Para corrigir a hidrólise espontânea da DHC foi incluído um branco da reação. Para o cálculo da atividade, considerou-se o coeficiente de absortividade molar de $1,29 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em U/mL, sendo que uma unidade arilesterase corresponde a 1 μmol de DHC hidrolisada por minuto, por mL de soro (Spectrum SP-2000, Xangai, China).

A atividade arilesterase da PON-1 foi determinada de acordo com o método descrito por Gan et al. (1991). A reação foi iniciada com a adição de 20 μL de soro diluído 20 vezes em 2,0 mL de tampão Tris HCl 20 mmol/L, pH 8,0, contendo CaCl_2 1 mmol/L e acetato de fenila 1 mmol/L, usado como substrato. A cinética da reação de formação do fenol foi monitorada com leituras a cada minuto durante três min, em comprimento de onda de 270 nm, a 25 °C. Para corrigir a hidrólise espontânea do acetato de fenila foi incluído um branco da reação. Para o

cálculo da atividade, considerou-se o coeficiente de absorvidade molar de $1,31 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em U/mL, sendo que uma unidade arilesterase corresponde a 1 μmol de acetato de fenila hidrolisado por minuto, por mL de soro (Spectrum SP-2000, Xangai, China).

A atividade paroxonase da PON-1 foi determinada conforme metodologia descrita por Senti et al. (2003). A reação foi iniciada com a adição de 18 μL de soro, em 150 μL de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,05, contendo CaCl_2 2 mmol/L e paroxon 1,1 mmol/L, usado como substrato. A reação de hidrólise foi monitorada por três min, a 37 °C, com leituras a cada minuto, em 405 nm, em equipamento automatizado Cobas-Mira Plus® (Roche Diagnósticos, Basel, BS, Suíça). Para o cálculo da atividade, foi considerado o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do paroxon em 405 nm de $18,05 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. O resultado foi expresso em U/mL, sendo que uma unidade de atividade paroxonase é equivalente à hidrólise de 1 μmol de paroxon por mililitro de soro, por minuto.

3.9 Análise Estatística

A estatística descritiva foi apresentada na forma de média e desvio-padrão ou erro-padrão. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2). Os testes de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov foram aplicados para avaliar a normalidade das variáveis contínuas. Quando necessário, utilizou-se a transformação logarítmica dos dados. Aos dados com distribuição gaussiana aplicou-se a análise de variância (ANOVA) para Medidas Repetidas e teste complementar de Tukey, ou teste t pareado de Student, para verificar o efeito temporal da ingestão das cápsulas com extratos secos de erva-mate verde ou tostada e grupo controle (análise intragrupos). Para os dados que apresentaram distribuição não gaussiana, foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman (*Repeated Measures ANOVA on Ranks*), para as comparações intra-grupos. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela ANOVA e teste complementar de Tukey ou por meio do teste de Kruskal-Wallis, para dados paramétricos ou não paramétricos, respectivamente. Para a avaliação das diferenças entre os constituintes químicos e a capacidade antioxidante da erva-mate verde e da erva-mate tostada *in vitro*, utilizou-se o teste t de Student. Foi considerado um nível de significância menor que 5% e todas as análises foram

realizadas no software *SigmaPlot* 12.0 (Systat Software Inc. (SSI), San Jose, Califórnia, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS SECOS DE ERVA-MATE

4.1.1 Teor de Saponinas, Fenóis Totais e Medidas da Capacidade Antioxidante Total

O teor de saponinas e fenóis totais totais e a atividade antioxidante dos extratos secos de erva-mate utilizados em nosso estudo foram avaliados em ensaios *in vitro* (Tabela 1). Como pode ser observado, o EMV apresentou concentração maior de saponinas totais e fenóis totais em relação ao EMT, correspondendo a 36 e 10%, em média, respectivamente ($P < 0,05$). No entanto, em virtude das características físicas dos extratos nebulizados, as cápsulas com EMT possuíam maior quantidade de extrato, cerca de 300 mg por cápsula, enquanto as cápsulas com EMV continham 250 mg de extrato. Assim, apesar de o EMV apresentar maior teor de constituintes em relação ao EMT, não houve diferença significativa na quantidade de saponinas totais por cápsula ou, inclusive, as cápsulas de EMT apresentaram maior quantidade de fenóis totais do que as cápsulas de EMV ($P < 0,05$). Resultados semelhantes foram observados para a capacidade antioxidante total. Estes resultados estão de acordo com estudo prévio de nosso laboratório, demonstrando também a estabilidade química desses componentes em estudo de longa duração (ANDRADE, 2011).

Tabela 1 – Teor de saponinas, fenóis totais e medidas da capacidade antioxidante total (FRAP e TEAC) nos extratos secos de erva-mate verde e tostada em cápsulas.

	Extrato Seco de Erva-Mate			
	Verde		Tostada	
	mg/g	mg/cápsula	mg/g	mg/cápsula
Saponinas				
Totais	33,1 ± 3,0*	7,8 ± 0,7	20,9 ± 3,0	6,3 ± 0,9
Fenóis				
Totais	309,3 ± 6,5*	73,9 ± 1,5*	278,6 ± 8,7	83,6 ± 2,8
	mmol/g	mol/cápsula	mmol/g	mol/cápsula
FRAP	1,79 ± 0,05	0,43 ± 0,01*	1,70 ± 0,06	0,51 ± 0,02
TEAC	0,97 ± 0,08	0,23 ± 0,02	0,74 ± 0,03	0,22 ± 0,01

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão. FRAP = *Ferric Reducing Antioxidant Potential*; TEAC = *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*. Ensaios colorimétricos realizados com três amostras em triplicata; * $P < 0,05$ comparado ao extrato de erva-mate tostada (teste *t* de Student).

4.1.2 Caracterização dos Compostos Fenólicos por CLAE

A tabela 2 e as figuras 6 e 7 mostram os resultados da caracterização dos compostos fenólicos nos extratos secos de erva-mate verde e tostada. O principal composto fenólico encontrado nos extratos foi o ácido clorogênico, correspondendo a cerca de 40% dos compostos fenólicos totais para o EMV e 30% para o EMT ($P < 0,05$), seguido dos ácidos gálico e 4,5-dicafeoilquínico, os quais também estão presentes em maior concentração no EMV. Porém, concentração similar de ácido cafeico foi observada em ambos os extratos. A concentração dos compostos fenólicos foi semelhante em ambas as cápsulas de EMV e EMT (Tabela 2).

Infusões de erva-mate possuem ampla quantidade de compostos fenólicos, especialmente o ácido clorogênico, o qual tem sido extensivamente estudado devido a sua capacidade antioxidante (revisado por BASTOS et al., 2007a; HECK; de MEJIA, 2007). O mate tostado apresenta, essencialmente, os mesmos componentes da erva-mate verde (revisado por BASTOS et al., 2007a). Assim, nossos resultados também demonstraram constituintes semelhantes nos extratos secos de erva-mate verde e tostada. Além disso, estudos de longa e curta duração demonstraram que estes compostos são quimicamente estáveis em

cápsulas (ANDRADE, 2011 - Dissertação). De fato, polifenóis encapsulados apresentaram maior estabilidade química e biodisponibilidade dos compostos *in vitro* e *in vivo* (FANG; BHANDARI, 2010). Além disso, o extrato seco de erva-mate apresentou maior concentração de ácidos fenólicos quando comparado às folhas desidratadas de erva-mate (BERTÉ et al., 2011).

Tabela 2 – Concentração de compostos fenólicos nos extratos secos de erva-mate verde e tostada em cápsulas.

Ácidos Fenólicos	Extrato Seco de Erva-Mate			
	Verde		Tostada	
	mg/g	mg/cápsula	mg/g	mg/cápsula
Clorogênico	123,5 ± 7,8*	29,5 ± 1,8	93,0 ± 6,2	27,9 ± 1,9
Gálico	28,7 ± 1,7*	7,1 ± 0,4	25,4 ± 0,3	7,6 ± 0,1
4,5-Dicafeoil- quínico	27,7 ± 1,6*	7,0 ± 0,4	22,0 ± 1,5	6,6 ± 0,5
Caféico	2,4 ± 0,2	0,63 ± 0,05	2,1 ± 0,17	0,68 ± 0,05

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão. Ensaios realizados por CLAE com três amostras em triplicata; * $P < 0,05$ comparado ao extrato seco de erva-mate tostada (teste *t* de Student).

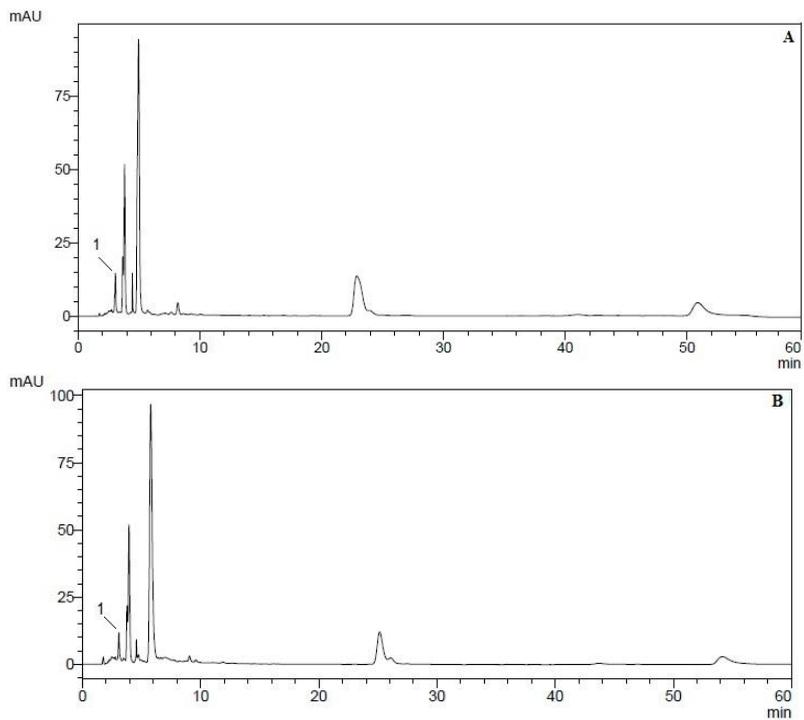


Figura 6. Cromatogramas representativos do perfil de ácidos fenólicos dos extratos secos de erva-mate verde (A) e tostada (B) em 280 nm obtidos em CLAE. Pico (1) = ácido gálico.

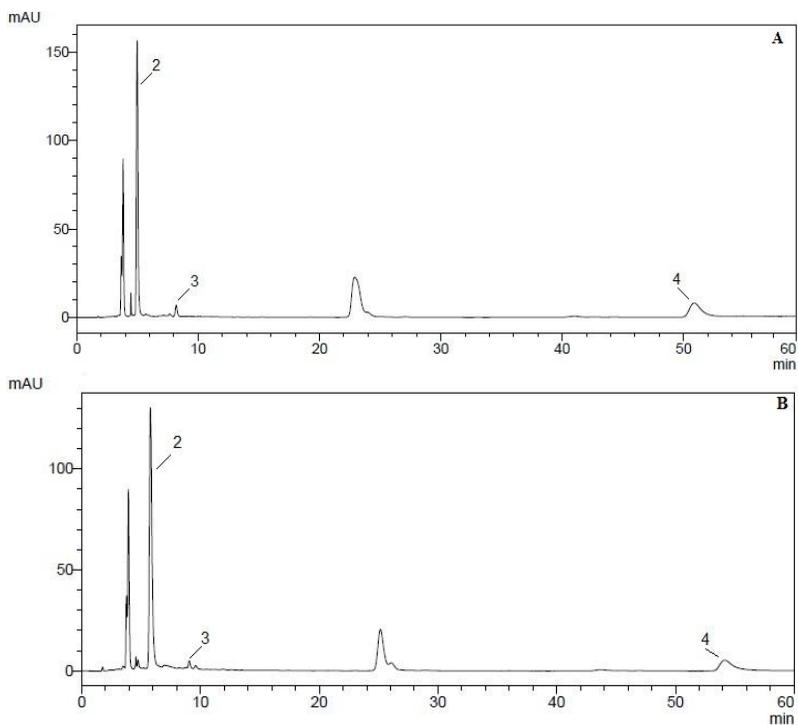
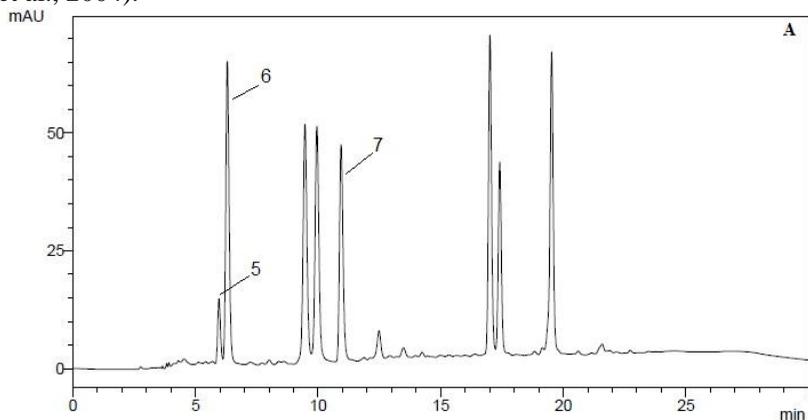


Figura 7. Cromatogramas representativos do perfil de ácidos fenólicos dos extratos secos de erva-mate verde (A) e tostada (B) em 325 nm obtidos em CLAE. Picos: (2) ácido clorogênico; (3) ácido caféico; (4) ácido 4,5-dicafeoilquínico.

4.1.3 Caracterização de Catequinas por CLAE

A metodologia utilizada no presente estudo para a caracterização das catequinas foi originalmente descrita por Matsubara e Rodriguez-Amaya (2006a) e, posteriormente, usada por Pereira et al. (2012) para a quantificação de catequinas em infusões de erva-mate verde e tostada. Os cromatogramas representados na Figura 8 mostram os picos possivelmente correspondentes às catequinas que foram identificados de acordo com os tempos de retenção de seus respectivos padrões, representando assim, catequina, epigalocatequina e epigalocatequina galato. Porém muitos trabalhos relatam a ausência de catequinas em extrato de erva-mate (revisado por HECK; de MEJIA, 2007; revisado por BASTOS et al., 2007a; BASTOS et al., 2007b; MATSUBARA e AMAYA, 2006b). Portanto, para a confirmação da presença de catequinas, foi utilizada a cromatografia líquida, com detector UV-Visível DAD, associada à espectrometria de massa (HPLC-DAD-EM), pois esta metodologia confere alta sensibilidade às catequinas, mesmo quando presentes em baixas concentrações (PELILLO et al., 2004; POON, 1998; WANG et al., 2008). Estes resultados estão mostrados na seção 4.1.5. Em geral, a detecção e quantificação de catequinas não podem ser feitas apenas por análise cromatográfica em UV-Visível, utilizando espectros individuais e baseados em tempos de retenção comparados aos padrões, tendo em vista a presença de outros compostos fenólicos no extrato de erva-mate com espectro similar (NISHITANI; SAGESAKA, 2004; YAO et al., 2004).



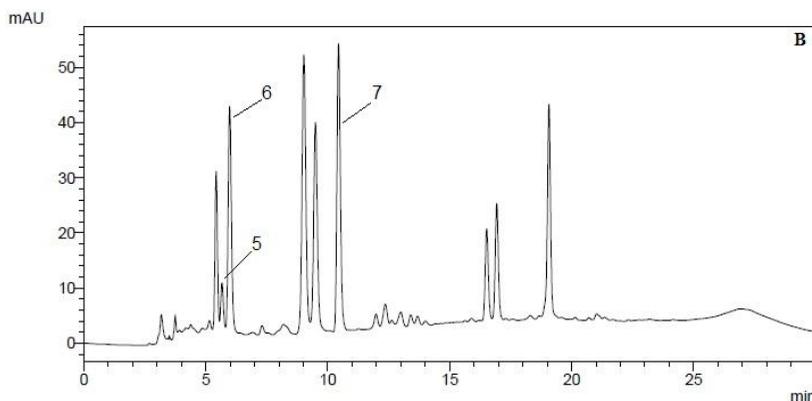


Figura 8. Cromatogramas representativos do perfil de catequinas dos extratos secos de erva-mate verde (A) e tostada (B) em 280 nm obtidos em CLAE. Picos: (5) catequina; (6) epigallocatequina; (7) epigallocatequina galato.

4.1.4 Caracterização de Metilxantinas por CLAE

A tabela 3 e figura 9 mostram os resultados da caracterização das metilxantinas nos extratos secos de erva-mate verde e tostada. O principal alcaloide purínico encontrado nos extratos foi a cafeína, sendo que no EMV esta esteve presente em concentração 15% superior àquela encontrada no EMT ($P < 0,05$). Conforme Bastos et al. (2006), o teor de metilxantinas aumenta após estágios de secagem de folhas de mate. Este fato pode provocar diferenças nos resultados de processamentos tecnológicos avaliando especialmente o tempo e a temperatura de exposição das folhas e a metodologia de extração. Ainda neste contexto, segundo Oliveira et al. (2006), sob o ponto de vista tecnológico sabe-se que, em geral, extratos aquosos de plantas medicinais exibem baixa estabilidade química. No entanto, os extratos secos de erva-mate utilizados no presente estudo são estáveis para metilxantinas, conforme demonstrado anteriormente em estudo de longa duração (Andrade, 2011).

Cápsulas de suplementos dietéticos, contendo extratos vegetais, apresentam alto teor de cafeína, principalmente com associações de extratos de erva-mate e chá verde (ANDREWS et al., 2007). O segundo alcaloide encontrado foi a teobromina com concentrações semelhantes em ambos os extratos secos de erva-mate. A teofilina não foi detectada nos extratos secos de erva-mate analisados.

Tabela 3 – Concentração de metilxantinas nos extratos secos de erva-mate verde e tostada em cápsulas.

	Extrato Seco de Erva-Mate			
	Verde		Tostada	
	mg/g	mg/cápsula	mg/g	mg/cápsula
Cafeína	16,0 ± 0,62*	3,6 ± 0,14	13,6 ± 0,11	4,2 ± 0,03
Teobromina	2,7 ± 0,07	0,64 ± 0,02	2,32 ± 0,34	0,70 ± 0,10

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão. Ensaios realizados por CLAE com três amostras em triplicata; * $P < 0,05$ comparado ao extrato seco de erva-mate tostada (mg/g) (teste t de Student).

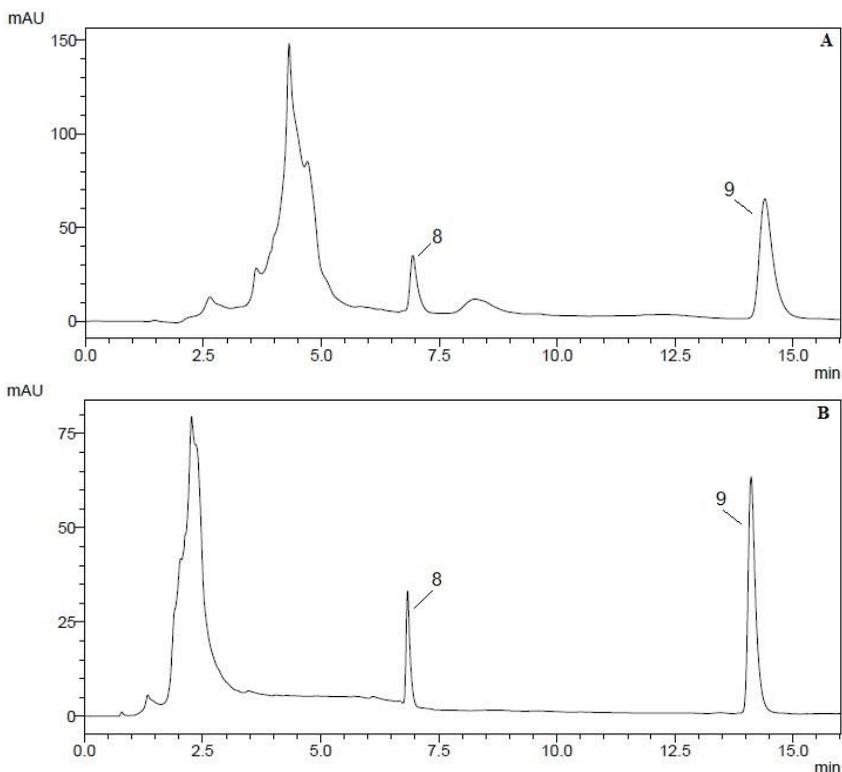


Figura 9. Cromatograma representativo de metilxantinas nos extratos secos de erva-mate verde (A) e tostada (B) em 280 nm, obtidos em CLAE. Picos: (8) teobromina; (9) cafeína

4.1.5 Identificação de Catequinas por CLAE/EM

O monitoramento de íons seletivos foi usado para detectar fragmentos de íons específicos de catequinas de acordo com estudos anteriores (SHEN et al., 2006; ZEEB et al., 2000; WANG et al., 2008). Espectros de massa foram selecionados para íons moleculares $[M+H]^+$ de (-)-epigalocatequina galato (m/z 459), epigalocatequina (m/z 307), catequina e epicatequina (m/z 291). Cromatogramas por CLAE/EM indicando o tempo de retenção dos picos identificados, de acordo com padrões externos, estão representados na figura 10. O íon molecular ($[M+H]^+$, m/z 459) da epigalocatequina galato foi detectado em 12,4 min com fragmentos de íons característicos de m/z 289 e m/z 139. O íon molecular ($[M+H]^+$, m/z 307) da epigalocatequina foi detectado em 10 min com fragmentos de íons característicos de m/z 289 e m/z 139. O íon molecular ($[M+H]^+$, m/z 291) da catequina e epicatequina foram identificados em 10,8 e 14,6 min, respectivamente, com fragmentos de íons característicos de m/z 273 e m/z 139.

As figuras 11 e 12 mostram os cromatogramas obtidos por CLAE/EM referentes aos extratos secos de erva-mate verde e tostada, respectivamente. Os íons moleculares m/z 459 e m/z 289 referentes à epigalocatequina galato e fragmentos de íons de galocatequina e epigalocatequina galato, respectivamente, não estão representados devido ao fato de se apresentarem em baixas intensidades na corrida cromatográfica e detecção em EM. Os íons moleculares identificados foram referentes aos isômeros catequina e epicatequina ($[M+H]^+$, m/z 291), detectados de 5 a 8 minutos com fragmentos de íons característicos de m/z 273 e m/z 139. O íon molecular referente à epigalocatequina ($[M+H]^+$, m/z 307) também foi detectado de 4 a 6 minutos com fragmento de íon de m/z 139.

Pelo fato de catequina e epicatequina serem isômeros dificulta a correta identificação das mesmas. Além disso, acredita-se que pela baixa concentração destes compostos no extrato seco de erva-mate e a rápida degradação durante a análise, seus picos de identificação apresentaram-se com tempos de retenção diferentes em relação aos respectivos padrões, podendo assim, resultar em coincidências de massas neste caso com outras substâncias presentes no extrato seco. O íon fragmento m/z 273 apresentou a mesma característica, ratificando a pouca estabilidade destes compostos nas amostras. O íon m/z 139, encontrado como fragmento para todas as catequinas aqui analisadas, tornou-se útil à identificação e confirmação da presença de catequinas nas amostras de

extratos secos de erva-mate, supondo ser mais estável do que os demais íons. Dado relevante na análise com EM foi a presença de íon molecular $[M+H]^+$, m/z 195 da cafeína exatamente em 15 minutos, eluindo junto com o íon fragmento m/z 139, tornando, assim, inviável e incorreta a análise de catequinas, somente por CLAE e detector UV-Visível, como publicado por Pereira et al. (2012). De fato, Bastos et al. (2007b) já haviam descrito que os extratos aquosos de erva-mate verde e tostada não possuem catequinas como constituinte químico, em análise feita por *electrospray* e espectrometria de massa (ESI-MS).

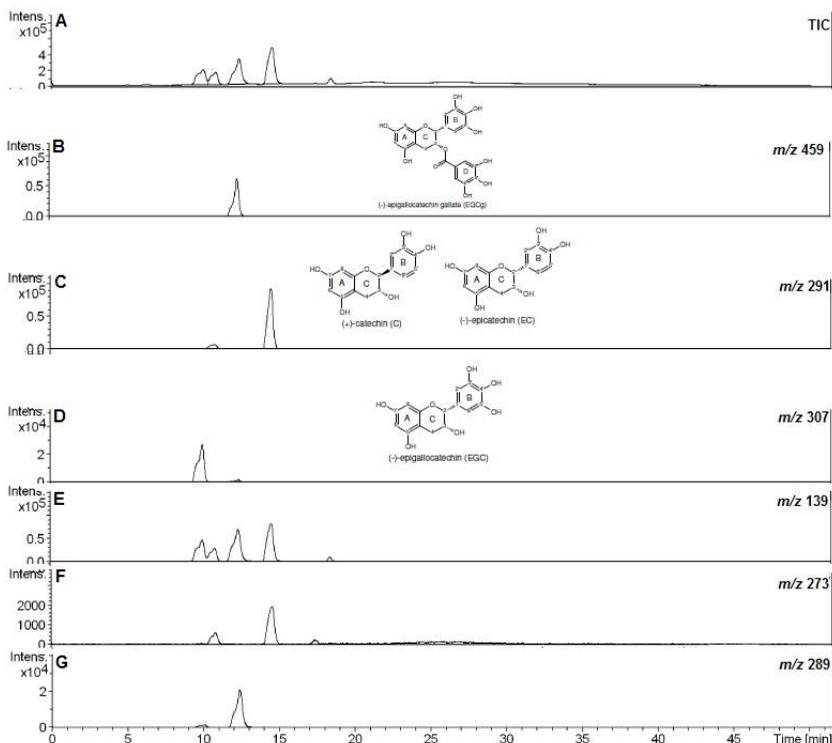


Figura 10. (A) Cromatograma UV-Visível + EM de padrões de catequinas. (B-G) Íons filtrados para cada catequina: a presença de dois ou mais picos revelam a presença de isômeros.

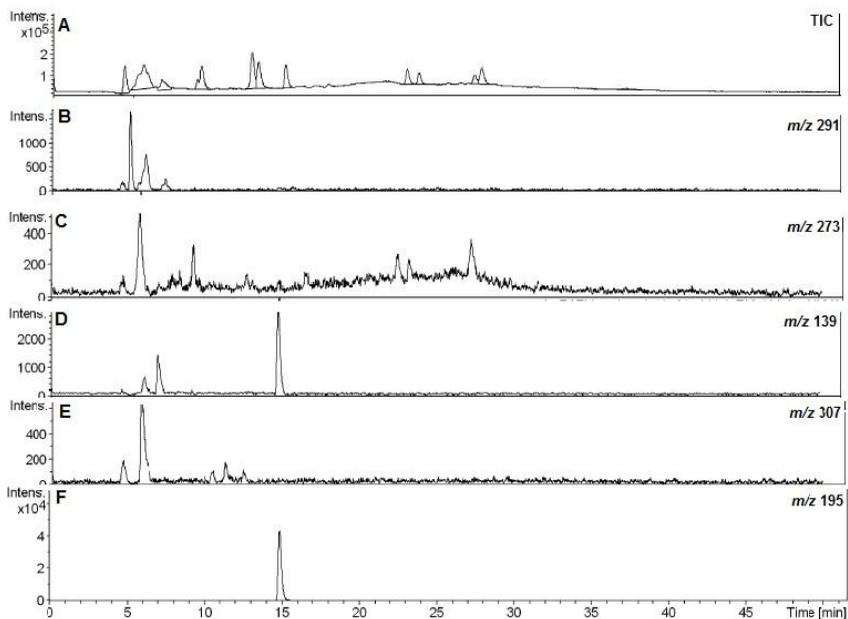


Figura 11. (A) Cromatograma UV-Visível + EM do extrato seco de erva-mate verde. (B-F) Íons filtrados para cada catequina: a presença de dois ou mais picos revelam a presença de isômeros.

