Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Atividade antioxidante do chá mate (*Ilex*
paraguariensis)**

Ruth Lobato Teixeira Matsumoto

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Saúde Pública para fins de
obtenção do título de Mestre em
Saúde Pública.

Área de concentração: Nutrição

Orientadora: **Prof^a. Assoc. Deborah Helena Markowicz Bastos**

São Paulo
2008

Atividade antioxidante do chá mate (*Ilex paraguariensis*)

Ruth Lobato Teixeira Matsumoto

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Saúde Pública para fins de
obtenção do título de Mestre em
Saúde Pública.

Área de concentração: Nutrição

Orientadora: **Prof^a Assoc. Deborah Helena Markowicz Bastos**

São Paulo

2008

À minha família,
em especial **Vinicius** e
Laura que fazem tudo na
minha vida valer a pena

AGRADECIMENTOS

À Profa. Deborah Helena Markowicz Bastos pela confiança, incentivo e incessante colaboração;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte financeiro para realização da pesquisa e pela concessão de bolsa de estudo;

À Empresa Leão Júnior pela doação de amostras de chá mate utilizadas nesta pesquisa

A todas as participantes do protocolo, as quais gentilmente concordaram com todas as normas e doaram sangue para realização deste estudo;

Ao Prof. Alejandro Gugliucci pela inspiração científica e colaboração para o desenvolvimento deste estudo;

Ao Prof. Edson Luiz da Silva da Universidade Federal de Santa Catarina pela atenção e todo auxílio dispensado ao longo desta pesquisa;

À Dra. Simone Mendonça e Profa. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno pela relevante cooperação na realização deste projeto;

À Profa. Titular Ana Cristina d’Andretta Tanaka por disponibilizar o Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula Souza para realização das coletas de sangue;

À Valéria S. Nunes, Fabiana Ferreira e Rodrigo Iborra do Laboratório de Lípidos (LIM 10) da Faculdade de Medicina da USP pelas análises de LDL;

Ao Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro da Universidade São Francisco pela realização das análises de PCR *real time*;

Às colegas de laboratório Geni Rodrigues Sampaio, Liania Luzia, Emília Ishimoto, LÍlian Pino e Rosana Manólio Soares pelo espírito de equipe e bons momentos;

À amiga Daniela Moura de Oliveira pela ajuda nas análises de eletroforese e pelo fundamental apoio durante todo este trabalho.

À aluna de iniciação científica Michele Moreira pela ajuda nos testes e coleta de sangue dos voluntários;

RESUMO

INTRODUÇÃO: A erva-mate (*Ilex paraguariensis*), uma planta nativa e consumida em grande parte da América do Sul, apresenta diversos compostos bioativos que já demonstraram importante atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. O chá mate é um produto desta planta cujas propriedades antioxidantes ainda não foram avaliadas em ensaios com humanos. **OBJETIVO:** Este projeto visa avaliar o potencial antioxidante do chá mate *in vivo* e *ex vivo* sobre o plasma e LDL de humanos após a ingestão de chá-mate. **MÉTODOS:** Indivíduos em jejum (n=20) tiveram seu sangue coletado em três momentos: antes, após uma hora e depois de 1 semana (7 dias) da ingestão diária de chá-mate. O plasma e a LDL obtidos nos três momentos foram submetidos à oxidação por três mecanismos diferentes [Cobre (Cu^{+2}), lipoxigenase e peroxinitrito (SIN-1)] e em seguida foram medidos os produtos de peroxidação lipídica formados: a concentração de TBARs (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e a formação de dienos conjugados empregando-se métodos espectrofotométricos. Também foram determinados o perfil antioxidante total do plasma (TAS), avaliação da lipoperoxidação plasmática basal (TBARs), avaliação da fragmentação da Apolipoproteína B após oxidação da LDL, por eletroforese em gel com SDS-PAGE e os níveis de expressão, por meio de análise de PCR *real time*, de alguns genes relacionados à produção de enzimas antioxidantes. Teste t de *Student* pareado foi utilizado para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados das diversas análises antes e após o consumo do chá. **RESULTADOS:** Os resultados obtidos pela maioria dos ensaios realizados demonstraram que o consumo de chá mate aumentou a resistência à oxidação, a capacidade antioxidante plasmática e a expressão de genes relacionados à produção de enzimas antioxidantes. **CONCLUSÃO:** Esses resultados sugerem que o consumo de chá mate por período curto pode atuar como antioxidante por múltiplos mecanismos e portanto pode contribuir para diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônicas relacionadas a processos oxidativo.

Descritores: Antioxidantes; compostos fenólicos; *Ilex paraguariensis*, peroxidação lipídica, LDL, enzimas antioxidantes

ABSTRACT

INTRODUCTION: Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) is a native and widely consumed South American plant. It contains high concentrations of bioactive compounds that respond for its high antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*. This activity has not been demonstrated yet in humans for the mate tea, a product derived from Yerba Mate. **OBJECTIVE:** The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of maté tea *in vivo* and *ex vivo* on plasma and LDL human after ingestion of mate tea infusion. **METHODS:** Fasting peripheral venous blood samples of twenty healthy women (n=20) were taken in three different times: before drinking the tea, one hour later and after one week of daily consumption (7 days) of mate tea. The plasma and isolated LDL were oxidated with 3 different systems [copper (CuSO₄), lipoxygenase and peroxynitrite (SIN-1)]. Next, the peroxidation products evaluated were: concentration of malonaldehyde (TBA) and conjugated dienes (lag time), using spectrophotometric methods. We also measured the plasma total antioxidant status (TAS), serum levels of malondialdehyde (MDA) as thiobarbituric substances (TBARS), fragmentation of apo B using SDS-PAGE and the level of antioxidant enzyme gene expression by PCR *real time*. Paired *t* student test was used to analyze the results before and after ingestion of mate tea. **RESULTS:** The results obtained by most of the tests showed that mate tea ingestion increased the plasma and LDL resistance by *ex vivo* oxidation, the plasma antioxidant capacity and the level of antioxidant enzyme gene expression. **CONCLUSION:** This study suggests that regular consumption of mate tea can act as an antioxidant by multiple mechanisms and thus may contribute decrease the risk of developing chronic diseases related to oxidative processes.

Key words: Antioxidant; phenolic compounds; *Ilex paraguariensis*, Lipid peroxidation, LDL, antioxidant enzymes

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Radicais livres: conceito e formação	17
2.2 Peroxidação lipídica	22
2.3 Estresse oxidativo e antioxidantes	25
2.4 Compostos fenólicos como antioxidantes	29
2.5 Erva-Mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	33
2.5.1 Classificação dos principais produtos comerciais	36
2.5.1.1 Chimarrão e Tererê	36
2.5.1.2 Chá mate tostado	37
2.5.2 Propriedades funcionais da Erva-mate	38
3. JUSTIFICATIVA	41
4. OBJETIVOS	41
4.1 Objetivo geral	41
4.2 Objetivos específicos	41
5. MATERIAL E MÉTODOS	42
5.1 Casuística	42
5.2 Critérios de inclusão	42
5.3 Critérios de exclusão	42
5.4 Desenho do estudo	42
5.5 Preparação da infusão de chá-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	43
5.6 Obtenção de sangue, plasma e LDL	44
5.7 Medida das variáveis bioquímicas	45
5.8 Oxidação do plasma e da LDL	46
5.8.1 Oxidação do plasma	46
5.8.2 Oxidação da LDL	46

5.9 Monitoramento da peroxidação lipídica	47
5.9.1 Formação de Dienos conjugados	47
5.9.1.1 Plasma	47
5.9.1.2 LDL	48
5.9.2 Determinação das Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	48
5.10 Medida do perfil de antioxidantes totais no plasma	49
5.11 Avaliação da lipoperoxidação basal do plasma (TBARS)	49
5.12 Extração de RNA e síntese de cDNA	50
5.13 Quantificação da Expressão por PCR em Tempo real	50
5.14 Eletroforese da porção protéica da LDL	52
5.15 Avaliação do consumo alimentar	53
5.16 Análise dos resultados	54
5.17 Questões éticas	54
6. RESULTADOS	55
6.1 Características da população estudada	55
6.2 Quantificação dos produtos de peroxidação lipídica no plasma	55
6.2.1 Formação de Dienos conjugados	55
6.2.2 Determinação das Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	56
6.3 Medida do perfil de antioxidantes totais no plasma	57
6.4 Avaliação da lipoperoxidação do plasma (TBARS)	57
6.5 Quantificação da expressão por PCR em tempo real	58
6.6 Quantificação dos produtos de oxidação da fração LDL	59
6.6.1 Formação de Dienos conjugados após indução oxidativa com Sulfato de Cobre	59
6.6.2 Razão máxima de Formação de Dienos conjugados em LDL após	60

indução oxidativa com 3-morfolinosidininona (SIN-1) e Lipoxigenase	
6.6.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	61
6.7 Avaliação da fragmentação da Apolipoproteína B	63
6.8 Avaliação do consumo alimentar	66
7. DISCUSSÃO	68
8. CONCLUSÃO	84
9. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	85
ANEXOS	
Anexo 1 – Registro de consumo alimentar	101
Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia.	24
Figura 2: Esquema das defesas antioxidantes enzimáticas, mostrando a geração de espécies reativas	27
Figura 3: Estrutura molecular dos alcalóides presentes na erva-mate	35
Figura 4: Estrutura molecular das saponinas presentes na erva-mate	35
Figura 5: Estrutura molecular dos ácidos fenólicos presentes na erva mate	36
Figura 6: Desenho do estudo	43
Figura 7: Valores individuais da concentração de malonaldeído formado na LDL (TBARS) antes (T=0), após 1 hora (t=1) e depois de 1 semana (t=2) de consumo do chá-mate	63
Figura 8: Placa de eletroforese com as bandas de LDL oxidada e não oxidada (controle) com sulfato de cobre de cada participante obtidas antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate	64
Figura 9: Placa de eletroforese com as bandas de LDL oxidada com sulfato de cobre de cada participante obtidas antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos sobre os efeitos biológicos de erva mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	40
Tabela 2: Características da população estudada no período basal	55
Tabela 3: <i>Lag Time</i> de oxidação do plasma (Dienos conjugados) antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate	56
Tabela 4: Concentração de malonaldeído formado no plasma (TBARS) após indução oxidativa, antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate	56
Tabela 5: Perfil de antioxidantes totais no plasma (TAS) antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate.	57
Tabela 6: Concentração de malonaldeído formado no plasma (TBARS) antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate	58
Tabela 7: Avaliação da Expressão relativa das enzimas antioxidantes Glutathione peroxidase (GPx), Superóxido dismutase (SOD) e Catalase antes (T=0) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate	59
Tabela 8: <i>Lag Time</i> de oxidação da LDL (Dienos conjugados) antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate	59
Tabela 9: Razão máxima de Formação de Dienos conjugados em LDL após indução oxidativa com Sulfato de Cobre antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate	60
Tabela 10: Razão máxima de Formação de dienos conjugados em LDL após indução oxidativa com lipoxigenase antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate	61
Tabela 11: Razão máxima de Formação de Dienos conjugados em LDL após indução oxidativa com 3-morfolinossidininonimina (SIN-1), antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate	61

Tabela 12: Concentração de malonaldeído formado na LDL (TBARS) após indução oxidativa antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate	62
Tabela 14: Composição nutricional estimada do consumo alimentar dos indivíduos antes e durante o período de intervenção	66
Tabela 15: Composição nutricional do consumo alimentar dos indivíduos estimada ajustado pela energia, antes e durante o período de intervenção	67

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio é um dos maiores focos da pesquisa recente relacionada ao câncer e a doenças cardiovasculares (Halliwell 2000).

Estudos epidemiológicos mostram que uma dieta saudável, na qual a maior parte da ingestão de calorias provém de vegetais, pode reduzir o risco de doenças crônico-degenerativas como aterosclerose e câncer (Halliwell 2000). Este efeito protetor advém não somente dos macronutrientes presentes nas plantas, como as proteínas, carboidratos complexos e lipídeos, mas também de compostos originários do seu metabolismo secundário que são denominados, genericamente, de fitoquímicos (Bravo 1998; Visioli *et al.* 2000; Halliwell 2000). Estas substâncias são capazes de agir como protetoras frente ao estresse oxidativo (conjunto de condições intra e extracelulares que leva à geração exacerbada de radicais livres de oxigênio), atuando como “varredores” de radicais livres e/ou moduladores dos mecanismos de defesa antioxidante e do sistema de reparo do DNA (Moller e Loft 2006; Thompson *et al.* 2005; Johnston *et al.* 2004).

Dos vários produtos naturais que estão sendo estudados, os que contêm compostos fenólicos tem sido objeto de muitas pesquisas (Manah *et al.* 2004).

Os compostos fenólicos constituem-se num complexo grupo de substâncias químicas presentes em plantas e produtos de origem vegetal e fazem parte da dieta humana (Lindsay 2000; Karakayas 2001; Clifford 2004). Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de alimentos e bebidas contendo estes compostos exercem um papel importante na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (Block *et*

al. 1992, Knert *et al.* 1996), decorrente, em grande parte, da sua reconhecida atividade antioxidante (Johnston *et al.* 2004).

As bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) contêm vários compostos bioativos, como as metilxantinas (cafeína e teobromina), as saponinas e os compostos fenólicos. Nesta última classe de compostos, os mais abundantes são os ácidos fenólicos, normalmente os ácidos cafeoilquínicos ou clorogêncios (Clifford e Ramirez 1990; Mazzafera 1997; Carini *et al.* 1998; Bastos *et al.* 2005; Bastos *et al.* 2006).

A atenção para a erva-mate e o seu potencial uso para a promoção de saúde, vem sendo focado apenas recentemente pela comunidade científica. Em meados da década de 90 foram publicados os primeiros trabalhos que demonstraram a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de infusões de erva-mate verde (chimarrão) (Gigliucci e Stahl 1995; Gigliucci 1996; Campos *et al.* 1996). Em seguida, outros resultados publicados a partir de ensaios com infusões da erva-mate verde demonstraram outros efeitos fisiológicos benéficos ao organismo relacionados ao seu consumo (Bracesco *et al.* 2003; Ramirez-Mares *et al.* 2004; Gorzalczany *et al.* 2001; Baisch *et al.* 1998; Stein *et al.* 2005; Gugliucci e Menini 2002; Lunceford e Gugliucci 2005).

A grande maioria dos trabalhos mencionados foi conduzida com a erva-mate para chimarrão, isto é, a erva-mate verde seca e cancheada. Não há trabalhos *in vivo* que evidenciem se o processo de torrefação da erva-mate verde para a produção do chá-mate, o qual promove inúmeras transformações relativamente à composição qualitativa e quantitativa dos compostos bioativos, influencia na atividade antioxidante desta matéria prima.

Visto que: (a) o chá mate é um alimento de baixo custo, versátil, que pode ser consumido na forma de bebida fria ou quente, constituindo-se em veículo de substâncias bioativas naturalmente presentes num alimento saudável. (b) Não existir publicações que evidenciem se erva-mate torrada apresenta potencial antioxidante *in vivo*, este trabalho propôs a avaliar se o chá mate apresenta atividade antioxidante *in vivo* e *ex vivo* sobre o plasma e LDL de humanos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radicais livres: conceito e formação

A associação entre a presença de radicais livres e a patogênese de diversas doenças, bem como a proteção conferida por certas substâncias antioxidantes, tem despertado o interesse da comunidade científica (Halliwell e Gutteridge 2000).

O termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa. Isto determina uma atração para um campo magnético, o que pode torná-lo altamente reativo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora. Os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se. Portanto os radicais livres ou provocam ou resultam dessas reações de óxido-redução (Halliwell e Gutteridge 2000).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, radicais livres são formados fisiologicamente pelo organismo, como resultado do processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias das células, a fim de gerar ATP. Os radicais livres produzidos pelos macrófagos e neutrófilos são empregados contra bactérias e fungos invasores do organismo, produzindo ação lesiva a estes microrganismos. Estes também podem ser formados pela exposição do organismo a fatores exógenos, como ozônio, radiações gama e ultravioleta, tabaco, substâncias tóxicas presentes em alimentos e bebidas (aditivos químicos, hormônios, aflatoxinas, etc), alto consumo de gorduras saturadas (frituras, embutidos, etc) e de

certos medicamentos. Por outro lado, o excesso de radicais livres leva a importantes alterações em nível molecular que estão associadas a danos às macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas e DNA, gerando alterações teciduais que estão implicadas em inúmeros processos patológicos, como por exemplo: câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, diabetes, cirrose, artrite reumatóide etc. (Halliwell e Gutteridge 2000).

Em sua maioria, os radicais livres derivam do oxigênio e denominam-se genericamente “Espécies Reativas de oxigênio” (EROs). Estas também podem se referir às espécies que não são radicais livres, e sim algumas moléculas derivadas de oxigênio capazes de gerar radical livre, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Abdalla 2006).

Dentre as EROs, o radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($HO^\bullet$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são formados em todas as células aeróbias, enquanto a espécie mais reativa, oxigênio singlete (1O_2), é formada pela excitação do oxigênio fundamental (3O_2), pela energia térmica ou fotoquímica, dissipada por substâncias “sensibilizadoras” quando irradiadas com luz em comprimento de onda específico (Abdalla 2006).

Os radicais livres podem ainda ser formados por reações químicas envolvendo espécies reativas de nitrogênio (ERN), enxofre (ERS), pelas reações enzimáticas da ciclooxigenase, lipoxigenase e aldeído oxidase, pelas reações catalisadas por metais de transição como o ferro e o cobre, entre outras (Rover Júnior *et al.* 2001; Halliwell 2000; Belló 2002).