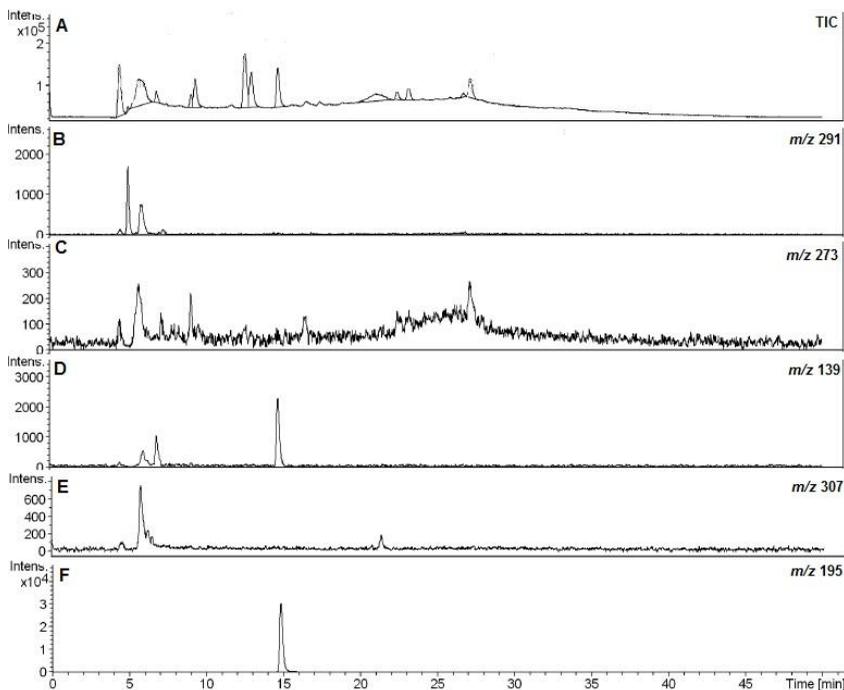


Figura 12. (A) Cromatograma UV-Visível + EM do extrato seco de erva-mate tostada. (B-F) Íons filtrados para cada catequina: a presença de dois ou mais picos revelam a presença de isômeros.

4.2. ESTUDOS *In Vivo*

4.2.1 CARACTERÍSTICAS BIODEMOGRÁFICAS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Setenta e sete indivíduos participaram efetivamente da pesquisa, sendo 29 homens e 48 mulheres, com idade de $45,2 \pm 1,4$ anos e IMC de $26,3 \pm 0,39$ kg/m². Do total de indivíduos participantes, 38 fizeram uso de cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, 16 fizeram uso de cápsulas com extrato seco de erva-mate tostada e 23 usaram cápsulas com amido (placebo). As características biodemográficas estão apresentadas na Tabela 4. Como pode ser observado, não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de estudo para os parâmetros histórico familiar de DAC e sedentarismo (teste do χ^2). Por

outro lado, os indivíduos do grupo NLP apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos parâmetros idade, peso e IMC. Assim os indivíduos NLP apresentaram idade inferior em relação aos indivíduos dos grupos DLP-EMT e HCE-EMV e HCE-PL, (25 e 30%, respectivamente). Os indivíduos do grupo NLP apresentaram menor peso corporal e IMC em relação aos indivíduos grupo HCE-PL, correspondendo a cerca de 23% e 17%, respectivamente ($P < 0,05$; ANOVA e teste complementar de Tukey; Tabela 4).

Tabela 4 – Características biodemográficas dos participantes no início do estudo.

	Estudo Toxicológico	Dislipidêmicos sem Uso de Hipolipemiantes (DLP)			Hipercolesterolêmicos Usuários de Estatina (HCE)	
	NLP-EMV	EMV	EMT	PL	EMV	PL
Gênero (M/F)	9/5	6/10	7/9	3/13	4/4	4/3
Idade (anos)	35,1 ± 3,5*	46,4 ± 2,9	48,4 ± 2,6	44,4 ± 2,7	51,2 ± 2,8	50,7 ± 4,9
Peso (kg)	66,4 ± 2,4**	76,9 ± 3,8	76,5 ± 4,3	70,5 ± 3,3	73,7 ± 2,9	80,0 ± 3,5
IMC (kg/m ²)	24,2 ± 0,9**	26,8 ± 0,8	26,8 ± 0,7	25,4 ± 0,9	27,1 ± 0,5	27,9 ± 0,9
Histórico DAC	6 (42,8%)	8 (50,0%)	12 (75,0%)	7 (43,7%)	5 (71,4 %)	6 (75%)
Sedentarismo	6 (42,8%)	5 (31,25%)	10 (62,5%)	7 (43,7%)	3 (42,8%)	1 (12,5%)

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão; M/F = masculino/feminino; IMC = Índice de massa corporal; DAC = Doença arterial coronariana. NLP-EMV = Normolipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde. DLP-EMV, DLP-EMT e DLP-PL = Dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, tostada e placebo, respectivamente. HCE-EMV e HCE-PL = Hipercolesterolêmicos usuários de estatina que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde e placebo,

respectivamente. $*P < 0,05$ comparado aos grupos DLP-EMT, HCE-EMV e HCE-PL; $**P < 0,05$ comparado ao grupo HCE-PL (ANOVA e teste complementar de Tukey).

4.2.2 AVALIAÇÃO DA EVENTUAL TOXICIDADE CLÍNICA DO EXTRATO SECO DE ERVA-MATE VERDE EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

4.2.2.1 Estudo Toxicológico Agudo

O estudo toxicológico agudo foi realizado com 14 voluntários saudáveis, sendo nove mulheres e cinco homens, com idade de $35,1 \pm 3,5$ anos. A ingestão de três cápsulas de extrato seco de erva-mate verde, três vezes ao dia, durante sete dias consecutivos não provocou efeitos adversos nos participantes da pesquisa durante este período. No exame de eletrocardiograma não se evidenciou alteração eletrocardiográfica (Figuras 13, 14 e 15). Da mesma forma, não se observaram alterações significativas no peso corpóreo e na circunferência da cintura (Tabela 5). Por outro lado, observou-se redução de 6,0%, em média, nos valores da pressão arterial diastólica, após 3 e 7 dias de consumo de cápsulas de erva-mate verde ($P < 0,05$), mas não houve modificação na pressão sistólica (Tabela 5). Considerando que variações na pressão arterial podem ser fisiológicas e ocorrer de acordo com o estado de movimento ou repouso, estresse e condições nutricionais, a alteração ocorrida, apesar de significativa, pode não ser devido ao produto utilizado, até mesmo porque não se evidenciou modificação da pressão arterial no estudo toxicológico crônico ou com a erva-mate tostada (resultados apresentados na seção 4.2.2.2; Tabela 8). Além disso, os valores obtidos estiveram dentro da faixa de normalidade, assim como aqueles obtidos para a pressão arterial sistólica. Dessa forma, esta alteração não se constitui, necessariamente, em indício de cardiotoxicidade, pois não se evidenciou alteração cardíaca na avaliação do eletrocardiograma durante o período avaliado.



Figura 13 – Perfil eletrocardiográfico representativo de um participante referente ao período basal, sem consumo de cápsulas com extrato seco de erva-mate verde.

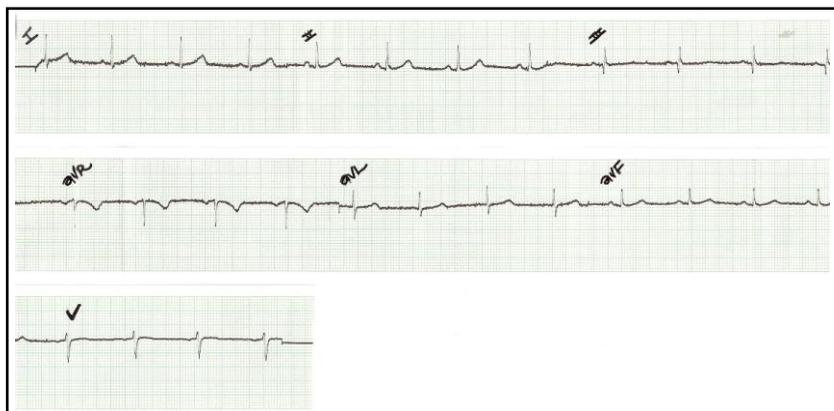


Figura 14 – Perfil eletrocardiográfico representativo de um participante após 3 dias de consumo das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde.



Figura 15 – Perfil eletrocardiográfico representativo de um participante após sete dias de consumo das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde.

Tabela 5 - Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, durante três e sete dias, no peso corporal, circunferência da cintura e pressão arterial dos participantes.

	Período de ingestão das cápsulas		
	Basal	3 dias	7 dias
Peso corporal (kg)	66,4 ± 2,4	65,9 ± 2,3	65,6 ± 2,3
Circunferência da			
Cintura (cm)	84,3 ± 1,8	84,1 ± 1,7	83,2 ± 1,8
PAS (mm Hg)	109,8 ± 3,0	108,7 ± 2,5	104,3 ± 2,9
PAD (mm Hg)	74,4 ± 2,7	70,1 ± 2,6*	69,3 ± 2,9*

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão (n = 14). PAS = Pressão Arterial Sistólica; PAD = Pressão Arterial Diastólica. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo basal (sem consumo de cápsulas de erva-mate verde; ANOVA para Medidas Repetidas e teste complementar de Tukey).

Em relação aos resultados do hemograma, não houve alteração significativa nos valores da maioria dos parâmetros hematológicos no período avaliado, como por exemplo, índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina, número de plaquetas, hematócrito, contagem de eritrócitos, eosinófilos, basófilos e de leucócitos totais. No entanto, após sete dias, o número de neutrófilos foi 12% menor ($P = 0,009$; Tabela 6),

em relação ao basal, enquanto após três e sete dias, o número de monócitos e linfócitos foi 23% ($P = 0,006$; Tabela 6) e 18% ($P = 0,002$; Tabela 6), respectivamente, maior em relação ao basal, entretanto mantendo-se ainda dentro dos valores de referência e retornando ao valor basal após 60 dias de estudo. Vale notar que, apesar da existência de relatos sobre efeitos deletérios do extrato de *Ilex paraguariensis* em linfócitos humanos *in vitro*, relatando atividade citotóxica em função da cafeína presente no extrato (ALVES et al., 2008; WNUCK et al., 2009), não observamos diminuição no número dessas células no presente estudo.

Tabela 6 – Parâmetros hematológicos antes e após a ingestão de cápsulas contendo EMV, durante 7 dias.

Parâmetros	Período de ingestão das cápsulas		
	Basal	3 dias	7 dias
Hemácias ($\times 10^7/\mu\text{L}$)	4,44 \pm 0,10	4,42 \pm 0,10	4,39 \pm 0,11
Hemoglobina (g/dL)	13,6 \pm 0,27	13,5 \pm 0,26	13,4 \pm 0,29
Hematócrito (%)	39,7 \pm 0,74	39,5 \pm 0,73	39,3 \pm 0,83
VCM (fL)	89,5 \pm 0,80	89,5 \pm 0,79	89,6 \pm 0,75
HCM (pg)	30,6 \pm 0,2	30,6 \pm 0,30	30,6 \pm 0,26
CHCM (g/dL)	34,2 \pm 0,24	34,2 \pm 0,22	34,1 \pm 0,20
Plaquetas ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	241,1 \pm 17,0	244,6 \pm 16,94	244,2 \pm 17,9
Leucócitos ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	5,9 \pm 0,32	5,9 \pm 0,36	5,9 \pm 0,37
Neutrófilos ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	3,17 \pm 0,32	2,89 \pm 0,26	2,77 \pm 0,28*
Eosinófilos ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	0,15 \pm 0,03	0,16 \pm 0,03	0,18 \pm 0,03
Basófilos ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	0,037 \pm 0,005	0,032 \pm 0,004	0,032 \pm 0,003
Linfócitos ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	2,09 \pm 0,08	2,25 \pm 0,14	2,47 \pm 0,15*
Monócitos ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	0,43 \pm 0,02	0,53 \pm 0,03*	0,45 \pm 0,03

Os resultados estão expressos como média \pm erro-padrão. VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo basal (sem consumo de cápsulas de erva-mate verde; ANOVA para Medidas Repetidas e teste complementar de Tukey e teste t pareado de Student).

A Tabela 7 apresenta os resultados dos parâmetros bioquímicos séricos dos indivíduos saudáveis antes e após a ingestão das cápsulas de erva-mate verde. A ingestão das cápsulas de EMV não alterou os valores dos principais marcadores bioquímicos de função hepática e renal ou indicadores de desequilíbrios metabólicos, como bilirrubina, creatinina, glicose, ácido úrico, colesterol total, triglicerídeos e eletrólitos. Dentre esses, as provas de função hepática desempenham importante interesse, pois diversas substâncias são extensamente biotransformadas pelo fígado. As transaminases (ALT e AST) e a GGT são bons marcadores, pois ocorre aumento nas atividades dessas enzimas em 90% dos casos de doença hepática (LIMA et al., 2002) e a determinação da isoenzima AST no soro é útil para avaliar danos em órgãos e tecidos como músculo estriado, miocárdio, além do tecido hepático (PANTEGHINI, 1990). Vale notar que além de não ter havido aumento, observou-se diminuição temporária de 18,6% na atividade da AST após três dias de consumo das cápsulas ($P = 0,028$; Tabela 7). Além disso, não foi encontrada alteração na atividade da ALT, considerada mais específica na avaliação da função hepática (BURTIS et al., 1994). A atividade da GGT também esteve 8% diminuída, após sete dias de consumo das cápsulas de EMV, ($P = 0,037$). Tendo em vista que a GGT é um indicador sensível de doença inflamatória e lesão hepática, estando elevada em doenças obstrutivas das vias biliares (BURTIS et al., 1994), pode-se considerar clinicamente irrelevante a diminuição observada.

No exame de urina de rotina, observou-se cor normalmente amarela ou amarela clara e aspecto ligeiramente turvo, sem registro de eventuais odores anormais. Na análise bioquímica da urina, não foram observadas alterações no pH urinário, densidade, proteínas, glicose, corpos cetônicos, hemoglobina, bilirrubina e urobilinogênio. Da mesma forma, na análise do sedimento urinário não houve alterações na contagem de células epiteliais, leucócitos ou hemácias, ou presença de flora bacteriana (resultados não mostrados).

Tabela 7 – Parâmetros bioquímicos antes e após a ingestão de cápsulas contendo EMV, durante 7 dias por indivíduos saudáveis.

Parâmetros	Período de ingestão das cápsulas		
	Basal	3 dias	7 dias
Glicose (mg/dL)	81,6 ± 1,1	82,1 ± 0,9	83,7 ± 1,4
Ácido Úrico (mg/dL)	3,8 ± 0,31	3,7 ± 0,30	3,7 ± 0,17
Creatinina (mg/dL)	0,51 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,52 ± 0,02
Colesterol Total (mg/dL)	213,1 ± 12,0	206,6 ± 11,6	199,4 ± 9,7
Triglicerídeos (mg/dL)	86,1 ± 6,1	82,8 ± 6,9	83,5 ± 5,9
AST (U/L)	37,1 ± 2,4	30,2 ± 2,5*	33,8 ± 2,1
ALT (U/L)	29,9 ± 2,0	31,6 ± 2,7	30,3 ± 4,5
GGT (U/L)	16,4 ± 1,8	16,1 ± 1,6	15,1 ± 2,0*
CK Total (U/L)	126,1 ± 17,6	130,1 ± 26,8	102,1 ± 16,2*
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,55 ± 0,08	0,61 ± 0,07	0,54 ± 0,06
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,19 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,02
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,35 ± 0,05	0,38 ± 0,05	0,32 ± 0,04
Sódio (mEq/L)	135,5 ± 0,5	135,3 ± 0,24	135,4 ± 0,40
Potássio (mEq/L)	4,0 ± 0,05	4,0 ± 0,05	4,0 ± 0,06

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão. AST = Aspartato aminotransferase; ALT = Alanina aminotransferase; GGT = gama-glutamil transferase; CK Total = Creatina quinase total. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo basal (sem consumo de cápsulas de erva-mate verde; teste t pareado de Student).

4.2.2.2 Estudo Toxicológico Crônico

O estudo toxicológico crônico foi realizado com os mesmos voluntários saudáveis do estudo toxicológico agudo. Neste estudo crônico também não foram evidenciados efeitos adversos nos participantes da pesquisa. Isto pode ser observado, por exemplo, nas avaliações de ausência de alterações eletrocardiográficas (Figuras 16, 17 e 18), peso corporal, circunferência da cintura e pressão arterial sistólica e diastólica (Tabela 8).



Figura 16 – Perfil eletrocardiográfico representativo de um participante referente ao período basal, sem consumo de cápsulas com extrato seco de erva-mate verde.



Figura 17 – Perfil eletrocardiográfico representativo de um participante após 30 dias de consumo das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde.

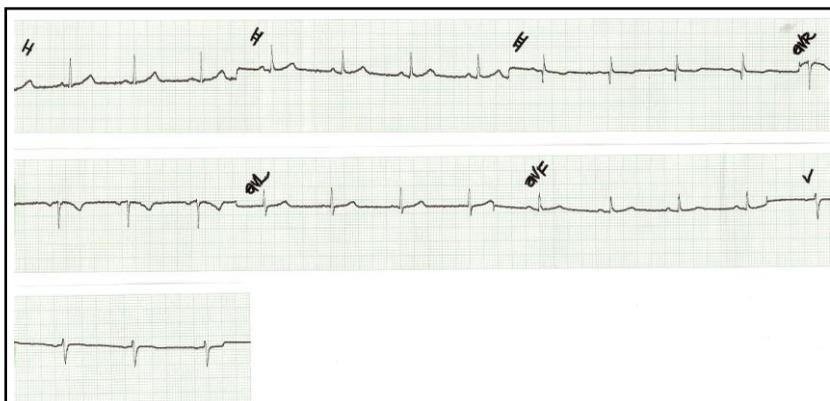


Figura 18 – Perfil eletrocardiográfico representativo de um participante após 60 dias de consumo das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde.

Tabela 8- Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde no peso corporal, circunferência da cintura e pressão arterial dos participantes após 30 e 60 dias.

	Período de ingestão das cápsulas		
	Basal	30 dias	60 dias
Peso corporal (kg)	66,4 ± 2,4	66,1 ± 2,4	66,2 ± 2,3
Circunferência da			
Cintura (cm)	84,3 ± 1,8	83,2 ± 1,5	84,0 ± 1,8
PAS (mm Hg)	109,8 ± 3,0	107,1 ± 3,2	109,3 ± 2,9
PAD (mm Hg)	74,4 ± 2,7	75,0 ± 2,0	70,7 ± 1,9

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão. PAS = Pressão Arterial Sistólica; PAD = Pressão Arterial Diastólica.

Não se observaram alterações detectáveis na série vermelha do hemograma (Tabela 9). No entanto, foram observadas pequenas variações significativas em relação à série branca, como aumento de 25% no número de monócitos após 60 dias, assim como encontrado no estudo agudo ($P = 0,010$; Tabela 9), porém ainda mantendo-se dentro dos valores de referência. Anteriormente, em estudo pré-clínico realizado em nosso laboratório (ANDRADE et al., 2012), também foi relatado aumento no número de monócitos em ratos Wistar fêmeas. Entretanto, a monocitose ocorre, normalmente, nas infecções virais, leucemia mielomonocítica crônica e após quimioterapia (WILLIAMS et al., 1976), sendo, portanto, de difícil associação com o consumo do extrato de erva-mate.

Os voluntários saudáveis apresentaram diminuição significativa no número de neutrófilos após sete (12%; $P = 0,008$; Tabela 6) e 30 dias (13%; $P = 0,021$; Tabela 9), permanecendo, entretanto, dentro dos limites de referência (HARKNESS; WAGNER, 1993). De qualquer maneira, pode-se especular que esta redução esteja relacionada ao potencial anti-inflamatório da erva-mate, particularmente devido ao efeito das saponinas presentes no extrato (WANG et al., 2008), ação já demonstrada por vários autores, através de diferentes modelos de inflamação em animais ou em cultura de células (SAFAYHI; SAILER, 1997; YUAN et al., 2006). A administração de erva-mate diminuiu os marcadores de inflamação no pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro (LANZETTI et al., 2008) ou de mediadores inflamatórios em camundongos obesos (ARÇARI et al., 2011). Segundo Dartora et al. (2012), a administração oral a ratos de metabólitos

primários ou polissacarídeos de alto peso molecular solúveis isolados de erva-mate provocou a redução do influxo de neutrófilos, evitando seu acúmulo nos pulmões, em modelos experimentais de septicemia, reforçando o papel nutracêutico da *Ilex paraguariensis* e seus componentes químicos primários. Além disso, os autores também sugerem uma nova opção como adjuvante anti-séptico e para o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos vegetais.

Em seres humanos, Morais (2009) demonstrou que a ingestão prolongada de infusão de erva-mate promoveu diminuição na concentração sérica da PCR-us em indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos, porém os resultados são considerados não conclusivos já que os valores de PCR-us mantiveram-se durante todo o estudo dentro dos valores de referência, caracterizando o grupo como de baixo risco para DAC em relação a esses marcadores. De qualquer maneira, os resultados destes estudos mostraram-se promissores para a realização de estudos adicionais para avaliar o efeito anti-inflamatório da erva-mate em seres humanos.

Após 60 dias do consumo das cápsulas de erva-mate, observou-se elevação de eosinófilos (30%; $P = 0,019$; Tabela 9) e redução significativa de basófilos (27%; $P < 0,05$; Tabela 9), respectivamente, porém permanecendo ainda dentro dos valores de referência. Este resultado pode estar associado a possíveis reações alérgicas ao produto utilizado. Porém, nestes casos a eosinofilia e a basopenia observadas estariam com o número de eosinófilos ou basófilos acima ou abaixo, respectivamente, dos valores de referência para indivíduos saudáveis (BAIN, 2006). Além disso, segundo Rogerio et al. (2010) alguns metabólitos secundários derivados de extratos vegetais podem diminuir a eosinofilia e o recrutamento de eosinófilos em modelos animais, bem como outras características envolvidas em doenças alérgicas, incluindo a produção de quimiocinas e citocinas.

Tabela 9 – Parâmetros hematológicos antes e após a ingestão de cápsulas contendo EMV, durante 60 dias.

Parâmetros	Ingestão das cápsulas contendo EMV		
	Basal	30 dias	60 dias
Hemácias ($\times 10^7/\mu\text{L}$)	4,44 \pm 0,10	4,46 \pm 0,10	4,42 \pm 0,12
Hemoglobina (g/dL)	13,6 \pm 0,27	13,6 \pm 0,26	13,5 \pm 0,32
Hematócrito (%)	39,7 \pm 0,74	39,8 \pm 0,79	39,2 \pm 0,86
VCM (fL)	89,5 \pm 0,80	89,2 \pm 0,77	88,9 \pm 0,93
HCM (pg)	30,6 \pm 0,26	30,6 \pm 0,31	30,7 \pm 0,35
CHCM (g/dL)	34,2 \pm 0,24	34,3 \pm 0,21	34,6 \pm 0,19
Plaquetas ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	241,1 \pm 17,0	239,5 \pm 18,4	251,6 \pm 19,4
Leucócitos ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	5,89 \pm 0,32	5,75 \pm 0,35	6,38 \pm 0,37
Neutrófilos ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	3,17 \pm 0,32	2,75 \pm 0,28*	3,10 \pm 0,29
Eosinófilos ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	0,15 \pm 0,03	0,18 \pm 0,04	0,20 \pm 0,04*
Basófilos ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	0,037 \pm 0,0057	0,031 \pm 0,0038	0,027 \pm 0,0042*
Linfócitos ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	2,09 \pm 0,08	2,26 \pm 0,13	2,52 \pm 0,17
Monócitos ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	0,43 \pm 0,02	0,52 \pm 0,04	0,54 \pm 0,04*

Os resultados estão expressos como média \pm erro-padrão. VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo basal (ANOVA para Medidas Repetidas e teste complementar de Tukey ou teste t pareado de Student).

A Tabela 10 apresenta os resultados dos parâmetros bioquímicos séricos dos indivíduos saudáveis, antes e 30 e 60 dias após a ingestão de cápsulas de EMV. Nestes períodos não houve alterações deletérias nos valores dos principais marcadores bioquímicos de função hepática e renal ou indicadores de desequilíbrios metabólicos, como perfil lipídico, enzimas transaminases, bilirrubina, e creatinina. Inclusive, após 30 dias houve redução de 25% na atividade sérica da CK total ($P = 0,002$; Tabela 10), semelhante ao observado anteriormente no estudo toxicológico agudo após sete dias (19%; $P = 0,012$; Tabela 7). Porém, os valores de referência são bastante amplos para este analito, permanecendo, portanto, em níveis considerados normais para indivíduos sadios. Esta enzima é encontrada em concentrações elevadas no músculo esquelético, músculo cardíaco, cérebro e trato gastrointestinal, com base nisso também acreditamos que esta variação possa ter ocorrido pela prática de exercícios físicos (BURTIS et al., 1994), apesar da instrução inicial a todos os voluntários para manter os hábitos cotidianos e não introduzir atividades novas.

Na oitava semana de estudo, observou-se aumento significativo na glicemia dos voluntários saudáveis (5,7%; $P = 0,043$; Tabela 10). Neste contexto, Berté et al. (2011) relataram que o extrato seco de erva-mate possui maior conteúdo de carboidratos e energia em relação às folhas de erva-mate desidratadas. Porém, a elevação da glicemia observada pode ser devida a outras causas, pois os indivíduos dislipidêmicos, os quais consumiram as mesmas cápsulas de EMV, não apresentaram aumento significativo (Basal: 80,4 mg/dL vs. 60 dias: 81,7 mg/dL). Além disso, com base nos resultados do estudo toxicológico pré-clínico em animais (ANDRADE et al., 2012) o extrato de erva-mate não aumentou a glicemia. Além disso, também não observamos elevação da glicemia em estudos anteriores com seres humanos e infusões de erva-mate (MORAIS et al., 2009; BOAVENTURA et al., 2012b; STEFANUTO, 2010). Ao contrário, a suplementação com chá mate na dieta de ratos obesos diminuiu a concentração de glicose sérica (PANG et al., 2008). Além disso, Klein et al. (2011) demonstraram que o chá mate melhorou o controle glicêmico de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2, diminuindo a glicemia de jejum e a hemoglobina glicada.

Em relação aos eletrólitos, observou-se aumento significativo na concentração de sódio após 30 (3,6%; $P < 0,05$) e 60 dias (2,7%; $P < 0,05$), porém sem alteração nos valores de potássio (Tabela 10). O aumento da ingestão de sódio na alimentação pode ter influenciado a

sua elevação no soro (PRADO et al., 1999). Alternativamente, a ação diurética da erva-mate também pode ter influenciado este parâmetro. Segundo Gorgen et al. (2005) a *Ilex paraguariensis* pode interferir no sistema circulatório, agindo como diurético ou agente hipotensor. Apesar das variações estatísticas, os valores de sódio mantiveram-se dentro da faixa de normalidade para indivíduos saudáveis.

Tabela 10 – Parâmetros bioquímicos antes e após a ingestão de cápsulas contendo EMV, durante 60 dias.

Parâmetros	Período de Ingestão das cápsulas contendo EMV		
	Basal	30 dias	60 dias
Glicose (mg/dL)	81,6 ± 1,08	82,1 ± 1,86	86,3 ± 2,30*
Ácido Úrico (mg/dL)	3,8 ± 0,31	3,8 ± 0,22	3,6 ± 0,29
Creatinina (mg/dL)	0,51 ± 0,03	0,50 ± 0,03	0,53 ± 0,03
Colesterol Total (mg/dL)	213,1 ± 12,0	213,3 ± 11,1	217,4 ± 8,8
Triglicerídeos (mg/dL)	86,1 ± 6,1	95,2 ± 8,2	84,6 ± 7,4
AST (U/L)	37,1 ± 2,4	33,6 ± 3,9	33,4 ± 3,4
ALT (U/L)	29,9 ± 2,0	27,3 ± 4,6	32,1 ± 3,1
GGT (U/L)	16,4 ± 1,8	16,3 ± 1,8	17,0 ± 2,0
CK Total (U/L)	126,1 ± 17,6	94,7 ± 13,2*	111,1 ± 15,9
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,55 ± 0,08	0,41 ± 0,04	0,56 ± 0,07
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,19 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,02
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,35 ± 0,05	0,31 ± 0,05	0,34 ± 0,06
Sódio (mEq/L)	135,5 (133 – 140)	140,5 (136 – 145)**	139 (135 – 141)**
Potássio (mEq/L)	4,05 ± 0,05	4,10 ± 0,04	4,13 ± 0,06

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão e mediana (valor mínimo e máximo) para sódio. AST = Aspartato aminotransferase; ALT = Alanina aminotransferase; GGT = gama-glutamil transferase; CK Total = Creatina quinase total. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo basal (ANOVA para Medidas Repetidas e teste complementar de Tukey ou teste t pareado de Student); ** $P < 0,05$ comparado ao respectivo basal (teste de Friedman – ANOVA *on Ranks*).