Radical superóxido

O radical superóxido (O_2^-) é produzido continuamente através de diversos processos celulares onde ocorre a redução de um elétron do oxigênio. A molécula toma então uma carga negativa e torna-se radicalar.

O superóxido é formado em pequenas quantidades na cadeia respiratória aeróbia. Também é produzido por macrófagos como agente antibacteriano. Algumas enzimas têm o superóxido como intermediário reacional ou mesmo produto final. Os principais danos causados pelo superóxido em sistemas biológicos são a destruição de centros metálicos de proteínas, oxidação de cadeias laterais de aminoácidos e a formação de outras espécies oxidativas, como o radical hidroxila e o peroxinitrito (Winterbourn e Kettle 2003).

Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apresenta poder oxidante indireto, gerando radical hidroxila ($HO^\bullet$) e interagindo com o radical superóxido (O_2^-). Nesse caso, ele torna-se um potente oxidante e, dependendo da concentração, pode degradar qualquer célula (Mattos *et al.* 2003).

Como é uma molécula relativamente apolar, o H_2O_2 pode atravessar membranas por difusão simples, reagindo localmente com íons metálicos como o ferro (II) e o cobre (I) através da chamada reação de *Fenton*. Nesta reação ocorre a formação do radical hidroxila. Este mecanismo é responsabilizado por danos encontrados no DNA em situações de estresse oxidativo (Mattos *et al.* 2003).

O peróxido de hidrogênio é gerado pelas mesmas fontes que produzem o radical superóxido, pois tanto a reação enzimática (superóxido dismutase):

como a sua redução produzem peróxido de hidrogênio (Mattos *et al.* 2003).

Radical hidroxila

O radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) é considerado o mais poderoso oxidante de todas as espécies reativas de oxigênio. Isso porque pode reagir com todos os tipos de macromoléculas biológicas, produzindo derivados que não podem ser regenerados através do metabolismo celular. Este radical pode ser gerado principalmente através da reação de *Fenton*, mas também por outros mecanismos diversos, a partir do peroxinitrito, radical superóxido e na presença da ação catalítica de metais de transição (Halliwell e Gutteridge 2000).

Os principais alvos da ação do radical hidroxila são o DNA (que sofre danos nas suas bases, levando à quebra da dupla cadeia) e os ácidos graxos insaturados (que sofrem peroxidação lipídica) (Halliwell e Gutteridge 2000).

Oxigênio singlete

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) resulta da excitação da molécula de oxigênio, sem ocorrer a sua ionização. O oxigênio (no estado fundamental) é excitado por moléculas previamente excitadas pela luz, numa reação conhecida como fotossensibilização. Também pode ser produzido em determinadas reações enzimáticas, sem a intervenção da luz (Abdalla 2006).

O ($^1\text{O}_2$) pode reagir com biomoléculas adicionando-se a ligações duplas (como por exemplo, em ácidos graxos insaturados) ou por transferência de energia (por exemplo, eliminando radicais livres necessários para a catálise de algumas enzimas) (Abdalla 2006).

Efeitos deletérios, observados quando determinadas células são expostas à luz, têm sido atribuídos à produção do ($^1\text{O}_2$), que pode ser produzido em sistemas biológicos tendo como agente fotossensível o pigmento retinal da púrpura visual ou a porfirina (produto metabólico de compostos hemínicos). A excessiva formação de ($^1\text{O}_2$) foi relacionada ao dano em células visuais expostas de forma prolongada à luz, e a sintomas na epiderme (como erupções e espessamento), causados pelo acúmulo de porfirina na pele, devido a alterações metabólicas congênitas (Halliwell e Gutteridge 2000).

Óxido nítrico e peroxinitrito

O óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) é um radical livre sintetizado em nosso organismo, que possui propriedades fisiológicas importantes, dentre as quais se destacam seus papéis como neurotransmissor e como vasodilatador (Abdalla 2006). Em algumas situações apresenta um potencial citotóxico relacionado à formação de

espécies de alta reatividade e citotoxicidade. Por ser uma espécie radicalar, o ($\text{NO}^\bullet$) é capaz de reagir rapidamente com outros radicais importantes do ponto de vista biológico, tais como oxigênio molecular e o radical superóxido (O_2^-), sendo o peroxinitrito ($^\bullet\text{OONO}$) o produto desta reação. Tais espécies são potentes oxidantes, capazes de oxidar lípidos, proteínas e bases do DNA entre outros problemas (Queiroz e Batista 1999).

2.2 Peroxidação lipídica

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação dos radicais livres, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica. Isso ocorre devido ao fato dos ácidos graxos poliinsaturados serem, por causa de suas múltiplas duplas ligações, excelente alvos para o ataque das EROs (Sies 1993).

Tal processo pode gerar uma série de reações deletérias que acarretam alterações na sua estrutura e permeabilidade. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos (como malonaldeído e dienos conjugados) culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Assim como na formação dos radicais livres, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na resposta inflamatória participando na formação de prostaglandinas e de outras vias de transdução de sinais. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (Halliwell e Gutteridge 2000).

Nos sistemas biológicos a peroxidação pode ocorrer principalmente por duas vias: A primeira uma via enzimática envolvendo as ciclooxygenases e lipoxigenases na oxigenação dos ácidos graxos poliinsaturados e a segunda, que envolve a participação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, metais de transição e outros (Lima e Abdalla 2001).

O mecanismo de lipoperoxidação é uma reação em cadeia que pode ser dividido didaticamente em três etapas (Dotan *et al.* 2004):

1º Etapa – Iniciação: As EROs são formadas a partir da reação de moléculas de lipídeos com o oxigênio (O_2) na presença de algum agente catalisador, como a luz, calor, ou íons metálicos. Ao sofrer ataque das EROs, a cadeia poliinsaturada perde um átomo de hidrogênio, formando assim um radical livre. Ou seja, o processo é iniciado quando o radical hidroxila ($HO\cdot$) captura um átomo de hidrogênio do carbono metileno na cadeia do ácido graxo, que se torna radical alquil ($L\cdot$).

2º Etapa – propagação: Durante este processo, os radicais livres formados reagem com o oxigênio para formar o radical peroxila ($LOO\cdot$), que é muito instável e reage posteriormente com um átomo de hidrogênio da molécula de ácido graxo adjacente formando os hidroperóxidos, que ao se decomporem formam novos radicais livres.

3º Etapa – Terminação: Nesta última etapa, ocorre a reação em cadeia entre os próprios radicais originando produtos não radicais, como os aldeídos. O principal

deles é o malondialdeído (MDA), que é altamente tóxico. Estas etapas estão representadas na Figura abaixo:

Figura 1: Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia. Adaptado Mafra *et al.* 1999.

As oxidações dos lípides pelas EROs constituem a base da formação da placa de aterosclerose, que é iniciada principalmente pela oxidação da LDL (Nordberger e Arnèr 2001). Inúmeras outras patologias como diabetes, hiperlipidemia, doenças hepáticas, cardiovasculares e neurodegenerativas mostram níveis aumentados de produtos da lipoperoxidação no plasma, como por exemplo, hidroperóxidos, dienos conjugados, aldeídos e outros (Halliwell e Gutteridge 2000).

2.3 Estresse oxidativo e antioxidantes

O conjunto de condições intra e extracelulares que leva à geração exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs) é denominado “estresse oxidativo” (Sies 1993). Tal evento é caracterizado como uma consequência da insuficiência do potencial antioxidante do organismo ou da exacerbação de processos que induzam uma maior formação de espécies oxidantes, resultando em danos oxidativos responsáveis por várias ações deletérias, tais como aumento nos níveis de peroxidação de lipídios de membranas, aumento na carbonilação de proteínas e até danos ao DNA intracelular (Ferreira *et al.* 1997 e Diaz *et al.* 1997).

O estresse oxidativo tem sido relacionado com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas tais como as cardiopatias, aterosclerose e alguns tipos de câncer (Halliwell e Gutteridge 2000).

Para prevenir ou reduzir os efeitos do estresse oxidativo, o organismo está equipado com diversos mecanismos de defesa antioxidante, tais como a presença dos antioxidantes não enzimáticos (β -caroteno, selênio, α -tocoferol, vitamina C, compostos fenólicos etc.) e os antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPX) que neutralizam ou reduzem a ação das EROs (Yu 1994).

Antioxidantes enzimáticos

O sistema antioxidante enzimático constitui a primeira defesa endógena a agir aos ataques das espécies reativas de oxigênio, impedindo sua formação ou sequestram-nas de forma a impedir sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar (Rover Júnior *et al.* 2001)

Através da ação das enzimas antioxidantes, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, evitando assim a formação do radical hidroxila, que é extremamente reativo e deletério às células (Boveris e Cadenas 1997).

O sistema antioxidante enzimático é formado por diversas enzimas, entre elas, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Figura 2) (Halliwell e Gutteridge 2000).

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco (CuZn-SOD) está presente principalmente no citoplasma e nos fluidos extracelulares, enquanto que SOD-mangânês (Mn-SOD) está localizada primariamente na mitocôndria. Esta enzima tem papel fundamental na defesa do organismo contra o ataque das EROs, pois atua através da dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (Winterbourn e Kettle 2003).

A GPx, uma enzima antioxidante dependente de selênio, catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de outros peróxidos orgânicos, às custas da conversão da glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (GSSG) e água (H_2O) e peróxidos orgânicos a álcool. Assim, a GPx desempenha um papel importante na inibição da peroxidação lipídica e na prevenção de danos no DNA e no RNA (Martins 2007).

A Catalase é uma hemoproteína citoplasmática localizada nos peroxissomos do fígado e rins e em microperoxissomos de outras células. Tal enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água (H_2O) e oxigênio (O_2) (Rojkind *et*

al.

2002).

Figura 2: Esquema das defesas antioxidantes enzimáticas, mostrando a geração de espécies reativas Mitocôndria, NADPHoxidase ou xantina oxidase e outros sistemas convertem (O_2) em ($O_2^{\bullet-}$), o qual é dismutado pela superóxido dismutase (SOD), H_2O_2 pode ser convertido em H_2O pela catalase (CAT) e/ou glutatona peroxidase (GPx), ou o H_2O_2 pode formar radical hidroxil ($\bullet OH$) após reação com Fe^{+2} . A (GPx) reduz todos os hidropéroxidos além do H_2O_2 utilizando glutatona reduzida (GSH), um doador de hidrogênio. Outra enzima, a glutatona redutase (GR), mantém o equilíbrio entre (GSH) (99%) e (glutaciona oxidada (GSSG 1%). O ($O_2^{\bullet-}$), se não retirado do meio, pode reagir rapidamente com óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) para formar peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$).

Fonte: Griending e FitzgeralD 2003.

Antioxidantes não enzimáticos

Os antioxidantes não enzimáticos, em sua maioria, necessitam ser adquiridos pela alimentação. As frutas e vegetais são as principais fontes destes antioxidantes. A maior parte dos estudos científicos se concentrou em três nutrientes chaves: a vitamina E, a vitamina C e os pigmentos carotenóides. Estes nutrientes parecem ter uma ação conjunta eficiente na eliminação das EROs (ILSI 2002).

A vitamina E pode ser considerada a mais significativa dos antioxidantes lipofílicos, pois participa ativamente da inibição da oxidação da LDL. É encontrada

nas membranas das lipoproteínas e em tecidos como fígado, rins, tecido adiposo e adrenal. A vitamina E bloqueia a peroxidação lipídica por atuar como *scavenger* de radicais livres, tais como os radicais peroxila, radical superóxido, hidroxila e oxigênio singlete. Para que ela possa atuar sobre os efeitos deletérios dos radicais livres, deve se manter no seu estado não oxidado, o qual a torna dependente de outros antioxidantes, como a vitamina C (Rique *et al.* 2002 e Martins *et al.* 2004).

A vitamina C é uma vitamina hidrofílica que pode funcionar como neutralizador de espécies reativas de oxigênio. Acredita-se que o ácido ascórbico possa proteger o organismo contra a ação dos radicais livres de duas formas: diretamente, eliminando os radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio antes que eles iniciem a peroxidação lipídica e indiretamente, regenerando a forma ativa da vitamina E e outros antioxidantes como os flavonóides e a glutathione, para que estes exerçam seu potencial antioxidante (Rique *et al.* 2002 e Jacob 1998).

Os carotenóides compreendem uma família de compostos naturais, dos quais mais de 600 variantes estruturais estão reportadas e caracterizadas. São pigmentos freqüentemente encontrados em alimentos de origem vegetal e os responsáveis pelas colorações amarela, alaranjada e vermelha. Os principais carotenóides presentes nos alimentos são o betacaroteno, licopeno, glutathione, quercetina e luteína. Alguns carotenóides como betacaroteno se convertem em vitamina A no organismo. A estrutura química dos carotenóides é baseada em uma cadeia de carbonos com a presença de ligações duplas, compartilhadas ou não. Estas ligações duplas características fazem desses compostos potenciais antioxidantes, uma vez que suas moléculas são capazes de receber elétrons de espécies reativas, neutralizando os

radicais. A ação seqüestradora de radicais é proporcional ao número de ligações duplas conjugadas, presentes nas moléculas dos carotenóides (Krinsky 1994).

Existe ainda uma série de outros antioxidantes não enzimáticos que participam da defesa contra as EROs nos sistemas biológicos como, por exemplo os oligoelementos (zinco, cobre, selênio etc) flavonóides e outros compostos fenólicos (derivados de plantas). Esta última classe de antioxidante será descrita separadamente no próximo item (Vannucchi *et al.* 1998 e Hanasaki *et al.* 1994).

2.4 Compostos fenólicos como antioxidantes

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo conhecida atualmente mais de 8.000 estruturas. São metabólitos secundários de plantas, que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Tais substâncias ocorrem naturalmente em frutas frescas, vegetais, nos chás e nos vinhos tintos e fazem parte integral da dieta humana (Manach *et al.* 2004).

Pesquisas sobre a absorção e biodisponibilidade de polifenóis ainda são escassas, principalmente devido às limitações de métodos analíticos devidamente validados. A maioria desses compostos está presente nos alimentos na forma de ésteres, glicosídeos ou de polímeros que não são possíveis de ser absorvidos na sua forma nativa. Sabe-se que a estrutura química dos polifenóis e a composição da microflora intestinal determinam a taxa e a extensão da absorção e a natureza dos metabólitos circulantes no plasma (Scalbert 2000). A medida direta da concentração destes compostos na circulação e urina e o aumento da capacidade antioxidante do

plasma após sua ingestão, pode fornecer evidências de sua absorção no trato gastrointestinal (Manach *et al.* 2004).

Após a ingestão, os fenólicos são conjugados no intestino delgado e mais tarde no fígado. Aparecem no plasma de 1 a 7h após sua ingestão, geralmente conjugados com ácido glucurônico ou como compostos sulfatados e metilados (Manach *et al.* 2004; Nardine *et al.* 2002; Scalbert *et al.* 2005).

Acredita-se que a biodisponibilidade e atividade biológica dos polifenóis está diretamente relacionada com sua estrutura química e, além disso, exista uma variabilidade individual sobre o metabolismo e biodistribuição desses compostos em humanos (Monteiro *et al.* 2007).

Os polifenóis têm sido objeto de estudo de muitas pesquisas por estarem associados à prevenção de doenças crônico-degenerativas, como aterosclerose e câncer. A bioatividade dos fenólicos pode estar relacionada com potencial antioxidante, que é associada à própria natureza química deste grupo de compostos: devido à sua estrutura, polifenóis são em geral bons agentes redutores e juntamente com outros agentes redutores encontrados na dieta tais como vitamina C, vitamina E e carotenóides, podem proteger tecidos e estruturas celulares contra danos oxidativos (Vinson e Dabbag 1998). Tais substâncias são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos através da captação de radicais livres, bloqueando reações em cadeia e algumas vezes agindo como quelantes de metais (Shahidi *et al.* 1992), atuando tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (Soares 2002).

Além do potencial antioxidante, os fenólicos possuem outras propriedades, dentre elas, atividade antiinflamatória, anti-agregação plaquetária, diurética, antiviral e anticarcinogênica, sendo também benéficos ao sistema cardiovascular por sua participação na vasodilatação (Rice-Evans 1996; Neiva *et al.* 1999).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grandes grupos: Os flavonóides e seus derivados e os ácidos fenólicos.

Os denominados de flavonóides são os que apresentam a estrutura química descrita como C6-C3-C6, sendo estes os compostos mais diversificados no reino vegetal. Podem ser representados pelas antocianinas, flavonas, flavonóis, catequinas, taninos e isoflavonas. A distribuição dos flavonóides nos vegetais depende de diversos fatores de acordo com a fila/ordem/família do vegetal, bem como da variação das espécies. Os flavonóides são formados da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético. Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente raios ultravioletas, pois a formação dos flavonóides é acelerada pela luz (Degáspari e Waszczynskyj 2004).

Os flavonóides atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres, em ambos os compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico. Esses compostos têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (Bianchi e Antunes 1999).

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o

organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças (Manah *et al.* 2004).

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C_6-C_3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal. O terceiro grupo é representado pelos ácidos fenólicos que, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também se ligar entre si ou com outros compostos. A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido caféico, o qual, associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico (Soares 2002).

Os ácidos clorogênicos são um conjunto de 5 grupos principais de compostos fenólicos e seus isômeros formados, principalmente, pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos derivados do ácido cinâmico: o ácido cafeico, o ferúlico, ou o *p*-cumárico. O ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) é o mais relatado dentro desta classe de substâncias, sendo absorvido no intestino antes e após a metabolização por bactérias (Olthof *et al.* 2001 e 2003).

Durante as últimas décadas, os efeitos protetores do ácido clorogênico (ACG) sobre os sistemas biológicos foram abordados em diferentes estudos *in vitro* e *in vivo*. Há diversos estudos que avaliaram produtos ricos em ACG na prevenção do câncer, doenças cardiovasculares entre outras (Soares 2002; Karakayas 2001; Mancine-Filho e Moreira 2003; Giada e Mancine-Filho 2004; Bravo 1998 e Waterman e Mole 1994). Alguns autores verificaram seu efeito antioxidante na diminuição da oxidação *in vitro* de LDL, sendo comparado ao poder encontrado para a Vitamina E, C e β -Caroteno

(Laranjinha *et al.* 1994; Vinson e Dabbagh 1998). Essa ação antioxidante é devida à presença de um grupamento orto-di-hidroxila no anel aromático do ácido cafêico, que atuaria como um aceptor de radicais livres, participando na fase de iniciação e de propagação do processo oxidativo (Monteiro e Trugo 2005). Em outro trabalho, foi relatado que o 5-CQA apresentou propriedades anti-inflamatórias devido a sua capacidade de inibição do processo inflamatório mediado por citocinas (Tatefuji *et al.* 1996). No estudo conduzido por Parker *et al.* (1998) e Herling *et al.* (1999) observou-se uma diminuição dos níveis sanguíneos de glicose, por meio da inibição da enzima glicose-6-fosfatase após uso de injeções de ACG.

Essa variedade de efeitos benéficos atribuídos ao ACG, preponderantemente ao 5-CQA, tem encorajado muitos pesquisadores a trabalhar com essa família de compostos fenólicos (Clifford e Ramirez-Martinez 1990; Nardine *et al.* 2002; Gugliucci e Menine 2002; Olthoff *et al.* 2003; Bastos *et al.* 2005).

2.5 Erva- Mate (*Ilex paraguariensis*)

A Erva-mate é uma árvore da família das aquifoliáceas, originária da região subtropical da América do Sul, presente no sul do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai. Entretanto, cerca de 80% da área de ocorrência pertence ao Brasil, distribuindo-se entre os Estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A região Sul é a maior produtora, onde é explorada por pequenos produtores que se reúnem em cooperativas para processá-la ou comercializá-la (Heck e Mejla 2007).

O consumo de bebidas a base de erva-mate remonta de centenas de anos. Os indígenas das nações Guaraní e Quíchua tinham o hábito de beber infusões com suas folhas. Atualmente os produtos da erva-mate são consumidos como chá quente ou gelado, como chimarrão (Brasil) ou tererê (Mato Grosso do Sul e Paraguai) (Esmelindro *et al* 2002 e Bastos e Torres 2003).

A *Ilex paraguariensis* é utilizada na medicina popular e por herboristas recomendada para artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de líquido, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas. Devido a estas propriedades, a erva-mate encontra-se incluída em importantes farmacopéias como a Martindale e a British Herbal Pharmacopoeia. (Anesini *et al.* 2006).

Os principais fitoquímicos presentes na erva-mate são os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas. Nesta última classe de compostos podemos citar a cafeína, a teobromina e a teofilina (Figura 1) (Alikaridis 1987), componentes de reconhecida ação sobre o sistema nervoso central, aos quais é atribuída a ação estimulante do mate. Dentre a classe de saponinas encontram-se as agliconas, os ácidos ursólico e oleanólico (Figura 2) (Gnoatto *et al* 2007). Tais substâncias são responsáveis pelo amargor e espuma do mate e pela atividade antiinflamatória além de outras inúmeras propriedades biológicas (Gnoatto *et al* 2007). Entre os compostos fenólicos destaca-se o elevado conteúdo de derivados cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico (ACGs) e seus isômeros (Figura 3), aos quais se atribui a ação adstringente e antioxidante do produto (Clifford 1990 e Cardozo-Junior *et al.* 2007). Além do ácido clorogênico, os flavonóides rutina, quercetina, diglicosídeo de

luteolina, taninos e a cafeoilglicose também estão presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (Ricco *et al.* 1991; Carini *et al.* 1998; Filip *et al.* 2001).

Figura 3: Estrutura molecular dos alcalóides presentes na erva mate **Fonte:** Bastos *et al.* 2007

Figura 4: Estrutura molecular das saponinas presentes na erva mate **Fonte:** Bastos *et al.* 2007

Figura 5: Estrutura molecular dos ácidos fenólicos presentes na erva mate **Fonte:** Bastos *et al.* 2007

2.5.1 Classificação dos principais produtos comerciais

2.5.1.1 Chimarrão e Tererê

O chimarrão e o tererê são as denominações dadas tradicionalmente à erva-mate seca, triturada e socada com grande porcentagem de paus, folhas, pó e goma.

Chimarrão é destinado à degustação em cuia, com água quente conservando o paladar amargo. O tererê consiste em infusão de erva-mate degustada com água gelada (Bastos e Torres *et al.* 2003 e Embrapa 2006).

O processamento da erva-mate para chimarrão e tererê consiste basicamente de três etapas: sapeco, secagem e cancheamento. O sapeco é realizado junto ao fogo direto e consiste na passagem rápida dos ramos com folhas sobre as chamas do sapecador. O equipamento consiste de um cilindro metálico, perfurado e inclinado através do qual a erva colhida passa recebendo as chamas. Esta etapa tem por função a retirada da umidade superficial e inativação de enzimas (peroxidase e polifenoloxidase) que causam a oxidação do produto. A temperatura média da erva na

entrada do sapecador é de 400°C e na saída é de 65°C. O tempo de residência oscila em torno de 8 minutos. O tempo de residência e a temperatura média da erva nos secadores dependem das características operacionais de cada sistema. No secador de esteira, o tempo médio é de 3 horas e a temperatura varia entre 90 e 110°C. No secador rotativo, o produto permanece em contato direto com a fumaça por aproximadamente 30 minutos. No entanto, a temperatura não apresenta a mesma uniformidade da utilizada no secador de esteira, sendo que na entrada do secador a temperatura média é de 350°C e na saída 110°C.

O cancheamento consiste na trituração da erva após o processo de secagem. Em seguida, a erva é peneirada e o material coletado passa a denominar-se erva cancheada. Esta pode ser usada diretamente como matéria-prima para a produção de chás ou, após passar por um processo de soque, como chimarrão (Esmelindro *et al.* 2002; Bastos e Torres 2003 e EMBRAPA 2006)

2.5.1.2 Chá mate tostado

A erva-mate padronizada para preparação do chá mate tostado é o produto beneficiado constituído somente de folhas ou de folhas e de galhos, triturados, tostados em equipamentos apropriados. A erva-mate passa por um sistema de forno com fogo indireto semelhante ao que se usa para torrefação de café, para então dar origem ao chá mate tostado. Depois de tostado o mate passa por um processo de extração, por água quente e vapor sob pressão, em colunas extratoras, onde são retirados os sólidos solúveis. O líquido extraído (extrato) é adoçado transformando-se em xarope. O extrato é desidratado em contato com ar quente transformando-se em mate solúvel (Bastos e Torres 2003 e EMBRAPA 2006).

O processo de torrefação leva á modificações importantes em produtos de origem vegetal devido à degradação térmica progressiva, como a perda de nutrientes, assim como a possível diminuição do teor de polifenólicos. Contudo, este efeito pode ser minimizado pela formação de produtos antioxidantes da reação de Maillard, tais como as melanoidinas, que possuem uma forte atividade antioxidante atuando como captadores de metais pesados e promovendo a decomposição de hidroperóxidos. Essas mudanças refletem-se na atividade antioxidante desses produtos (Bastos e Torres 2003; Manzocco *et al.* 2001).

A erva-mate padronizada para preparação do chá mate verde é o produto beneficiado, constituído somente de folhas, ou de folhas e de galhos, triturados, conservando a cor de origem (Bastos e Torres 2003 e EMBRAPA, 2006).

2.5.2 Propriedades funcionais da Erva-mate

O interesse no potencial uso da erva-mate para a promoção de saúde é relativamente recente. Em meados da década de 90 foram publicados os primeiros trabalhos que demonstraram a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de infusões de erva-mate verde e seca (chimarrão) (Glugliucci 1996; Glugliucci e Stahl 1995 e Campos *et al.* 1996).

Filip *et al.* 2000 e 2001 observou um maior potencial antioxidante da erva-mate quando comparada a diferentes espécies de *Ilex* consumidas na América do sul. No estudo realizado por Bastos e colaboradores (2007), os extratos de erva-mate verde e tostada apresentaram atividade antioxidante *in vitro* superior à do chá verde (*Camellia sinesis*). Em outra pesquisa verificou-se que a erva-mate apresentava atividade antioxidante equivalente ou superior à vitamina C, Vitamina E e ou Trolox,

substâncias consideradas como padrão para essa propriedade (Laranjinha *et al.* 1994; Vinson e Dabbagh 1998; Schinella *et al.* 2000; Gugliucci e Menini 2002 e Chandra e Mejia 2004). Na sequência, outros resultados publicados a partir de ensaios com infusões da erva-mate verde demonstraram alguns dos efeitos farmacológicos popularmente atribuídos a esta planta: efeito colerético e de propulsão intestinal (Gorzalczany *et al.* 2001); inibição da glicação, reação na qual açúcares reagem com proteínas e lipídes plasmáticos que se acumulam formando locais propícios à formação de radicais livres (Lunceford e Gugliucci *et al.* 2005); ação hipocolesterolêmica (Stein *et al.* 2005) efeito vasodilatador e vasorelaxante (Baisch *et al.* 1998; Felippi 2005 e Stein *et al.* 2005); atuação na progressão da aterosclerose (Mosimann *et al.* 2006) e outros trabalhos sobre a atividade antioxidante relacionados ou não com a inibição do processo de oxidação da LDL e alterações na estrutura e no sistema de reparo do DNA, o que poderia contribuir para prevenção da aterosclerose e câncer (Filip *et al.* 2000; Gugliucci e Menini 2002; Bracesco *et al.* 2003; Ramirez-Mares *et al.* 2004; Bastos *et al.* 2006; Menine *et al.* 2007 e Miranda *et al.* 2008).

A Tabela 1 descreve resumidamente alguns trabalhos sobre os efeitos biológicos da infusão de erva-mate *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, em que se confrontam os objetivos, a metodologia empregada e os resultados observados.

A grande maioria das pesquisas aqui relacionadas foi conduzida com a erva-mate beneficiada para chimarrão, isto é, a erva mate verde seca e cancheada. A torrefação promove mudanças na composição química da erva mate, como a degradação de cafeína e ácidos fenólicos e a formação de melanoidinas, pirazinas e pirinas, assim como altera a cinética de extração dos compostos bioativos (Bastos *et*

al. 2006), o que pode levar a modificações na biodisponibilidade e em atividades biológicas, como a atividade antioxidante.

Tabela 1: Estudos sobre os efeitos biológicos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

Amostra - Tipo de estudo	Objetivo	Metodologia	Resultado	Referência
Infusão de erva-mate verde, indivíduos saudáveis – <i>ex vivo</i>	Verificar efeito da ingestão de infusão de mate em LDL humana	Produção de TBARS; Dienos conjugados; fragmentação de Apo B por SDS-PAGE.	A infusão foi capaz de minimizar a oxidação induzida conforme avaliada por todos os métodos empregados	Gugliucci e Menini 2002
Infusão de erva-mate verde, indivíduos saudáveis – <i>ex vivo</i>	Avaliar a prevenção de oxidação de LDL humano e prevenção de desnaturação de DNA de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Indução da quebra da cadeia de DNA por peróxido de hidrogênio; Oxidação da LDL por ação da lipoxigenase e por peróxido.	A oxidação da LDL e a quebra do DNA foram inibidos pela infusão de mate em um mecanismo dose-dependente	Brasceno <i>et al.</i> 2003
Extrato de erva-mate verde, Ratos machos Wistar – <i>ex vivo</i>	Investigar as propriedades vasorelaxantes de diferentes extratos de erva mate em artéria mesentérica de ratos.	Perfil lipídico; Leito arterial mesentérico de ratos.	O extrato de erva-mate possui efeito hipocolesterolêmico e, ainda, atividade vasorelaxante dose-dependente em artéria mesentérica de ratos, sugerindo o envolvimento do óxido nítrico nesse efeito.	Stein <i>et al</i> 2005
Extrato de erva-mate verde, Coelhos machos New Zealand – <i>in vivo</i>	Verificar se a erva mate pode reduzir a progressão da aterosclerose em coelhos alimentados com colesterol.	Avaliação da lesão aterosclerótica na artéria aorta; Perfil lipídico; dosagem de TBARS; Enzimas antioxidantes.	O extrato de erva-mate possui a habilidade de reduzir a progressão de aterosclerose experimental <i>in vivo</i> .	Mosimann <i>et al</i> 2006
Erva-mate verde (chimarrão), voluntários saudáveis – <i>ex vivo</i>	Verificar se o consumo de chimarrão influencia atividade da enzima antioxidante, paroxonose (PON-1), presente na HDL	Atividade sérica da PON-1	O consumo de chimarrão aumentou atividade da enzima PON-1.	Menine <i>et al</i> 2007
Erva-mate verde, tostada e chá verde – <i>in vitro</i>	Avaliar a atividade antioxidante do chá mate e chá verde em extratos aquoso, alcóolico e etanólico.	Atividade antioxidante por captação do radical livre DPPH e inibição da oxidação por sistema β -caroteno/ácido linoléico.	Elevada atividade antioxidante de diferentes extratos de erva-mate (verde e tostada) e de chá verde	Bastos <i>et al</i> 2007
Erva-mate verde, Ratos Wistar – <i>ex vivo</i>	Avaliar a ação do extrato de erva mate verde sobre a secreção de enzimas antioxidantes presentes na cavidade oral (peroxidases)	Atividade de secreção de peroxidases em glândulas submandibulares através de métodos espectrofotômetros.	Aumento significativo da secreção de peroxidases e potencial ação quimiopreventiva da cavidade oral	Filip <i>et al</i> 2007
Erva-mate tostada, Ratos machos Swiss – <i>ex vivo</i>	Avaliar a atividade antioxidante do chá mate e sua influência no sistema de reparo do DNA.	Ensaio cometa	A ingestão regular de chá mate aumentou a resistência do DNA à oxidação induzida por peróxido de hidrogênio e melhorou a reparação do DNA em células do fígado, independentemente da dose ingerida.	Miranda <i>et al</i> 2008

3. JUSTIFICATIVA

Considerando que o consumo de bebidas a base de erva-mate verde (*Ilex paraguariensis*) pode ser benéfico à saúde visto sua comprovada atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, assim como outros efeitos fisiológicos já relatados pela literatura científica, o presente estudo pretende avaliar se a erva-mate torrada (chá mate) pode promover o mesmo efeito antioxidante observado para a erva-mate verde no plasma e na fração lipoprotéica (LDL) do sangue de indivíduos saudáveis.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante do chá mate sobre o plasma e LDL de humanos após a sua ingestão.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a ingestão de chá mate altera a susceptibilidade à oxidação do plasma e LDL de humanos;
- Avaliar se a ingestão de chá mate altera o grau de fragmentação protéica da LDL após indução oxidativa;
- Avaliar se a ingestão de chá mate é capaz de aumentar a capacidade antioxidante total e diminuir produção de lipoperóxidos no plasma de humanos;
- Avaliar se a ingestão de chá mate altera os níveis de expressão de genes relacionados à síntese das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase e a glutathiona peroxidase;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Casuística

Foram selecionadas 20 voluntárias saudáveis provenientes da Faculdade de Saúde Pública da USP. Com 15 delas as análises foram feitas no plasma e as 5 restantes na LDL. Todas assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes do início do protocolo (Anexo 2).

5.2 Critérios de inclusão

Mulheres com idades entre 18 e 35 anos, com índice de massa corpórea (IMC) entre 19 a 30 kg/m², perfil lipídico normal (III Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias 2001), clinicamente saudáveis e sem tratamento medicamentoso.

5.3 Critérios de exclusão

Mulheres fumantes, com IMC < 19 ou >30 kg/m² e que façam uso regular de medicamento ou suplemento com propriedades antioxidantes e/ou hipolipemiante.

5.4 Desenho do estudo

O estudo foi longitudinal, de intervenção com duração de 2 semanas (15 dias).

Os participantes desta pesquisa foram orientados a evitar café, chá, bebida alcoólica, refrigerante, chocolate e a manter a alimentação habitual durante todo o andamento do estudo (período *washout* e período intervenção com chá mate) (Figura 6). Foi permitida a ingestão de no máximo 2 copos de suco de fruta por dia (300ml) no decorrer do protocolo (Murso *et al.* 2005). Depois de terminado o período *washout*, os participantes ingeriram 300ml de chá-mate (5g/300ml) logo após ter sido realizada a primeira coleta de sangue (T=0) e o mesmo volume uma vez por dia,

durante uma semana (período de intervenção). A segunda coleta de sangue foi efetuada após 1 hora de consumo do chá-mate (T=1) para avaliar o efeito agudo da ingestão da bebida, conforme a metodologia empregada por Gugliucci (1996) e Gugliucci e Menini (2002). Finalizado o período de intervenção (7 dias), os voluntários foram submetidos a uma nova coleta de sangue (T=2) para avaliar o efeito do consumo prolongado, conforme metodologia empregada por Yukawa *et al.* (2004) e Murso *et al.* (2005)

Figura 6: Desenho do estudo

5.5 Preparo da infusão de chá mate (*Ilex paraguariensis*)

As amostras de erva-mate torrada liofilizada foram cedidas pela empresa Leão Jr. (Curitiba- PR), sendo utilizado um único lote em todo o experimento. A quantidade de chá mate estabelecida a ser ingerida pelos participantes seguiu a mesma concentração utilizada por Gugliucci (1996) e Gugliucci e Menini (2002), em que 5 gramas de chá mate em pó solúvel foram imersos em 300ml a 500ml de água.