4.2.3 ESTUDO HIPOCOLESTEROLÊMICO DAS CÁPSULAS DE ERVA-MATE EM INDIVÍDUOS NORMOLIPIDÊMICOS E DISLIPIDÊMICOS SEM USO DE HIPOLIPEMIANTE

As Tabelas 11 e 12 apresentam os resultados da avaliação laboratorial do perfil lipídico dos participantes NLP ($n = 14$). Após o consumo diário de aproximadamente 2,25 g de extrato seco de erva-mate verde pelos participantes normolipidêmicos por 30 e 60 dias foi observado aumento médio de 3,0 e 10,4 mg/dL (5,9 e 20,5%) no HDL-C e diminuição de aproximadamente 4,0 e 13,5% na relação CT/HDL-C e 7,0% e 17,5% na relação LDL-C/HDL-C após 30 e 60 dias, respectivamente ($P < 0,001$; Fig. 19). Não houve variação expressiva nos valores de colesterol total, LDL-C, Não-HDL-C, sd-LDL-C e triglicérides ($P > 0,05$). Apesar de não ter sido estatisticamente significativo, houve redução média de LDL-C de 4,6 mg/dL (1,7%) e 5,9 mg/dL (2,0%) em 30 e 60 dias, respectivamente. Além disso, após 60 dias, 50% dos indivíduos mostraram redução de LDL-C de 23,6 mg/dL e de triglicérides de 17,1 mg/dL, em média, com diminuição máxima de 46 mg/dL e 38 mg/dL, respectivamente. Dessa maneira, a ingestão de EMV em cápsulas melhorou as variáveis do perfil lipídico, inclusive para indivíduos que já apresentavam valores desejáveis dos lipídeos séricos. Vale salientar que 43% dos indivíduos normolipidêmicos apresentaram histórico familiar de DAC (Tabela 4) e que, portanto, possuem algum fator genético que acarreta em risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Dessa forma, com base nesses resultados, sugere-se que a ingestão de erva-mate poderá, em longo prazo, prevenir o surgimento da hipercolesterolemia. Além disso, já foi demonstrado anteriormente que infusões de erva-mate verde ou tostada melhorou o perfil lipídico sérico, principalmente pela redução da concentração de LDL-C e aumento de HDL-C de indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos (MORAIS et al., 2009).

Tabela 11- Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, por 30 e 60 dias, no perfil lipídico sérico de indivíduos normolipidêmicos.

	Colesterol (mg/dL)				
	Total	LDL	HDL	Não-HDL	sd-LDL
Basal	213,1 ± 12,0	145,1 ± 10,1	50,8 ± 3,7	162,3 ± 10,6	35,6 ± 5,0
Δ 30 dias (mg/dL)	0,23 ± 5,42	-4,58 ± 4,79	3,00 ± 1,53	- 2,76 ± 4,94	3,43 ± 1,95
Δ 60 dias (mg/dL)	4,28 ± 7,49	-5,84 ± 6,29	10,42 ± 1,97*	-6,14 ± 6,75	0,42 ± 3,64

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão. sd-LDL = Fração LDL pequena e densa; * $P < 0,001$ comparado ao respectivo valor basal (teste t pareado de Student).

Tabela 12- Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, por 30 e 60 dias, no perfil lipídico sérico de indivíduos normolipidêmicos.

	Triglicerídeos (mg/dL)	LDL-C/HDL-C	CT/HDL-C
Basal	86,1 ± 6,10	3,01 ± 0,26	4,36 ± 0,27
Δ 30 dias (mg/dL)	9,07 ± 5,21	-0,21 ± 0,11	-0,18 ± 0,13
Δ 60 dias (mg/dL)	-1,50 ± 5,72	-0,52 ± 0,08*	-0,58 ± 0,09*

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão (n = 14). * $P < 0,001$ comparado ao respectivo valor basal (teste t pareado de Student).

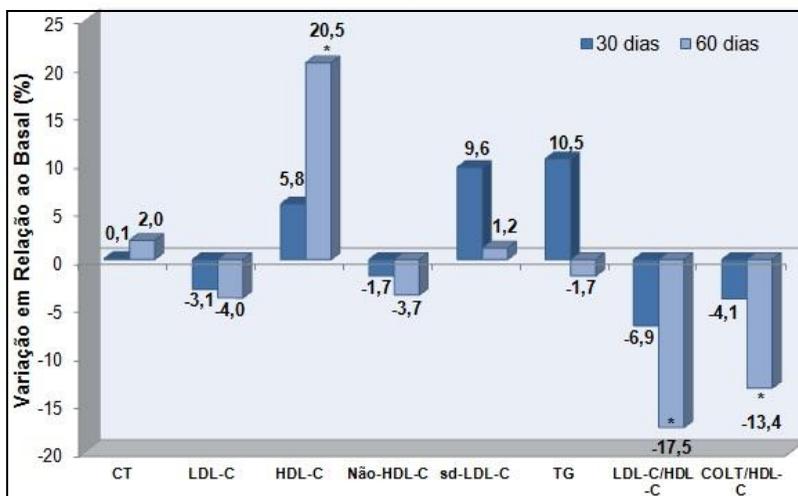


Figura 19. Variação percentual média dos valores de parâmetros lipídicos dos indivíduos normolipidêmicos após o consumo das cápsulas com EMV por 30 e 60 dias, em relação aos respectivos valores basais. CT = Colesterol Total; LDL-C = LDL-colesterol; HDL-C = HDL-colesterol; Não-HDL-C = Não-HDL-colesterol; sd-LDL = Fração LDL pequena e densa; TG = Triglicerídeos; LDL-C/HDL-C = Razão entre a fração do colesterol associada à LDL e HDL. CT/HDL-C = Razão entre colesterol total e fração do colesterol associada à HDL. * $P < 0,001$ comparado ao respectivo valor basal (teste *t* pareado de Student).

As Tabelas 13 e 14 apresentam os resultados da avaliação laboratorial do perfil lipídico dos participantes dislipidêmicos ($n = 48$), distribuídos em três grupos de estudo que consumiram cápsulas com EMV ($n = 16$), EMT ($n = 16$) e cápsulas com amido (PL) ($n = 16$) durante 30 e 60 dias. A ingestão de cápsulas com EMV foi responsável pelo aumento significativo de 5,6 mg/dL de HDL-C (10,7%; $P < 0,001$) após 60 dias, em relação ao basal. Neste mesmo período, os indivíduos do grupo placebo apresentaram aumento de apenas 0,3 mg/dL nos valores de HDL-C (0,6%; $P > 0,05$). Após 60 dias, a relação CT/HDL-C mostrou tendência à redução nos indivíduos DLP que consumiram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde ou tostada (-5,6%; $P = 0,061$; teste *t* pareado de Student). As cápsulas de EMV não promoveram variação expressiva nos demais parâmetros lipídicos, tanto em relação aos valores basais como em relação aos valores do grupo

placebo (Tabelas 13 e 14). Apesar disto, 50% dos indivíduos que consumiram cápsulas de erva-mate verde mostraram redução média de triglicerídeos de 34,1 mg/dL, após 30 dias, e de 28 mg/dL, após 60 dias. Em relação aos valores de LDL-c, 37% dos indivíduos que consumiram cápsulas de EMV mostraram redução média de 19 mg/dL, após 30 dias e 25% dos indivíduos mostraram diminuição de 23 mg/dL após 60 dias. A ingestão das cápsulas de EMT diminuiu significativamente a concentração de triglicerídeos séricos em 30 mg/dL (14%) e 46 mg/dL (21%), em média, em relação ao período basal, após 30 e 60 dias, respectivamente ($P < 0,05$; Tabela 14). Os indivíduos do grupo placebo apresentaram redução não significativa de 7,5 e 8,3 mg/dL ($P > 0,05$; Tabela 14). Vale salientar que após 60 dias, 75% dos indivíduos que consumiram as cápsulas com EMT mostraram diminuição média de 68,5 mg/dL de triglicerídeos, e 43% dos indivíduos mostraram redução de 17,6 mg/dL de LDL-C.

Paganini Stein et al. (2005) foram os primeiros autores a relatar diminuição significativa de colesterol total e triglicerídeos pelo extrato aquoso de *Ilex paraguriensis* em ratos alimentados com dieta rica em colesterol. Como mencionado acima, com base nos resultados de estudos de nosso laboratório com seres humanos, infusões de erva-mate verde ou chá mate tostado diminuíram a concentração de LDL-C de indivíduos normo e dislipidêmicos (MORAIS et al., 2009) e de pacientes diabéticos (KLEIN et al., 2012), porém não foram observadas reduções de triglicerídeos. Os resultados do presente estudo também não demonstraram efeito significativo da ingestão prolongada de EMV nas concentrações séricas de triglicerídeos, assim como em outros estudos após o consumo de diferentes extratos vegetais ou chás preto e verde (GUIMARÃES et al., 2000; MARON et al., 2003; TOKUNAGA et al., 2002; WANGEN et al., 2001). No entanto, houve diminuição significativa de TG nos indivíduos que ingeriram cápsulas com EMT. A ação da cafeína e da teobromina, presentes em maior concentração no EMT, pode estar envolvida da diminuição de TG por estimular a mobilização e a oxidação de lipídeos (ACHESON et al., 2004) e por aumentar a atividade da lipase lipoproteica (GOMES, 2012). Outros pesquisadores atribuem a diminuição de TG pela erva-mate à inibição da atividade da lipase pancreática pelo ácido clorogênico (MARTINS et al., 2010) e pelas saponinas triterpênicas, as quais aceleram o trânsito gastrointestinal e diminuem a absorção intestinal de triglicerídeos (YOSHIKAWA et al., 2009). Não obstante, com base em nossos

resultados não podemos explicar a ausência de diminuição de TG pelas cápsulas de EMV.

Por outro lado, não observamos variação expressiva nos valores de colesterol total, sd-LDL-C, LDL-C, HDL-C e nas relações CT/HDL-C e LDL-C/HDL-C após a ingestão de cápsulas de EMT em comparação ao basal ou ao grupo placebo (Tabelas 13 e 14). Vale notar que em mulheres com sobrepeso, a ingestão de cápsulas com extrato de erva-mate verde (cerca de 1 g por dia) durante seis semanas não promoveu alterações nos parâmetros lipídicos (KIM et al., 2012).

Tabela 13- Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, tostada ou amido, no perfil lipídico sérico dos indivíduos dislipidêmicos sem uso de hipolipemiantes.

	Colesterol (mg/dL)				
	Total	LDL	HDL	Não-HDL	sd-LDL
EMV (n = 16)					
Basal	257,8 ± 7,4	172,6 ± 8,4	52,7 ± 3,9	205,1 ± 8,5	66,1 ± 9,0
Δ 30 dias	9,96 ± 7,04	8,26 ± 6,79	2,57 ± 1,34	7,38 ± 6,81	1,45 ± 4,72
Δ 60 dias	14,00 ± 7,21	9,02 ± 6,04	5,65 ± 1,35**	8,34 ± 6,88	-4,05 ± 5,54
EMT (n = 16)					
Basal	254,2 ± 7,3	159,5 ± 9,4	50,4 ± 5,4	203,8 ± 7,1	52,0 ± 5,8
Δ 30 dias	9,43 ± 5,92	12,04 ± 4,06	2,15 ± 2,30	7,28 ± 4,58	3,29 ± 4,31
Δ 60 dias	-4,18 ± 5,62	2,50 ± 5,86	0,55 ± 1,58	-4,74 ± 5,07	-4,69 ± 3,56
PL (n = 16)					
Basal	245,9 ± 10,4	164,0 ± 10,4	54,1 ± 3,6	191,8 ± 10,3	52,6 ± 8,3
Δ 30 dias	5,37 ± 7,23	6,54 ± 7,20	0,33 ± 1,79	5,04 ± 6,80	-6,23 ± 5,28
Δ 60 dias	9,68 ± 6,45	11,06 ± 6,43	0,31 ± 1,45	9,37 ± 5,74	-4,23 ± 4,16

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão. EMV = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde; EMT = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate tostada; PL = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com amido, ou grupo placebo; sd-LDL = Fração LDL pequena e densa; ** $P < 0,001$ comparado ao respectivo valor basal (teste t pareado de Student).

Tabela 14 - Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde, tostada ou amido, no perfil lipídico sérico dos indivíduos dislipidêmicos sem uso de hipolipemiantes.

	Triglicerídeos (mg/dL)	LDL-C/HDL-C	COLT/HDL-C
EMV (n = 16)			
Basal	162,1 ± 26,0	3,56 ± 0,32	5,31 ± 0,42
Δ 30 dias	-4,25 ± 9,60	-0,05 ± 0,14	-0,14 ± 0,15
Δ 60 dias	-3,37 ± 18,78	-0,16 ± 0,11	-0,29 ± 0,14
EMT (n = 16)			
Basal	221,3 ± 51,3	3,51 ± 0,27	5,80 ± 0,58
Δ 30 dias	-30,06 ± 13,26*	0,13 ± 0,11	-0,15 ± 0,16
Δ 60 dias	-45,75 ± 19,32*	0,03 ± 0,16	-0,23 ± 0,20
PL (n = 16)			
Basal	139,1 ± 15,6	3,20 ± 0,28	4,77 ± 0,31
Δ 30 dias	-7,50 ± 11,35	0,17 ± 0,16	0,15 ± 0,16
Δ 60 dias	-8,43 ± 11,05	0,19 ± 0,10	0,16 ± 0,10

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão. EMV = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde; EMT = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate tostada; PL = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com amido, ou grupo placebo; LDL-C/HDL-C = Razão entre a fração do colesterol associada à LDL e HDL. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo valor basal (teste t pareado de Student).

A ausência de redução significativa de LDL-C pela ingestão das cápsulas de erva-mate pode ser explicada pela quantidade de princípios ativos, como saponinas e compostos fenólicos, presentes nas cápsulas. Segundo Ferreira et al. (1997), o extrato de erva-mate, bem como as suas saponinas isoladas, formam complexos com o ácido cólico *in vitro*, sugerindo a possibilidade de inibição da absorção do colesterol no intestino que depende de ácidos biliares para a formação das micelas mistas. Em estudo anterior, Moraes et al. (2009) utilizaram infusões de erva-mate verde ou tostada, sendo a dose diária de saponinas de 350 mg e 130 mg, respectivamente. Neste caso foi demonstrado redução de LDL-C de 8,3 mg/dL para indivíduos normolipidêmicos e 13,7 mg/dL para indivíduos dislipidêmicos em 40 dias de estudo. No presente estudo, a dose diária de saponinas contidas nas cápsulas com extrato seco de EMV e EMT foi de aproximadamente 71 mg e 57 mg, respectivamente. Assim, a menor concentração de saponinas presente nestes extratos pode ter sido a causa da discreta redução de LDL-C nos indivíduos em estudo. Dessa forma, especula-se que a dose de 130 mg de saponinas diárias seja a quantidade mínima para que se possa verificar o efeito.

Baseado no potencial redutor de colesterol da erva-mate acredita-se que seja relevante a utilização de tecnologias visando à concentração dos constituintes químicos da erva-mate. Murakami et al. (2011) e Prudêncio et al. (2012) aplicaram a tecnologia de nanofiltração e Boaventura et al. (2012a) utilizaram a criocentração do extrato aquoso para concentrar as saponinas e os compostos fenólicos da erva-mate, respectivamente. Resta estabelecer, entretanto, se a concentração alcançada é suficiente para a diminuição de colesterol sérico em seres humanos. Em indivíduos hipercolesterolêmicos, a ingestão de 3 g/dia de saponina sintética, durante duas semanas, diminuiu a absorção intestinal de colesterol e aumentou a excreção fecal de esteróis neutros, tendo como consequência a diminuição significativa da concentração de LDL-C em 13% (HARRIS et al., 1997). Outra proposta seria a associação de extratos de *Ilex paraguariensis* e de *Camellia sinensis* em cápsulas, devido à alta concentração de catequinas desta última, especialmente epigallocatequina galato, as quais também são responsáveis pela redução das concentrações de colesterol total e LDL-C (BATISTA et al., 2009).

A concentração diminuída de HDL-C é considerado fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose. Através do transporte reverso do colesterol, a HDL retira o colesterol das artérias transportando-o até o fígado onde o colesterol é captado seletivamente pelos receptores SR-B1

(*scavenger receptors, class B type I*) ou através da captação das lipoproteínas remanescentes (IDL e remanescentes de quilomícrons) que recebem o colesterol da HDL através da CETP (*cholesterol-ester transfer protein*) (revisado por LIMA; COUTO, 2006). A HDL também tem outras ações que contribuem para a proteção contra a aterogênese, tais como a remoção e redução de lipídeos oxidados da LDL (efeito antioxidante), inibição da síntese de moléculas de adesão, e consequente diminuição da ligação de monócitos ao endotélio (efeito anti-inflamatório), e estimulação da liberação de óxido nítrico (efeito vasorelaxante) (revisado por SPOSITO, 2007). Nossos resultados mostraram que a ingestão de cápsulas com EMV aumentou a concentração sérica de HDL-C nos indivíduos com dislipidemia em 2,6 mg/dL (4,9%) e 5,6 mg/dL (10,7% ($p < 0,001$), após 30 e 60 dias de tratamento, respectivamente (Tabela 13). Para os indivíduos dislipidêmicos que consumiram cápsulas com EMT a concentração sérica de HDL-C aumentou 2,15 mg/dL (4,26%), após 30 dias, enquanto os indivíduos do grupo placebo não apresentaram variação. De acordo com as recomendações de estratégias para a diminuição de colesterol sérico do *NCEP Adult Treatment Panel III* de 2001, o aumento de 1 mg/dL do HDL-C reduz o risco de doenças cardiovasculares em 3% (GORDON et al., 1989) e, dessa maneira, os participantes dislipidêmicos que consumiram cápsulas com EMV podem apresentar diminuição do risco para a doença de aproximadamente 15%.

Ainda não está claro o mecanismo bioquímico pelo qual a erva-mate promoveu aumento do HDL-C. Um dos possíveis mecanismos seria a indução da síntese da apolipoproteína A-I, a qual é o maior componente protéico da HDL e indicativa da quantidade de partículas de HDL presente no plasma ou do potencial de formação de novas partículas de HDL (FRANK; MARCEL, 2000). Entretanto, a ingestão de infusões de erva-mate verde ou tostada durante 40 dias por indivíduos dislipidêmicos também promoveu aumento médio de 5,4% de HDL-C, sem modificação na concentração de apolipoproteína A-I (MORAIS et al., 2009). Assim, o aumento de HDL-C não está associado ao aumento no número de partículas de HDL e estudos adicionais deverão ser realizados para esclarecer este mecanismo.

A tabela 15 mostra a comparação entre os grupos NLP e DLP que ingeriram cápsulas com EMV. Após 60 dias, os indivíduos NLP apresentaram aumento de 10,4 mg/dL (20,6%) na concentração de HDL-C, enquanto os DLP apresentaram aumento de 5,7 mg/dL (11,6%) ($P = 0,057$) e também apresentaram maior diminuição nas relações

CT/HDL-C e LDL-C/HDL-C em relação aos DLP ($P = 0,012$ e $P = 0,002$, respectivamente). As diferenças para LDL-C e Não-HDL-C não se mostraram estatisticamente significativas em relação aos dois grupos de estudo.

Tabela 15 – Efeito da ingestão das cápsulas com EMV nas concentrações de LDL-C, HDL-C, Não-HDL-C e nas relações CT/HDL-C e LDL-C/HDL-C entre os participantes normolipidêmicos ou dislipidêmicos sem uso de estatina.

	Variação em Relação ao Basal (%)			
	Normolipidêmicos		Dislipidêmicos	
	Após 30 dias	Após 60 dias	Após 30 dias	Após 60 dias
LDL-C	-1,68 ± 3,43	-1,94 ± 4,26	6,54 ± 4,43	6,75 ± 4,00
HDL-C	5,76 ± 3,07	20,57 ± 3,66	6,58 ± 3,11	11,61 ± 2,72
Não-HDL-C	-0,50 ± 3,30	-1,70 ± 4,15	4,16 ± 3,43	4,42 ± 3,22
CT/HDL-C	-4,08 ± 2,61	-13,76 ± 2,06	-1,36 ± 3,11	-4,73 ± 2,56*
LDL-C/HDL-C	-6,48 ± 3,17	-18,55 ± 2,75	0,75 ± 4,24	-4,06 ± 3,25*

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão. n = número de participantes; LDL-C = LDL-colesterol; HDL-C = HDL-colesterol; Não-HDL-C = Não HDL-colesterol; CT/HDL-C = Razão entre a fração do colesterol e HDL; LDL-C/HDL-C = Razão entre a fração do colesterol associada à LDL e HDL. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo período de tempo do grupo Dislipidêmico que consumiu cápsulas com EMV (teste t de Student).

4.2.4 ESTUDO HIPOCOLESTEROLÊMICO DAS CÁPSULAS DE ERVA-MATE EM INDIVÍDUOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS EM USO DE ESTATINAS

Fármacos hipolipemiantes, como as estatinas (inibidores da enzima HMG-CoA redutase), foram de grande avanço para a prática clínica, considerando que esta classe de medicamentos possui efeitos farmacológicos múltiplos e que resulta numa potente diminuição do LDL-C e na prevenção do processo aterosclerótico (CHONG; BACHENHEIMER, 2000). A Figura 20 e as Tabelas 16 e 17 apresentam os resultados do efeito da ingestão das cápsulas de EMV por indivíduos hipercolesterolêmicos em uso de estatinas. As estatinas e as doses diárias utilizadas foram: atorvastatina 20 e 40 mg, sinvastatina 10, 20 e 40 mg ou rosuvastatina 10 e 20 mg. Após 30 dias do consumo das cápsulas de EMV, houve diminuição sérica de 9,9 mg/dL de LDL-C, equivalente a 6,7%, e de 18,8 mg/dL, equivalente a 12,7%, após 60 dias, porém sem diferença significativa. No entanto, 62,5% dos indivíduos deste grupo apresentaram reduções de 18,9 mg/dL e 37,8 mg/dL no LDL-C, após 30 e 60 dias, respectivamente ($P < 0,05$). No grupo placebo, observou-se aumento de 7,0 mg/dL de LDL-C após 30 dias e redução de 6,9 mg/dL de LDL-C, após 60 dias, ambos não significativos. Provavelmente, os resultados não apresentaram diferença significativa entre os períodos de tratamento e entre os grupos (HCE-EMV vs. HCE-PL), pelo pequeno número de participantes. Como demonstrado anteriormente por Morais et al. (2009), utilizando infusão de erva-mate, houve um potencial efeito sinérgico com as estatinas na redução de LDL-C.

O efeito sinérgico da erva-mate com as estatinas pode ser explicado com base nos diferentes mecanismos bioquímicos de ação hipocolesterolêmica desses componentes. Enquanto as estatinas diminuem a síntese do colesterol endógeno por inibição competitiva da enzima HMG-CoA redutase, aumentando a síntese dos receptores celulares para a LDL e levando à maior captação dessa lipoproteína do plasma (revisado por STEINBERG, 2006), a erva-mate diminui o colesterol plasmático (particularmente o LDL-C) pela provável inibição da absorção do colesterol intestinal através da ação de suas saponinas constituintes, as quais, conforme já comentado, formam complexos com os sais biliares e colesterol, impedindo *in vitro* a formação das micelas mistas (FERREIRA et al., 1997). A diminuição da absorção de colesterol promove a formação de quilomícrons no intestino com menor

conteúdo de colesterol e consequente liberação de quantidades menores de colesterol ao fígado, o qual sintetiza menor número de partículas de VLDL, com subsequente formação diminuída de LDL (GAGNÉ et al., 2002). Além disso, o extrato de erva-mate diminuiu a concentração intracelular de malonil-CoA em ratos alimentados com dieta rica em colesterol (PANG et al., 2008). O malonil-CoA, o qual é substrato para a síntese de ácidos graxos, foi mais oxidado diminuindo a adiposidade visceral desses animais, provavelmente via beta-oxidação mitocondrial. Assim, a administração do extrato de erva-mate implicou na regulação gênica da adipogênese, atuando na síntese de ácidos graxos (PANG et al., 2008).

A dupla inibição tem sido amplamente relatada pelo uso concomitante das estatinas com o fármaco “ezetimibe”, o qual inibe a absorção intestinal do colesterol por bloquear o transportador de membrana NPC1L1 (*Niemann-Pick C1 Like1*) (GRIGORE; NORATA; CATAPANO, 2008; TADIBOYINA et al., 2005). Com base nas recomendações de estratégias do *NCEP Adult Treatment Panel III* (NCEP, 2001), a diminuição de 18,8 mg/dL de LDL-C promovida pela ingestão de extrato seco de erva-mate verde por indivíduos hipercolesterolêmicos é, possivelmente, capaz de reduzir o risco de eventos coronarianos em cerca de 19%.

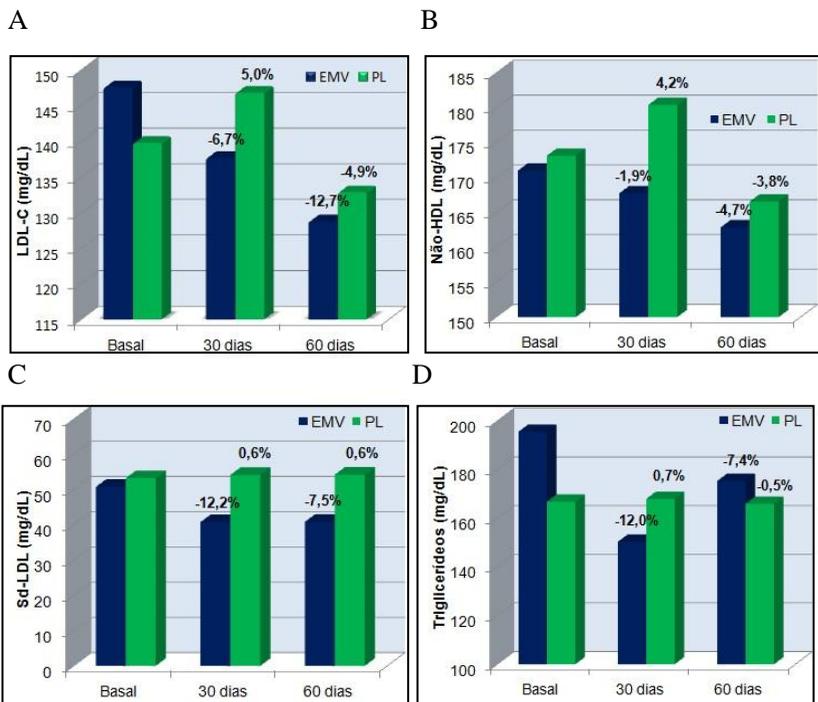


Figura 20. Concentração de parâmetros lipídicos de indivíduos com hipercolesterolemia, sob tratamento com estatinas, que ingeriram cápsulas com EMV (n = 8) e amido (PL) (n = 7) nos parâmetros LDL-C (A), Não-HDL-C (B), sd-LDL-C (C) e Triglicerídeos (D). Os resultados estão expressos como média. LDL-C = LDL-colesterol; Não-HDL-C = Não-HDL-colesterol; sd-LDL = Fração LDL pequena e densa.

Tabela 16- Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde ou amido, na concentração de colesterol total e frações lipoprotéicas dos indivíduos hipercolesterolêmicos em uso de estatina.