Neste volume havia aproximadamente 375mg de teor de fenólicos totais por grama de chá mate solúvel, determinação de acordo com Genovese *et al.* (2003).

5.6 Obtenção de sangue, plasma e LDL

Depois de finalizado o período *washout*, de cada um dos participantes foi coletado 30mL de sangue após jejum de doze horas (T=0), 30mL de sangue após uma hora da ingestão de chá-mate (T=1), e a seguir, a mesma quantidade de amostra, depois de finalizado o período de intervenção com chá após doze horas de jejum (T=2).

A coleta foi realizada por profissional capacitado (técnico ou auxiliar de enfermagem) e em local reservado e equipado exclusivamente para este fim. Todo material necessário para coleta de sangue foi utilizado pela primeira vez para este fim e teve seu descarte efetuado dentro dos padrões de segurança laboratorial.

Para separação do plasma, o sangue foi coletado em tubos vacutainer contendo Heparina, o qual foi centrifugado a 4°C por 15 minutos a 1500 x g. O plasma obtido foi armazenado a -70°C até início das análises.

Para a análise referente à partícula LDL, o sangue foi coletado em tubos vacutainer contendo EDTA, o qual foi submetido à centrifugação nas mesmas condições descritas acima para separação do plasma e em seguida acrescida dos seguintes inibidores de proteases: Aprotinina (2µg/ml), Benzamidina (2mM), PMSF (1mM) e o antioxidante BHT (2mM). Essas amostras foram mantidas sob refrigeração (4°C) e imediatamente após a obtenção do plasma, a fração LDL foi isolada de acordo com método proposto por Havel *et al.* (1955). Resumidamente a densidade do plasma foi ajustada para 1.019g/ml através da adição de solução de

Brometo de potássio (KBr) e posteriormente submetido a ultracentrifugação sequencial por 18 horas a 40.000 rpm a 4°C. Após remoção da camada superior contendo a fração VLDL, a densidade do plasma foi ajustada para 1.063g/ml com a adição de KBr e novamente ultracentrifugada nas mesmas condições descritas acima. A camada superior onde estavam presentes as LDL foi coletada por aspiração e dialisada a 4°C por 12h contra tampão salino pH=7,4 (150mM de NaCl, 1,0mM de EDTA e 10,0mM de Trizma base). A LDL teve sua concentração protéica ajustada para 100µg de proteína/mL com tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,4 .

A LDL dos voluntários foi armazenada, por no máximo uma semana a 4°C ao abrigo da luz, até início dos ensaios de oxidação.

5.7 Medida das variáveis bioquímicas

O perfil lipídico dos voluntários (Colesterol total, triglicérides e HDL) foi realizado no Laboratório de Lípidos da Faculdade de Medicina da USP, sendo determinado por métodos enzimáticos colorimétricos da Roche Diagnostics Corp.(Indianápolis, IN), por meio de sistema automatizado (COBAS MIRA, Roche Diagnostics –Mannheim, Alemanha), sendo o cálculo do colesterol LDL (LDL) realizado pela fórmula de Friedwald, 1972.

A concentração de proteína total das LDL (100µg/ml) teve sua concentração determinada por meio da utilização de kit comercial da LABTEST, que se baseia no método de Biureto (Gornall *et al.* 1949).

5.8 Oxidação do plasma e da LDL

O plasma e a LDL isolados foram oxidados e utilizados para avaliar a capacidade de inibição da peroxidação lipídica através de ensaios *ex vivo*. A oxidação foi realizada nas amostras retiradas em jejum (T=0), após 1 hora (T=1) e após período de intervenção (T=2).

5.8.1 Oxidação do plasma

Foi empregado um sistema modelo em que o plasma foi diluído (1:10) pela adição de tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7,4. Em seguida, foi adicionado o agente oxidante sulfato de cobre (CuSO₄), na concentração final de 0,5mM preparado em água MiliQ. A incubação do sistema foi feita em banho-maria com agitação a 37°C por até 6h. No final desse período a reação foi interrompida pela adição dos antioxidantes BHT (40µM) e EDTA (5mM) e resfriamento em gelo, conforme descrito por Gugliucci e Menini (2002). A seguir foram quantificados os lipoperóxidos formados (item 5.9.2).

5.8.2 Oxidação da LDL

Para oxidação da LDL foram utilizados 3 métodos de oxidação distintos, conforme descrito por Gugliucci e Menini (2002) e recomendado por Halliweel (2000). Primeiramente a LDL foi oxidada nas mesmas condições descritas no item 5.8.1 utilizando 10µM de CuSO₄ para posteriormente serem determinados os produtos de peroxidação formados através da análise de TBARS (item 5.9.2). Além disso foi oxidada por:

a) 1mM do agente oxidante 3-morfolinosidininona (SIN-1) recentemente preparado em solução tampão fosfato de sódio 50mM, pH=7,4;

b) 200U/ml de Lipoxigenase da soja (EC 1.13.11.12) diluída em tampão borato 50mM, pH=9,0;

c) 5 μ M de sulfato de cobre (CuSO₄) preparado em tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7,4.

Nestes três últimos métodos empregados, a concentração protéica da LDL (100 μ g/ml) foi ajustada pela adição de cada um dos diferentes tampões utilizados para preparação dos respectivos agentes oxidantes. Em seguida foi monitorada a produção de dienos conjugados (item 5.9.1.2).

5.9 Monitoramento da peroxidação lipídica

5.9.1 Formação de Dienos conjugados

5.9.1.1 Plasma

A cinética da oxidação do plasma foi continuamente monitorada pela medida da formação de dienos conjugados, por meio da variação da absorbância a 234 nm em equipamento Shimadzu modelo UV-1650PC. Resumidamente 20 μ L de plasma foram ressuspensos em 3 mL de solução tampão fosfato (pH 7,4 0,02 M) até a concentração de 0,67%(1:150). Aliquotas de 2mL foram retiradas dessa solução e 100 μ L de CuSO₄ (1,25 mM) foram adicionados. A absorbância foi analisada em intervalos de 5min por até 3 horas a 37°C. A forma de apresentação dos resultados

foi através da *lag time* (tempo de latência para a partícula de LDL se oxidar, em minutos) (Proudfoot *et al.* 1997 e Mursu *et al.* 2005)

5.9.1.2 LDL

A formação de dienos conjugados na LDL foi determinada pela variação na absorbância, monitorada continuamente em 234nm, durante 3h, em intervalos de 5 minutos a 37°C. Os resultados foram expressos através de *lag time* (minutos) e cálculo da razão máxima de formação de dienos conjugados (abs/min), que é obtida pela divisão da absorbância máxima pelo tempo em que ela ocorreu. Quanto menor for este valor, mais lenta é a produção de dienos conjugados em LDL (Esterbauer e Zollner 1989 e Iborra *et al.* 2008)

5.9.2 Determinação das Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

(TBARS)

Os lipoperóxidos do plasma e LDL gerados pela indução oxidativa, conforme descrita nos itens 5.8.1 e 5.8.2, foram analisados através da quantificação do malonaldeído formado, utilizando-se para isso, a reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), e o composto formado detectado através de espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1650PC.

O plasma e a LDL oxidadas foram adicionadas de 1ml de solução de ácido tiobarbitúrico (0,046M), ácido tricloroacético (0,92M) e ácido clorídrico (0,25M) e o sistema foi aquecido a 100°C por 30 minutos. Em seguida foi centrifugado a 4°C por 15 minutos a 8000 x g e a leitura do sobrenadante foi feita a 535 nm. A quantificação foi feita utilizando-se uma curva de calibração com 1,1,3,3 tetraetoxipropano- TEP

(Antolovich *et al.* 2002; Cirico e Omaye 2006 e Mursu *et al.* 2005). Os valores foram expressos em μmol de TBARs/ml de plasma e μmol de TBARs/mg de proteína da LDL. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

5.10 Medida do perfil de antioxidantes totais no plasma

A determinação do perfil de antioxidantes totais no plasma (“TAS” Randox Laboratories LTD, UK) foi realizada no Laboratório de Lípidos da Faculdade de Medicina da USP, por meio de sistema automatizado (COBAS MIRA, Roche Diagnostics –Mannheim, Alemanha) sendo obtida por meio da incubação de ABTS[®] (“2,2-Azino-Diethyl benzothiazoline sulfonic acid”) com a peroxidase (metmioglobine) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), resultando na produção do radical cátion ABTS^{®+}, o qual é detectado com comprimento de onda de 600nm. As substâncias antioxidantes, presentes na amostra, impedem a reação gerando uma redução na intensidade de cor. Assim, a redução da intensidade de cor é proporcional à concentração de antioxidantes totais no plasma. Todas as reações foram feitas em duplicata.

5.11 Avaliação da lipoperoxidação do plasma (TBARS)

A concentração de TBARS foi realizada como indicativa de peroxidação lipídica *in vivo* no plasma dos participantes. 1ml de solução de TBA (TBA 0,046M; TCA 0,092M; HCL 0,25M) foi adicionada em 500 μl de plasma (diluição 1:10 em PBS 0.02M pH=7.4). Em seguida as amostras foram colocadas em banho-maria em ebulição por 30min. Após este procedimento as amostras foram submetidas à centrifugação (15min/8000g a 4°C) e, a seguir, o sobrenadante foi lido em

espectrofotômetro com comprimento de onda de 535nm. A quantificação foi feita utilizando-se uma curva de calibração com 1,1,3,3 tetraetoxipropano- TEP (Antolovich *et al.* 2002; Cirico e Omaye 2006 e Mursu *et al.* 2005) e expressa como μmol de TBARS/ml de plasma. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

5.12 Extração de RNA e síntese de cDNA

A análise de expressão dos genes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx) foram feitas por meio do ensaio de PCR *real time* (Livak *et al.* 2001). Para isso o sangue dos voluntários foi colhido em tubos contendo heparina e aproximadamente 2ml foram destinados à extração de RNA. Para a estabilização e proteção do RNA, todas as amostras destinadas a este fim foram armazenadas em *RNAholder* (BioAgency) -20°C até o momento da extração do RNA. Essa foi feita usando-se o *QIAamp RNA Blood Mini Kit* (QIAGEN) seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração, aproximadamente 100 μg de RNA foram usados para a síntese do cDNA usando o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

5.13 Quantificação da Expressão por PCR em Tempo real

Cerca de 500 μL de sangue foram retiradas das voluntárias e adicionadas à 1,3ml de *RNAlater Solution* (Ambion) e armazenadas a -70°C . O RNA total foi isolado usando o *RiboPureTM-Blood Kit* (Ambion) seguindo as instruções do fabricante. Para a síntese do cDNA usou-se o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A quantificação da expressão dos genes Glutathione Peroxidase (GPx), Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (Cat) e do gene constitutivo β -actina (utilizado para “normalizar” as amostras por estar presente em todas as células e ser expresso continuamente da mesma forma) foi feita por meio de PCR em tempo real. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), e o C_t (*threshold cycle* - momento da reação em que a fluorescência da amostra começa a ser detectada) determinado com o auxílio do *RQ Study* Software (Applied Biosystems). O C_t de uma reação é determinado, principalmente, pela quantidade de cDNA molde presente no começo da reação de amplificação.

Para um volume final de 50 μ l a reação foi preparada como descrito a seguir: 25 μ l de *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), 10 μ M de cada *primer* e 10 μ l de cDNA total (100 ng). Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), utilizando como molde a sequência de nucleotídeos:

CAT

R	5'TCT	GGT	GAT	ATC	GTG	GGT	GA	3'
F	5'CCT	CGT	TCA	GGA	TGT	GGT	TT	3'

SOD

R	5'GCT	TGA	TAG	CCT	CCA	GCA	AC	3'
F	5'TCA	ATG	GTG	GGG	GAC	ATA	TT	3'

GPx

R	5'CAT	TCC	GCA	GGA	AGG	TAA	AG	3'
F	5'GGT	TCG	AGC	CCA	ATT	TAA	CA	3'

Para amplificação foi usado o ciclo descrito a seguir: 2 min a 50°C de pré-tratamento de UDG (Uracil-DNA Glicosilase) e desnaturação de 2 min a 95°C,

seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, e uma extensão a 72°C por 30s, seguida de uma análise de curva de *melting* (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 s iniciando-se em 95°C). Através desta análise foi possível averiguar a especificidade da reação de amplificação, uma vez que o fluoróforo usado emite luz sempre que um dímero de DNA é formado (Livak *et al.* 2001).

Todas as reações foram feitas em triplicata e a média do C_t usada para avaliação da expressão gênica. Os genes *GPx*, *SOD* e *Cat* foram analisados e sua expressão normalizada de acordo com a expressão do gene constitutivo β -actina, e a expressão relativa calculada de acordo com a formula $2^{-(E_n - R_n)}$, sendo que E_n corresponde ao valor do C_t do gene estudado (*GPx*, *SOD* e *Cat*) e R_n o valor do C_t do gene constitutivo. A expressão relativa foi expressa em Unidades Arbitrárias (U.A).

5.14 Eletroforese da porção protéica da LDL

Para realização da eletroforese SDS-PAGE, a LDL (100µg de proteína/mL) foi diluída em tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7,4. Em seguida, foi adicionado agente oxidante sulfato de cobre, na concentração de 10µM preparado na mesma solução tampão (Gugliucci *et al.* 2002).

A incubação do sistema foi feita em banho-maria (37°C) por até 16h. Após esse período uma alíquota foi retirada e as reações interrompidas pela adição dos antioxidantes BHT (40µM) e EDTA (5mM) e resfriamento em gelo. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C por no máximo uma semana até o momento da análise de eletroforese.

A eletroforese foi conduzida de acordo com Laemmli (1970). O gel concentrador contendo 7,5% de acrilamida em tampão TRIS-HCl pH 6,8 foi

preparado sobre o gel de análise com 10% de acrilamida em tampão TRIS-HCl pH 8,8. Os dois equipamentos utilizados para eletroforese foram do tipo vertical, da Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia) o modelo Hoefer miniVE conferiu ao gel dimensões de 8 cm x 9 cm x 1,0 mm. O equipamento Hoefer SE250 conferiu aos géis as dimensões de 8cm x 7 cm x 0,75 mm. Trinta microgramas (30 µg) de proteína (LDL oxidada) foram aplicadas em cada poço. A amperagem foi fixada em 20 mA para cada gel de 1,0 mm e 15 mA para géis de 0,75 mm; voltagem auto-ajustável, até o máximo de 300V. Após a corrida, os géis foram corados com Solução de Azul de Comassie R Brilhante 0,025% em 40% de metanol e 7% de ácido acético, e descorada no mesmo solvente. Os padrões de peso molecular utilizados foram: miosina (203 kDa), beta-galactosidase (120 kDa), albumina bovina sérica (95 kDa) e ovalbumina (49 kDa).

Para analisar as placas de eletroforese foi verificado o número de bandas de proteína formadas nas LDL de cada voluntário resultante da oxidação com sulfato de cobre. Para isso foi adotado como critério de avaliação a comparação entre as bandas de proteína não oxidadas (controle) e as bandas das proteínas das estruturas que foram oxidadas obtidas nos três momentos de tratamento (T=0, T=1 e T=2). Quanto maior a semelhança, em termos de densidade óptica, entre a banda oxidada e a banda controle menor terá sido o dano à estrutura da proteína.

5.15 Avaliação do consumo alimentar

Cada voluntário foi orientado a preencher, antes da coleta de sangue (período basal) e durante o período de intervenção, um inquérito de consumo alimentar constituído por registro de 3 dias, o qual relata os hábitos alimentares mais comuns,

sendo 2 dias de semana e 1 de final de semana. Esse instrumento de avaliação do hábito alimentar foi empregado com objetivo de verificar se os voluntários seguiram as orientações estabelecidas para participação do estudo (ANEXO 1).

O consumo alimentar foi avaliado utilizando o programa *Nut Win (versão 2.0)* da Escola Paulista de Medicina - UNIFESP.

5.16 Análise dos resultados

Os resultados das diferentes análises foram apresentados como média e desvio padrão. Teste t de *Student* pareado foi utilizado para verificar se houve diferença estatisticamente significativa, ao nível de 5%, entre os resultados das diversas análises antes (T=0) e após o consumo do chá (T=1 e T=2). Esta análise foi feita utilizando o programa SPSS versão 10.0 for Windows.

5.17 Questões éticas

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (processo nº 169/2006) e os responsáveis e participantes assinaram o *termo de consentimento livre e esclarecido*, antes do seu início, que os deixou cientes do conteúdo, possíveis riscos e finalidade do projeto (ANEXO 2).

6. RESULTADOS

6.1 Características da população estudada

As variáveis, perfil antropométrico (idade, índice de massa corporal) e perfil lipídico encontram-se dentro dos critérios de inclusão estipulados pelo estudo, sendo ambos apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Características da população estudada

	Valores*
Nº de indivíduos	20
Idade (anos)	25,25 ± 3,43
IMC (kg/m ²)	23,18 ± 2,40
Colesterol total (mg/dl)	172 ± 28,8
LDL (mg/dl)	91,3 ± 20,1
HDL (mg/dl)	53,3 ± 10,7
TG (mg/dl)	93,8 ± 23,1

Média ±DP

6.2 Quantificação dos produtos de peroxidação lipídica no plasma

6.2.1 Formação de Dienos conjugados

A suscetibilidade do plasma à oxidação foi determinada pelo tempo de resistência do plasma à oxidação (“Lag Time”). Os resultados revelaram que a capacidade média de retardar a oxidação do plasma depois de uma hora (T=1) e após uma semana de consumo diário de chá (T=2) da ordem de 21,15 e 23,90 minutos, respectivamente, foi significativamente maior que no período basal (T=0) de 12,46 minutos (Tabela 3).