	Colesterol (mg/dL)				
	Total	LDL	HDL	Não-HDL	sd-LDL
EMV					
Basal	217,7 ± 9,7	147,5 ± 10,0	46,7 ± 4,2	171,0 ± 10,6	50,8 ± 11,2
Δ 30 dias	-1,1 ± 5,8	-9,9 ± 6,0	2,1 ± 3,6	-3,2 ± 3,4	-10,0 ± 5,7
Δ 60 dias	-9,1 ± 8,6	-18,8 ± 15,0	-1,0 ± 1,9	-8,1 ± 9,64	-9,9 ± 8,7
PL					
Basal	219,6 ± 11,4	139,8 ± 10,4	46,4 ± 5,4	173,1 ± 9,9	53,3 ± 8,8
Δ 30 dias	8,1 ± 13,3	7,0 ± 12,6	0,8 ± 1,5	7,3 ± 14,0	0,9 ± 5,2
Δ 60 dias	-9,0 ± 17,3	-6,9 ± 15,8	-2,4 ± 1,5	-6,6 ± 17,3	1,0 ± 3,8

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão. HCE-EMV = Participantes hipercolesterolêmicos, em uso de estatina, que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde; HCE-PL = Participantes hipercolesterolêmicos, em uso de estatinas, que ingeriram cápsulas com amido, ou grupo placebo; sd-LDL = Fração LDL pequena e densa.

Tabela 17- Efeito da ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate verde ou amido, nos parâmetros lipídicos dos indivíduos hipercolesterolêmicos em uso de estatina.

	Triglicerídeos (mg/dL)	LDL-C/HDL-C	COLT/HDL-C
EMV			
Basal	195,6 ± 73,0	3,59 ± 0,77	5,11 ± 0,80
Δ 30 dias	-45,2 ± 50,8	-0,73 ± 0,70	-0,62 ± 0,63
Δ 60 dias	-20,2 ± 35,1	-0,71 ± 0,82	-0,37 ± 0,61
PL			
Basal	166,8 ± 40,2	3,20 ± 0,36	5,05 ± 0,54
Δ 30 dias	1,1 ± 12,0	0,21 ± 0,37	0,23 ± 0,43
Δ 60 dias	-0,8 ± 13,7	0,07 ± 0,46	0,13 ± 0,52

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão. HCE-EMV = Participantes hipercolesterolêmicos, em uso de estatina, que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde; HCE-PL = Participantes hipercolesterolêmicos, em uso de estatinas, que ingeriram cápsulas com amido, ou grupo placebo.

Para comparação, em pacientes sob tratamento com estatinas que tiveram diminuição do LDL-C em 27%, a duplicação da dose de estatina promoveu diminuição adicional de LDL-C de apenas 7% (ROBERTS, 1997). Dessa forma, os nossos resultados indicaram o efeito somatório (sinérgico) da erva-mate com as estatinas na diminuição do colesterol plasmático, sugerindo, assim, que a erva-mate pode ser um potencial adjuvante terapêutico para a redução de LDL-C em indivíduos sob tratamento com estatina. Além disso, os nossos achados podem assumir grande relevância clínica em função da possibilidade de diminuição da dose de estatinas, reduzindo, assim, os seus efeitos colaterais, como a hepatotoxicidade (BERTOLAMI, 2005) e também a rabdomiólise, quando a estatina é associada aos fibratos (BROWN, 2008).

Os indivíduos hipercolesterolêmicos que consumiram as cápsulas de EMV apresentaram diminuições da fração LDL pequena e densa (sd-LDL) de 10,0 mg/dL (-12,26%) e 9,9 mg/dL (-7,55%), após 30 e 60 dias, respectivamente, porém não significativas, enquanto os participantes do grupo placebo apresentaram aumento de 0,90 mg/dL (1,7%) e 0,99 mg/dL (1,9%) após 30 e 60 dias, respectivamente ($P > 0,05$). Vale salientar que em 30 e 60 dias, 62,5% dos participantes reduziram os valores de sd-LDL, em média, 18,8 mg/dL e 22,1 mg/dL, respectivamente, enquanto que no grupo controle, para os mesmos períodos 57,1% reduziram, em média, 9,30 mg/dL e 5,25 mg/dL, respectivamente. Sabe-se que as estatinas diminuem também a concentração da sd-LDL (BALDASSARRE et al., 2005; BAHADIR et al., 2009; CAVALCANTE; SILVA, 2012), contudo não existem relatos sobre o efeito sinérgico da erva-mate com as estatinas na diminuição de frações aterogênicas.

É importante notar que estes indivíduos em uso de estatina que ingeriram as cápsulas de EMV também apresentaram elevação de HDL-C de 2,12 mg/dL, equivalente a 4,5%, após 30 dias, corroborando a diminuição do risco para DAC em 6,4%, segundo o NCEP (2001). O risco aterogênico também foi reduzido neste caso através das relações LDL-C/HDL-C e CT/HDL-C que demonstraram reduções de 0,73 mg/dL (-3,2%) e 0,71 mg/dL (-5,6%), assim como 0,62 mg/dL (-2,0%) e 0,37 mg/dL (-1,9%), após 30 e 60 dias, respectivamente. Os indivíduos HCE do grupo placebo não apresentaram variações expressivas ou significativas para esses parâmetros ($P > 0,05$; Tabelas 16 e 17). Não houve variação significativa ou expressiva para o colesterol total e não-HDL-C.

A maior variação detectada entre os períodos de estudo foi em relação aos triglicerídeos nos indivíduos que consumiram as cápsulas de EMV, com diminuição de 45,2 mg/dL (-12,0%) e 20,2 mg/dL (-7,3%), após 30 e 60 dias, respectivamente, porém sem diferença significativa, possivelmente pela grande variação dos resultados. Após 60 dias, 50% dos indivíduos hipercolesterolêmicos que ingeriam as cápsulas com EMV tiveram diminuição média de 80 mg/dL de triglicerídeos. Não houve alteração significativa nos valores de triglicerídeos nos indivíduos do grupo placebo. Além de diminuir a concentração de LDL-C na circulação, as estatinas também podem, embora de forma discreta, diminuir a concentração de triglicerídeos devido à maior retirada de IDL e VLDL remanescentes pelo fígado (DURRINGTON et al., 2004). Dessa forma, também foi observado efeito sinérgico da erva-mate com as estatinas na diminuição de triglicerídeos, pois a erva-mate pode inibir a atividade da lipase pancreática e aumentar a oxidação de ácidos graxos insaturados no fígado (MARTINS et al., 2010; YOKOSHIKAWA et al., 2009).

4.2.5 ÍNDICES ANTROPOMÉTRICOS

As Tabelas 18 e 19 mostram os resultados referentes ao peso corpóreo e circunferência da cintura. Como pode ser observado, não houve alterações significativas nesses parâmetros após o consumo das cápsulas de erva-mate. Resultados semelhantes foram encontrados anteriormente com as infusões de erva-mate verde e tostada (MORAIS et al., 2009). Por outro lado, o uso de cápsulas contendo uma mistura de erva-mate, guaraná (*Paullinia cupana*) e damiana (*Turnera diffusa* var. *aphrodisiaca*) prolongou o esvaziamento gástrico, reduziu o tempo de percepção de saciedade e induziu uma significativa perda de peso (5,1 kg) após 45 dias em indivíduos com sobrepeso (ANDERSEN; FOGH, 2001). Além disso, o consumo de cápsulas de extrato de erva-mate verde reduziu cerca de 0,5 kg e 0,3% na gordura corporal, em mulheres com sobrepeso (KIM et al., 2012).

Tabela 18- Efeito da ingestão das cápsulas com EMV, EMT e PL no peso corporal e circunferência da cintura (CC) dos participantes dislipidêmicos.

	Parâmetros Antropométricos	
	Peso Corporal (kg)	CC (cm)
EMV (n = 16)		
Basal	76,95 ± 3,77	92,84 ± 1,87
Após 30 dias	76,74 ± 3,62	91,28 ± 1,90
Após 60 dias	76,85 ± 3,45	92,84 ± 2,08
EMT (n = 16)		
Basal	76,52 ± 4,32	95,34 ± 3,29
Após 30 dias	76,57 ± 4,35	96,43 ± 3,24
Após 60 dias	75,85 ± 4,45	96,18 ± 3,45
PL (n = 16)		
Basal	70,47 ± 3,34	89,62 ± 2,86
Após 30 dias	70,19 ± 3,45	90,90 ± 3,10
Após 60 dias	70,42 ± 3,50	90,75 ± 3,08

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão. EMV e EMT = Dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extratos secos de erva-mate verde e tostada, respectivamente; PL = Dislipidêmicos sem uso de estatina que consumiram cápsulas com amido.

Tabela 19- Efeito da ingestão por 30 e 60 dias das cápsulas com EMV e PL no peso corporal e circunferência da cintura (CC) dos participantes hipercolesterolêmicos em uso de estatina.

	Parâmetros Antropométricos	
	Peso Corporal (kg)	CC (cm)
EMV (n = 8)		
Basal	73,74 ± 2,95	96,31 ± 1,57
Após 30 dias	73,48 ± 2,98	94,87 ± 1,94
Após 60 dias	72,96 ± 2,81	92,68 ± 2,20
PL (n = 7)		
Basal	83,32 ± 4,60	99,21 ± 2,84
Após 30 dias	83,30 ± 4,77	99,14 ± 4,12
Após 60 dias	83,19 ± 4,93	99,07 ± 3,47

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão. n = número de participantes; HCE-EMV = Hipercolesterolêmicos que ingeriram cápsulas com extratos secos de erva-mate verde; HCE-PL = Hipercolesterolêmicos sem uso de estatina que consumiram cápsulas com amido.

4.2.6 EFEITO DO CONSUMO DAS CÁPSULAS COM EXTRATO SECO DE ERVA-MATE NOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Diante do conhecimento de que o estresse oxidativo está envolvido no mecanismo pelo qual fatores de risco como hiperlipidemia, hipertensão, diabetes *mellitus* e tabagismo levam à lesão vascular e às sequelas clínicas da aterosclerose (DZAU et al., 2006; STEPHENS; KHANOLKAR; BAIN, 2009), e considerando a notável habilidade antioxidante da infusão de erva-mate demonstrada em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, no presente estudo também foi investigado o potencial da ingestão das cápsulas de erva-mate diminuir o estresse oxidativo em indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos, em uso ou não de estatina. A avaliação deste efeito foi feita através da determinação de marcadores sanguíneos, como a concentração de glutathione reduzida sanguínea; a atividade da enzima paroxonase sérica; o conteúdo de lipídeos oxidados no plasma; enzimas antioxidantes e a capacidade antioxidante (FRAP), que mede o conjunto de substâncias antioxidantes, ou redutoras, presentes no plasma e que podem ser responsáveis pela proteção do organismo contra os efeitos deletérios dos radicais livres.

4.2.6.1 Indivíduos Normolipidêmicos ou Dislipidêmicos sem Uso de Estatina

4.2.6.1.1 Capacidade Antioxidante do Soro

Os resultados do efeito da ingestão a curto e longo prazos das cápsulas contendo EMV e EMT, em comparação ao grupo controle (placebo), na capacidade antioxidante do soro dos voluntários dislipidêmicos, assim como o efeito das cápsulas contendo EMV em indivíduos normolipidêmicos, estão apresentados na Tabela 20 e Figura 21.

No estudo de curto prazo (sete dias), os indivíduos NLP apresentaram aumento na capacidade antioxidante do soro em 88,9 $\mu\text{mol/L}$ (15,9%; $P < 0,001$) comparado ao valor basal, após a ingestão das cápsulas de EMV, sendo que este efeito se manteve durante 30 dias (16,0%; $P < 0,001$). Resultados semelhantes foram observados para os indivíduos DLP que consumiram as cápsulas com EMV (aumento de 16,8% e 18,2% após sete e 30 dias; $P < 0,05$). Porém, não houve

diferença significativa na capacidade antioxidante após 60 dias da ingestão das cápsulas com EMV para ambos os grupos. Os indivíduos que consumiram as cápsulas de EMT ou placebo não apresentaram variações significativas.

Resultados de estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que a capacidade antioxidante no soro aumentou significativamente 1 h após a ingestão de infusão de erva-mate por indivíduos saudáveis (SILVA et al., 2008). Neste mesmo estudo, foi demonstrada a elevação da resistência do plasma e das partículas de LDL contra a peroxidação lipídica após a ingestão, possivelmente devido ao efeito antioxidante dos compostos fenólicos presentes no extrato, sugerindo que os mesmos foram absorvidos, atingiram a circulação sanguínea em quantidade suficientemente elevada para provocar o efeito antioxidante e permaneceram aderidos às partículas de LDL. A ingestão de infusões de erva-mate verde e tostada durante 20 dias promoveu elevação da capacidade antioxidante de 20,7 e 25,6% para os indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos, respectivamente (MORAIS, 2009). Boaventura et al., 2012b demonstrou aumento na capacidade antioxidante em indivíduos dislipidêmicos após ingestão por 90 dias de chá mate sugerindo ser efetivo para suplementação dietética para prevenção de doenças cardiovasculares em indivíduos que não realizam dieta.

A capacidade antioxidante do plasma é a consequência de efeitos individuais e sinérgicos de inúmeros componentes, como ácido úrico, compostos fenólicos, ácido ascórbico, tocoferóis, bilirrubina e albumina, dentre outros (WAYNER et al., 1987). O consumo prolongado de alimentos ricos em antioxidantes costuma apresentar maior número de variáveis que influenciam a capacidade antioxidante do plasma. Assim, tem sido reportado que nos estudos de consumo de extratos vegetais em forma de chás por longa duração, os aumentos na atividade antioxidante do plasma são pequenos (3-10%) e geralmente não significativos (McANLIS et al., 1998; van het HOF et al., 1997). Tendo em vista que no presente estudo a capacidade antioxidante no soro foi avaliada em amostra de sangue coletada em jejum, após 12-14 h da última ingestão das cápsulas de erva-mate, o aumento obtido de aproximadamente 18% pode ser considerado expressivo.

O ácido úrico pode ser o responsável por aproximadamente 60% da capacidade antioxidante no ensaio de FRAP utilizado no presente estudo (BENZIE; STRAIN, 1996; WAYNER et al., 1987). Assim, é interessante notar que a ingestão por curto prazo ou prolongada de

cápsulas com extrato seco de erva-mate não promoveu alterações importantes na concentração sérica de ácido úrico (Tabela 21), dos participantes DLP, sendo que os resultados referentes aos indivíduos NLP mostrados em seção anterior. Indicando assim, que o aumento na capacidade antioxidante foi devido aos constituintes do extrato de erva-mate *per se*, provavelmente polifenóis, ou indiretamente, pelo aumento de outras substâncias redutoras por um mecanismo ainda desconhecido.

Tabela 20 – Efeito da ingestão das cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde, tostada ou amido na capacidade antioxidante do soro ($\mu\text{mol/L}$) de indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos após 7, 30 e 60 dias.

	Período de Ingestão das Cápsulas			
	Basal	7 dias	30 dias	60 dias
<i>Normolipidêmicos</i>				
EMV (n = 14)	557,2 \pm 23,0	646,0 \pm 26,3**	646,6 \pm 25,1**	555,7 \pm 25,3
<i>Dislipidêmicos</i>				
EMV (n = 16)	571,6 \pm 34,0	667,6 \pm 34,8*	675,6 \pm 23,3*	634,4 \pm 26,1
EMT (n = 16)	704,9 \pm 59,8	811,2 \pm 46,7	754,6 \pm 44,9	707,0 \pm 36,8
PL (n = 16)	694,4 \pm 30,6	732,3 \pm 39,1	660,2 \pm 48,1	647,2 \pm 40,0

Os resultados estão expressos como média \pm erro-padrão. n = número de participantes. EMV = Participantes normolipidêmicos e dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde; EMT = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate tostada; PL = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com amido, ou grupo placebo. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,001$ comparado ao respectivo valor basal (ANOVA para Medidas Repetidas e teste complementar de Tukey).

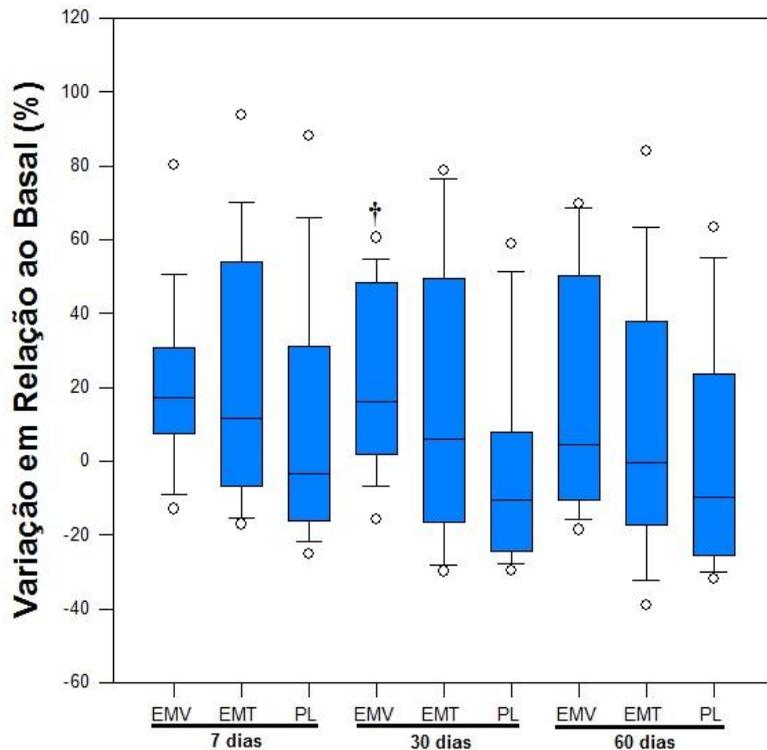


Figura 21. Variação percentual da capacidade antioxidante do soro em indivíduos dislipidêmicos após 7, 30 e 60 dias da ingestão de cápsulas de erva-mate verde (EMV), tostada (EMT) e placebo (PL) em relação aos valores basais. Os resultados estão expressos como mediana (valor mínimo - máximo). $\dagger P < 0,05$ comparado ao respectivo período de tempo do grupo Dislipidêmico que consumiu cápsulas com PL (ANOVA *on Ranks* e teste complementar de Tukey).

Tabela 21 – Efeito da ingestão de cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde e tostada ou amido, por indivíduos dislipidêmicos, no ácido úrico (mg/dL).

	Período de Ingestão das Cápsulas			
	Basal	7 dias	30 dias	60 dias
EMV (n = 16)	3,77 ± 0,27	3,72 ± 0,32	3,96 ± 0,26	3,84 ± 0,27
EMT (n = 16)	4,10 ± 0,40	4,09 ± 0,36	4,42 ± 0,46	4,11 ± 0,47
PL (n = 16)	3,92 ± 0,22	3,69 ± 0,25	3,86 ± 0,14	3,48 ± 0,19

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão. n = número de participantes. EMV = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde; EMT = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate tostada; PL = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com amido, ou grupo placebo.

4.2.6.1.2 Hidroperóxidos Lipídicos

A tabela 22 e Figura 22 mostram os resultados de hidroperóxidos lipídicos após a ingestão das cápsulas com extrato seco de erva-mate por indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos. Em indivíduos normolipidêmicos, as cápsulas com EMV promoveram diminuição significativa de 2,2 $\mu\text{mol/L}$ (28,5%; $P < 0,05$) e 3,8 $\mu\text{mol/L}$ (48,3%; $P < 0,001$), após 30 e 60 dias, respectivamente, comparado ao valor basal. Resultados semelhantes foram observados nos indivíduos DLP que consumiram as cápsulas com EMV, apresentando diminuições de 2,9 $\mu\text{mol/L}$ (41,3%; $P < 0,05$) e 3,3 $\mu\text{mol/L}$ (47,3%; $P < 0,001$) após 30 e 60 dias, respectivamente. Os indivíduos dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com EMT tiveram diminuição significativa dos valores de hidroperóxidos lipídicos (1,96 $\mu\text{mol/L}$; $P < 0,05$) somente após 30 dias, comparado ao valor basal. A ingestão das cápsulas por sete dias não apresentou diminuição significativa. Os indivíduos do grupo placebo não apresentaram variações significativas na concentração de hidroperóxidos lipídicos.

A peroxidação lipídica no soro representa o resultado do efeito deletério de espécies reativas de oxigênio e/ou de nitrogênio nos lipídeos de membranas plasmáticas, organelas e de lipoproteínas. Nossos resultados demonstraram que indivíduos com dislipidemia apresentaram diminuição da lipoperoxidação após 30 e 60 dias de consumo das cápsulas de erva-mate verde. Resultados semelhantes foram observados anteriormente, com diminuição de aproximadamente 34% da lipoperoxidação após 20 dias de consumo de infusão de erva-mate por indivíduos com dislipidemia (MORAIS, 2009). Por outro lado, Boaventura et al. (2012b) mostraram que o consumo a longo prazo de chá mate não reduziu a peroxidação lipídica sérica em indivíduos dislipidêmicos e Bertipaglia de Santana et al. (2008) demonstraram que a associação de soja e chá verde não foi capaz de diminuir os hidroperóxidos lipídicos no plasma de indivíduos dislipidêmicos. Em nosso trabalho, sugerimos que a diminuição da lipoperoxidação foi decorrente da maior concentração de ácido fenólicos presentes no extrato seco de erva-mate.

Tabela 22 – Efeito da ingestão de cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde e tostada ou amido, por indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos, na concentração sérica de hidroperóxidos lipídicos ($\mu\text{mol/L}$).

	Período de Ingestão das Cápsulas			
	Basal	7 dias	30 dias	60 dias
<i>Normolipidêmicos</i>				
EMV (n = 14)	7,86 \pm 0,90	9,77 \pm 0,46	5,62 \pm 0,70*	4,08 \pm 0,64**
<i>Dislipidêmicos</i>				
EMV (n = 16)	6,96 \pm 0,65	7,33 \pm 0,67	4,06 \pm 0,56*	3,67 \pm 0,48**
EMT (n = 16)	5,99 \pm 0,52	4,72 \pm 0,53	4,03 \pm 0,56*	4,87 \pm 0,70
PL (n = 16)	6,80 \pm 0,99	6,28 \pm 0,80	5,24 \pm 0,69	5,38 \pm 0,41

Os resultados estão expressos como média \pm erro-padrão. n = número de participantes. EMV = Participantes normolipidêmicos e dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde; EMT = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate tostada; PL = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com amido, ou grupo placebo. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,001$ comparado ao respectivo valor basal (ANOVA para Medidas Repetidas e teste complementar de Tukey ou teste t pareado de Student).

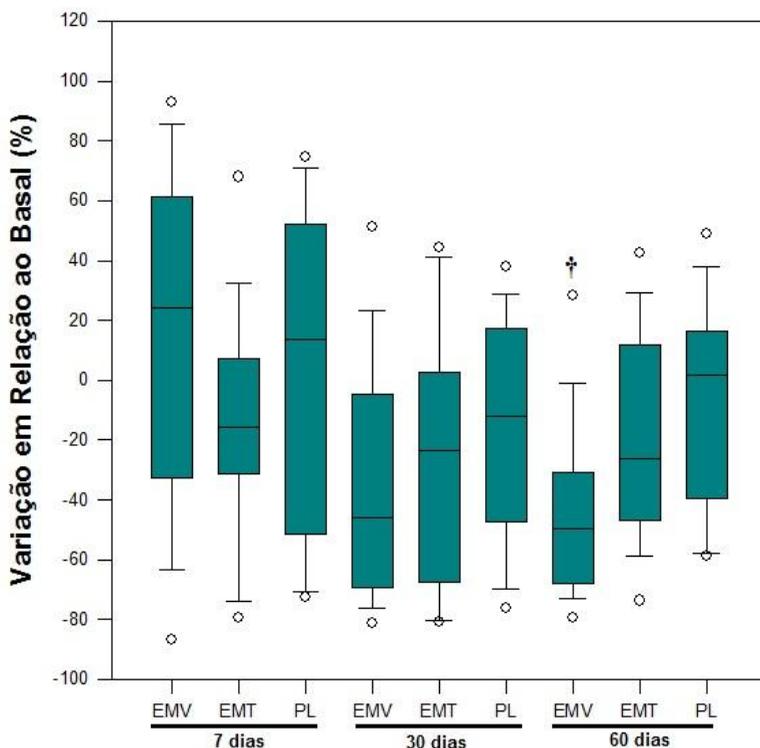


Figura 22. Variação percentual dos hidroperóxidos lipídicos em indivíduos dislipidêmicos após 7, 30 e 60 dias da ingestão de cápsulas de erva-mate verde (EMV), tostada (EMT) e placebo (PL) em relação aos valores basais. Os resultados estão expressos como mediana (valor mínimo - máximo). $^{\dagger}P < 0,05$ comparado ao respectivo período de tempo do grupo Dislipidêmico que consumiu cápsulas com PL (ANOVA *on Ranks* e teste complementar de Tukey).

4.2.6.1.3 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

A tabela 23 e Figura 23 mostram os resultados de TBARS antes e após a ingestão de cápsulas com EMV, EMT ou placebo. Em indivíduos normolipidêmicos, as cápsulas com EMV promoveram redução de 3,4 $\mu\text{mol/L}$ (36,7%) e 4,4 $\mu\text{mol/L}$ (47,6%) após sete e 30 dias, respectivamente, comparado ao valor basal ($P < 0,001$). No entanto, após 60 dias não houve redução significativa. Os indivíduos

dislipidêmicos que consumiram as cápsulas com EMV apresentaram diminuições nas concentrações de TBARS após sete e 30 dias de 6,0 $\mu\text{mol/L}$ (40,3%) e 9,5 $\mu\text{mol/L}$ (63,9%), respectivamente ($P < 0,05$), em 60 dias houve redução de 4,8 $\mu\text{mol/L}$ (27,8%), porém não foi significativa. Por outro lado, os indivíduos DLP que ingeriram as cápsulas com EMT tiveram diminuições de 1,5 $\mu\text{mol/L}$ (16,4%), 3,9 $\mu\text{mol/L}$ (16,3%) e 3,4 $\mu\text{mol/L}$ (14,3%) após sete, 30 e 60 dias, respectivamente, comparado ao valor basal, sendo apenas marginalmente significativa ($P = 0,083$, $P = 0,057$ e $P = 0,058$; teste *t* pareado de Student), e sem diferença significativa quando comparado ao grupo placebo ($P > 0,05$; Figura 23). Como pode ser observado, não houve variação de TBARS nos indivíduos do grupo placebo.

Matsumoto et al. (2009) demonstraram redução na concentração de TBARS, após 1 semana com a ingestão de chá mate, por mulheres saudáveis. Acredita-se que o sequestro de radicais livres esteja relacionado no mecanismo pelo qual agem ácidos fenólicos e seus metabólitos. Assim estes compostos atingem níveis suficientes no plasma de indivíduos, prevenindo a peroxidação, como já foi mostrado anteriormente (GUGLIUCCI, 1996; GUGLIUCCI; STAHL, 1995).

Tabela 23 – Efeito da ingestão de cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde e tostada ou amido na concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ($\mu\text{mol/L}$) no plasma de indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos.

	Período de Ingestão das Cápsulas			
	Basal	7 dias	30 dias	60 dias
<i>Normolipidêmicos</i>				
EMV (n = 14)	9,17 \pm 0,59	5,80 \pm 0,25**	4,80 \pm 0,38**	10,12 \pm 0,46
<i>Dislipidêmicos</i>				
EMV (n = 16)	15,04 (12,54 – 18,76)	6,40* (4,17 – 11,39)	4,95* (4,28 – 6,32)	10,68 (7,82 – 11,86)
EMT (n = 16)	10,94 \pm 1,48	9,15 \pm 1,81	6,68 \pm 0,70	7,20 \pm 0,75
PL (n = 16)	7,98 (6,15 – 14,55)	8,09 (4,05 – 12,04)	7,16 (5,71 – 10,70)	10,00 (5,78 – 11,69)

Os resultados estão expressos como média \pm erro-padrão e mediana (valor mínimo - máximo). n = número de participantes. EMV = Participantes normolipidêmicos e dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde; EMT = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate tostada; PL = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com amido, ou grupo placebo. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo valor basal (ANOVA *on Ranks* e teste complementar de Tukey); ** $P < 0,001$ comparado ao respectivo valor basal (teste *t* pareado de Student).

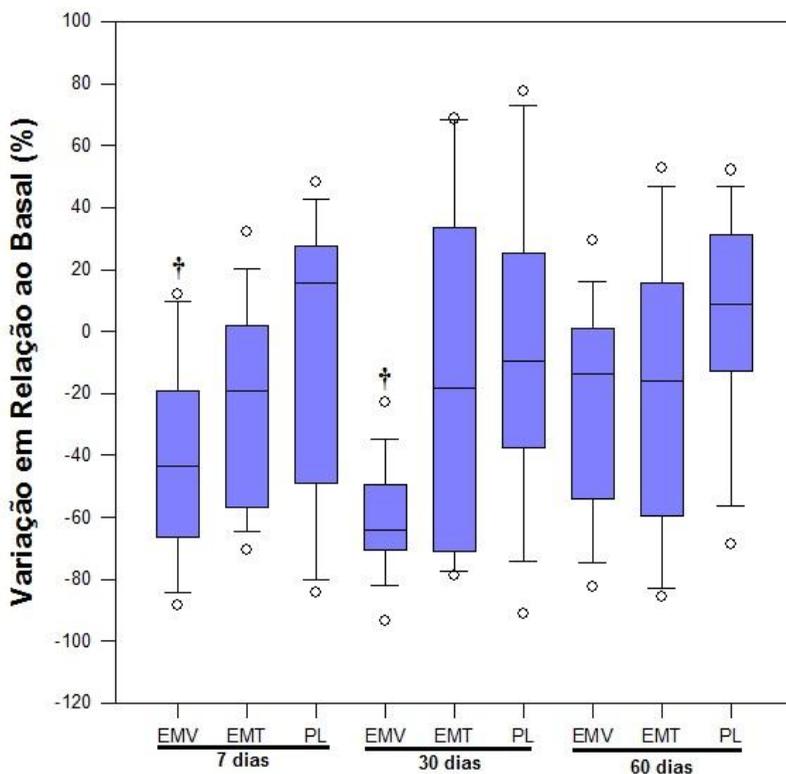


Figura 23. Variação percentual das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em indivíduos dislipidêmicos após 7, 30 e 60 dias da ingestão de cápsulas de erva-mate verde (EMV), tostada (EMT) e placebo (PL) em relação aos valores basais. Os resultados estão expressos como mediana (valor mínimo - máximo). † $P < 0,05$ comparado ao respectivo período de tempo do grupo Dislipidêmico que consumiu cápsulas com PL (ANOVA *on Ranks* e teste complementar de Tukey).

4.2.6.1.4 Glutathiona Reduzida Sanguínea

A ingestão das cápsulas com EMV por indivíduos normolipidêmicos promoveu aumento de 82,5 $\mu\text{mol/L}$ (8,9%) e 72,4 $\mu\text{mol/L}$ (7,8%) após sete e 60 dias, respectivamente, em relação ao basal ($P < 0,05$ e $P < 0,001$; teste t pareado de Student). No entanto, não houve redução significativa após 30 dias. Também não houve alterações

significativas de GSH nos demais grupos de estudo (Tabela 24). A erva-mate aumentou a concentração de GSH em aproximadamente 30% em indivíduos normolipidêmicos, enquanto os indivíduos dislipidêmicos apresentaram aumento de 7,5%, após 40 dias de ingestão de infusão de erva-mate (MORAIS, 2009).

Tabela 24 – Efeito da ingestão de cápsulas de EMV, EMT ou placebo na concentração de glutatona reduzida sanguínea ($\mu\text{mol/L}$) de indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos.

	Período de Ingestão das Cápsulas			
	Basal	7 dias	30 dias	60 dias
<i>Normolipidêmicos</i>				
EMV (n = 14)	922, 8 \pm 31,0	1005,3 \pm 32,6*	922,5 \pm 32,6	995,2 \pm 26,9**
<i>Dislipidêmicos</i>				
EMV (n = 16)	984,8 \pm 4,3	977,5 \pm 28,7	1008,2 \pm 41,4	953,8 \pm 34,5
EMT (n = 16)	995,2 \pm 44,1	905,5 \pm 41,1	1036,5 \pm 62,6	955,5 \pm 49,1
PL (n = 16)	1073,6 \pm 53,8	968,1 \pm 32,3	1104,0 \pm 47,0	1001,7 \pm 39,3

Os resultados estão expressos como média \pm erro-padrão. n = número de participantes. EMV = Participantes normolipidêmicos e dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde; EMT = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate tostada; PL = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com amido, ou grupo placebo. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,001$ comparado ao respectivo valor basal (teste t pareado de Student).

4.2.6.1.5 Atividade da Glutationa Peroxidase

A atividade da glutathione peroxidase eritrocitária não foi modificada pela ingestão das cápsulas contendo EMV ou EMT por participantes NLP ou DLP, independente do período avaliado ou entre os grupos de tratamento (Tabela 25; $P > 0,05$). Assim como nossos resultados, também foi relatado por Arçari et al. (2011) que a ingestão de infusão de erva-mate por 60 dias não modificou a atividade de GPx em indivíduos normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos. Por outro lado, Matsumoto et al. (2009) relataram aumento na atividade da GPx uma semana após ingestão de chá mate por mulheres saudáveis.

Tabela 25 – Efeito da ingestão de cápsulas de EMV, EMT ou placebo na atividade da glutathiona peroxidase (mU/mg proteína) por indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos.

	Período de Ingestão das Cápsulas			
	Basal	7 dias	30 dias	60 dias
<i>Normolipidêmicos</i>				
EMV (n = 14)	36,7 ± 1,0	35,4 ± 1,2	37,6 ± 2,1	40,5 ± 3,0
<i>Dislipidêmicos</i>				
EMV (n = 16)	34,7 ± 1,7	30,4 ± 1,8	30,9 ± 1,9	36,3 ± 1,5
EMT (n = 16)	29,5 ± 2,9	29,5 ± 3,4	30,1 ± 2,4	32,7 ± 1,5
PL (n = 16)	31,3 ± 2,6	30,5 ± 2,8	31,5 ± 1,7	37,4 ± 1,8

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão. n = número de participantes. EMV = Participantes normolipidêmicos e dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde; EMT = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate tostada; PL = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com amido, ou grupo placebo.

4.2.6.1.6 Superóxido Dismutase (SOD)

A tabela 26 mostra os resultados da atividade da SOD antes e após a ingestão de cápsulas com EMV, EMT ou placebo. Em indivíduos normolipidêmicos, as cápsulas com EMV promoveram aumento de 0,35 USOD/mg (65,9%; $P < 0,001$), 0,15 USOD/mg (44,1%; $P < 0,05$) e 0,13 USOD/mg (37,0%; $P < 0,05$) na atividade da SOD em relação ao basal após, respectivamente, sete, 30 e 60 dias. Os indivíduos dislipidêmicos que consumiram as cápsulas com EMV apresentaram aumento de 0,17 USOD/mg (38,5%) na atividade da SOD comparado ao valor basal, após 60 dias ($P < 0,05$). No entanto, não se observou aumento na atividade após sete e 30 dias. A Figura 24 mostra que em 60 dias os indivíduos dislipidêmicos que consumiram cápsulas com EMV apresentaram maior variação em relação ao basal. As cápsulas de EMT e o grupo placebo não promoveram aumento significativo na atividade da SOD nos indivíduos dislipidêmicos.

Em estudo por longo prazo também foi comprovado por Arçari et al. (2011) que a ingestão de infusão de erva-mate aumentou a atividade da SOD em indivíduos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos. Assim os compostos bioativos da erva-mate, ácido fenólicos ou seus metabólitos agem como indutores de expressão gênica de enzimas antioxidantes. Em ratos foi demonstrado que os ácidos ferúlico, gálico e *p* – cumárico aumentam a expressão de RNA em tecidos cardíaco e hepático, bem como a atividade das enzimas SOD, GPx e Catalase, assim como a capacidade antioxidante total (YEH et al., 2009). Também foi demonstrado que as saponinas, presentes no *Panax Ginseng* são capazes de induzir transcrição gênica da SOD em células HepG2 de câncer hepático humanas, indicando uma ligação molecular entre as saponinas do ginseng e seus efeitos inibitórios sobre o envelhecimento e mutação por radicais de oxigênio (KIM et al., 1996).

Tabela 26 – Efeito da ingestão por 7, 30 e 60 dias de cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde e tostada ou amido, por indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos, na atividade da superóxido dismutase (U/mg proteína).

	Período de Ingestão das Cápsulas			
	Basal	7 dias	30 dias	60 dias
<i>Normolipidêmicos</i>				
EMV (n = 14)	0,34 ± 0,02	0,57 ± 0,03**	0,49 ± 0,03*	0,47 ± 0,04*
<i>Dislipidêmicos</i>				
EMV (n = 16)	0,45 (0,31 – 0,49)	0,50 (0,39 – 0,58)	0,35 (0,30 – 0,45)	0,58* (0,48 – 0,69)
EMT (n = 16)	0,48 ± 0,03	0,46 ± 0,04	0,53 ± 0,03	0,51 ± 0,05
PL (n = 16)	0,48 ± 0,04	0,47 ± 0,03	0,44 ± 0,04	0,49 ± 0,05

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão e mediana (valor mínimo e máximo). n = número de participantes. EMV = Participantes normolipidêmicos e dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde; EMT = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate tostada; PL = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com amido, ou grupo placebo. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,001$ comparado ao respectivo valor basal (ANOVA para Medidas Repetidas e teste complementar de Tukey e teste t pareado de Student); * $P < 0,05$ comparado ao respectivo valor basal (ANOVA *on Ranks* e teste complementar de Tukey).

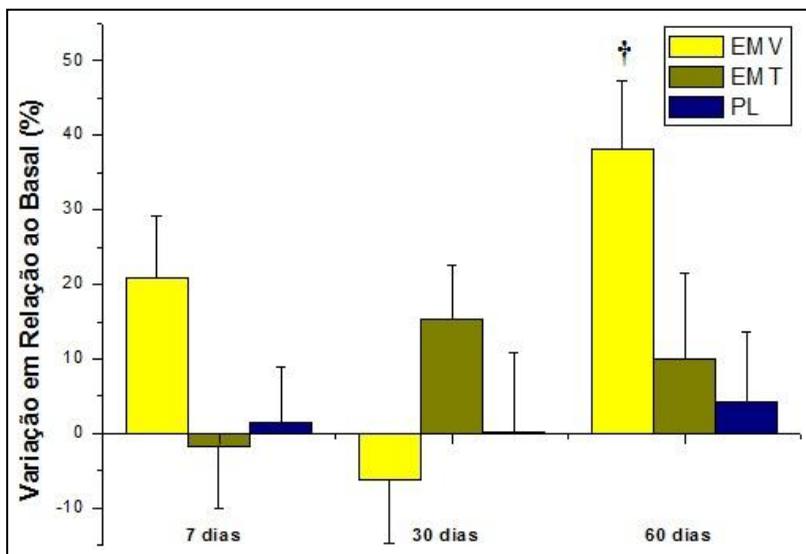


Figura 24. Variação percentual na atividade da superóxido dismutase em indivíduos dislipidêmicos após 7, 30 e 60 dias da ingestão de cápsulas de erva-mate verde (EMV), tostada (EMT) e placebo (PL) em relação aos valores basais. Os resultados estão expressos como mediana (valor mínimo - máximo). † $P < 0,05$ comparado ao respectivo período de tempo do grupo Dislipidêmico que consumiu cápsulas com PL (ANOVA e teste complementar de Tukey).

4.2.6.1.7 Atividade Catalase

A tabela 27 mostra os resultados da atividade da catalase antes e após a ingestão de cápsulas com EMV, EMT ou placebo. Apenas o consumo das cápsulas de EMV promoveu aumento significativo na atividade da catalase após sete (82,0%) e 30 dias (27,5%) em indivíduos NLP e após 30 dias (14,7%) em indivíduos DLP, em relação aos correspondentes valores basais ($P < 0,05$). Não foram evidenciadas diferenças entre os tratamentos para os períodos avaliados ($P > 0,05$; resultados não mostrados). Os nossos resultados estão parcialmente em desacordo com aqueles relatados por Matsumoto et al. (2009), que mostraram aumento na atividade da catalase após uma semana de ingestão de chá mate por mulheres saudáveis. Assim, as diferenças observadas entre os efeitos dos extratos de EMV e EMT deverão ser

melhor exploradas em trabalhos futuros.

Tabela 27 – Efeito da ingestão de cápsulas com EMV, EMT ou placebo na atividade da catalase (U/mg proteína) de indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos.

	Período de Ingestão das Cápsulas			
	Basal	7 dias	30 dias	60 dias
<i>Normolipidêmicos</i>				
EMV(n = 14)	0,10 ± 0,006	0,18 ± 0,01**	0,13 ± 0,006*	0,10 ± 0,006
<i>Dislipidêmicos</i>				
EMV (n = 16)	0,10 ± 0,009	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,005*	0,12 ± 0,007
EMT (n = 16)	0,11 ± 0,007	0,09 ± 0,005	0,12 ± 0,003	0,12 ± 0,009
PL (n = 16)	0,10 ± 0,008	0,09 ± 0,006	0,12 ± 0,008	0,11 ± 0,008

Os resultados estão expressos como média ± erro-padrão. n = número de participantes. EMV = Participantes normolipidêmicos e dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde; EMT = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate tostada; PL = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com amido, ou grupo placebo. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo basal (teste t pareado de Student); ** $P < 0,001$ comparado ao respectivo valor basal (ANOVA para Medidas Repetidas e teste complementar de Tukey).

4.2.6.1.8 Atividade Sérica da Enzima Paroxonase

A Tabela 28 mostra os resultados do efeito da ingestão das cápsulas contendo EMV, EMT ou placebo na atividade sérica da enzima paroxonase (PON1) em indivíduos NLP e DLP. Como pode ser observado, apenas as cápsulas de EMV promoveram aumento significativo na atividade da PON1 em indivíduos NLP e DLP de 28,7% e 17,4%, respectivamente, após sete dias ($P < 0,05$). Não foram observadas variações significativas nos demais períodos de tempo avaliados, assim como diferenças entre os tratamentos.

Tem sido relatado que a atividade da PON1 pode ser modulada por agentes externos, apresentando-se diminuída em fumantes com doença arterial coronariana (JAMES; LEVIEV; RIGHETTI, 2000; JARVIK et al., 2002; KLEEMOLA et al., 2002), após a ingestão de refeição rica em gordura oxidada (SUTHERLAND et al., 1999), bem como na gravidez e menopausa (LI; LIU; LIANG, 2003). Por outro lado, a atividade da PON1 pode ser aumentada pelo consumo de antioxidantes dietéticos (polifenóis, vitaminas C e E) e medicamentos (estatinas e contraceptivos orais) (JARVIK et al., 2002; KLEEMOLA et al., 2002; LI; LIU; LIANG, 2003). A ingestão aguda de infusão de erva-mate aumentou em 10%, em média, a atividade da PON1 no plasma de quatro indivíduos saudáveis (MENINI et al., 2007). Assim como em nossos resultados, recentemente, Boaventura et al. (2012b) relataram que não houve aumento de PON1 após a ingestão de infusão de erva-mate por longo prazo, porém 50% dos indivíduos dislipidêmicos apresentaram aumento em média de 23%, sugerindo proteção contra doenças cardiovasculares nestes indivíduos. Dessa maneira, parece que a erva-mate e outros antioxidantes nutricionais, por um mecanismo ainda não elucidado, melhora a atividade da enzima antioxidante PON1 de alguns indivíduos, podendo contribuir para a proteção do organismo contra os eventos cardiovasculares, pois a atividade da enzima antioxidante PON1 está inversamente associada à aterosclerose. Um dos prováveis mecanismos é pela hidrólise pela PON1 de lipídeos oxidados específicos nas lipoproteínas, em macrófagos e em lesões ateroscleróticas (AVIRAM; ROSEMBLAT, 2005). Vale notar que a atividade sérica da PON1 está diminuída inclusive em indivíduos hipercolesterolêmicos (MACKNESS et al., 1991). Assim, estratégias que promovam a elevação da atividade da PON1 são consideradas interessantes para reduzir o risco de desenvolvimento da aterosclerose.

Tabela 28 – Efeito da ingestão de cápsulas de EMV, EMT ou placebo na atividade sérica da enzima paroxonase (U/mL) de indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos.

	Período de Ingestão das Cápsulas			
	Basal	7 dias	30 dias	60 dias
<i>Normolipidêmicos</i>				
EMV (n = 14)	44,71 (26,62 – 117,19)	53,81* (27,55 – 158,25)	48,93 (28,70 – 136,26)	46,80 (28,75 – 112,41)
<i>Dislipidêmicos</i>				
EMV (n = 16)	59,81 (32,01 – 120,83)	70,63* (36,45 – 143,19)	65,69 (34,52 – 121,01)	53,69 (33,52 – 97,06)
EMT (n = 16)	32,45 (23,52 – 96,54)	35,74 (25,79 – 106,94)	34,84 (25,03 – 99,13)	36,33 (23,55 – 113,14)
PL (n = 16)	84,00 (28,12 – 125,80)	93,39 (30,78 – 123,82)	76,97 (27,16 – 110,48)	83,00 (27,13 – 115,85)

Os resultados estão expressos como mediana (valor mínimo – valor máximo). n = número de participantes. EMV = Participantes normolipidêmicos e dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate verde; EMT = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com extrato seco de erva-mate tostada; PL = Participantes dislipidêmicos que ingeriram cápsulas com amido, ou grupo placebo. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo valor basal (ANOVA *on Ranks* e teste complementar de Tukey).

4.2.6.2 Indivíduos Hipercolesterolêmicos em Uso de Estatina

Vários estudos mostraram o efeito antioxidante das estatinas (FRANZONI et al., 2003; ROSENSON, 2004; TRAVIDOU et al., 2006), sobretudo, em pacientes hipercolesterolêmicos ou com risco para doenças cardiovasculares (WASSMANN et al., 2012; HARAMAKI et al., 2007). Além disso, Roberto et al. (2010) também demonstraram que o efeito antioxidante das estatinas pode ocorrer por vários mecanismos, incluindo o efeito inibitório direto da enzima NADPH oxidase circulante.

Nesse sentido, avaliamos também o potencial efeito sinérgico do extrato seco de erva-mate verde com as estatinas e os resultados do efeito do consumo das cápsulas com EMV e amido (placebo) nos parâmetros do estresse oxidativo nos indivíduos HCE em tratamento com estatinas estão mostrados nas figuras 25 a 28.

Para o grupo HCE usuários de estatina, a ingestão de cápsulas com EMV promoveu elevação significativa da capacidade antioxidante de aproximadamente 29%, 17% e 8%, após 7, 30 e 60 dias, respectivamente em relação ao basal ($P < 0,05$; teste t pareado de Student; Figura 25). Os indivíduos do grupo placebo tiveram diminuição significativa da capacidade antioxidante após 60 dias (aproximadamente 9% em relação ao basal; $P < 0,05$). Estudo anterior de nosso laboratório também demonstrou aumento na capacidade antioxidante do soro, após 20 e 40 dias de ingestão de infusão de erva-mate, em indivíduos dislipidêmicos, usuários de estatinas (MORAIS, 2009).

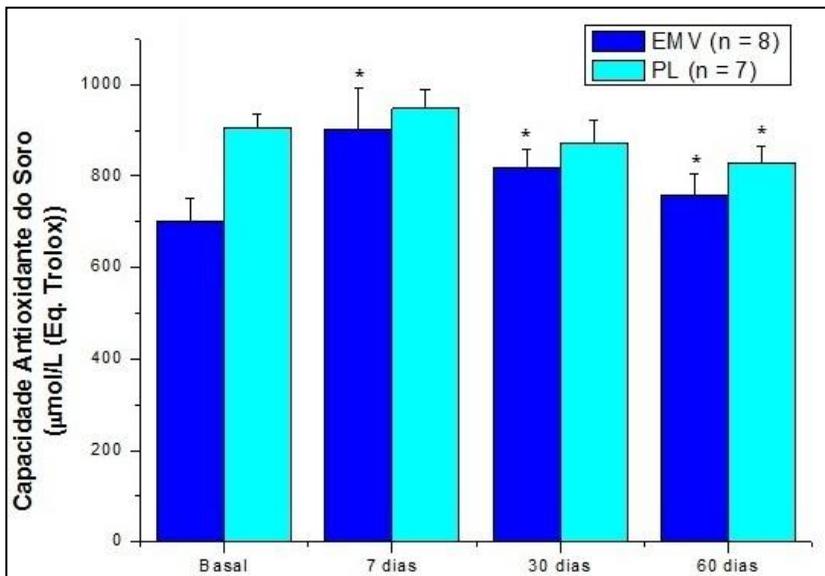


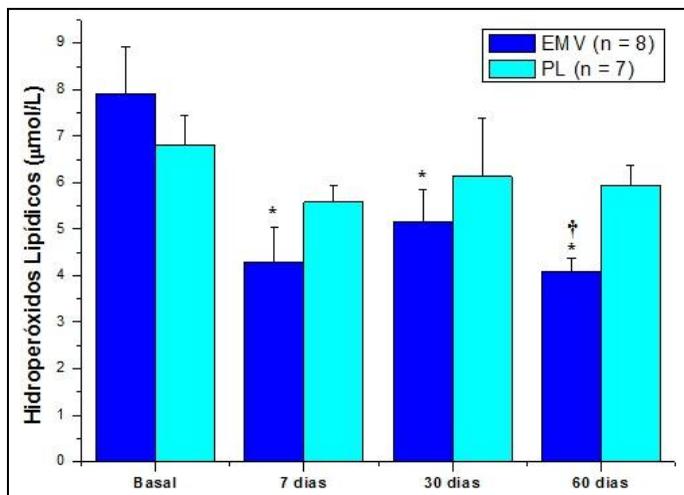
Figura 25. Efeito da ingestão de cápsulas com EMV ou amido (placebo) em indivíduos hipercolesterolêmicos, usuários de estatina na capacidade antioxidante do soro. Os resultados estão expressos como média \pm erro-padrão. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo valor basal (teste t pareado de Student).

Não houve alterações significativas nas concentrações de GSH sanguínea ou de ácido úrico sérico (resultados não mostrados), exceto aumento de 11,7% de ácido úrico no grupo placebo após 60 dias ($P < 0,05$; teste t pareado de Student).

Além disso, a ingestão das cápsulas com EMV promoveu diminuição significativa na concentração sérica de hidroperóxidos lipídicos em 45,6, 34,6 e 48,3% após sete, 30 e 60 dias, respectivamente ($P < 0,05$; teste t pareado de Student). Em comparação ao placebo, as cápsulas de EMV mostraram diferença significativa somente no período de 60 dias (EMV = $-3,82 \mu\text{mol/L}$ vs. Placebo = $-0,89 \mu\text{mol/L}$, em relação ao basal; $P < 0,05$; ANOVA e teste complementar de Tukey; Figura 26A). Também foi observada diminuição temporária de $3,21 \mu\text{mol/L}$ das TBARS, após sete dias de ingestão das cápsulas de EMV ($P < 0,05$; teste t pareado de Student; Figura 26B). Em comparação ao placebo, as cápsulas de EMV mostraram diferença significativa somente no período de sete dias (EMV = $-3,12 \mu\text{mol/L}$ vs. Placebo = $-0,68$

$\mu\text{mol/L}$; $P < 0,05$; ANOVA e teste complementar de Tukey; Figura 26B). Estudo anterior de nosso laboratório também demonstra diminuição na concentração sérica de hidroperóxidos lipídicos, após 20 e 40 dias de ingestão de infusão de erva-mate, em indivíduos hipercolesterolêmicos usuários de estatinas (MORAIS, 2009).

A



B

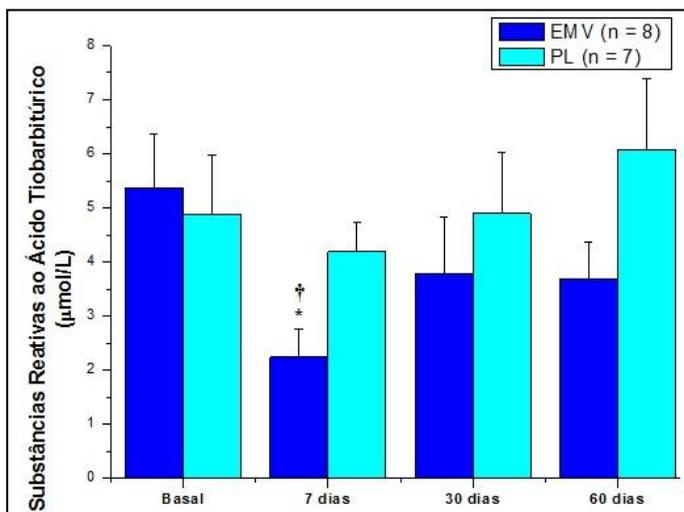


Figura 26. Efeito da ingestão de cápsulas com EMV ou amido (placebo) nos parâmetros do estresse oxidativo de indivíduos

hipercolesterolêmicos usuários de estatina (HCE): (A) Hidroperóxidos Lipídicos; (B) Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico. Os resultados estão expressos como média \pm erro-padrão. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo valor basal (teste t pareado de Student); † $P < 0,05$ comparado ao respectivo período de tempo do grupo HCE que consumiu cápsulas com PL (ANOVA e teste complementar de Tukey).

Infelizmente, são escassos os estudos que avaliaram o efeito das estatinas nos marcadores plasmáticos do estresse oxidativo. Ky et al. (2008) avaliaram a influência da pravastatina e atorvastatina no estresse oxidativo de indivíduos hipercolesterolêmicos, porém os resultados apresentados foram inconsistentes, com alterações não significativas na concentração de LDL oxidada ou na excreção de produtos de peroxidação lipídica (isoprostanos), dentre outros. O trabalho realizado por Travidou et al. (2006), por sua vez, demonstrou que o tratamento com sinvastatina em indivíduos hipercolesterolêmicos promoveu diminuição significativa da LDL oxidada.

A Figura 27 mostra os resultados do efeito da ingestão de cápsulas com EMV na atividade da SOD. Após 30 dias de consumo das cápsulas observou-se aumento significativo, mas temporário, na atividade da SOD de 0,123 USOD/mg proteína (25,9%) ($P < 0,05$; teste t pareado de Student). Para as demais enzimas antioxidantes, GPx e catalase, não se observou diferença estatística entre os grupos de estudos ou entre os períodos de tempo avaliados (resultados não mostrados).