Tabela 3: *Lag Time* de oxidação do plasma (Dienos conjugados) antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate

Período de Tratamento (T)	Lag Time de oxidação do plasma (min)*	Sig. Entre os grupos (p) **
0	12,46 ± 7,58	0,008 ¹ 0,048 ²
1	21,15 ± 11,46	
2	23,90 ± 20,3	

*Valores expressos como média ± DP (N=15).

** Valor da probabilidade obtido por *Teste t* pareado.

¹p = Comparação do período basal (T=0) com o período agudo (T=1).

²p = Comparação do período basal (T=0) com o período intervenção (T=2).

6.2.2 Determinação das Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A concentração de malonaldeído produzida após indução oxidativa reduziu significativamente entre os períodos agudo (T=1; 4,69 µmol/l) e período intervenção (T=2; 4,44 µmol/l) de consumo de chá mate quando comparado com o período basal (T=0; 5,30 µmol/l) (Tabela 4).

Tabela 4: Concentração de malonaldeído formado no plasma (TBARS) após indução oxidativa antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate

Período de Tratamento (T)	TBARS (µmol/l)*	Sig. Entre os grupos (p) **
0	5,30 ± 1,38	0,004 ¹ 0,001 ²
1	4,69 ± 0,98	
2	4,44 ± 0,81	

*Valores expressos como média ± DP (N=15).

** Valor da probabilidade obtido por *Teste t* pareado.

¹p = Comparação do período basal (T=0) com o período agudo (T=1).

²p = Comparação do período basal (T=0) com o período intervenção (T=2).

6.3 Medida do perfil de antioxidantes totais no plasma

O perfil de antioxidantes totais no plasma (TAS) foi estatisticamente maior após 1 semana de consumo diário de chá mate (T=2; 0,97mmol/l) comparando-se com o período basal (T=0; 0,92 mmol/l). No entanto, não foi observada diferença ao se comparar com o período agudo (T=1; 0,91 mmol/l) (Tabela 5).

Tabela 5: Perfil de antioxidantes totais no plasma (TAS), antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate.

Período de Tratamento (T)	TAS (mmol/l) *	Sig. Entre os grupos (p) **
0	0,92 ± 0,10	0,579 ¹ 0,001 ²
1	0,91 ± 0,11	
2	0,97 ± 0,09	

*Valores expressos como média ± DP (N=15).

** Valor da probabilidade obtido por *Teste t* pareado.

¹p = Comparação do período basal (T=0) com o período agudo (T=1).

²p = Comparação do período basal (T=0) com o período intervenção (T=2).

6.4 Avaliação da lipoperoxidação do plasma (TBARS)

A concentração de malonaldeído presente no plasma dos voluntários, determinada pelo método de TBARS, diferiu significativamente revelando que a formação média de produtos de oxidação não é estatisticamente a mesma nos três momentos de tratamento. A produção média de lipoperóxidos basais após uma hora e depois de uma semana de consumo diário de chá da ordem de 3,60 e 2,73µmol/l, respectivamente foi significativamente menor que o período basal de 4,32µmol/l (Tabela 6).

Tabela 6: Concentração de malonaldeído formado no plasma (TBARS) antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate

Período de Tratamento (T)	TBARS ($\mu\text{mol/l}$)*	Sig. Entre os grupos (p) **
0	4,32 $\pm$ 1,15	0,000 ¹
1	3,60 $\pm$ 1,15	
2	2,73 $\pm$ 0,65	0,000 ²

*Valores expressos como média $\pm$ DP (N=15).

*Valores expressos como média $\pm$ DP (N=15).

** Valor da probabilidade obtido por *Teste t* pareado.

¹p = Comparação do período basal (T=0) com o período agudo (T=1).

²p = Comparação do período basal (T=0) com o período intervenção (T=2).

6.5 Quantificação da expressão por PCR em tempo real

Comparando com a situação basal (T=0), notamos que a ingestão diária de chá mate por uma semana (T=2) aumentou significativamente a expressão dos genes responsáveis pela produção das enzimas antioxidantes Glutathione peroxidase (GPx), Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (Tabela 7).

Tabela 7: Avaliação da Expressão relativa das enzimas antioxidantes Glutathione peroxidase (GPx), Superóxido dismutase (SOD) e Catalase antes (T=0) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate

Enzimas	T=0* (UA)	T=2* (UA)	Sig. Entre os grupos (p) **
GPx	1,45	30,35	0,000
SOD	0,2	4,69	0,000
CATALASE	0,11	1,91	0,001

*Valores expressos como média $\pm$ DP (N=15).

** Valor da probabilidade obtido por *Teste t* pareado.

UA Unidades arbitrárias

6.6 Quantificação dos produtos de oxidação da fração LDL

6.6.1 Formação de Dienos conjugados após indução oxidativa com Sulfato de Cobre

Assim como para o plasma, a suscetibilidade das LDL à oxidação foi determinada pelo tempo de resistência à oxidação (“Lag Time”) após as mesmas terem sido submetidas a peroxidação induzida com sulfato de cobre. Além disso foi avaliada a razão máxima de formação de dienos conjugados, a qual indica a quantidade de formação de dienos durante o processo oxidação. Quanto menor for este valor menor será a formação de produtos de oxidação (dienes conjugados). Observou-se que após os períodos de consumo de chá mate, T=1 (36,24 min) e T=2 (39,34 min), as LDL apresentaram maior capacidade de retardar a oxidação quando comparadas com o período basal (T=0; 32,50min). (Tabela 8). Nota-se também, que houve uma produção significativamente menor de dienos conjugados apenas após o consumo prolongado (T=2) de chá mate (Tabela 9).

Tabela 8: *Lag Time* de oxidação da LDL (Dienes conjugados) antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate

Período de Tratamento (T)	Lag Time de oxidação da LDL (min)*	Sig. Entre os grupos (p) **
0	32,50 ± 11,60	0,006 ¹
1	36,24 ± 11,76	
2	39,34 ± 14,17	0,010 ²

*Valores expressos como média ± DP (N=5).

** Valor da probabilidade obtido por *Teste t* pareado.

¹p = Comparação do período basal (T=0) com o período agudo (T=1).

²p = Comparação do período basal (T=0) com o período intervenção (T=2).

Tabela 9: Razão máxima de Formação de Dienos conjugados em LDL após indução oxidativa com Sulfato de Cobre antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate

Período de Tratamento (T)	Razão máxima de formação de Dienos ($\Delta \text{ abs}/\Delta \text{ time}$) *	Sig. Entre os grupos (p) **
0	0,0031 $\pm$ 0,00072	0,452 ¹
1	0,0028 $\pm$ 0,00039	
2	0,0020 $\pm$ 0,00011	0,029 ²

*Valores expressos como média $\pm$ DP (N=5).

** Valor da probabilidade obtido por *Teste t* pareado.

¹p = Comparação do período basal (T=0) com o período agudo (T=1).

²p = Comparação do período basal (T=0) com o período intervenção (T=2).

6.6.2 Razão máxima de Formação de Dienos conjugados em LDL após indução oxidativa com 3-morfolinossidininonimina (SIN-1) e Lipoxigenase

Outros mecanismos de peroxidação, que podem ser considerados mais próximos daqueles que acontecem nos organismos, foram testados. Para tanto, o 3-morfolinossidininonimina (SIN-1) e a lipoxigenase da soja (EC 1.13.11.12) foram utilizados como indutores da oxidação. A produção de dienos conjugados foi analisada por meio da razão máxima de formação de dienos e não houve diferença significativa na produção de lipoperóxidos devido à ingestão do chá-mate com ambos os oxidantes utilizados (Tabela 10 e Tabela 11).

Tabela 10: Razão máxima de Formação de dienos conjugados em LDL após indução oxidativa com lipoxigenase antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate

Período de Tratamento (T)	Razão máxima de formação de Dienos ($\Delta \text{ abs}/\Delta \text{ time}$) *	Sig. Entre os grupos (p) **
0	0,0014 $\pm$ 0,00023	0,977 ¹
1	0,0014 $\pm$ 0,00016	
2	0,0010 $\pm$ 0,00039	0,144 ²

*Valores expressos como média $\pm$ DP (N=5).

** Valor da probabilidade obtido por *Teste t* pareado.

¹p = Comparação do período basal (T=0) com o período agudo (T=1).

²p = Comparação do período basal (T=0) com o período intervenção (T=2).

Tabela 11: Razão máxima de Formação de Dienos conjugados em LDL após indução oxidativa com 3-morfolinossidinonimina (SIN-1), antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate

Período de Tratamento (T)	Razão máxima de formação de Dienos ($\Delta \text{ abs}/\Delta \text{ time}$) *	Sig. Entre os grupos (p) **
0	0,0082 $\pm$ 0,0038	0,203 ¹
1	0,0067 $\pm$ 0,0024	
2	0,0077 $\pm$ 0,0009	0,688 ²

*Valores expressos como média $\pm$ DP (N=5).

** Valor da probabilidade obtido por *Teste t* pareado.

¹p = Comparação do período basal (T=0) com o período agudo (T=1).

²p = Comparação do período basal (T=0) com o período intervenção (T=2).

6.6.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A concentração de malonaldeído formado nas LDL após a indução oxidativa com sulfato de cobre foi significativamente menor somente após uma hora de consumo de chá mate (T=1; 4,12 μ mol/g de LDL) quando comparado com o período

basal (T=0; 4,90 μ mol/g de LDL). No entanto, podemos observar uma diminuição na quantidade de lipoperóxidos formados na LDL após o consumo diário de chá (T=2; 3,85 μ mol/g de LDL), que provavelmente não foi significativa devido a um indivíduo (Tabela 12 e Figura 7).

Tabela 12: Concentração de malonaldeído formado na LDL (TBARS) após indução oxidativa antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate

Período de Tratamento (T)	TBARS (μ mol/g de proteína LDL)*	Sig. Entre os grupos (p) **
0	4,90 $\pm$ 0,32	0,018 ¹
1	4,12 $\pm$ 0,35	
2	3,85 $\pm$ 0,78	0,058 ²

*Valores expressos como média $\pm$ DP (N=5).

** Valor da probabilidade obtido por *Teste t* pareado.

¹p = Comparação do período basal (T=0) com o período agudo (T=1).

²p = Comparação do período basal (T=0) com o período intervenção (T=2).

Figura 7: Concentração de malonaldeído formado na LDL (TBARS) de cada participante antes (T=0), após 1 hora (t=1) e depois de 1 semana (t=2) de consumo do chá-mate

6.7 Avaliação da fragmentação da Apolipoproteína B

A partir da comparação entre as bandas de proteína das LDL (Apo B) oxidada e não oxidada (controle) de cada um dos voluntários obtida nos 3 momentos de tratamento do estudo (T=0, T=1 e T=2) foi possível avaliar o grau de fragmentação da apolipoproteína B. Os resultados deste ensaio demonstraram que parece haver uma diferença no grau de fragmentação da Apo B após o período intervenção do estudo (T=2), ou seja, as bandas que representam o período de consumo diário de chá mate assemelham-se com as bandas controle, sugerindo uma possível proteção dos

	T=0		T=1		T=2	
	oxidada	controle	oxidada	controle	oxidada	controle
Voluntário 16
Voluntário 17
Voluntário 18
Voluntário 19
Voluntário 20

Figura 9: Placa de eletroforese com as bandas de LDL oxidada com sulfato de cobre de cada participante obtidas antes (T=0), após 1 hora (T=1) e depois de 1 semana (T=2) de consumo do chá-mate

1 = 1 Banda
2 = 2 Bandas

6.8 Avaliação do consumo alimentar

A Tabela 14 apresenta a composição nutricional estimada da dieta dos indivíduos durante o período *washout* e período intervenção do estudo. Pode-se observar que a composição de nutrientes consumida não se alterou entre os períodos de pesquisa, mesmo depois de realizado o ajuste do consumo dos nutrientes pela energia ingerida (Tabela 15).

Tabela 14: Composição nutricional estimada do consumo alimentar dos indivíduos antes e durante o período de intervenção

Nutrientes ¹	Período <i>washout</i>	Período intervenção	Sig. (p) ²
Energia (Kcal)	1688,62 ± 372,88	1480,23 ± 427,09	0,038
Carboidrato (%)	57,14 ± 5,76	54,74 ± 8,09	0,245
Proteína (%)	16,54 ± 2,41	16,68 ± 3,87	0,860
Lipídeos (%)	26,37 ± 5,38	28,56 ± 5,81	0,150
Ácidos graxos saturados (g)	19,77 ± 13,27	17,14 ± 9,55	0,395
Ácidos graxos monoinsaturado (g)	12,25 ± 4,99	11,74 ± 5,69	0,679
Ácidos graxos polinsaturados (g)	7,20 ± 3,73	5,87 ± 2,100	0,125
Vitamina A (UI)	4848,49 ± 4248,40	4430,64 ± 2,582,28	0,577
Vitamina E (ATE)	7,29 ± 6,19	9,14 ± 11,10	0,47
Vitamina C (mg)	135,23 ± 124,99	91,96 ± 51,22	0,152

¹ Valores expressos como média ± DP (N=20)

² Test *t* para amostras pareadas

Tabela 15: Composição nutricional do consumo alimentar dos indivíduos estimada ajustado pela energia, antes e durante o período de intervenção

Nutrientes¹	Período <i>Washout</i>	Período intervenção	Sig. (p)²
Energia (Kcal)	1688,62 ± 372,88	1480,23 ± 427,09	0,038
Carboidrato (%)	60,77 ± 14,95	60,03 ± 17,90	0,860
Proteína (%)	17,62 ± 4,93	17,48 ± 6,90	0,902
Lipídeos (%)	12,74 ± 3,78	13,93 ± 5,02	0,259
Ácidos graxos saturados (g)	19,44 ± 12,55	17,20 ± 8,05	0,413
Ácidos graxos monoinsaturado (g)	12,25 ± 4,12	11,75 ± 5,16	0,651
Ácidos graxos polinsaturados (g)	8,32 ± 3,08	5,93 ± 2,84	0,360
Vitamina A (UI)	4848,49 ± 4248,40	4430,64 ± 2,582,28	0,577
Vitamina E (ATE)	7,29 ± 6,19	9,14 ± 11,10	0,470
Vitamina C (mg)	135,23 ± 124,99	91,96 ± 51,22	0,152

¹ Valores expressos como média ± DP (N=20)

² Test *t* para amostras pareadas

7. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, diversos estudos têm demonstrado a participação dos radicais livres na etiologia de diversas doenças, das quais destacam-se as cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Neste sentido, surgiu o interesse por parte da comunidade científica em investigar a ação de substâncias presentes naturalmente nos alimentos, as quais poderiam atuar como protetores frente ao estresse oxidativo, prevenindo a formação ou sequestrando os radicais livres e interrompendo a cadeia de reações de propagação.

Recentemente muita atenção tem sido voltada aos derivados polifenólicos, produzidos no metabolismo secundário de plantas, os quais têm se mostrado promissores na quimioprevenção das doenças crônicas não transmissíveis, possivelmente devido a suas propriedades antioxidantes (Bravo 1998). Dentro desse grupo de compostos destacam-se os ácidos hidroxicinâmicos, que estão presentes nos alimentos principalmente esterificados com o ácido quínico, denominando-se ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico). O café é a maior fonte de ácido clorogênico na dieta humana, sendo que outras fontes dietéticas incluem frutas, legumes, grãos (Clifford *et al.* 1990; Clifford 1999) e a erva-mate (Carini *et al.* 1998; Bastos *et al.* 2007), a qual possui particular importância para a população brasileira.

Em grande parte da América do Sul, aproximadamente um terço da população ingere erva mate na forma de chimarrão, tereré ou na de chá. O consumo se dá por simples hábito cultural ou na medicina popular como no tratamento de artrite, dificuldades na digestão, dores de cabeça, reumatismo, obesidade e doenças hepáticas (Filip *et al.* 2000).

Estudos utilizando diversos modelos de oxidação *in vitro* e *ex vivo* já constatarem que os compostos polifenólicos presentes na erva-mate têm propriedades antioxidantes (Gugliucci e Stahl 1995; Gugliucci 1996; Gugliucci e Menine 2002). A maioria destas pesquisas foi realizada com a erva-mate verde e cancheada (*Ilex paraguariensi*) não havendo trabalhos *in vivo* que evidenciem se o processo de torrefação desta planta influencia na atividade antioxidante desta matéria prima.

A fim de verificar o potencial antioxidante do chá mate, diversas metodologias *in vivo* e *ex vivo* foram realizadas no plasma e na LDL de humanos antes e após o consumo de chá. Dentre os métodos empregados estão o ensaio das Substâncias Reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS), que nos permite fazer a avaliação da degradação oxidativa de ácidos graxos plasmáticos através da quantificação de um produto de oxidação chamado Malonaldeído; a conjugação de dienos, outro produto resultante da oxidação lipídica de primeira geração e com pico de absorção a 230-235nm, que é comumente usada como ponto final para determinação da atividade antioxidante de uma amostra; e o ensaio de descoloração do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) - ABTS[®], sendo possível fazer a avaliação da capacidade antioxidante, através da descoloração do ABTS⁺ na presença de antioxidantes redutores, e assim dar uma idéia da ação acumulativa dos antioxidantes do chá mate presentes no plasma após seu consumo (Giada e Mancini-Filho 2004).

Os resultados dos ensaios de dienos conjugados realizados no plasma, após indução oxidativa com sulfato de cobre, são apresentados na Tabela 3. Nota-se que o chá mate consumido após 1 hora (T=1) e diariamente durante 1 semana (T=2) favoreceu aumento significativo da resistência do plasma à oxidação. O mesmo efeito

foi observado quando utilizamos a LDL como substrato, não havendo alteração sobre a produção de dienos somente quando comparado ao consumo agudo (Tabela 8 e Tabela 9). Esses resultados sugerem que o chá mate apresenta atividade antioxidante *ex vivo* por retardar a oxidação do plasma e LDL e diminuir a lipoperoxidação, o que representa uma possível proteção contra o desenvolvimento de aterosclerose. Resultado semelhante foi observado por estudos conduzido por Gugliucci e Stahl (1995) e Gugliucci (1996), em que o consumo após uma hora de infusão de erva-mate verde mostrou importante atividade antioxidante sobre a oxidação da LDL *in vitro* e *ex vivo*, respectivamente. É possível verificar que o mesmo comportamento ocorre no caso do café, onde a ingestão diária de uma grande quantidade de café *arabica* (8g/150ml) durante uma semana por indivíduos saudáveis contribuiu para redução da suscetibilidade da LDL à oxidação (Basal=101,0 ± 8,4min vs Intervenção com café = 130,0 ± 12,9 min p<0,001) (Yukawa *et al.* 2004). Segundo os autores, esses resultados são atribuídos aos compostos fenólicos presentes em tal bebida, como o ácido clorogênico e caféico.

A proteção contra a lipoperoxidação induzida, conferida por compostos fenólicos dietéticos, também foi demonstrada por um estudo feito com chocolate, resultando em menores valores de F2-isoprostano no plasma dos participantes, 2 e 4 h após seu consumo (Wiswedel *et al.* 2004).

O mecanismo antioxidante proposto relaciona-se possivelmente com a presença de substâncias (ácidos fenólicos) capazes de quelar metais e seqüestrarem radicais livres formados tanto na etapa de iniciação como na de propagação do processo oxidativo (Gugliucci e Stahl 1995; Gugliucci 1996; Gugliucci e Menine 2002).

Segundo Cintra (1999) os compostos fenólicos podem reagir com as EROs, como o radical superóxido e hidroxila, atuando como agentes redutores, doadores de hidrogênio e seqüestradores de radicais livres. Pesquisas atuais sugerem que esses metabólitos são absorvidos no trato gastrointestinal e estão biodisponíveis no plasma dentro de 0,5 a 4 horas depois de sua ingestão, cujo pico de absorção ocorre após 1h de consumo (Monteiro *et al.* 2007; Nardine *et al.* 2002) . Tal fenômeno pode explicar os efeitos benéficos resultantes do consumo agudo e prolongado de chá mate, visto que, do mesmo modo que no café, a erva mate também apresenta altos teores de ácido clorogênico e cafeíco (Clifford *et al.* 1990; Bastos *et al.* 2006).

É importante salientar que, mesmo sendo considerado um antioxidante hidrofílico, uma outra hipótese para que os ácidos fenólicos presentes no chá mate tornem a LDL mais resistente à oxidação seja, possivelmente através da regeneração da vitamina E (radical α -tocoferila a α -tocoferol) e de outros antioxidantes associados a esta lipoproteína, participando de forma similar à vitamina C do mecanismo protetor contra lipoperoxidação (Nardini *et al.* 1997; Silva *et al.* 1998).

Epicatequinas e catequinas podem prevenir a depleção de α -tocoferol (vitamina E), atuando como um antioxidante de reatividade intermediária entre ascorbato e α -tocoferol (Lolito e Fraga 1998). De acordo com Arteel e Sies (1999) e Zhu (2002), é necessária uma concentração de 0,22 μ M a 40 μ M de catequina, considerada elevada, para que ela tenha efeito antioxidante. É provável que alguns estudos sobre avaliação de atividade antioxidante de ácidos fenólicos *in vivo* e *ex vivo* apresentaram resultados desfavoráveis no que diz respeito à redução da susceptibilidade da LDL à oxidação devido à quantidade insuficiente de antioxidante

administrado ou, talvez, por falhas na metodologia, no desenho e controle dos participantes no estudo (Hodgson *et al.* 2000; Caccetta *et al.* 2000; Murso *et al.* 2005).

Os mecanismos moleculares que iniciam a oxidação da LDL *in vivo* ainda são desconhecidos, no entanto sabe-se que algumas substâncias estão potencialmente envolvidas neste processo, como a oxidação da LDL por metais de transição (Cu^+ e Fe^{++}). Além desse mecanismo outros também já foram evidenciados como a interação desta lipoproteína com peroxinitrito, (3-morfolinosidininonimina – SIN-1) e ação enzimática via lipoxigenase (Halliwell 2000).

Os metais de transição agem como um pro-oxidantes catalisando a formação de radicais livres de oxigênio, os quais podem reagir com a LDL ocasionando aumento na produção hidroperóxidos lipídicos (Halliwell 2000). No caso da 3-morfolinosidininonimina (SIN-1) os radicais livres são formados por reações químicas envolvendo espécies reativas de nitrogênio (ERN), onde ocorre a formação de peroxinitrito ($\text{OONO}^\cdot$) através da reação do óxido nítrico ($\text{NO}^\cdot$) com o radical superóxido ($\text{O}_2^\cdot$). O SIN-1 oxida as partes protéicas e lipídicas da LDL e sua utilização pode ser justificada porque a geração de $\text{OONO}^\cdot$, a partir desse composto, ocorre com um fluxo lento e de forma constante, o que seria mais semelhante à via de formação de $\text{OONO}^\cdot$ em situações fisiológicas (Thomas *et al.* 1998). Através de reações enzimáticas ocorre a produção de radicais livres pela lipoxigenase. Tal enzima participa da formação das prostaglandinas e leucotrienos, substâncias responsáveis pelo desenvolvimento de processos inflamatórios, que quando com atividade aumentada pode gerar acréscimos de hidroperóxidos lipídicos, e dessa forma contribuir para o aparecimento da aterosclerose (Silva *et al.* 1998 e 2002).

Como o processo de oxidação-antioxidação é complexo e pode envolver diferentes vias, torna-se necessária a avaliação de vários parâmetros capazes de fornecer um perfil da atividade antioxidante de uma amostra. Desta forma foi avaliada a eficiência do chá mate como antioxidante utilizando 3 métodos de peroxidação, conforme descrito por Gugliucci e Menini (2002) e recomendado por Halliweel (2000): (1) a indução da oxidação por peroxinitrito (SIN-1), (2) a indução por sulfato de cobre (Cu^{+2}) e (3) por lipoxigenase da soja (EC 1.13.11.12).

Em um ensaio *in vitro* realizado por Gugliucci e Menine (2002), onde se pretendia avaliar a proteção antioxidante da erva-mate verde sobre a LDL de indivíduos saudáveis após a mesma ter sido incubada com lipoxigenase e SIN-1, observou-se uma expressiva diminuição dose-dependente da oxidação desta lipoproteína em ambos oxidantes utilizados. Os autores atribuem estes resultados a capacidade do extrato de erva mate verde atuar como *scavengers* dos radicais livres de nitrogênio e, também, interagir com a lipoxigenase modificando o estado redox de ferro, o qual é necessário para o funcionamento adequado desta enzima.

No presente estudo, não foi observado efeito estatisticamente significativo relativamente aos marcadores da peroxidação lipídica no qual foram utilizados o SIN-1 (Tabela 11) e lipoxigenase (Tabela 10) como indutores da oxidação, devido ao consumo de chá-mate.

Isso deve ter ocorrido possivelmente devido ao fato dos fitoquímicos presentes no chá mate não serem aptos a reagir com espécies reativas de nitrogênio ou inativar a atividade de enzimas que possam ser aterogênicas, como a lipoxigenase, e sim serem capazes de atuar como sequestradores de metais de transição e/ou como neutralizadores de espécies reativas de oxigênio (Gugliucci 1996). Outra hipótese

seria que, talvez, por o chá mate passar por um processo de torrefação, na qual sofra alterações químicas, que por sua vez contribua para perda parcial da biodisponibilidade dos compostos fenólicos, possam ter colaborado para esses resultados. No entanto a suposição preponderantemente mais acertada seria que a metodologia elegida para avaliar a ação do chá mate como antioxidante (Dienos conjugados) não fosse a mais apropriada no que se refere ao SIN-1 e à lipoxigenase, ou não foi devidamente padronizada, já que os resultados foram positivos no caso da utilização do sulfato de cobre (Tabela 8 e Tabela 9). Neste caso, o método mais adequado para determinação do dano oxidativo induzido por SIN-1 seria o que fosse mais específico para produtos de oxidação gerados por espécies reativas de nitrogênio (ERN), como nitrito, nitratos, carbonilas, resíduos de nitrotirosina, etc (Vasconcelos *et al.* 2007). O mesmo se aplica no caso da lipoxigenase. Deste modo, mais estudos são necessários a fim de investigar essas hipóteses.

Presume-se que a oxidação de LDL *in vivo* se inicie nos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípides da superfície da membrana e, a seguir, se propague aos lípides do núcleo, resultando em modificação oxidativa tanto dos ácidos graxos poliinsaturados, como do colesterol e fosfolípides e, finalmente, modificação e degradação da apolipoproteína B (apo B) (Batlouni 1997).

Produtos finais da peroxidação lipídica, como o malonaldeído podem fragmentar e na sequência promover o *cross-link* entre lisina e arginina na Apo B, modificando seu perfil eletroforético e com isso provocar alterações funcionais na partícula de LDL que culminam com o aparecimento da aterosclerose (Steinberg *et al.* 1990; Gugliucci e Menine 2002). A fim de verificar se a ingestão de chá mate poderia inibir esse processo conduzimos a análise de eletroforese em gel com SDS-PAGE

após as LDL dos participantes serem submetidas a peroxidação *ex vivo* com sulfato de cobre.

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a erva mate verde é capaz de evitar a fragmentação da proteína presente na LDL (apo B) (Gugliucci 1996 e Gugliucci e Menini 2002). Ervas tradicionalmente utilizadas na medicina popular chinesa e coreana, como a *Scolopendra subspinipes*, comprovaram efeito similar num estudo *in vitro* (Yoon *et al.* 2006). Em nosso estudo também foi verificada uma menor degradação na maior parte das bandas de proteína das LDL obtidas após uma semana de consumo de chá mate (T=2), quando comparadas com as bandas controle (Figuras 8 e 9). Este efeito pode ser explicado pela presença de compostos com atividade antioxidante no chá mate, tais como os ácidos clorogênicos, que têm demonstrado serem aptos a neutralizar radicais livres, captar metais de transição ou decompor peróxidos inibindo, desse modo, a degradação oxidativa nas proteínas (Waszczynskyj 2004). Portanto sugere-se que a erva mate torrada seja capaz de proteger as proteínas da peroxidação lipídica e com isso possa prevenir alterações na Apolipoproteína B.

A quantidade máxima de lipoperóxidos formados ocorre aproximadamente 6 horas após a indução oxidativa plasmática, quando os antioxidantes endógenos, como a vitamina E, são esgotados (Silva *et al.* 1998). A partir desses dados a lipoperoxidação do plasma e da LDL isolada foram induzidas por 6 horas, conforme metodologia detalhada nos itens **5.8.1** e **5.8.2** e determinada após esse período através do ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Após os períodos de consumo de chá, agudo (T=1) e prolongado (T=2), a concentração de TBARS reduziu significativamente em ambas as amostras avaliadas em relação ao controle (T=0). Os resultados estão expressos na Tabela 4 (PLASMA) e na Tabela 12 (LDL).

O efeito protetor do chá mate também foi claramente demonstrado mediante as modificações nos valores de hidroperóxidos lipídicos presentes no plasma, verificadas nos mesmos momentos de tratamento ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Tabela 6).

O hidroperóxido lipídico tem sido considerado um adequado biomarcador do início da peroxidação lipídica (Giada e Mancini-filho 2004). Desse modo, os achados deste estudo confirmaram o potencial protetor dos fitoquímicos presentes no chá mate, particularmente os ácidos clorogênicos, contra o ataque de espécies reativas a estruturas lipídicas do organismo, tais como membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas (Salah *et al.* 1995; Gugliucci 1996; Gugliucci e Menini 2002; Brascresco *et al.* 2003; Yukawa *et al.* 2004; Murso *et al.* 2005 e Cirico *et al.* 2006;).

Nos tecidos, a maioria dos polifenóis interage com a superfície da membrana plasmática, devido a sua hidrofília, mas alguns conseguem penetrar a membrana (Saija *et al.* 1995). Em pH fisiológico, a maioria dos polifenóis interage com a cabeça polar dos fosfolipídeos da membrana, formando pontes de hidrogênio envolvendo os grupos hidroxil do polifenol (Verstraeten *et al.* 2003). Com o aumento do pH, ocorre uma desprotonação dos grupos hidroxil, aumentando a interação do polifenol com a membrana. A adsorção dos polifenóis a membrana plasmática limita o acesso de oxidantes que iriam atacar a superfície membranar (Manach *et al.* 2004).

Em razão das propriedades antioxidantes anfífilas do ácido clorogênico, e de seus metabólitos (Salah *et al.* 1995; Gugliucci 1996 e Cren-Olivé *et al.* 2003), o consumo de chá mate pelos participantes pode ter contribuído com a atuação de antioxidantes da fase aquosa, na regeneração da vitamina E, conforme demonstrado e discutido no ensaio de dienos conjugados (Tabela 3 e Tabela 8), além de ter,

provavelmente, favorecido a manutenção da concentração de vitamina E e de β -caroteno em estruturas lipídicas no plasma e em outros tecidos (Salah *et al.* 1995; Zhu *et al.* 1999; Rice-Evans *et al.* 1996). Outra explicação pode ser atribuída as saponinas presentes no chá mate, as quais podem reduzir a expressão de genes pró-inflamatórios como o TNF- α e NF- κ B (Heck e Meija 2007; Shishodia *et al.* 2003) o que, hipoteticamente, contribuiria na redução do estresse oxidativo.

A integridade das estruturas lipídicas no organismo depende primariamente da atividade de antioxidantes lipossolúveis, tais como a vitamina E e o β -caroteno. A vitamina E é essencial na defesa antioxidante de membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas (Kontush *et al.* 1996 ; Gohil *et al.* 1986; Burton e Ingold 1986). Além disso, a efetividade da ação antioxidante desta vitamina é estreitamente dependente do sinergismo entre antioxidantes presentes na fase aquosa, principalmente a vitamina C e a glutathione (Gohil *et al.* 1986).

Enquanto consideráveis evidências indicam que a maioria dos fitoquímicos presentes em vegetais e frutas apresenta atividade antioxidante *in vitro* (Sichel *et al.* 1991; Gugliucci 1995; Bastos *et al.* 2007) pouco se sabe se a ingestão destes alimentos poderia promover o mesmo benefício *in vivo*, visto que, diversos fatores interferem na absorção e metabolismo destes compostos tais como: a reatividade da substância antioxidante relativamente aos radicais livres, o número de radicais que podem ser inativados por essa substância, as vias metabólicas dos produtos formados, a interação entre substâncias antioxidantes, a sua localização e o seu caráter hidrofílico ou hidrofóbico, a biodisponibilidade entre outros (Manah *et al.* 2004).

Por meio da análise do perfil de antioxidantes totais no plasma (“TAS”), pôde-se avaliar, *in vivo*, as alterações na concentração dos antioxidantes plasmáticos após tratamento agudo (T=1) e prolongado (T=2) com chá mate.

A capacidade antioxidante total (“TAS”) dos voluntários aumentou significativamente após uma semana de intervenção com chá mate indicando uma elevação do perfil antioxidante plasmático (Tabela 5), não havendo alteração após 1h de consumo da bebida. Esta última constatação é contrária ao que, em geral, está descrito na literatura. Vários estudos demonstraram que há um aumento na capacidade antioxidante plasmática após aproximadamente 1 hora de consumo de bebidas ricas em compostos fenólicos, tais como o chá verde (Rietveld *et al.* 2003). Esta resposta tem sido atribuída ao aumento do ácido úrico plasmático, o qual é responsável por cerca de 60% da atividade antioxidante total do plasma (Benzie e Strain 1996 e Manah *et al.* 2004). Em concordância com esses resultados, uma pesquisa recente sugere que o café pode contribuir para o aumento da capacidade antioxidante plasmática pouco tempo após sua ingestão. Nesse estudo o consumo de 200ml de café aumentou após 1 hora em 6 e 7% a capacidade antioxidante plasmática de indivíduos saudáveis quando analisadas pelos métodos de CROCIN e TRAP, respectivamente (Natella *et al.* 2002).

A ocorrência de resultados contraditórios entre o nosso estudo e os mencionados acima, talvez esteja relacionada não apenas à diferença na metodologia empregada e período em que a mesma foi realizada, já que realizamos as análises de “TAS” após 1 mês da coleta de sangue dos voluntários, sendo o mesmo devidamente armazenado (-70°C), mas também por outros fatores que devem ser considerados, como o consumo nutricional do grupo de estudo (Tabela 14). Ou seja, a ausência de

alteração no TAS após o consumo agudo de chá mate (Tabela 5), talvez esteja refletindo discreta falha na resposta de alguns componentes nutricionais na alimentação dos voluntários, que participam da capacidade antioxidante total. Ressalta-se, entretanto, que a ausência de análises bioquímicas, relativas ao estado de vitaminas antioxidantes dos participantes, limita as conclusões que possam ser feitas, com respeito à influência do consumo dietético habitual desses indivíduos, nos resultados da intervenção com chá mate observados na pesquisa. Além disso, não houve diferença no padrão alimentar dos voluntários antes e após o tratamento com chá, conforme mostra a Tabela 14 e 15 (valores dos nutrientes ajustados pela energia). Por outro lado, independentemente das reais condições do estado nutricional dos voluntários no período inicial da realização do estudo (T=0 e T=1), os resultados sobre o efeito antioxidante do consumo diário de chá mate (T=2) são corroborados pela observação de outros protocolos que avaliaram o efeito da ingestão prolongada de alimentos ricos em compostos fenólicos na capacidade antioxidante plasmática, como por exemplo, o chá verde e o vinho tinto. Um estudo verificou que o consumo diário de duas xícaras de chá verde promoveu uma melhora no estado antioxidante de indivíduos saudáveis (Erba *et al.* 2005). Da mesma forma foi relatado que a ingestão moderada de vinho tinto, por duas semanas, resultou em aumento de 7% da capacidade antioxidante plasmática quando comparado com o período basal (Sang *et al.* 2005). Estes resultados confirmam os achados de Micallef e colaboradores (2007) comprovando que o consumo moderado de vinho tinto por um período curto induziu um significativo aumento do status antioxidante plasmáticos em jovens e idosos saudáveis.