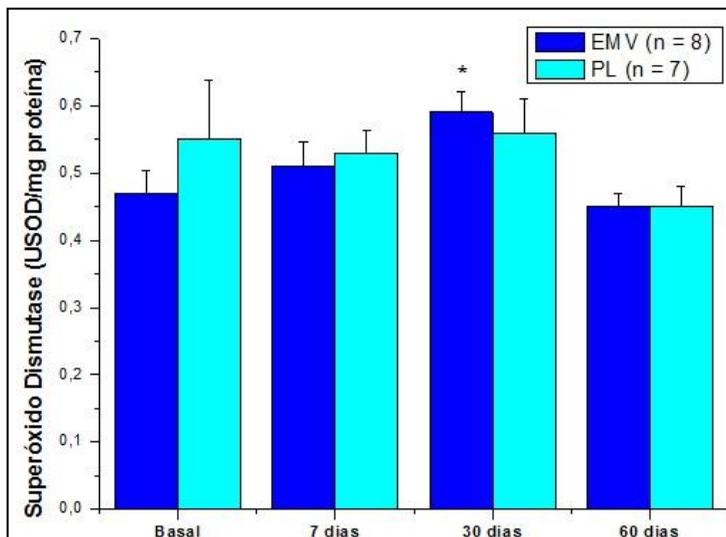


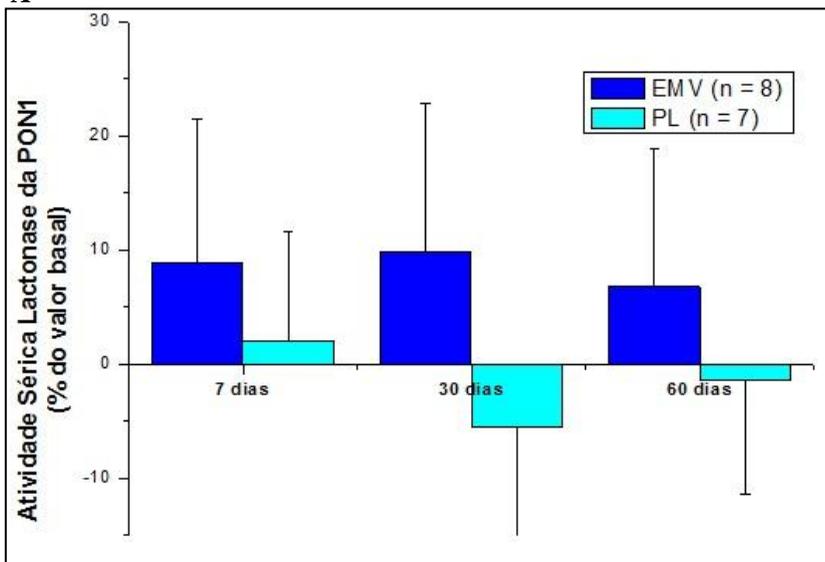
Figura 27. Efeito da ingestão de cápsulas com EMV ou amido (placebo) em indivíduos hipercolesterolêmicos, usuários de estatina na atividade enzimática da superóxido dismutase. Os resultados estão expressos como média \pm erro-padrão. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo valor basal (teste t pareado de Student).

A Figura 28 mostra os resultados do efeito da ingestão de cápsulas com EMV na atividade da enzima PON1 utilizando diferentes substratos, os quais definem as atividades lactonase, arilesterase e paroxonase. Não houve diferença significativa nos períodos de tempo avaliados, porém em comparação ao placebo, as cápsulas de EMV mostraram aumento na atividade lactonase em 7, 30 e 60 dias (EMV = 8,9%, 9,8 e 6,8% vs. Placebo = 2,0%, -5,5% e -1,4%, em relação ao basal; $P < 0,05$; ANOVA e teste complementar de Tukey; Figura 28A). O mesmo foi observado para a atividade arilesterase em 7, 30 e 60 dias (EMV = 6,0%, 7,6 e 8,2% vs. Placebo = 0,6%, -9,5% e -4,6%, em relação ao basal; $P > 0,05$; Figura 28B). Para a atividade paroxonase, observou-se aumento significativo de 22,4% em comparação ao grupo placebo após sete dias de consumo das cápsulas de EMV ($P < 0,05$) e de 17,6% e 14,3% em relação ao valor basal após 30 e 60 dias, respectivamente, mas sem diferença significativa (Figura 26C). No presente estudo, demonstramos que a ingestão em curto e prolongado prazos de cápsulas com EMV aumentou a atividade da PON1 no

plasma, estando de acordo com estudos anteriores de nosso laboratório com infusão de erva-mate em mulheres saudáveis e em indivíduos dislipidêmicos usuários de estatinas (FERNANDES et al., 2012; MORAIS, 2009).

Dessa forma, o extrato de *Ilex paraguariensis* pode, por meio do aumento da atividade da PON1, evitar a perda da função antiaterogênica da HDL quando a partícula está sob estresse oxidativo (MENINI et al., 2007). Além disso, o aumento na atividade da PON1 pode ter contribuído, parcialmente, para o aumento da capacidade antioxidante do plasma e redução da oxidação do plasma e de partículas de lipoproteínas de baixa densidade após a ingestão de infusão de erva-mate (GUGLIUCCI, 1996; SILVA et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2009).

A



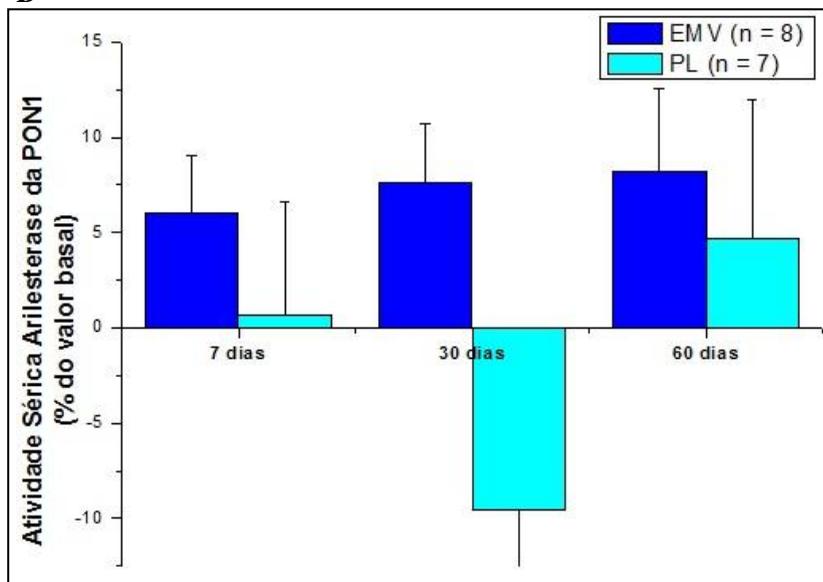
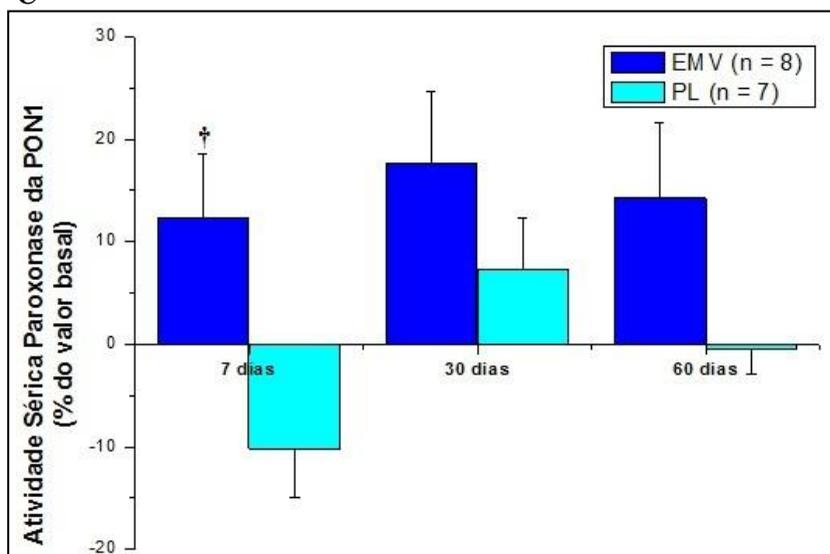
B**C**

Figura 28. Efeito da ingestão de cápsulas com EMV ou amido (PL, placebo) nos parâmetros do estresse oxidativo de indivíduos hipercolesterolêmicos usuários de estatina (HCE): (A) Atividade Sérica Lactonase da PON1; (B) Atividade Sérica Arilesterase da PON1; (C) Atividade Sérica Paroxonase da PON1. Os resultados estão expressos como média \pm erro-padrão. $^{\dagger}P < 0,05$ comparado entre os grupos de cada período (ANOVA e teste complementar de Tukey).

4.3 Considerações Finais

O processamento da erva-mate para produção do extrato de erva-mate verde, consumido na forma de chimarrão ou tererê, envolve etapas de colheita das partes aéreas da planta, sapeco, secagem e moagem, enquanto que para a produção do extrato de erva-mate tostada, consumido na forma de chá mate envolve, ainda, processo de torrefação, o qual submete o extrato de erva-mate à temperatura de aproximadamente 120 °C por 15 min (MACHADO et al., 2007). Apesar desta torrefação adicional, Bastos et al. (2007) mostraram semelhança entre a composição dos extratos em relação aos compostos fenólicos, prevalecendo o ácido clorogênico, responsável pelo potencial antioxidante da erva-mate (revisado por BASTOS et al., 2007a; revisado por HECK; de MEJIA, 2007). Nesse sentido, as cápsulas com extratos secos de erva-mate verde e tostada utilizadas no presente estudo também apresentaram teores de fenóis totais e ácidos fenólicos semelhantes. Não obstante, foram observados melhores efeitos antioxidantes nos marcadores do estresse oxidativo dos participantes que consumiram cápsulas de EMV, possivelmente pelo fato do sequestro de radicais livres por ácidos fenólicos e seus metabólitos que atingiram níveis suficientes no plasma dos indivíduos, como já foi mostrado para chimarrão (GUGLIUCCI, 1996; GUGLIUCCI; STAHL, 1995). De qualquer maneira, essas comparações não são ainda conclusivas devido ao pequeno número de participantes deste estudo. Portanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a absorção e a biodisponibilidade dos ácidos fenólicos dos extratos secos de erva-mate verde e tostada em seres humanos. É possível que, apesar do processo inicial de torrefação não alterar a concentração dos compostos fenólicos na erva-mate tostada, ocorra modificação da biodisponibilidade desses compostos fenólicos *in vivo*, gerando menor efeito antioxidante em relação ao extrato de erva-mate verde. Além disso, estudos envolvendo absorção e

biodisponibilidade do ácido clorogênico em seres humanos não são totalmente conclusivos. Monteiro et al. (2007) identificaram o ácido clorogênico e seus isômeros no plasma humano depois da ingestão aguda de café, uma bebida rica em ácido clorogênico, indicando sua absorção e metabolismo. Confirmado por, Farah et al. (2008) que além disso mostra que a urina parece não ser o melhor meio de excreção de isômeros do ácido clorogênico, pela grande variação inter-individual relacionadas à absorção e metabolismo. Ainda assim, o ácido cafeico foi o único ácido fenólico encontrado no plasma humano depois da administração de café (NARDINI et al., 2002). Segundo Olthof, Hollman e Katan (2001), cerca de 1/3 dos ácidos clorogênicos ingeridos são absorvidos a partir do intestino delgado e o restante atinge o cólon, onde as bactérias colonizadoras provavelmente hidrolisam os ácidos clorogênicos aos ácidos cafeico e quínico. Ainda assim, Stalmach et al. (2010) avaliou a absorção intestinal e metabolismo de ácidos clorogênicos, após consumo de café por voluntários humanos com Ileostomia. Análises revelam que dos compostos identificados, na secreção ileal, 78% estavam presentes no café, e 22% eram metabólitos, como os ácidos ferúlico e cafeico. Ao longo de 24 h após a ingestão do café, foi detectada a excreção de 8% de metabólitos do ácido clorogênico na urina. Em seres humanos com o cólon intacto, após ingestão de café, a excreção urinária corresponde a 29% (Stalmach et al., 2009). Destacando a importância do metabolismo do cólon para os compostos fenólicos. Auxiliando na elucidação das vias envolvidas após a ingestão e metabolismo dos ácidos clorogênicos, assim como na distinção entre os compostos absorvidos nos intestinos delgado e grosso. O ácido cafeico é altamente absorvido em seres humanos (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001) e metabolizado em ácidos ferúlico, vanílico e hipúrico, os quais foram encontrados na urina de indivíduos (RECHNER et al., 2001). Logo, estes metabólitos do ácido clorogênico e/ou do ácido cafeico podem agir como antioxidantes na circulação. Ainda, a atividade antioxidante da erva-mate *in vitro* foi maior quando comparada aos seus constituintes antioxidantes isoladamente, como o ácido clorogênico e o ácido cafeico, em concentrações equivalentes (SILVA et al., 2008), o que sugere um efeito sinérgico dos constituintes do mate, como já fora reportado por Carini et al. (1998). Este efeito sinérgico pode ser atribuído aos demais antioxidantes presentes no mate, como as vitaminas A, C e E, além de outros compostos fenólicos, incluindo os flavonoides.

Pesquisas com a aplicação de polifenóis atraem grande interesse na área de alimentos funcionais, nutracêuticos e na indústria farmacêutica pelo seu potencial benefício à saúde humana. No entanto, a efetividade dos polifenóis depende da preservação de seus ingredientes ativos (FANG; BHANDARI, 2010). A utilização da formulação farmacêutica de erva-mate em cápsulas no presente estudo foi baseada na elevada atividade antioxidante *in vitro* da erva-mate, inclusive maior do que os chás verde e preto ou o vinho tinto (BIXBY et al., 2005; CAMPOS; SCOBAR; LISSI, 1996), no potencial hipocolesterolêmico de infusão de erva-mate (MORAIS et al., 2009) e nos estudos de estabilidade dos compostos ativos do extrato seco de erva-mate verde em cápsulas (ANDRADE, 2011).

Contudo ainda faltam estudos demonstrando a biotransformação e metabolização de polifenóis no extrato de erva-mate. Assim, de forma alusiva, após administração de chá verde (*Camellia sinensis*), que contém grande quantidade de polifenóis (BALENTINE et al., 1997), a ratos, demonstrou-se que a bioatransformação envolveu os sistemas de enzimas de fases I e II (EMBOLA et al., 2001). Sendo assim, o chá verde induziu a enzima citocromo P450, essencial para o início da conversão de metabólitos solúveis em água e enzimas de fase II, importante mecanismo quimioprotetor, facilitando a detoxificação (DASGUPTA et al., 2003). Assim, ocorreu aumento na excreção de glicuronídeos, meio de detoxificação e excreção de xenobióticos (EMBOLA et al., 2001). Desse modo, a Glutathione Transferase (GT) e o citocromo P450, por serem enzimas sensíveis a compostos exógenos, são utilizados como biomarcadores (STEGEMAN *et al.*, 1990; BUCHELI & FENT, 1995). Inúmeros produtos naturais têm sido considerados potentes agentes quimiopreventivos que inibem significativamente a expressão de enzimas de fase I, com indução seletiva de enzimas de fase II e que aumentam a defesa antioxidante (BAYNEY et al., 1987; BENSON et al., 1980; BEGLEITER et al., 1997). Dessa forma, produtos naturais como a erva-mate podem aumentar a atividade das enzimas antioxidantes como forma de o organismo aumentar o metabolismo dos constituintes considerados xenobióticos. A maior atividade das enzimas antioxidantes, por sua vez, pode ser usada igualmente nas reações de eliminação das espécies radicalares. Resta estabelecer, entretanto, a extensão pela qual a erva-mate ativou as enzimas antioxidantes pela via de indução de fase II ou pela ativação direta, bem como os reais benefícios desse efeito.

O consumo de plantas medicinais tem crescido nos últimos tempos e o assunto vem recebendo muita atenção. Uma das justificativas para esse crescimento é que mais pessoas têm decidido retornar ao caminho “mais natural” de vida, com aumento na crença, embora errônea, de que todo produto natural é saudável e seguro (ERNST, 2004; RIETJENS et al., 2005). Assim, para o uso seguro e apropriado das cápsulas de erva-mate, foram realizados estudos de toxicidade pré-clínica (ANDRADE et al., 2012) e, no presente estudo, foi dada sequência nos estudos clínico e de ação farmacológica. A ingestão das cápsulas com EMV por voluntários saudáveis mostrou que o uso do produto foi bem tolerado, com ausência de danos renais ou hepáticos (Tabelas 7 e 10). Entretanto, durante esta fase do estudo foram observados dois casos de diarreia e irritação gástrica por indivíduos que já apresentavam tendência para gastrite ou úlcera. De fato, nesses casos ocorre o agravamento quando são ingeridas doses elevadas de cafeína (ALTIMARI et al., 2011). A erva-mate contém grande quantidade de metilxantinas, cafeína e teobromina, as quais são substâncias tônica e estimulante cardíaco, com ação estimulante sobre o sistema nervoso e em altas doses pode induzir insônia, nervosismo, irritabilidade, ansiedade, náuseas e desconforto gastrointestinal (JAMES, 1992). Contudo, a dose estabelecida para o estudo fez alusão a estudos anteriores realizados com infusões de erva-mate verde e tostada, as quais não mostraram toxicidade em indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos (MORAIS et al., 2009).

Outra propriedade do EMV observada em nosso estudo foi a diminuição significativa na pressão arterial diastólica, após sete dias de tratamento, de aproximadamente 5 mmHg, equivalente a 6,5%, em relação aos valores basais (Tabela 3). Embora pequena e, talvez, sem significado clínico, essa diminuição na pressão arterial corrobora resultados *in vivo* e *in vitro* prévios, onde foi demonstrado que o extrato aquoso de erva-mate melhorou de forma significativa a contração e o relaxamento vascular da artéria aorta de camundongos com aterosclerose (FELIPPI et al., 2006) e o relaxamento da artéria mesentérica de ratos (MUCCILLO-BAISCH et al., 1998), indicando o envolvimento do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante da erva-mate. Além disso, Görgen et al. (2005) mostraram que o extrato de *Ilex paraguariensis* diminuiu a hidrólise de nucleotídeos em ratos. O ATP estimula a produção celular de óxido nítrico (MOTTE et al., 1995), evidenciando a possível relação entre o efeito hipotensor de *Ilex paraguariensis* e o nível aumentado de ATP, que pode induzir

vasodilatação. Os compostos fenólicos e flavonóides presentes no extrato de erva-mate (FILIP et al., 2000) inibiram a atividade de nucleotidases *in vitro*, as quais estão envolvidas em vários processos de lesão vascular (KAVUTCU et al., 1999). Com este efeito, a erva-mate promoveu diminuição da hidrólise de ATP, ADP e AMP, podendo contribuir para o tratamento de doenças cardiovasculares. De qualquer maneira, os resultados do presente estudo mostram-se promissores para a realização de estudos adicionais para avaliar o efeito vasodilatador dos polifenóis presentes na erva-mate em seres humanos.

Para finalizar, os resultados apresentados no presente estudo estão de acordo com as informações do *National Cholesterol Education Program* (NCEP, 2002), o qual preconiza que, antes de iniciar o tratamento medicamentoso em indivíduos com dislipidemia leve ou moderada, deve-se fazer uso de opções terapêuticas não farmacológicas como a utilização de produtos de origem alimentar ricos em vitaminas E e C, fitosteróis, flavonoides e outros compostos fenólicos (GIGLEUX et al., 2007). Assim, as cápsulas de erva-mate, cujo consumo se mostrou seguro, podem contribuir para a diminuição de fatores de risco fortemente associados à aterosclerose, como a dislipidemia e o estresse oxidativo, principalmente para aqueles indivíduos que não toleram o sabor amargo das infusões de erva-mate.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- A administração das cápsulas com EMV a indivíduos normolipidêmicos, durante uma e oito semanas, não apresentou toxicidade clínica aparente, incluindo ausência de modificação significativa na maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados e não promoveu diferença no ganho de peso corporal, nem provocou alterações cardíacas;
- O EMV reduziu significativamente a pressão arterial diastólica (~5 mmHg) dos participantes após 7 dias de consumo;
- As cápsulas com extratos secos de erva-mate verde e tostada apresentaram concentrações semelhantes de fenóis totais, ácidos fenólicos, saponinas e cafeína;
- A ingestão de cápsulas com EMV por indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos, durante 60 dias, promoveu elevação significativa na concentração sérica de HDL-C e nas relações LDL-C/HDL-C e CT/HDL-C. Porém, não houve variação expressiva nos valores de colesterol total, LDL-C, Não-HDL-C, triglicerídeos e sd-LDL;
- A ingestão de cápsulas com EMT por indivíduos dislipidêmicos, durante 30 e 60 dias, promoveu diminuição significativa na concentração sérica de triglicerídeos. Porém, não houve variação expressiva nos valores de colesterol total, HDL-C, LDL-C, Não-HDL-C e sd-LDL;
- Em geral, o efeito da ingestão do EMV nos parâmetros lipídicos foi semelhante para indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos, com diminuição apenas das relações CT/HDL-C e LDL-C/HDL-C, após 60 dias de consumo nos participantes normolipidêmicos;
- Para os participantes hipercolesterolêmicos sob tratamento com estatinas, não houve diferença significativa de efeito entre o EMV e o grupo controle para os parâmetros do perfil lipídico.

Porém as cápsulas contendo EMV apresentaram efeito sinérgico importante com as estatinas na diminuição da concentração sérica de LDL-C, sd-LDL, CT e triglicérides, após 30 e 60 dias de consumo;

- Entre os participantes dislipidêmicos, houve melhores efeitos antioxidantes no grupo que consumiu cápsulas com EMV;
- O consumo de cápsulas com EMV aumentou a capacidade antioxidante do soro após sete e 30 dias nos indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos e aumentou a concentração de GSH nos participantes normolipidêmicos, após sete e 60 dias;
- O consumo de cápsulas com EMV diminuiu os hidroperóxidos lipídicos após 30 e 60 dias nos indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos e diminuiu as TBARS após sete e 30 dias nos participantes normolipidêmicos e dislipidêmicos;
- O consumo de cápsulas com EMV aumentou a atividade da enzima antioxidante PON1 após sete dias nos participantes normolipidêmicos e dislipidêmicos.
- O consumo de cápsulas com EMV aumentou a atividade da SOD após sete, 30 e 60 dias nos indivíduos normolipidêmicos e após 60 dias nos indivíduos dislipidêmicos; assim como aumentou a atividade da catalase após sete e 30 dias nos participantes normolipidêmicos e após 30 dias nos indivíduos dislipidêmicos;
- A ingestão de cápsulas com EMV em associação com as estatinas por participantes hipercolesterolêmicos aumentou a capacidade antioxidante após sete, 30 e 60 dias, porém não houve alteração nos valores de glutathiona reduzida;
- A ingestão de cápsulas com EMV por participantes hipercolesterolêmicos sob tratamento com estatinas diminuiu a concentração sérica dos hidroperóxidos lipídicos após sete, 30 e 60 dias e diminuiu a concentração de TBARS após sete dias;

- A ingestão de cápsulas com EMV em associação com estatinas por participantes hipercolesterolêmicos aumentou a atividade arilesterase, lactonase e paroxonase da enzima PON1 em comparação ao grupo placebo. Porém, diferença estatística observada somente após sete dias.
- Em geral, as cápsulas com EMV apresentaram melhores efeitos biológicos em comparação às cápsulas com EMT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHESON, K.J.; GREMAUD, G.; MEIRIM, I.; MONTIGON, F.; KREBS, Y.; et al. Metabolic effects of caffeine in humans: lipid oxidation or futile cycling? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 40 – 46, 2004.

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

AFANAS'EV, I.B.; DOROZHKO, A.I.; BRODSKII, A.V.; KOSTYUK, V.A.; POTAPOVITCH, A.I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n.11, p. 1763-1769, 1989.

ALVES, R.J.; JOTZ, G.P.; do AMARAL, V.S.; MONTES, T.M.; MENEZES, H.S.; et al. The evaluation of mate (*Ilex paraguariensis*) genetic toxicity in human lymphocytes by the cytokinesis-block in the micronucleus assay, **Toxicology. In Vitro**, v. 22, p. 695 – 698, 2008.

ALTIMARI, L. R.; CYRINO, E. S.; ZUCAS, S. M.; OKANO, A. H.; BURINI, R. C. Cafeína: ergogênico nutricional no esporte. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 9, n. 3, p. 57-64, jul., 2001.

ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 14, n. 3, p. 243-250, 2001.

ANDRADE, F. **Estudo toxicológico e análise da estabilidade térmica do extrato nebulizado de erva-mate**. 2011. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Florianópolis. 2011.

ANDRADE, F.; ALBUQUERQUE, C.A.C.; MARASCHIN, M.; SILVA, E.L. Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract: Results of acute and 90 days subchronic toxicity studies in rats and rabbits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 328 – 334, 2012.

ANDREWS, T.C.; BALLANTYNE, C.M.; HSIA, J.A.; KRAMER, J.H. Achieving and maintaining national cholesterol education program low-density lipoprotein cholesterol goals with five statins. **The American Journal of Medicine**, v. 111, n. 3, p. 185-191, 2001.

ANDREWS, K.W.; SCHWEITZER, A.; ZHAO, C.; HOLDEN, J.M.; ROSELAND, J.M.; et al. The caffeine contents of dietary supplements commonly purchased in the US: analysis of 53 products with caffeine-containing ingredients. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 231 – 239, 2007.

ANVISA 1996 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – nº 116 – **Normas para estudo da toxicidade de produtos fitoterápicos**, de 08/08/1996. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.

ANVISA 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – nº90 – **Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos**, de 16/03/2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivos, Brasília, DF.

ANVISA 2005. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – nº1 – **Guia para a realização de estudos de estabilidade**, de 29/07/2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivos, Brasília, DF.

ARAUJO, F.B.; BARBOSA, D.S.; HSIN, C.Y.; MARANHÃO, R.C.; ABDALLA, D.S.P. Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia. **Atherosclerosis**, v.117, n. 1, p. 61-71, 1995.

ARÇARI, D.P.; BARTCHEWSKY, W.; SANTOS, T.W.; OLIVEIRA, K.A.; DEOLIVEIRA, C.C.; et al. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, p. 110 – 115, 2011.

ASSMANN G.; CULLEN P.; SCHULTE, H. The Münster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. **European Heart Journal**, v. 19, suppl. A, p. A2-A11, 1998.

ASSMANN, G.; NOFER, J.R. Atheroprotective effects of high density lipoproteins. **Annual Review of Medicine**, v. 54, p. 321-341, 2003.

AULTON, M.E. **Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design**. Edinburg: Churchill Livingstone, 2 ed. p. 388 - 390, 2002.

AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 957, p. 146–161, 2002.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; GAITINI, D.; NITCECKI, S.; HOFFMANN, A.; et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis (CAS) reduces common carotid intima-media thickness (IMT), blood pressure and LDL oxidation. **Clinical Nutrition**, v. 23, p. 423–433, 2004.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. **Current Opinion in Lipidology**, v. 16, n. 4, p. 393–399, 2005.

BAHADIR, M.A.; OGUZ, A.; UZUNLULU, M.; BAHADIR, O. Effects of different statin treatments on small dense low-density lipoprotein in patients with metabolic syndrome. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 16, p. 684-690, 2009.

BAIGENT, C.; KEECH, A.; KEARNEY, P.M.; BLACKWELL, L.; BUCK, G.; et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90.056 participants in 14 randomised trials of statins. **The Lancet**, v. 366, p. 1267-1278, 2005.

BAIN, Barbara J.; Path. **Blood cells: a practical guide**. Blackwell, 2006.

BALDASSARRE, S.; SCRUEL, O.; DECKELBAUM, R.J.; DUPONT, I.E.; DUCOBU, J.; CARPENTIER, Y.A. Beneficial effects of atorvastatin on sd LDL and LDL phenotype B in statin-naive patients and patients previously treated with simvastatin or pravastatin. **International Journal of Cardiology**, v. 104, p. 338-345, 2005.

BALENTINE, D.A.; WISEMAN, S.A.; BOUWENS, L.C.M. The chemistry of tea flavonoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 693-704, 1997.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARRETO, S.M.; PASSOS, V.M.A.; CARDOSO, A.R.A.; LIMA-COSTA, M.F. Quantificando o risco da doença coronariana na comunidade. Projeto Bambuí. **Arquivo Brasileiro Cardiologia**, v. 81, n. 6, p. 549-555, 2003.

BASTOS, D.H.M.; ISHIMOTO, E.Y.; MARQUES, M.O.M.; FERRI, A.F.; TORRES, E.A.F.S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 538 - 543, 2006.

BASTOS, D.H.M.; DE OLIVEIRA, D.M.; MATSUMOTO, R.L.T.; CARVALHO, P.O.; RIBEIRO, M.L. Yerba maté: Pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v.1, n. 1, p.37-46, 2007a.

BASTOS, D.H.M.; SALDANHA, L.A.; CATHARINO, R.R.; SAWAYA, A.C.H.F.; CUNHA, I.B.S.; et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camellia sinensis*) Extracts. **Molecules**, v. 12, p. 423 -432, 2007b.

BASTOS, D.H.M.; GUGLIUCCI, A. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. **Fitoterapia**, v. 80, p. 138-142, 2009.