Provavelmente o consumo diário de chá mate (período intervenção), em comparação a uma única dose consumida no dia (consumo agudo), tenha sido indispensável para que ocorressem as alterações positivas nos valores do TAS verificadas no presente estudo. Confirmando estas suposições, foi relatado que a ingestão de dieta pobre ou rica em vegetais e frutas, por duas semanas, resultou em diferentes efeitos na concentração de carotenóides no plasma e, conseqüentemente, na capacidade antioxidante total, sendo verificado aumento apenas no grupo que consumiu grande quantidade de antioxidantes. (Thompson *et al.* 2005). Por fim, esses resultados sugerem que a ingestão regular de chá mate pode incrementar o potencial de defesa antioxidante do organismo.

Os sistemas antioxidantes endógeno existem para proteger o organismo contra os efeitos danosos dos radicais livres, os quais são produzidos em condições fisiológicas normais do metabolismo aeróbico resultante de diversos processos bioquímicos. A defesa primária é dada, por enzimas que cataliticamente inativam a formação de radicais livres. Elas agem principalmente evitando a formação de EROS que poderiam danificar as estruturas celulares dando início a peroxidação (Barreiros *et al.* 2006).

Os radicais livres, quando produzidos em excesso, geram estresse oxidativo podendo lesar tecidos e/ou se associar com moléculas (açúcares, proteínas, lipídios, DNA), o que resulta na etiologia de várias doenças, dentre elas a aterosclerose e câncer (Halliwell 2000).

Pesquisas indicam que as defesas antioxidantes naturais (endógenas) podem ser reforçadas pela introdução de substâncias advindas através da dieta, assim como os compostos fenólicos (Park *et al.* 2003). Além da sua atividade antioxidante direta,

vários estudos têm destacado múltiplas funções e mecanismos importantes relacionados à habilidade dos compostos fenólicos de se ligarem a receptores celulares e transportadores de membrana e influenciarem a expressão gênica de enzimas, a sinalização e a adesão celular (Giada e Mancini-Filho 2006; Frei e Higdon 2003).

Uma vez que a deficiência no sistema de defesa antioxidante pode ser a causa de aumento da lipoperoxidação e, conseqüentemente do aparecimento de doenças degenerativas; (Halliwell 2000) e dos relatos de que os mecanismos endógenos de defesa antioxidante podem ser auxiliados favoravelmente com a introdução de alimentos ricos em compostos fenólicos por meio da dieta (Park *et al.* 2003) avaliou-se os níveis de expressão de alguns genes relacionados à produção das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione peroxidase (GPx) antes (T=0) e após o período prolongado de consumo de chá mate (T=2).

A superóxido dismutase (SOD), uma enzima que promove a dismutação do radical superóxido até peróxido de hidrogênio (Niki 2004), a glutathione peroxidase (GPx) uma enzima que utiliza como substrato a glutathione e é capaz de eliminar peróxidos e detoxificar produtos eletrofílicos (Niki 2004) e a catalase (CAT), uma enzima responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio para produzir água e oxigênio molecular (Niki 2004), apresentaram aumento significativo de sua expressão genética após tratamento com chá mate, o que pode ter contribuído para a diminuição na lipoperoxidação e aumento da capacidade antioxidante plasmática observada neste grupo de estudo. Esses dados estão apresentados na Tabela 7.

Os polifenóis podem exercer habilidade antioxidante por neutralizarem radicais livres, mas também através da proteção dos antioxidantes endógenos, por

aumentar sua expressão, como foi observado num estudo conduzido por Ross e Kasum (2002), onde houve aumento na concentração das enzimas GPx e SOD em eritrócitos humanos após o consumo de apigenina, um flavonóide encontrado em frutas e ervas. Do mesmo modo, foi demonstrado por Toyokuni e colaboradores (2003) que ácidos fenólicos presentes em extratos de plantas de Mauritânia foram capazes de aumentar a expressão de enzimas antioxidantes em células COS 7.

Um dos possíveis mecanismos de ação desses fitoquímicos envolve a modulação da expressão genética de enzimas antioxidantes, as quais auxiliam na eliminação de carcinógenos e toxinas prejudiciais ao organismo, como os lipoperóxidos, prevenindo assim a interação com macromoléculas (proteínas, lipídios e DNA), o que poderia provocar mutações e culminar no aparecimento de cânceres (Yeh e Yen 2006).

Em geral, ácidos fenólicos que são capazes de induzir atividade de enzimas antioxidantes apresentam grande habilidade antioxidante plasmática (Yeh e Yen 2006). Neste estudo foi possível verificar aumento do perfil de antioxidantes plasmáticos (TAS) somente após 1 semana de consumo de chá mate (Tabela 5), entretanto observamos uma significativa diminuição de lipoperóxidos plasmáticos em ambos os períodos de tratamento quando comparado com período basal (Tabela 6). Esses resultados indicam que, provavelmente houve um ligeiro aumento da capacidade antioxidante aguda, mas que deva estar abaixo do limite detectável pela análise de “TAS”. Essa hipótese poderia ser confirmada pelos resultados que obtivemos com aumento da expressão genética das enzimas responsáveis pela produção de GPx, SOD e CAT, no entanto não foi possível realizar essa análise no período agudo de consumo da bebida, já que outros estudos indicam que para que

ocorra algum aumento da atividade de enzimas antioxidantes é necessário um período maior de tratamento com o alimento antioxidante que se pretende testar (Fernández-Pachón *et al.* 2006).

No geral observou-se que os resultados mais significativos, no que se refere à ação antioxidante do chá mate, ocorreram com as análises realizadas no plasma (Dienos, TBARS, TAS e PCR *real time*) do que na LDL (Dienos, TBARS, Fragmentação da Apo B). Isso provavelmente ocorreu devido o plasma ser relativamente protegido da oxidação pelos antioxidantes presentes naturalmente no plasma, como as vitaminas C, E e beta-caroteno. Além desses componentes, substâncias fenólicas, como as presentes no chá mate, também auxiliam na defesa antioxidante plasmática. As lipoproteínas, em especial a LDL, também apresentam antioxidantes contidos em suas próprias partículas, como alfa-tocoferol e (vitamina E) o beta-caroteno. No entanto, os antioxidantes que podem protegê-las do processo oxidativo no meio plasmático, como os polifenóis presentes no chá mate, são sujeitos a remoção durante o procedimento de isolamento da fração LDL (diálise) tornando-se mais suscetíveis à oxidação, de modo que poderiam atuar com maior potencialidade como antioxidante *in vivo* do que em ensaios *ex vivo* (Halliwell 2000). Ou seja, pode ser que os resultados dos ensaios no plasma foram melhores decorrentes de uma menor quantidade de substâncias antioxidantes do chá ativas na LDL.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pela maioria dos ensaios *ex vivos* e *in vivo* demonstraram que o consumo de chá mate aumentou a resistência à oxidação, diminuiu a produção de lipoperóxidos formados no plasma e na LDL e contribuiu para redução da fragmentação da proteína presente na LDL após indução oxidativa. Além disso, foi observado que o consumo de uma única dose diária de chá mate durante uma semana (T=2) aumentou significativamente o perfil de antioxidantes plasmáticos e a expressão de genes relacionados à produção de enzimas antioxidantes, tais como Glutathione peroxidase (GPx), Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT).

Nesse contexto, sugere-se que a atividade antioxidante dos fitoquímicos do chá mate pode atuar por diferentes mecanismos: além de ocorrer diretamente, por meio da neutralização de espécies reativas, pode se processar através de mecanismos indiretos, como, por exemplo, a modulação de enzimas antioxidantes, as quais podem resultar em modificações do estado redox celular (Scalbert *et al.* 2005). Portanto, a ingestão de chá mate pode contribuir para diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônicas relacionadas a processos oxidativo, tais como a aterosclerose e câncer. Além disso, é importante reconhecer que as doenças degenerativas envolvem diferentes mecanismos e é difícil para qualquer antioxidante ser efetivo em todos. Os efeitos da ingestão de uma planta medicinal podem não ser resultados de um simples composto, mas de uma sinergia entre compostos.

9. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Abdalla DSP. Estresse Oxidativo e Alimentação. In: Tirapegui J. Nutrição - Fundamentos e Aspectos Atuais. 2. ed. São Paulo: Atheneu; 2006, p.181-197.
2. Alikaridis F. Natural constituents of *Ilex* species. J Ethnopharmacol 1987; 20:121-144.
3. Anesini C, Ferraro G, Filip R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. Food Chem. 2006; 97 (3): 459-464.
4. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. Analyst 2002;(127):183-198.
5. Arteel G E e Sies H. Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. FEBS Lett. 1999;462: 167–170.
6. Estilos de Vida Saudáveis, Nutrientes e antioxidantes. ILSI Europe Concise Monograph Series. 2002; 20-26.
7. Baisch ALM, Johnston KB, Stein FLP Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats J Ethnopharmacol 1998; 60 (2): 133-139
8. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. J Braz Chem Soc 2006; 29(1): 113-23.
9. Bastos DHM, Torres EAFS. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex Paraguariensis*) e saúde pública. Nutrire 2003; (26):77-89.
10. Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS *et al.* The chlorogenic acid and caffeine content of yerba mate (*Ilex Paraguariensis*) beverages. Acta Farm. Bonaerense 2005; 24(1): 91-5.
11. Bastos DHM, Isshimoto E, Marques MOM, Fernando FA Torres EAFS. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex Paraguariensis*) infusions. Journal of food and Analysis 2006; 19(6-7): 538-543.

12. Bastos DH, Fornari AC, Queiroz YS, Torres EAFS. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex Paraguariensis*) leaves *Braz arch bio technol.* 2006; .49 (3):399-404.
13. Bastos DH, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya AC, Cunha IB, Carvalho PO, Eberlin MN. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules* 2007;12(3):423-32.
14. Bastos DH, Oliveira DM, Matsumoto RLT Carvalho PO Ribeiro ML. Yerba maté: Pharmacological properties, research and biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 2007;1(1):37-46.
15. Batlouni M. Hipótese Oxidativa da Aterosclerose e Emprego dos Antioxidantes na Doença Arterial Coronária *Arq Bras Cardiol* 1997; 68 (1):55-63.
16. Belló A. Dano Oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres. In: Marroni NP et al. *Estresse oxidativo e Antioxidantes*. Porto Alegre: ULBRA. 2002: 49-61.
17. Benzie IFF e Strain JJ. The ferric reducing ability o plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239: 70-76.
18. Bianchi MLP e Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr* 1999; 12 (2): 123-130.
19. Block G, Patterson B and Subar A. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of epidemiological evidence. *Nutr Cancer.* 1992; 18: 1-29.
20. Boveris A, Cadenas E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: Clerck L and Massaro D. *Oxygen, Gene Expression and Cellular*, Marcel Dekker: New York 1997;105: 1-25.
21. Bracesco N, Dell MRA, Behtash S, Glugliucci A *et al.* Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA

- double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *J Altern Complement Méd* 2003; 9(3):379-387.
22. Bravo L. Polyphenols, chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutrition*. 56(11): 317-333, 1998.
 23. Burton G W and Ingold KU. Beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*. 1984; 224 (4649): 569-573.
 24. Caccetta R A-A, Croft K D, Beili L J and Puddey I B Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability *Am J Clin Nutr* 2000;71:67-74.
 25. Campos AM, Escobar J, Lissi EA. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguariensis* extracts and red wine. *J Braz Chem Soc* 1996; 7(1): 43-49.
 26. Cardozo-junior E L, Ferrarese-Filho O, Cardozo-Filho L, Ferrarese MLL, Donaduzzi CM ; Sturion JA . Methylxanthines and phenolic compounds contents in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. *J Food Compost Anal*. 2007;20:1-10.
 27. Carini M, Facino RM, Aldini G, Calloni M, Colombo L. Characterization of phenolic antioxidants from maté (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/Tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998; 12: 1813-1819.
 28. Chandra S, Mejia EG. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Reductase Activity of na Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex Paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. *J Agric Food Chem* 2004; (52):3583-3589.
 29. Cintra RMGC. Efeito antioxidante de especiarias. Avaliação da salsa (*Petroselinum sativum* Hoffm), cebolinha verde (*Allium shoenoprasum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). [Tese Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; 1999.

30. Cirico T L, Omaye S T. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food and Chemical Toxicology*; 2006 (44): 510–516.
31. Clifford MN, Ramirez-Martinez JR. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents on maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. *Food Chem* 1990; (35):13-21.
32. Clifford MN. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med.* 2004; 70:1103-1114.
33. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 1999; 79: 362-372.
34. Cren-Olivé C, Teissier E, Duriez P, Rolando C. Effect of catechin *O*-methylated metabolites and analogues on human LDL oxidation. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34 (7): 850-855.
35. Degáspari C H e Waszczynskyj N. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. *Visão Acadêmica.* 2004; (5): 33-40.
36. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keany JF. Antioxidants and Atherosclerotic Heart Disease *N England J Med* 1997; 337 (6): 1158-1166.
37. Dotan YD, Lichtenberg and I. Pinchuk Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress *Progress in Lipid Research* 2004; 43 (3): 200-227.
38. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa): Cultivo da Erva-mate. Disponível em: <
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-mate/CultivodaErvaMate>>. Acesso em: 22 de setembro 2006.
39. Erba D, Riso P, Bordoni A, Foti P, Biagi PL, Testolin G. Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *J Nutr Biochem.* 2005;6(3):144-149.

40. Esmelindro MC, Toniazzo G, Waczuk A, *et al.* Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2002; 22 (2): 199-204.
41. Esterbauer H, Zollner H. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med* 1989;7(2):197–203.
42. Felippi R. Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na reatividade vascular: enfoque na aterosclerose experimental. [Dissertação de mestrado] Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.
43. Fernández-Pachón MS, Bakkali F, Villaño D, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Acute intake of red wine does not affect antioxidant enzymes activities in human subjects. *Int J Vitam Nutr Res.* 2006; 76(5):291-8.
44. Ferreira A L A, Matsubara L S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo *Rev Ass Med Brasil* 1997; 43(1): 61-8
45. Filip RS, Lotito SB, Ferraco G, Raga CG. Antioxidant activity of *Ilex Paraguariensis* and related species. *Nutrition Res* 2000; 20(10):1437-1446.
46. Filip RS, López P, Giberti G, Coussio J and Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species *Fitoterapia.* 2001; 72(7): 774-778.
47. Filip R, Sebastian T, Ferraro G, Anesini C. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45(4):649-55.
48. Frankel EN, Huang SW, Kanner J, German JB. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *J Agric Food Chem* 1994; (42):1054-1059.
49. Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr.* 2003;133(10):3275S-84S.

50. Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of concentrations of low density cholesterol in plasma without the use of preparative ultracentrifuge. Clin Chem Baltimore. 1972; 499-502.
51. Genovese MI, Santos RJ, Hassimoto NMA, Lajolo FM. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. Rev Bras Cienc Farm. 2003; 39:167-169.
52. Giada MLR e Mancine-Filho J. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos de alimentos. Nutrire 2004; (28):91-107.
53. Giada MLR e Mancine-Filho J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. Ciências Biológicas e da Saúde (Online) 2006; 12: 7-15.
54. Glugliucci A, Stahl, A.J.C.. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex Paraguariensis*. Bioch Mol Biol Int.1995;35(1):47-56.
55. Glugliucci A. Antioxidant Effects of *Ilex Paraguariensis*: Induction of Decreased Oxidability of Human LDL *in vivo*. Biochem Biophys Res Commun. 1996; (224): 338-344.
56. Glugliucci A , Menini T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited *in vitro* by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureoides*. Life Sci 2002; (71): 693-705.
57. Gnoatto SC, Dassonville-Klimpt A, Da Nascimento S, Galéra P, Boumediene K, Gosmann G, Sonnet P, Moslemi S. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. Eur J Med Chem. 2007; [Epub ahead of print]
58. Gohil K, Packer L, de Lumen B, Brooks GA, Terblanche SE. Vitamin E deficiency and vitamin C supplements: exercise and mitochondrial oxidation. J Appl Physiol. 1986 Jun;60(6):1986-91.
59. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of Biuret reaction. J Biol Chem. 1949; 177:751-66

60. Gorzalczany S, Filip R, Alonso MR, Mino J, Ferraro GE, Acevedo C. Choleretic effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *J Ethnopharmacol* 2001; 75(2-3):291-4.
61. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in Biology and Medicine*. 3 ed. Oxford.2000; ford University Press.
62. Halliwell . Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward?.*Cardiovascular Research* 2000;410-418.
63. Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 1994; 15(3): 145-182.
64. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34: 1345-53.
65. Heck I and Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations *J Food Sci*. 2007; 72(9):R138-51.
66. Herling AW, Burger H, Schubert G, Hemmerle H, Schaefer H, Kramer W. Alterations of carbohydrate and lipid intermediary metabolism during inhibition of glucose-6-phosphatase in rats. *Eur J Pharmacol* 1999; 386(1): 75-82.
67. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 1993; (42):1107-1111.
68. Hodgson J M, Puddey I B, Croft K D, Burke V, Mori T A, Caccetta R A and Beilin L J Acute effects of ingestion of black and green tea on lipoprotein oxidation *Am J Clin Nutr* 2000;71:1103–7.
69. Hollman P C H, Katan M B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 1997; 51: 305-310.

70. Iborra RT, Ribeiro IC, Neves MQ, Charf AM, Lottenberg SA, Negrão CE, Nakandakare ER, Passarelli M. Aerobic exercise training improves the role of high-density lipoprotein antioxidant and reduces plasma lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus. *Scand J Med Sci Sports*. 2008; [Epub ahead of print]
71. Jacob RA. Vitamin C. In: Shils ME, et al., editors. *Modern nutrition in health and disease*. 9th ed. USA: Williams eWilkins, 1998;467-83.
72. Jilial I, Devara J S. Assessment of LDL oxidation: *in vivo* and *ex vivo* measurements . in: aruoma, o.i. e cuppet, s.l. – antioxidant methodology- in vivo and in vitro concepts. illionois: *AOCS* ;1997: 85-99.
73. Johnston K, Sharp P, Clifford M, Morgan L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters*. 2004; 579:1653-1657.
74. Karakayas EL. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. *Int J Food Sci. Nutr*. 2001; (52): 501-508.
75. Knert. P. Jarvinen R., Reunanen A. and Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br Med J*. 1996; 312: 478-481.
76. Kontush A, Karten BFB, Kohlschutter A and Beisiegel U. Antioxidant and prooxidant activity of a-tocopherol ihuman plasma and low density lipoprotein *J Lipid Res*. 1996; 37: 1436-14438
77. Krinsky NI. The biological properties of carotenoids. *Pure e Applied Chemistry* 1994; 66: 1003-1010.
78. Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.
79. Laranjinha JÁ, Almeida LM, Madeira VM. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem. Pharmacol*. 1994; 48: 487-494.
80. Lidsay DG. The nutritional enhancement of plant foods in Europe “Neodiet”. *Trends Food Sci Technol*. 2000; 11: 145-151.

81. Lima É S, Abdalla D S P Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Cienc Farm.* 2001; 37:294-303.
82. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25:402-8.
83. Lolito SB. and Fraga CG. (-)-Catequina preventes human plasma oxidation. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24: 435-441.
84. Lunceford N and Gugliucci A. *Ilex Paraguariensis* inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia* 2005; 76:419-427.
85. Mafra D, Abdalla D S P, Cozzolino S M F Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. *Rev Nutr Campinas.* 1999.12 (3): 205-212.
86. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C and Jime'nez L. Polyphenols: food sources and bioavailability *Am J Clin Nutr.* 2004;79:727– 47.
87. Mancine-Filho J, Moreira AVB. Efeito dos compostos fenólicos de especiarias sobre lípidos polinsaturados. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2003;9:130-133.
88. Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola D, Nicolo MC, Lericci CR. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science e Technol* 2001; 11:340-346.
89. Martins C M, Oliveira D M, Teixeira T F S, Peluzio M C G. O Paradoxo do Papel da Vitamina E na Iniciação e Progressão da Aterosclerose e sua correlação com os Radicais Livres. *Rev Med Minas Gerais* 2004;14(2):113-6.
90. Martins MMR. Influência da atividade física e do ambiente sobre os níveis de glutathione peroxidase e perfil lipídico em grupo de terceira idade. [Dissertação Mestrado]. Novo Hamburgo: Centro Universitário Feevale; 2007.
91. Mattos IL , Shiraishi KA, Braz AD e Fernandes J R. Peróxido de Hidrogênio: Importância e Determinação. *Quim Nova.* 2003; 26: 373-380.
92. Mazzafera P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. *Food Chem.* 1997; 60(1): 67-71.

93. 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 Med.* 2007; 73(11):1141-7.
94. Miranda DD, Arçari DP, Pedrazzoli J Jr, Carvalho PD, Cerutti SM, Bastos DH, Ribeiro ML. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis.* 2008; 24(4):375-81.
95. Micallef M, Lexis L, Lewandowski P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans *Nutr J.* 2007; 24(6):27-32.
96. Moller P e Loft S. Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. *Free Radic Biol Med.* 2006; 41(3):388-415.
97. Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo L C and Donangelo C. Chlorogenic Acid Compounds from Coffee Are Differentially Absorbed and Metabolized in Humans. *Nutrition.* 2007;137 (10): 2196-2201.
98. Monteiro M C e Trugo L C Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quim Nova.* 2005; 28(4): 637-641.
99. Mosimann ALP, Wilhelm-Filho D, da Silva EL Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol. *BioFactors* 2006; 26(1):59-70.
100. Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Helleranta M, Rissanen TH, Nurmi A, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Nyyssönen K, Virtanen JK, Salonen R, Salonen JT. Polyphenol-Rich Phloem Enhances the Resistance of Total Serum Lipids to Oxidation in Men *J Agric Food Chem.* 2005; 53(8):3017-22.
101. Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Alfthan G, Virtanen JK, Rissanen TH, Happonen P, Nyyssönen K, Kaikkonen J, Salonen R, Salonen JT. The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: a clinical trial *Free Radic Biol Med.* 2005; 38(4):527-34.

102. Nardini M, Cirillo E, Natella F and Scaccini C. Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption *J Agric Food Chem.* 2002; 50 (20): 5735 -5741.
103. Nardini M, Natella F, Gentili V, Di Felice M and Scaccini C Effect of Caffeic Acid Dietary Supplementation on the Antioxidant Defense System in Rat: An in Vivo Study *Arch Biochem Biophys.* 1997; 342(1): 157-160
104. [My paper]Natella F, Nardine M, Giannetti I, Dattilo C e Scaccini C Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans *J Agric Food Chem.* 2002; 50 (21):6211-6 12358504.
105. Neiva TJC, MoraisL.; Polack, M.; Simões, C.M.O.; D'amico, E.A. Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation. *Phytother Res.*1999; 13: 597-600.
106. Niki E. Antioxidants and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions.* 2004; 32:156-159.
107. Nordberg J and Arnér E S J Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system *Free Radic Biol Med.*2001; 31(11):1287-1312
108. Oliveira JA, Sevanian A, Rodrigues RJ, Apolinário E, Abdalla DS. Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. *Clin Biochem.* 2006; 39(7):708-14.
109. Olthof M R, Hollman PCH, Katan MB. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Extensively Absorbed in Humans *J Nutr.* 2001;131:66-71.
110. Olthof M R, Hollman PCH, Buijsman MNCP, JMM Van Amelsvoort, Katan MB. Human Nutrition and Metabolism Chlorogenic Acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans *J Nutr.* 2003;133:1806-1814.
111. Park YK, Park E, Kim JS, Kang MH. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutat Res.* 2003; 529(1-2):77-86.

112. Parker JC, Van Volkenburg MA, Levy CB, Martin WH, Burk SH, Kwon Y, Giragossian C, Gant TG, Carpino PA, McPherson RK, Vestergaard P, Treadway JL. Plasma glucose levels are reduced in rats and mice treated with an inhibitor of glucose-6-phosphate translocase. *Diabetes* 1998; 47(10):1630-6.
113. Proudfoot JM, Puddey IB, Beilin LJ, Stocker R, Croft KD. Unexpected dose response of copper concentration on lipoprotein oxidation in serum: discovery of a unique peroxidase-like activity of urate/albumin in the presence of high copper concentrations. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(5):699-705.
114. Queiroz S L e Batista A l A. Funções biológicas do óxido nítrico. *Quím. Nova*. 1999; 22(4): 584-590.
115. Ramirez-Mares MV, Chandra S, Mejia EG. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex Paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutat Res*. 2004; 554:53-65.
116. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20(7): 933-956.
117. Ricco RA, Wagner ML, Gurni AA. Estudio comparativo de flavonoides en seis especies austrosudamericanas del género *Ilex*. *Acta Farm Bonaer*. 1991; 10:29-35.
118. Rietveld A and Wiseman S Antioxidant Effects of Tea: Evidence from Human Clinical Trials. *Nutrition* 2003;133: 3285S-3292S.
119. Rique ABR, Soares EA, Meirelles CM. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares *Rev Bras Med Esporte* 2002; 8: 244-254.
120. Rojkind M, Domínguez-Rosales J., Nieto N, Greenwel P. "Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses". *Cell Mol Life Sci*. 2002; 59(11):1872-91.

121. Rover Júnior L, Höehr NF e Kubota APVLT. Sistema Antioxidante Envolvendo o Ciclo Metabólico da Glutathione Associado a Métodos Eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim Nova*. 2001; 24(1):112-119.
122. Saha P Das S. Elimination of Deleterious Effects of Free Radicals in Murine Skin Carcinogenesis by Black Tea Infusion, Theaflavins e Epigallocatechin Gallate. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2002;3(3):225-230.
123. Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F and Castelli F Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes *Free Radic Biol Med*. 1995;19 (4):481-486.
124. Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys*. 1995 ;322(2):339-46.
125. Sang S, Hou Z, Lambert JD, Yang CS. Redox properties of tea polyphenols and related biological activities. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(11-12):1704-14. Review.
126. Scalbert A, Johnson I.T and Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81: S215-217.
127. Schinella, G.R., Troiani, G., Dávila, V., Buschiazzi, P.M., Tournier, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex Paraguariensis*. *Biochem and Biophys Res Commun* 2000; (269):357-360.
128. Shahidi F, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1992;32(1):67-103.
129. Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, Aggarwal BB. Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of I κ B kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Res*. 2003; 63(15):4375-83.

130. Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Di Bilio AJ, Bonomo, R P In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂⁻. *Free Radic BiolMed*. 1991; 11(1): 1-8
131. Sies H. Strategies of antioxidant. Review. *Eur J Biochem*. 1993; 215 (2): 213-219.
132. Silva EL, Tsushida T, Terao J. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. *Arch Biochem Biophys*. 1998; 349(2):313-20.
133. Silva RR, Oliveira TT, Nagem TJ, Leão MA. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. *Rev Med Ribeirão Preto*. 2002; 35: 127-133.
134. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr Campinas*. 2002; 15(1): 71-81.
135. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias: Detecção, avaliação e tratamento. *Arq Bras Cardiol* 2001;77(3):28-32.
136. Stein FLP, Schmidt B, Furlong EB, Souza-Soares LA, Soares MC, Vaz MR, Muccillo Baisch AL. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biol Res Nurs*. 2005; 7(2):146-56.
137. Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherogenesis: current concepts. *JAMA* 1990; 264: 3047-52.
138. Tatefuji T, Izumi N, Ohta T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility *Biol Pharm Bull*. 1996; 19: 966 –970.
139. Thomas SR, Davies MJ, Stocker R. Oxidation and antioxidation of human low-density lipoprotein and plasma exposed to 3-morpholinol-sydnonimine and reagent peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 1998;11(5):484–94.

140. Thompson H.J., Heimendinger J., Gillette C., Sedlacek S.M. et al. In vivo investigation of changes in biomarkers of oxidative stress induced by plant food rich diets. *J Agric Food Chem* 53, 6126-6132, 2005.
141. Toyokuni S, Tanaka T, Kawaguchi W, Fang NR, Ozeki M, Akatsuka S, Hiai H, Aruoma OI, Bahorun T. Effects of the phenolic contents of Mauritian Endemic plant extracts on promoter activities of antioxidant enzymes. *Free Radic Res.* 2003; 37(11):1215-24.
142. Vannucchi H, Moreira EAM, Cunha DF, et al. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Rev Med Ribeirão Preto.* 1998; (31): 31-44.
143. Vasconcelos S M L, Goulart MO, Moura JBF, V Manfredine, Benfato MS, Kubota LT Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova* 2007; 30 (5)1323-1338.
144. Verstraeten S V., Keen C L., Schmitz H H., and P I. Oteiza Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure *Free Radic Biol Med.* 2003; 34 (1): 84-92.
145. Vinson JA e Dabbag YA. Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutr Res* 1998; 18:1067-107.
146. Visioli F, Borsani L, Galli C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc Res.* 2000; 47(3):419-25. Review.
147. Waterman PG, Mole S. Analysis of phenolic plant metabolites. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1994.
148. Winterbourn CC, Kettle A.J. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; (305):729-736.

149. Wiswedel I, Hirsch D, Kropf S, Gruening M, Pfister E, Schewe T, Sies H. Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F(2)-isoprostane concentrations in humans. *Free Radic Biol Med*. 2004 Aug 1;37(3):411-21.
150. Yeh C-T and Yen G-C Induction of Hepatic Antioxidant Enzymes by Phenolic Acids in Rats Is Accompanied by Increased Levels of Multidrug Resistance–Associated Protein 3 mRNA Expression Biochemical, Molecular, and Genetic Mechanisms. *Nutrition*. 2006; 136(1):11-5.
151. Yoon M, Jeong T, Park D, Xu M, Oh W H, Song KB, Lee W S, Park HY Antioxidant Effects of Quinoline Alkaloids and 2,4-Di-tert-butylphenol Isolated from *Scolopendra subspinipes* *Biol Pharm Bull*. 2006; 29 (4):735-9
152. Yu BP. Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiol Rev*. 1994; (74):139-162.
153. Yukawa GS, Mune M, Otani H, Tone Y, Liang XM, Iwahashi H, Sakamoto W. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. *Biochemistry*. 2004; 69(1):70-4.
154. Zhu QY, Holt RR, Lazarus SA, Orozco TJ, Keen CL. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Society for Experimental Biology and Medicine. Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227(5):321-9.

ANEXOS

Anexo 1 - Registro de consumo alimentar

Nome:_____ Idade____ Peso:____ Altura:_____ IMC:_____ Data____

Marque **tudo** o que você comeu, desde hora em que acordou até a hora em que foi dormir, nos 3 (três) dias descritos abaixo:

Dia: ____/____/2007, terça-feira.

Horário	Refeição	Alimento e/ou Bebida	Quantidade
	Café da manhã		
	Lanche da manhã		
	Almoço		
	Lanche da tarde		
	Jantar		
	Lanche da noite		

OBS: Se comeu algo fora das refeições descritas acima, mencione aqui: _____

Dia: ____/____/2007, quinta-feira.

Horário	Refeição	Alimento e/ou Bebida	Quantidade
	Café da manhã		
	Lanche da manhã		
	Almoço		
	Lanche da tarde		
	Jantar		
	Lanche da noite		

OBS: Se comeu algo fora das refeições descritas acima, mencione aqui: _____

Dia: ____/____/2007, sábado.

Horário	Refeição	Alimento e/ou Bebida	Quantidade
	Café da manhã		
	Lanche da manhã		
	Almoço		
	Lanche da tarde		
	Jantar		
	Lanche da noite		

OBS: Se comeu algo fora das refeições descritas acima, mencione aqui: _____

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996, segundo o Conselho Nacional de Saúde.

Título do Protocolo de Pesquisa: Avaliação da atividade antioxidante *ex vivo* de infusões de erva-mate (*Ilex Paraguariensis*).

Objetivo: O presente projeto de pesquisa irá avaliar se o chá-mate (*Ilex Paraguariensis*) apresenta atividade antioxidante, podendo proteger as lipoproteínas presentes no sangue humano de reações que podem ser prejudiciais à saúde.

População de Estudo: Alunos e funcionários da comunidade universitária.

Orientadora: Deborah Helena Markowicz Bastos

Autora da Pesquisa: discente de pós-graduação- FSP/USP – **Ruth Lobato Teixeira Matsumoto**

Caro Colaborador:

Para a realização desta pesquisa será coletada amostras de seu sangue (30,0 ml cada) em três momentos: antes, após uma hora e depois de 1 semana (7 dias) da ingestão diária de chá-mate. A coleta será feita por uma pessoa treinada em local apropriado. Também serão coletadas informações alimentares.

O sangue e as informações alimentares servirão para avaliar tanto as condições de proteção de seu sangue a processos de oxidação, isto é, reações que podem causar problemas à sua saúde, como para avaliar se o chá-mate pode prevenir este processo em sistemas modelo, isto é, fora do organismo humano.

Para retirar o sangue você sentirá uma picada e o local da picada poderá ficar arroxado, o que sumirá em poucos dias sem prejuízos à sua saúde.

Todos os resultados obtidos estarão a sua disposição, sendo sua identidade mantida em total sigilo. O sangue retirado será utilizado apenas neste estudo.

Você tem o direito de se retirar deste projeto a qualquer tempo. Este projeto será desenvolvido pelo Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade São Paulo.

Risco: O estudo não trará risco à sua integridade física e moral.

Benefícios: As informações obtidas neste estudo serão úteis cientificamente (a) para avaliar a variação do grau de proteção às reações de oxidação de uma amostra da

comunidade universitária e (b) para avaliar se o chá-mate que é consumido em grande parte do nosso país e conhecido por possuir substâncias antioxidantes é capaz de proteger lipoproteínas do sangue contra processos oxidativos que levam ao aparecimento de doenças.

Privacidade: As informações obtidas neste estudo poderão ser divulgadas em publicações, congressos, porém sem identificação do participante.

O pesquisador garante fornecer resposta a qualquer pergunta ou esclarecer qualquer dúvida que houver sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa.

A participação de vossa senhoria é voluntária, podendo retirar seu consentimento e deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem maiores consequências.

Ciente do compromisso assumido na minha colaboração com esta pesquisa, e pela importância da mesma subscrevo-me a seguir:

Nome (completo): _____

Assinatura: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Caso necessite informações complementares sobre a pesquisa, entrar em contato com:

Mestranda **Ruth Lobato Teixeira Matsumoto** e Prof^a **Deborah Helena Markowicz Bastos**, Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo, 715, ou pelo telefone 3061 7771 ou 3061 7701.