BATISTA, G.A.P.; CUNHA, C.L.P.; SCARTEZINI, M.; VON DER HEYDE, R.; BITENCOURT, M.G.; et al. Prospective Double-Blind Crossover Study of *Camellia sinensis* (Green Tea) in Dyslipidemias. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, p. 121 - 127, 2009.

BAYNEY, R.M.; RODKEY, J.A.; BENNETT, C.D.; LU, A.Y.; PICKETT, C.B. Rat liver NAD(P)H:quinone reductase nucleotide sequence analysis of a quinone reductase cDNA clone and prediction of the amino acid sequence of the corresponding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 572-575, 1987.

BEAGHOLE, R.; SARACCI, R.; PANICO, S. Cardiovascular diseases: causes, surveillance and prevention. **International Journal of Epidemiology**, v. 30, supl.1, p. S1-S4, 2001.

BEGLEITER, A.; LEITH, K.M.; CURPHEY, J.T.; DOHERTY, P.G. Induction of DT diaphorase in cancer chemoprevention and chemotherapy. **Oncology Research**, v. 9, p. 371–382, 1997.

BENSON, A.M.; HUNKELER, M.J.; TALALAY, P. Increase of NAD(P)H:quinine reductase by dietary antioxidants: Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, p. 5216–5220, 1980.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERTÉ, K.A.S.; BEUX, M.R.; SPADA, P.K.W.D.S.; SALVADOR, M.; HOFFMANN-RIBANI, R. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Yerba-Mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) Extract as Obtained by Spray Drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5523 – 5527, 2011.

BERTIPAGLIA DE SANTANA, M.; MANDARINO, M.G.; CARDOSO, J.R.; DICHI, I.; DICHI, J.D.; et al. Association between soy and green tea (*Camellia sinensis*) diminishes hypercholesterolemia and increases total plasma antioxidant potential in dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 24, n. 6, p. 562-568, 2008.

BERTOLAMI, M.C. Mecanismos de hepatotoxicidade. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, supl. V, p. 25-27, 2005.

BEUTLER, E.; KELLY, B.M.; DURON, O. Improved method for determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882 – 888, 1963.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIR, L. S.; DEMIR, S.; ROTA, S.; KÖSEOGLU, M. Increased serum malondialdehyde levels in chronic stage of ischemic stroke. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 1, p. 33-39, 2006.

BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**, v. 77, n. 3, p. 345-358, 2005.

BOAVENTURA, B.C. **Avaliação do efeito antioxidante da erva mate (*Ilex paraguariensis*) em indivíduos com dislipidemia**. 2010. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis. 2010.

BOVANTURA, B.C.B.; MURAMAKI, A.N.N.; PRUDÊNCIO, E.S.; MARASCHIN, M.; MURAMAKI, F.S.; et al. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, 2012a (In press).

BOAVENTURA, B.C.B.; DI PIETRO, P.F.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G.A.; MORAIS, E.C.; et al. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 657 – 664, 2012b.

BOESCH-SAADATMANDI, C.; POSPISSIL, R.T.; GRAESER, A.C.; CANALI, R.; BOOMGAARDEN, I.; et al. Effect of quercetin on Paraoxonase 2 levels in RAW264.7 macrophages and in human monocytes - role of quercetin metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n. 9, p.4168-4177, 2009.

BOLOKADZE, N.; LOBJANIDZE, I.; MOMTSELIDZE, N.; SOLOMONIA, R.; SHAKARISHVILI, R.; et al. Blood rheological properties and lipid peroxidation in cerebral and systemic circulation of neurocritical patients. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 30, n. 2, p. 99-105, 2004.

BORGOGNA, M., BELLICH, B., ZORZIN, L., LAPASIN, R., CESÀRO, A. Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 416-423, 2010.

BOVERIS, A.; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A.I.; KOCH, O.R. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 227, n. 2, p. 534 -541, 1983.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378 – 384, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

BRASIL, 1996 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – n 116 - Normas para estudo da toxicidade de produtos fitoterápicos, de 08/08/1996. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL, 2004 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – **Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos**, de 16/03/2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Morbidade hospitalar por local de internação e mortalidade geral**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm>>. Acesso em: 18 ago 2007.

BROWN, B.G.; ZHAO, X-Q.; CHAIT, A.; FISHER, L.D.; CHEUNG, M.C.; et al. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 1583-1592, 2001.

BROWN, W.V. Safety of statins. **Current Opinion in Lipidology**, v. 19, n. 6, p. 558-562, 2008.

BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of Cytochrome-P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 201-268. 1995.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; TIETZ, N.W. **Textbook of clinical chemistry**. Philadelphia: WB Saunders Co, p. 58-69, 1994.

CALLAWAY, C.W. Circumferences. In: Lohman T.G, Roche A.F, Martorell R, editors. **Anthropometric standardization reference manual**. Champaign: Human Kinetics Books, p. 44-5, 1991.

CAMPO, V.L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e as novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.

CAMPOS, A.M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E.A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguariensis* extracts and red wine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 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 Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, p. 1813-1819, 1998.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314 – 319, 2008.

CAVALCANTE, L.S.; SILVA, E.L. Application of a modified precipitation method for the measurement of small dense LDL-cholesterol (sd-LDL-C) in a population in southern Brazil. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 50, n. 9, p. 1649 – 1656, 2012.

CHANDRA, S.; de MEJIA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green

(*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3583-3589, 2004.

CHEUNG, B.M.Y.; LAUDER, I.J.; LAU, C.P.; KUMANA, C.R. Meta-analysis of large randomized controlled trials to evaluate the impact of statins on cardiovascular outcomes. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, n. 5, p. 640-651, 2004.

CHONG, P.H.; BACHENHEIMER, B.S. Current, new and future treatments in dyslipidaemia and atherosclerosis. **Drugs**, v. 60, n. 1, p. 55-93, 2000.

CLIFFORD, M.N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J.R. Chlorogenic acids and purine contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 13-21, 1990.

COSTA, L.G.; VITALONE, A.; COLE, T.B.; FURLONG, C.E. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 541-550, 2005.

CURTIN, B.F.; SEETHARAM, K.I.; DHOIEAM, P.; GORDON, R.K.; DOCTOR, B.P.; et al. Resveratrol induces catalytic bioscavenger paraoxonase 1 expression and protects against chemical warfare nerve agent toxicity in human cell lines. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 103, n. 5, p. 1524–1535, 2008.

DANTOINE, T.F.; DEBORD, J.; CHARMES, J.P.; MERLE, L.; MARQUET, P.; et al. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, n. 11, p. 2082 – 2088, 1998.

DARTORA, N.; SOUZA, L.M.; PAIVA, S.M.M.; SCOPARO, C.T.; IACOMINI, M.; et al. Rhamnogalacturonan from *Ilex paraguariensis*: a potential adjuvant in sepsis treatment. **Carbohydrate Polimers**, v. 92, p. 1776 – 1782, 2012.

DASGUPTA, T.; RAO, A.R.; YADAVA, P.K. Modulatory effect of Henna leaf (*Lawsonia inermis*) on drug metabolising phase I and phase II enzymes, antioxidant enzymes, lipid peroxidation and chemically

induced skin and forestomach papillomagenesis in mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 245, p. 11-22, 2003.

DAVI, G.; ALESSANDRINI, P.; MEZZETTI, A. *In vivo* formation of 8-Epi-prostaglandin F2 alpha is increased in hypercholesterolemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 17, p. 3230 – 3235, 1997.

De WHALLEY, C.; RANKIN, S.M.; HOULT, J.R.; JESSUP, W.; LEAKE, D.S. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 39, n. 11, p. 1743-1750, 1990.

DELADINO, L.; ANBINDER, P.S.; NAVARRO, A.; MARTINO, M. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v.71, p. 126-134, 2008.

DEMIRKAYA, S.; TOPCUOGLU, M.A.; AYDIN, A.; ULAS, U.H.; ISIMER, A.I.; et al. Malondialdehyde, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in peripheral blood erythrocytes of patients with acute cerebral ischemia. **European Journal of Neurology**, v. 8, n. 1, p. 43-51, 2001.

DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p. 1361 – 1394, 2005.

DIPLOCK, A. T.; CHARLEUX, J.L.; CROZIER-WILLI, G. KOK, F.J.; RICE-EVANS, C.; et al. Functional food science and defense against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v. 80, suppl. 1, p. 77S-112S, 1998.

DRAGANOV, D.I.; LA DU, B.N. Pharmacogenetics of paraoxonase: a brief review. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 369, n. 1, p. 78-88, 2004.

DURRINGTON, P.N.; TUOMILEHTO, J.; HAMANN, A.; KALLEND, D.; SMITH, K. Rosuvastatin and fenofibrate alone and in combination in type 2 diabetes patients with combined hyperlipidaemia. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 64, p. 137 - 151, 2004.

DUSTING, G.J.; TRIGGLE, C. Are we over oxidized? Oxidative stress, cardiovascular disease, and the future of intervention studies with antioxidants. **Vascular Health and Risk Management**, v. 1, n. 2, p. 93-97, 2005.

DZAU, V.J.; ANTMAN, E.M.; BLACK, H.R.; HAYES, D.L.; MANSON, J.E.; et al. The cardiovascular disease continuum validated: clinical evidence of improved patient outcomes. Part I: pathophysiology and clinical trial evidence (risk factors through stable coronary artery disease). **Circulation**, v. 114, n. 25, p. 2850-2870, 2006.

EMBOLA, C.W.; WEISBURGER, J.H.; WEISBURGER, M.C. Urinary excretion of *N*-OH-2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*] quinoline-*N*-glucuronide in F344 rats in enhanced by green tea. **Carcinogenesis**, v. 22, n.7, p. 1095-1098, 2001.

ERDMAN JUNIOR, J.W.; CARSON, L.; KWIK-URIBE, C.; EVANS, E.M.; ALLEN, R.R. Effects of cocoa flavonols on risk factors for cardiovascular disease. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17, suppl.1, p. 284-287, 2008.

ERNST, E. Risks of herbal medicinal products. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 13, p. 767-771, 2004.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407 – 421, 1990.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S.; et al. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 388, n. 2, p. 261-266, 2001.

FARAH, A.; MONTEIRO, M.; DONANGELO, C.M.; LAFAY, S. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 8, p. 2309 – 2315, 2008.

FAN, J.P.; HE, C.H. Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high performance liquid chromatography method. **Journal of**

Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 41, n. 3, p. 950-956, 2006.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, n.10, p. 872-879, 2002.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, p. 510 – 523, 2010.

FELIPPI, R.; RIBEIRO DO VALLE, R.M.; SILVA, E.L. Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na reatividade vascular de aorta torácica de ratos. In: XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Águas de Lindóia-SP, 2005. CD Rom, n. 44104.

FELIPPI, R.; RIBEIRO DO VALLE, R.M.; SILVA, E.L. Administration of aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reverses endothelial dysfunction in LDL receptor knockout mice. **Free Radical Research**, v. 40, n. 1, p. S104, 2006.

FERNANDES, E.S.; MACHADO, M.O.; BECKER, A.M.; ANDRADE, F.; MARASCHIN, M.; et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: In vitro and in vivo studies. **Nutrition**, v. 28, n.11 – 12, p. 1157 – 1164, 2012.

FERRÈ, N.; CAMPS, J.; PRATS, E.; VILELLA, E.; PAUL, A.; et al. Serum paraoxonase activity: a new additional test for improved evaluation of chronic liver damage. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 261–268, 2002.

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

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

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

FORTUNATO, G.; DI TARANTO, M.D.; BRACALE, U.M.; DEL GUERCIO, L.; CARBONE, F.; et al. Decreased paraoxonase-2 expression in human carotids during the progression of atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, p. 594-600, 2008.

FRANK, P.G.; MARCEL, Y.L. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. **The Journal of Lipid Research**, v. 41, p. 853-872, 2000.

FRANZONI, F.; QUIÑONES-GALVAN, A.; REGOLI, F.; FERRANNINI, E.; GALETTA, F. A comparative study of the *in vitro* antioxidant activity of statins. **International Journal of Cardiology**, v. 90, n. 2-3, p. 317-321, 2003.

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

FUHRMAN, B.; VOLKOVA, N.; AVIRAM, M. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. **Atherosclerosis**, v. 161, n.2, p. 307-316, 2002.

GAGNÉ, C.; GAUDET, D.; BRUCKERT, E. et al. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with atorvastatin or simvastatin in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. **Circulation**, v. 105, n. 21, p. 2469-2475, 2002.

GAN, K.N.; SMOLEN, A.; ECKERSON, H.W.; LADU, B.N. Purification of serum paraoxonase/ arylesterase: evidence of one esterase catalysing both activities. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 19, n. 1, p. 100-106, 1991.

GELEIJNSE, J.M.; LAUNER, I.J.; van der KUIP, D.A.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J.C.M. Inverse association of tea and flavonoid intakes

with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, n. 5, p. 880-886, 2002.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n.11, p. 1106-1114, 2000.

GIGLEUX, I.; JENKINS, D.J.; KENDALL, C.W.; MARCHIE, A.; FAULKNER, D.A.; et al. Comparison of a dietary portfolio diet of cholesterol-lowering foods and a statin on LDL particle size phenotype in hypercholesterolaemic participants. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 6, p. 1229-1236, 2007.

GNOATO, S.C.B.; SCHENKEL, E.P.; BASSANI, V.L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 723-726, 2005.

GNOATTO, S.C.B.; BASSANI, V.L.; COELHO, G.C.; SCHENKEL, E.P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. ST.-HIL., AQUIFOLIACEAE). **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 304 – 307, 2007.

GOMES, L.F. **Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre o metabolismo de ratos tratados com dieta hiperlipídica**. 2012. (Dissertação). Programa de Pós-graduação em ciências biológicas: fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre. 2012.

GORDON, D. J.; PROBSTFIELD, J. L.; GARRISON, R. J.; NEATON, J.D.; CASTELLI, W.P.; et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. **Circulation**, v. 79, p. 8-15, 1989.

GORGEN, M.; TURATTI, K.; MEDEIROS, A.F.; BUFFON, A.; BONAN, C.D.; et al. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* decreases nucleotide hydrolysis in rat blood serum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 73 – 77, 2005.

GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A.T.C.; SCHENKEL, E.P. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 3, p. 438-441, 1995.

GOUEDARD, C.; BAROUKI, R.; MOREL, Y. Induction of the Paraoxonase-1 Gene Expression by Resveratrol. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, p. 2378-2383, 2004a.

GOUEDARD, C.; BAROUKI, R.; MOREL, Y. Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 12, p.5209-5222, 2004b.

GRIGORE, L.; NORATA, G.D.; CATAPANO, A.L. Combination therapy in cholesterol reduction: focus on ezetimibe and statins. **Vascular Health and Risk Management**, v. 4, n. 2, p. 267-278, 2008.

GRUNDY, SM.; BALADY, G.J.; CRIQUI, M.H.; FLETCHER, G.; GREENLAND, P.; et al. Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA task force on risk reduction. **Circulation**, v. 97, p.1876-1887, 1998.

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

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

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, n. 2, p. 338-344, 1996.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D.H.M Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. **Fitoterapia**, v. 80, n. 2, p. 138-142, 2009.

GUIMARÃES, P.R.; GALVÃO, A.M.P.; BATISTA, C.M.; AZEVEDO, G.S.; OLIVEIRA, R.D.; et al. Eggplant (*Solanum melongena*) infusion has a modest and transitory effect on hypercholesterolemic subjects. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 9, p. 1027-1036, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2. ed. Oxford: Clarendon, 1989.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: A personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

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

HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Research**, v. 25, n. 1, p. 57-74, 1996b.

HARAMAKI, N.; IKEDA, H.; TAKENAKA, K.; KATOH, A.; SUGANO, R.; et al. Fluvastatin Alters Platelet Aggregability in Patients With Hypercholesterolemia: Possible Improvement of Intraplatelet Redox Imbalance via HMG-CoA Reductase. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p. 1471-1477, 2007.

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. **Biologia e Clínica de Coelho e Roedores**. 3. ed. 49p. São Paulo: Rocca, 1993.

HARRIS, W.S.; DUJOVNE, C.A.; WINDSOR, S.L.; SHERYL, L.; GERROND, C.; et al. Inhibiting cholesterol absorption with CP-88,818 (beta-tigogenin cellobioside; tiqueside): studies in normal and hyperlipidemic subjects. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 130, n.1, p. 55-60, 1997.

HECK, C.I.; de MEJIA, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoid of 28 vegetables and 9 fruits

commonly consumed in The Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 12, p. 2379-2383, 1992.

HERTOG, M.G.; HOLLMAN, P.C.; van de PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 8, p.1242-1246, 1993.

HERTOG, M.G.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, n. 4, p. 381-386, 1995.

HIRANO, T.; ITO, Y.; SAEGUSA, H.; YOSHINO, G. A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 2193-2201, 2003.

HORKE, S.; WITTE, I.; WILGENBUS, P.; KRUGER, M.; STRAND, D.; et al. Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. **Circulation**, v. 115, p. 2055-2064, 2007.

HUXLEY, R.R.; NEIL, H.A.W. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, n. 8, p. 904-908, 2003.

ISHITANE, L.H.; FRANCO, G.C.; PERPÉTUO, I.H.O.; FRANÇA, E. Desigualdade social e mortalidade precoce por doenças cardiovasculares no Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 40, n. 4, p. 684-691, 2006.

ITO, E; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Theophylline metabolism in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, n. 2, p. 323-330, 1997.

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

JAMES, J. E. Caffeine and health. London: Editora Academic Press, 1992.

JAMES, R.W.; LEVIEV, I.; RIGHETTI, A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 101, n. 19, p. 2252-2257, 2000.

JARVIK, G.P.; TSAI, N.T.; MCKINSTRY, L.A.; WANI, R.; BROPHY, V.H.; et al. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, p. 1329–1333, 2002.

KABAROGLU, C.; MUTAF, I.; BOYDAK, B.; OZMEN, D.; HABIF;; et al. Association between serum paraoxonase activity and oxidative stress in acute coronary syndromes. **Acta Cardiologica**, v. 59, n. 6, p. 606–611, 2004.

KANITZ, M.G.; GIOVANNUCCI, S.J.; JONES, J.S.; MOTT, M. Myocardial infarction in young adults: risk factors and clinical features. **The Journal of Emergency Medicine**, v.14, n. 2, p.139-145, 1996.

KANNEL, W.B. Coronary heart disease risk factors in the elderly. **The American Journal of Geriatric Cardiology**, v.11, n. 2, p. 101-107, 2002.

KAVUTCU, M.; MELZIG, M.F. *In vitro* effects of selected flavonoids on the 5-nucleotidase activity. **Pharmazie**, v. 54, p. 457–459, 1999.

KHATEEB, J.; GANTMAN, A.; KREITENBERG, A.J.; AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: A role for PPAR- δ pathway. **Atherosclerosis**, v.208, n. 1, p.119–125, 2010.

KIM, Y.H.; PARK, K.H.; RHO, H.M. Transcriptional Activation of the Cu,Zn-Superoxide Dismutase Gene through the AP2 Site by Ginsenoside Rb2 Extracted from a Medicinal Plant, *Panax ginseng**. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 40, p. 24539 – 24543, 1996.

KIM, H.J.; KO, J.; STORNI, C.; SONG, H.J.; CHO, Y.G. Effect of green mate in overweight volunteers: A randomized placebo-controlled human study. **Journal of functional foods**, v. 4, p. 287 – 293, 2012.

KITAMOTO, S.; NAKANO, K.; HIROUCHI, Y.; KOHJIMOTO, Y.; KITAJIMA, S.; et al. Cholesterol-lowering independent regression and stabilization of atherosclerotic lesions by pravastatin and by antimonocyte chemoattractant protein-1 therapy in nonhuman primates. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, p. 1522-1528, 2004.

KLEEMOLA, P.; FREESE, R.; JAUHAINEN, M.; PAHLMAN, R.; ALFTHAN, G.; et al. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. **Atherosclerosis**, v. 160, n. 2, p. 425-432, 2002.

KLEIN, G.A. **Efeito erva mate (*Ilex paraguariensis*) e da intervenção dietética no perfil glicêmico e lipídico em pacientes diabéticos tipo 2 ou de indivíduos com pré-diabetes.** (Dissertação) Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Florianópolis. 2010.

KLEIN, A.G.; STEFANUTO, A.; BOAVENTURA, B.C.B.; MORAIS, E.C.; CAVALCANTE, L.S.; et al.; Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 Diabetes and Pre-Diabetes individuals: A pilot study. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 30, n. 5, p.320-332, 2011.

KNEKT, P.; JARVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake, coronary mortality in Finland: a cohort study. **British Medical Journal**, v. 312, n. 7029, p. 478-481, 1996.

KRAEMER, K.H.; TAKETA, A.T.C.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; GILLAUME, D. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1119-1122, 1996.

KRAUSS, R.M.; ECKEL, R.H.; HOWARD, B.; APPEL, L.J.; DANIELS, S.R.; et al. AHA Dietary guidelines. Revision 2000: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. **Circulation**, v. 102, p. 2284-2299, 2000.

KY, B.; BURKE, A.; TSIMIKAS, S.; WOLFE, M.L.; TADESSE, M.G.; et al. The influence of pravastatin and atorvastatin on markers of

oxidative stress in hypercholesterolemic humans. **Journal of The American College of Cardiology**, v. 51, n. 17, p. 1653-1662, 2008.

LAKSHMI, S.V.V.; PADMAJA, G.; KUPPUSAMY, P.; KUTALA, V.K. Oxidative Stress in Cardiovascular Disease. **Indian Journal of Biochemistry Biophysics**, v. 46, n. 6, p. 421 – 440, 2009.

LANZETTI, M.; BEZERRA, F.S.; ROMANA-SOUZA, B.; BRANDO-LIMA, A.C.; KOATZ, V.L.G.; et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v. 24, p. 375–381, 2008.

LEE, W.J.; LEE, W.L.; TANG, Y.J.; LIANG, K.W.; CHIEN, Y.H.; et al. Early improvements in insulin sensitivity and inflammatory markers are induced by pravastatin in nondiabetic subjects with hypercholesterolemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 390, n. 1-2, p. 49-55, 2008.

LEVI, F.; LUCCHINI, F.; NEGRI, E.; LA VECCHIA, C. Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world. **Heart**, v. 88, p. 119-124, 2002.

LI, H.L.; LIU, D.P.; LIANG, C.C. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. **Journal of Molecular Medicine**, v. 81, n. 12, p. 766-779, 2003.

LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. Rio de Janeiro, Guanabara, 8. ed. p. 126 -129, 2002.

LIMA, E.S.; COUTO, R.D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 169-178, 2006.

LUSIS, A.J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233-241, 2000.

MACKNESS, M.I.; HARTY, D.; BHATNAGAR, D.; WINOCOUR, P.H.; ARROL, S.; et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 86, n. 2-3, p. 193-199, 1991.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N.; ABUASHIA, B.; ANDREW, J.M.; MACKNESS, M.I. Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. **Clinical Science**, v. 98, p. 355-363, 2000.

MANGIAPANE, H.; THOMSON, J.; SALTER, A.; BROWN, S.; BELL, G.D.; et al. The inhibition of the oxidation of low density lipoproteins by (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 3, p. 445-450, 1992.

MARON, D.J.; LU, G.P.; CAI, N.S.; WU, Z.G.; LI, Y.H.; et al. Cholesterol-lowering effect of a theaflavin-enriched green tea extract: a randomized controlled trial. **Archives of Internal Medicine**, v. 163, n. 12, p. 1448-1453, 2003.

MARTINS, F.; NOSO, T.M.; PORTO, V.B.; CURIEL, A.; GAMBERTO, A.; et al. Mate tea inhibits *in vitro* pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, v. 18, p. 42 – 47, 2010.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**. 4. ed. Londres: George Godwin, 1985.

MATSUBARA S.; RODRIGUEZ-AMAYA, B.B. Conteúdo de Miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 380 – 385, 2006a.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 401 – 407, 2006b.

MATSUMOTO, A.; HIROOKA, Y.; HIRONAGA, K.; ESHIMA, K.; SETOGUCHI, S.; et al. Effect of pravastatin on endothelial function in patients with coronary artery disease (cholesterol-independent effect of pravastatin). **The American Journal of Cardiology**, v. 88, n. 11, p. 1291-1294, 2001.

MATSUMOTO, R.L.T.; BASTOS, D.H.M.; MENDONÇA, S.; NUNES, V.S.; JR BARTCHEWSKY, W.; et al. Effects of Maté Tea (*Ilex paraguariensis*) Ingestion on mRNA Expression of Antioxidant

Enzymes, Lipid Peroxidation, and Total Antioxidant Status in Healthy Young Women. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1775-1780, 2009.

MAZZAFERA, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 67-71, 1997.

McANLIS, G.T.; McENENY, J.; PEARCE, J.; YOUNG, I.S. Black tea consumption does not protect low density lipoprotein from oxidative modification. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, n. 3, p. 202-206, 1998.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MENINI, T.; HECK, C.; SCHULZE, J.; de MEJIA, E.; GUGLIUCCI, A. Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein. **Planta Medica**, v. 73, n. 11, p. 1141-1147, 2007.

MONETTI, M.; CANAVESI, M.; CAMERA, M.; PARENTE, R.; PAOLETTI, R.; et al. Rosuvastatin displays anti-atherothrombotic and anti-inflammatory properties in apoE-deficient mice. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 5, p. 441-449, 2007.

MONTEIRO, M.; FARAH, A.; PERRONE, D.; TRUGO, L.C.; DONANGELO, C. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 10, p. 2196-2201, 2007.

MORAIS, E.C. **Avaliação dos efeitos hipocolesterolêmico, antioxidante e anti-inflamatório da infusão de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em indivíduos normolipidêmicos ou dislipidêmicos, usuários ou não de estatina.** 2009. (Dissertação). Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Florianópolis. 2009.

MORAIS, E.C.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G.A.; BOAVENTURA, B.C.B.; ANDRADE, F.; et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol

reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8316-8324, 2009.

MOSIMANN, A.L.P.; WILHELM-FILHO, D.; SILVA, E.L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors**, v. 26, n. 1, p. 59-70, 2006.

MOTTE, S.; COMMUNI, D.; PIROTTON, S.; BOEYNAEMS, J.M. Involvement of multiple receptors in the actions of extracellular ATP: the example of vascular endothelial cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 27, p. 1-7, 1995.

MUCCILLO-BAISH, A.L.; JOHNSTON, K.B.; PAGANINI STEIN, F.L. Endotheliumdependent vasorelaxing activity of aqueous extract of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 133-139, 1998.

MURAKAMI, A.N.N.; AMBONI, R.D.M.C.; PRUDÊNÇIO, E.S.; AMANTE, E.R.; ZANOTTA, L.M.; et al. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 2211-2216, 2011.

NARDINI, M.; CIRILLO, E.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 20, p. 5735-5741, 2002.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP). Report of the expert panel on population strategies for blood cholesterol reduction: executive summary. **Archives of Internal Medicine**, v. 151, p. 1071-1084, 1991.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP). Third report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adults Treatment Panel III). Executive summary. **The Journal of the American Medical Association**, v. 285, p. 2486-2497, 2001.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP). Third report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adults Treatment Panel III): final reports. **Circulation**, v. 106, p. 3143-3421, 2002.

NEATON, J.D.; BLACKBURN, H.; JACOBS, D.; KULLER, L.; LEE, D.J.; et al. Serum cholesterol and mortality findings for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. **Archives Internal Medicine**, v. 152, n. 7, p. 1490-1500, 1992.

NG, C.J.; WADLEIGH, D.J.; GANGOPADHYAY, A.; HAMA, S.; GRIJALVA, V.R.; et al. Paraonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 48, p. 44444-44449, 2001.

NG, C.J.; BOURQUARD, N.; GRIJALVA, V.; HAMA, S.; SHIH, D.M.; et al. Paraonase-2 Deficiency Aggravates Atherosclerosis in Mice Despite Lower Apolipoprotein-B-containing Lipoproteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 29491-29500, 2006.

NIJVELDT, R.J.; van NOOD, E.; van HOORN, D.E.; BOELEN, P.G.; van NORREN, K.; et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

NISHITANI, E.; SAGESAKA, Y.M. Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 675 - 685, 2004.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol Orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**, v. 220, p. 403 - 409, 1994.

OGA, S.; **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2 ed., 474p., 2003.

OLIVEIRA, W.P.; BOTT, R.F.; SOUZA, C.R.F. Manufacture of standardized dried extracts from medicinal Brazilian plants. **Dry Technology**, v. 24, p. 523 – 533, 2006.

OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 1, p. 597-600, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. **Physical Status: the use and interpretation of anthropometry**. WHO technical report series 854. Geneva: WHO, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Obesity: preventing and manging the global epidemic**. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva: WHO, 2000.

PAGANINI STEIN, F.L.; SCHIMIDT, B.; FURLONG, E.B. et al. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biological Research for Nursing**, v. 7, n. 2, p. 146-156, 2005.

PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 178–185, 2008.

PANTEGHINI, M. Aspartate aminotransferase isoenzymes. **Clinical Biochemistry**, v. 23, p. 311 – 319, 1990.

PASSOS, V.M.A.; ASSIS, T.D.; BARRETO, S.M. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 15, n.1, p. 35-45, 2006.

PELILLO, M.; BONOLI, M.; BIGUZZI, B.; BENDINI, A.; TOSCHI, T.G.; et al. An investigation in the use of HPLC with UV and MS-electrospry detection for the quantification of tea catechins. **Food Chemistry**, v. 87, p. 465 – 470, 2004.

PELLEGRINI, N.; VISIOLI, F.; BURATTI, S.; BRIGHENTI, F. Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the

influence of heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2532-2538, 2001.

PEREIRA, D.F.; KAPPEL, V.D.; CAZAROLLI, L.H.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; et al. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v. 19, n. 10, p. 868 -8777, 2012.

POLANCZYK, C.A. Fatores de risco cardiovascular no Brasil: os próximos 50 anos! **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, n. 3, p. 199-201, 2005.

POLIDORI, M.C.; CHERUBINI, A.; STAHL, W.; SENIN, U.; SIES, H.; et al. Plasma carotenoid and malondialdehyde levels in ischemic stroke patients: relationship to early outcome. **Free Radical Research**, v. 36, n. 3, p. 265-268, 2002.

POON, G.K. Analysis of catechins in tea extracts by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 794, p. 63 -74, 1998.

PRADO, F.C.; VALLE, J.R.; RAMOS, J.A. **Atualização terapêutica: manual prático de diagnóstico e tratamento; Therapeutic modernization: practical manual of diagnosis and treatment**. Artes Médicas, 1999.

PRUDÊNCIO, A.P.A.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMBONI, R.D.M.C.; MURAMAKI, A.N.N.; MARASCHIN, M.; et al. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 399 – 405, 2012.

RAISZADEH, F.; SOLATI, M.; ETEMADI, A.; AZIZI, F. Serum paraoxonase activity before and after treatment of thyrotoxicosis. **Clinical Endocrinology**, v. 60, n. 1, p. 75–80, 2004.

RECHNER, A.R.; SPENCER, J.P.; KUHNLE, G.; HAHN, U.; RICE-EVANS, C.A. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1213-1222, 2001.

REDDY, K.S.; YUSUF, S. Emerging epidemic of cardiovascular disease in developing countries. **Circulation**, v. 97, n. 6, p. 596-601, 1998.

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

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIETJENS, I.M.C.M.; BOERSMA, M.G.; van der WOUDE, H.; JEURISSEN, S.M.F.; SCHUTTE, M.E.; et al. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. **Mutation Research**, v. 574, 124–138, 2005.

RIZZO, M.; SPINAS, G.A.; CESUR, M.; OZBALKAN, Z.; RINI, G.B.; et al. Atherogenic lipoprotein phenotype and LDL size and subclasses in drug-naïve patients with early rheumatoid arthritis. **Atherosclerosis**, v. 207, n. 2, p. 502-506, 2009.

ROBERTO, C.; PASQUALE, P.; SERENA, D.S.; SIMONA, B.; VALERIO, S.; et al. Atorvastatin inhibits oxidative stress via adiponectin-mediated NADPH oxidase down-regulation in hypercholesterolemic patients. **Atherosclerosis**, v. 213, n. 1, p. 225-234, 2010.

ROBERTS, W. C. The rule of 5 and the rule of 7 in lipid-lowering by statin drugs. **The American Journal of Cardiology**, v. 80, p. 106-107, 1997.

ROCK, W.; ROSENBLAT, M.; MILLER-LOTAN, R.; LEVY, A.P.; ELIAS, M.; et al. Consumption of Wonderful Variety Pomegranate Juice and Extract by Diabetic Patients Increases Paraoxonase 1 Association with High-Density Lipoprotein and Stimulates Its Catalytic Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8704-8713, 2008.

RODRIGO, R.; GUICHARD, C.; CHARLES, R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 2, p. 111-127, 2007.

ROGERIO, A.P.; SÁ-NUNES, A.; FACCIOLI, L.H. The activity of medicinal plants and secondary metabolites on eosinophilic inflammation. **Pharmacological Research**, v. 62, p. 298 – 307, 2010.

ROSENBLAT, M.; AVIRAM, M. Oxysterol-induced activation of macrophage NADPH-oxidase enhances cell-mediated oxidation of LDL in the atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mouse: inhibitory role for vitamin E. **Atherosclerosis**, v. 160, n. 1, p. 69-80, 2002.

ROSENBLAT, M.; DRAGONOV, D.; WATSOM, C.E.; BISGAIER, C.L.; LA DU, B.N.; et al. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 23, p. 468–474, 2003.

ROSENBLAT, M.; HAYEK, T.; HUSSEIN, K.; AVIRAM, M. Decreased macrophage paraoxonase 2 expression in patients with hypercholesterolemia is the result of their increased cellular cholesterol content: effect of atorvastatin therapy. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, p. 175–180, 2004.

ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; COLEMAN, R.; ALMAGOR, Y.; AVIRAM, M. Antiatherogenicity of extra virgin olive oil and its enrichment with green tea polyphenols in the atherosclerotic apolipoprotein-E-deficient mice: enhanced macrophage cholesterol efflux. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 8, p. 514–523, 2008.

ROSENSON, R.S. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. **Atherosclerosis**, v. 173, n. 1, p. 1-12, 2004.

SACKS, F.M.; PFEFFER, M.A.; MOYE, L.A.; ROULEAU, J.L.; RUTHERFORD, J.D.; et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 14, p. 1001-1009, 1996.

SCALIA, R.; GOOSZEN, M.E.; JONES, S.P.; HOFFMEYER, M.; RIMMER, D.M.; et al. Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, v. 103, n. 21, p. 2598-2603, 2001.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000, Capítulo 27, p. 291-320.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In. In. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2002, Capítulo 15, p. 597-622.

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; de BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.

SCHRADER, C.; SCHIBORR, C.; FRANK, J.; RIMBACH, G. Curcumin induces paraoxonase 1 in cultured hepatocytes in vitro but not in mouse liver in vivo. **British Journal of Nutrition**, v. 105, p. 167 - 170, 2010.

SENTI, T.M.; ANGLADA, R.; ELOSUA, R.; MARRUGAT, J.; COVAS, M.I.; et al. Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population-based study. **European Journal of Internal Medicine**, v. 14, n. 3, p. 178 – 184, 2003.

SERDAR, Z.; ASLAN, K.; DIRICAN, M.; SARANDÖI, E.; YESILBURSA, D.; et al. Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. **Clinical Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 794-803, 2006.

SEVER, P.S.; DAHLÖF, B.; POULTER, N.R.; WEDEL, H.; BEEVERS, G.; et al. Prevention of coronary and stroke events with

atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial—Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. **The Lancet**, v.361, n. 9364, p.1149-1158, 2003.

SHARRETT, A.R.; BALLANTYNE, C.M.; COADY, S.A.; HEISS, M.D.; SORLIE, P.D.; et al. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein (a), apolipoproteins A-I e B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Circulation**, v. 104, n. 10, p. 1108-1113, 2001.

SHAW, F.V. **Spray drying as an alternative granulation technique**. In: Parikj DM. Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology. Nova York: Marcel Dekker, p. 75-96, 1997.

SHEN, D.; WU, Q.; WANG, M.; YANG, Y.; LAVOIE, E.J.; et al. Determination of the predominant catechins in *Acacia catechu* by liquid chromatography/electrospray ionization –mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3219 – 3224, 2006.

SHEPHERD, J.; COBBE, S.M.; FORD, I.; ISLES, C.G.; LORIMER, A.R.; et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. **The New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 20, p. 1301-1308,1995.

SHIH, D. M.; XIA, Y. R.; WANG, X. P.; WANG, S. S.; BOURQUARD, N.; et al. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. **Circulation Research**, v. 100, p. 1200 – 1207, 2007.

SHIMIZU, H.; KIYOHARA, Y.; KATO, I.; KITAZONO, T.; TANIZAKI, Y.; et al. Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama Study. **Stroke**, v. 35, n. 9, p. 2072-2077, 2004.

SHINER, M.; FUHRMAN, B.; AVIRAM, M. Paraoxonase 2 (PON2) expression is upregulated via a reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH)-oxidase-dependent mechanism

during monocytes differentiation into macrophages. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 12, p. 2052–2063, 2004.

SHINER, M.; FUHRMAN, B.; AVIRAM, M. Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is up-regulated by pomegranate juice phenolic anti-oxidants via PPAR γ and AP-1 pathway activation. **Atherosclerosis**, v. 195, p. 313–321, 2007.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, 1986.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, suppl. 6, p.1315S-1321S, 1995.

SILVA, E.L.; TSUSHIDA, T.; TERAQ, J. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low density lipoprotein by quercetin and quercetin-monoglucosides. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 349, n. 2, p. 313-320, 1998.

SILVA, E. L.; NEIVA, T.J.C.; SHIRAI, M.; TERAQ, J.; ABDALLA, D.S.P. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 973-979, 2008.

SINGLETON, V.R.; ORTHOFER, R.; LAMUELA RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SMITH, G.D.; SHIPLEY, M.J.; MARMOT, M.G.; ROSE, G. Plasma cholesterol concentration and mortality. The Whitehall Study. **The Journal of the American Medical Association**, v. 267, n. 1, p. 70 – 76, 1992.

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

SPOSITO, A.C. (Ed.) IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose - Departamento de Aterosclerose da

Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, supl. 1, 2007.

STALMACH, A.; MULLEN, W.; BARRON, D.; UCHIDA, K.; YOKOTA, K.; et al., Metabolite Profiling of Hydroxycinnamate Derivatives in Plasma and Urine after the Ingestion of Coffee by Humans: Identification of Biomarkers of Coffee Consumption. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, p. 1749–1758, 2009.

STALMACH, A.; STEILING, H.; WILLIAMSON, G.; CROZIER, A. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, p. 98 – 105, 2010.

STARK, A.; MADAR, Z. Dietary fiber. In: GOLDBERG, I. **Functional foods**. New York: Chapman and Hall, Cap.3, p.183-201, 1994.

STEFANUTO, A. **Efeito hipocolesterolêmico da erva mate (*Ilex paraguariensis*) associado ou não ao aconselhamento nutricional, em indivíduos dislipidêmicos em uso ou não de estatinas**. (Dissertação) Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Florianópolis. 2010.

STEGEMAN, J. J.; RENTON, K. W.; WOODIN, B. R.; ZHANG, Y. S.; ADDISON, R. F. Experimental and Environmental Induction of Cytochrome-P450E in Fish from Bermuda Waters. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.138, p.49-67. 1990.

STEINBERG, D. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy. **Journal of Lipid Research**, v. 47, p. 1339-1351, 2006.

STEPHENS, J.W.; KHANOLKAR, M.P.; BAIN, S.C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v. 202, n. 2, p. 321 -329, 2009.

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

STRASSMANN, B. B.; VIEIRA, A.R.; PEDROTTI, E.L.; MORAIS, H.N.F.; DIAS, P.F.; et al. Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8348-8353, 2008.

SUTHERLAND, W.H.F.; WALKER, R.J.; JONG, S.A.; van RIJ, A.M.; PHILLIPS, V.; et al. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 19, n. 5, p. 1340-1347, 1999.

TADIBOYINA, V.T.; LIU, D.M.; MISKIE, B.A.; WANG, J.; HEGELE, R.A. Treatment of dyslipidemia with lovastatin and ezetimibe in an adolescent with cholesterol ester storage disease. **Lipids in Health and Disease**, v. 4, p. 26, 2005.

TAKETA, A. T. C., BREITMAIER, E., SCHENKEL, E. P. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Maté). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 205 - 211, 2004.

TOKUNAGA, S.; WHITE, I.R.; FROST, C.; TANAKA, K.; KONO, S.; et al. Green tea consumption and serum lipids and lipoproteins in a population of healthy workers in Japan. **Annals of Epidemiology**, v. 12, n. 3, p. 157-165, 2002.

TOMÁS, M.; LATORRE, G.; SENTÍ, M.; MARRUGAT, J. Función antioxidante de las lipoproteínas de alta densidad: un nuevo paradigma em la arteriosclerosis. **Revista Espanhola de Cardiologia**, v. 57, n. 6, p. 557-569, 2004.

TRAVIDOU, A.; EFTHIMIADIS, A.; EFTHIMIADIS, I.; PASCHALIDOU, H. Antioxidant effects of simvastatin in primary and secondary coronary heart disease. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 485-489, 2006.

TSUZURA, S.; IKEDA, Y.; SUEHIRO, T.; OTA, K.; OSAKI, F.; et al. Correlation of plasma oxidized low-density lipoprotein levels to

vascular complications and human serum paraoxonase in patients with type 2 diabetes. **Metabolism**, v. 53, n. 3, p. 297–302, 2004.

URBANIAK, G.C.; PLOUS, S. Research Randomizer (Version 3.0) [Computer software]. Disponível em: <<http://www.randomizer.org/>> 22 de abril de 2011. Acessado em 05 de abril de 2012.

USDA, ARS, National Genetic Resources program. 2007. Germplasm Resources Information network (GRIN) (Online Database). Beltsville, Maryland: Natl. Germplasm Resources Laboratory. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?19756>. Acessado em Fevereiro de 2009.

VALKO, M; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

van het HOF, K.H.; de BOER, H.S.; WISEMAN, S.A.; LIEN, N.; WESTRATE, J.A.; et al. Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 5, p. 1125–1132, 1997.

VAN LENTEN, B. J.; NAVAB, M.; SHIH, D.; FOGELMAN, A. M.; LUSIS, A. J. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 11, n. 3 – 4, p. 155-161, 2001.

WALLACE, A.J.; SUTHERLAND, W.H.F.; MANN, J.I.; WILLIAMS, S.M. The effect of meals rich in thermally stressed olive and safflower oils on post-prandial serum paraoxonase activity in patients with diabetes. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 55, p. 951–958, 2001.

WANG, D.; LU, J.; MIAO, A.; XIE, Z.; YANG, D. HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis of polyphenols and purine alkaloids in leaves of 22 tea cultivars in China. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 361 -369, 2008.

WANGEN, K.E.; DUNCAN, A.M.; XU, X.; KURZER, M.S. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 225-231, 2001.

WASSMANN, S.; LAUFS, U.; MÜLLER, K.; KONKOL, C.; AHLBORY, K.; et al. Cellular Antioxidant Effects of Atorvastatin *In vitro* and *In vivo*. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, p. 300-305, 2002.

WAYNER, D.D.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; BARCLAY, L.R.C.; LOCKE, S.J. The relative contributions of vitamins E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 924, n. 3, p. 408-419, 1987.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325 – 333, 1981.

WHO - World Health Organization. **Cardiovascular Diseases**. Disponível em: <www.who.int/cardiovascular_diseases/en/>. Acessado em 20 de outubro de 2008a.

WHO - World Health Organization. **Cardiovascular Diseases: prevention and control**. Disponível em: <<http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cvd/en/>>. Acessado em 20 de novembro de 2008b.

WHO- World Health Organization.. **World Data Table**. Disponível em: <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_29_world_data_table.pdf>. Acessado em 15 de agosto de 2009.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E.L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: Yunes, R.A., Calixto, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó (SC): Argos Editora Universitária – UNOESC, 2001. p. 317-334.

WILLCOX, B.J.; CURB, J.D.; RODRIGUEZ, B.L. Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic

studies. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10, p. S75-S86, 2008.

WILLIAMS, W.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J. **Hematologia**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1976. 1179p. 1976. Traducao de: Hematology

WITTIG, J.; HERDERICH, M.; GRAEFE, E.U.; VEIT, M. Identification of quercetin glucuronides in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 753, n. 2, p. 237-243, 2001.

WNUK, M.; LEWINSKA, A.; OKLEJEWICZ, B.O.; BUGNO, M.; SLOTA, E.; et al. Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes *in vitro*. **Mutation Research**, v. 679, p. 18 – 23, 2009.

YAO, L.; JIANG, Y.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; LIU, X.; et al. HPLC analysis of flavonols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. **Food Chemistry**, v. 84, p. 622 – 628, 2004.

YEH, Y.H.; LEE, Y.T.; HSIEH, H.S.; HWANG, D.F. Dietary caffeic acid, ferulic acid and coumaric acid supplements on cholesterol metabolism and antioxidant activity in rats. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 17, p. 123 – 132, 2009.

YOSHIKAWA, M.; SUGIMOTO, S.; KATO, Y.; NAKAMURA, S.; WANG, T.; et al. Acylated oleanane-type triterpene saponins with acceleration of gastrointestinal transit and inhibitory effect on pancreatic lipase from flower buds of Chinese tea plant (*Camellia sinensis*). **Chemistry and Biodiversity**, v. 6, p. 903 – 915, 2009.

ZEEB, D.J.; NELSON, B.C.; ALBERT, K.; DALLUGE, J.J. Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 5020 – 5026, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CEP: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS - SANTA
CATARINA

Participante Nº

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O(A) Sr(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada “**Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em cápsulas: Avaliação dos efeitos hipocolesterolêmico e antioxidante em indivíduos com hiperlipidemias**” de responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Edson Luiz da Silva. Neste estudo, pretende-se avaliar se o consumo de cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde ou tostada durante 8 semanas melhora os parâmetros antioxidante e de dislipidemia. Estudos anteriores de nosso laboratório já mostraram que a ingestão de infusão de erva-mate verde (tipo chimarrão) ou chá mate tostado pode diminuir o colesterol, a glicemia e o estresse oxidativo em indivíduos com colesterol elevado ou com diabetes. As cápsulas serão distribuídas aos voluntários por sorteio. Você saberá o tipo de cápsula que tomou somente ao final do estudo, assim como também terá acesso aos resultados laboratoriais.

Para a demonstração destes possíveis efeitos benéficos da erva-mate precisamos de sua colaboração para a ingestão de 3 cápsulas de erva-mate, 3 vezes ao dia, juntamente com as principais refeições (independente do horário das mesmas), durante 60 dias. É importante que o consumo das cápsulas com o extrato seco de erva-mate não seja interrompido por mais de dois dias consecutivos. Além disso, o(a) senhor(a) deve manter os seus hábitos de vida regulares durante o período de tempo do estudo, como por exemplo, consumir o mesmo tipo de alimentação, praticar ou não exercícios físicos e, principalmente, não introduzir medicamentos de uso crônico. Caso o(a) senhor(a) já esteja usando algum medicamento, a dose do mesmo não deverá ser mudada durante o período do estudo. Precisamos, também, da sua autorização para a realização de exame clínico completo, eletrocardiograma e de uma coleta de 12 mL de sangue (3 tubos), em jejum de 12-14 horas, no primeiro e sétimo dias do início do estudo, e também após a quarta e oitava semanas, bem como aferição do peso, altura e circunferência abdominal. As cápsulas deverão ser tomadas inteiras com o auxílio de água, apenas.

Esse protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (nº 00560512.7.0000.0121) e trará apenas o desconforto das coletas de sangue. Porém, pessoas sensíveis à cafeína (um dos componentes o extrato seco de erva-mate) poderão sentir irritação gástrica, tremores, excitabilidade ou insônia. Caso ocorra algum desses efeitos colaterais com o(a) senhor(a), favor interromper o consumo das cápsulas de erva-mate e entrar em contato com os pesquisadores. Esperamos, entretanto, que esse estudo traga benefícios, tais como maior estímulo para que mais pessoas se beneficiem das propriedades da erva-mate à saúde humana, o qual poderá vir a ser utilizada como suplemento alimentar. Esta pesquisa não oferece riscos maiores do que os citados acima, não tem fins lucrativos, é confidencial e o seu nome será usado apenas no primeiro momento de coleta das amostras de sangue. Em seguida, as amostras serão identificadas pelo número do seu cadastro. Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas científicas, apresentados em congressos ou eventos científicos ou às autoridades sanitárias, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

O(A) senhor(a) poderá se beneficiar diretamente dos resultados obtidos no final do estudo, caso estes sejam de seu interesse. Sua participação é voluntária, podendo desistir desta pesquisa em qualquer momento. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelos telefones 3721-97.12; 9634-2312. Se você estiver de acordo em participar, garantimos que as informações obtidas e o material coletado serão confidenciais e só serão utilizados neste trabalho.

Eu, abaixo assinado, concordo em participar deste estudo.

Assinatura do(a) participante voluntário

Data __/__/__

Edson Luiz da Silva
Coordenador
Fone: 3721-9712;
R. 219
edson@ccs.ufsc.br

Aline Minuzzi Becker
Pesquisadora
Fones: 3721-9712 R.219
9634-23.12
ali.mb@hotmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
 CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
 DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
 CEP: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS - SANTA
 CATARINA
 FONE: (48) 3721-8053; 3721-9712 - FAX: (48) 3721-
 9542

Participante Nº

□□□□

Consentimento Para Participar Deste Estudo

Eu, _____ declaro que li e compreendi as informações contidas nesse documento. Fui devidamente informado(a) pelos pesquisadores – Prof. Dr. Edson Luiz da Silva e Aline Minuzzi Becker - dos procedimentos que serão utilizados e da conduta deste estudo intitulado intitulada “Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em cápsulas: Avaliação dos efeitos hipocolesterolêmico e antioxidante em indivíduos com hiperlipidemias”, e concordo em participar da pesquisa como voluntário. Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Florianópolis, ____ de _____ de _____.

Assinatura do(a) participante voluntário
 R.G. _____

 Prof. Dr. Edson Luiz da Silva
 Professor Coordenador

 Aline Minuzzi Becker
 Mestranda

APÊNDICE B

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em cápsulas: Estudo de toxicidade clínica em indivíduos saudáveis e efeito hipocolesterolêmico em indivíduos com hiperlipidemias.

Pesquisador: Edson Luiz da Silva

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2

CAAE: 00560512.7.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 120.070

Data da Relatoria: 08/10/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo clínico, randomizado, controlado, de intervenção (estudo toxicológico) e duplo-cego (estudo hipocolesterolêmico que pretende erificar a eventual toxicidade clínica da ingestão de cápsulas contendo extratos secos de erva mate verde ou tostada por indivíduos saudáveis e o seu efeito hipocolesterolêmico em indivíduos com hiperlipidemias.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral - Verificar a eventual toxicidade clínica da ingestão de cápsulas contendo extratos secos de erva mate verde ou tostada por indivíduos saudáveis e o seu efeito hipocolesterolêmico em indivíduos com hiperlipidemias. **Objetivos Específicos:** 1. Avaliar a eventual toxicidade de cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde ou tostada após ingestão durante uma semana (estudo agudo) por seres humanos saudáveis, por meio de exame clínico completo, eletrocardiograma de doze derivações, hemograma completo, exame de urina tipo I e testes bioquímicos de rotina no soro. 2. Avaliar a eventual toxicidade de cápsulas contendo extrato seco de erva-mate verde ou tostada após ingestão de doses repetidas durante 8 semanas (estudo crônico) por seres humanos saudáveis, por meio de exame clínico completo, eletrocardiograma de doze derivações, hemograma completo, exame de urina tipo I e testes bioquímicos de rotina no soro. 3.

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **Município:** FLORIANÓPOLIS **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Telefone:** (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9096 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Verificar o efeito da ingestão das cápsulas de erva -mate nas concentrações séricas de colesterol total, triglicérides, LDL-C, HDL-C e Não-HDL-C em indivíduos com hiperlipidemias sem uso de medicamentos hipolipemiantes, durante 60 dias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores informam que os possíveis riscos são: O estudo não apresenta riscos aos participantes, com exceção da dor e possível formação de hematoma provocados pelas coletas de sangue. Nos casos de possível hipersensibilidade à erva-mate, como desconforto gástrico, insônia e tremores, os participantes serão instruídos a interromper a ingestão das cápsulas e, conseqüentemente, deixarão de fazer parte do estudo. Como benefícios os pesquisadores apontam: "Os participantes terão como único benefício imediato os resultados dos exames laboratoriais realizados. Para a comunidade científica, espera-se contribuir para o esclarecimento sobre o uso seguro de uma nova forma de apresentação da erva-mate, ou seja, em cápsulas. Além disso, esperamos confirmar a sua propriedade de reduzir o colesterol sérico, conforme já demonstrado anteriormente para a infusão de erva-mate (chimarrão e mate tostado).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto encontra-se bem delineado e com ajustes feitos no TCLE a partir da solicitação realizada pelo CEP em avaliação anterior. Neste sentido, a referida pesquisa cumpre os requisitos solicitados para sua tramitação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta os documentos e solicitações de pendência anterior.

Recomendações:

Projeto aprovado e indicado para encaminhamento ao CONEP por ser um estudo fase 3 conforme os pesquisadores informam na folha de rosto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado e a ser encaminhado ao CONEP

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9806 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

APÊNDICE C

Questionário – Avaliação Clínica

Identificação

Nome: _____
 Sexo: masculino feminino
 Estado civil: _____
 Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____
 Raça: branco pardo amarelo negro
 Escolaridade: analfabeto 1º grau incompleto 1º grau completo 2º grau incompleto 2º grau completo superior
 incompleto superior completo pós-graduação
 Endereço: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____
 Estado: _____ Cep: _____ Telefone: (____) _____
 Email: _____
 Ocupação profissional: _____

Fatores de Risco:

Histórico Familiar de Diabetes sim não Parentesco: _____

Histórico Familiar de Hipertensão sim não Parentesco: _____

Antecedentes Familiares de Doença Arterial Coronariana sim não

Último colesterol total _____

Último LDL _____

Último triglicérides _____

Antecedentes de Morbidades (cirurgias, internações, doenças, processo inflamatório recente ou infeccioso): _____

Hábitos Alimentares:

1. Erva-mate: sim não. Forma: chimarrão chá mate tererê mate cocido. Freqüência: Diariamente semanalmente eventualmente. Quantidade: ≤ 1 litro 1 – 2 litros ≥ 2 litros.
2. Café: sim não. Freqüência: Diariamente semanalmente eventualmente. Quantidade: 1 xícara 1 – 3 xícaras mais 3 xícaras.
3. Chás: sim não. Freqüência: Diariamente semanalmente eventualmente.
4. Chocolate: sim não. Freqüência: Diariamente semanalmente eventualmente.
5. Sucos: sim não. Freqüência: Diariamente semanalmente eventualmente. Quantidade: 1 copo 1 – 3 copos mais 3 copos.
6. Óleo de oliva ou azeite de dendê: sim não. Freqüência: Diariamente semanalmente eventualmente.
7. Vinho: sim não. Freqüência: Diariamente semanalmente eventualmente.
8. Sementes oleaginosas: sim não. Freqüência: Diariamente semanalmente eventualmente.
9. Frutas cítricas: sim não. Freqüência: Diariamente semanalmente eventualmente.

Hábitos:

1. Atividade Física: sim não
 Quantas vezes na semana: _____ Qual tipo de atividade física _____
2. Bebida Alcoólica sim não Freqüente sim não Raramente sim não
3. Tabagista sim não N° cigarros/dia: _____ Eventualmente Ex-fumante _____ Parou há: _____
4. Medicação em uso
 Nenhum Diurético Medicamentos _____
 Vit. A ou carotenóides Vit. C Vit. E Vit. _____ Multivitaminas cápsulas de chá
 branco;verde
 Extratos Vegetais Óleo de peixe Antiinflamatórios não esteroidais
 Anticoncepcional Oral Injetável Intradérmico
 Outras medicações regulares
 Qual (is): _____