



**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

**ELENISE STUKER FERNANDES**

**EFEITO DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*, St. Hill.) NA  
MODULAÇÃO GÊNICA E NA ATIVIDADE DA ENZIMA  
PAROXONASE: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Florianópolis  
2011



Elenise Stuker Fernandes

**EFEITO DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*, St. Hill.) NA  
MODULAÇÃO GÊNICA E NA ATIVIDADE DA ENZIMA  
PAROXONASE: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Nutrição, da  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito para a obtenção do Grau  
de Mestre em Nutrição  
Orientador: Prof. Edson L. da Silva, Dr.

Florianópolis  
2011



Dedico essa obra aos *meus pais* que com o suor do rosto irrigaram a terra, e com a poeira do giz me ensinaram e me proporcionaram condições de concluir mais esta jornada.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a *Deus* e *Nossa Senhora Medianeira*, por ter me abençoado nessa longa caminhada.

Aos meus pais *Elvio* e *Estela* a quem devo a vida, os ensinamentos, o sorriso, a coragem de prosseguir. Que me ensinaram o real sentido da família. Em vocês tive o apoio e a força para prosseguir. Agradeço a vocês, que ao longo de toda a minha vida me apoiaram e incentivaram, não medindo esforços, entendendo a distância. Meu **MUITO OBRIGADA!**

Ao meu noivo *Allan*, pela força, incentivo, palavras de carinho nesses dois anos e por entender que a distância era necessária. Pelas horas intermináveis em que me acalmou, me fez sorrir. *Muito Obrigada minha maior loucura!*

Aos meus *anjos* que muito me ensinaram em tão pouco tempo.

Ao meu orientador *Edson Luiz da Silva*, pela paciência, dedicação, pelos ensinamentos nessa jornada e por me agradecer com esse projeto. *Obrigada!*

Ao Prof. *Marcos de Oliveira Machado* pelos ensinamentos.

À mestranda *Aline* pela ajuda e dedicação nos experimentos.

Às *voluntárias* que com tamanho empenho, disponibilidade, carinho e discernimento colaboraram na realização desta obra.

Às *Professoras, doutorandas, mestrandas, iniciação científica e funcionários* dos laboratórios de Oncologia Experimental e Hemopatias, Biologia Molecular e Micobactérias e de Análises Clínicas por me acolherem no meio farmacêutico e compartilhar o conhecimento, a amizade e ensinamentos práticos e teóricos.

Às mestrandas do Programa de Pós-Graduação em Nutrição pela amizade, carinho, confidências.

Às amigas *Fernanda, Haíra, Karina, Luciana, Marília* e *Veridiana* pelo incentivo, amizade e por compartilhar vários momentos nesses dois anos.

À Professora *Tereza Cristina Blasi* pelo incentivo, carinho, por ter despertado em mim o amor pela nutrição.

À Prof<sup>a</sup> *Elisabeth* e Prof. *Marcos* pelas contribuições na qualificação, e juntamente com o Prof. *Samuel* por ter aceitado participar da banca examinadora dessa dissertação.

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

*Elenise Stuker Fernandes*





♪ *O acaso vai me proteger*  
*Enquanto eu andar distraído...* ♪  
(Epitáfio, Titãs)

Não há nada como o sonho para criar o futuro. Utopia hoje, carne e osso amanhã.  
(Victor Hugo)



## RESUMO

FERNANDES, Elenise Stuker. **Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hill.) na modulação gênica e na atividade da enzima paroxonase: estudos *in vitro* e *in vivo*.** Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) espécie vegetal usada no preparo de bebidas como o chimarrão, o tererê e o chá mate tostado, possui propriedades antioxidante, hipocolesterolêmica e vasodilatadora, as quais podem ser benéficas na prevenção das doenças cardiovasculares (DCV). A paroxonase-2 (PON2) é uma enzima antioxidante cuja atividade está inversamente associada ao estresse oxidativo celular e pode ser modulada pela alimentação. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar se a erva-mate – verde ou tostada – possui a propriedade de modular a expressão gênica e a atividade da PON2 *in vitro*, em cultura de macrófagos, e *in vivo*, em monócitos e macrófagos obtidos após a ingestão das infusões de erva-mate por mulheres saudáveis. No estudo *in vitro*, células THP-1 foram incubadas com os extratos de erva-mate verde ou tostada ou com os ácidos clorogênico ou caféico, principal constituinte fenólico da erva-mate e metabólito plasmático. O estudo *in vivo* foi subdividido em agudo e de curta duração (sete dias). No estudo agudo, 20 voluntárias ingeriram 500 mL de infusão de erva-mate verde, tostada ou de água (controle) e amostras de sangue foram coletadas antes e 2 h após as ingestões. No estudo de curta duração, as mesmas 20 participantes consumiram as infusões de erva-mate ou de água, na dose de 330 mL três vezes ao dia, durante 7 dias, e amostras de sangue foram coletadas antes e no final do período, após jejum de 12-14 h. As diferenças foram avaliadas pelo teste *t* pareado de Student, teste de Wilcoxon e Mann-Whitney, considerando-se  $p < 0,05$  como significativo. De acordo com os resultados obtidos no estudo *in vitro*, os extratos de erva-mate verde ou tostada (0,8 e 2,4  $\mu\text{g/mL}$ , ou 1 e 3  $\mu\text{M}$  equiv. Ácido clorogênico/L) aumentaram a expressão gênica da PON2 nos macrófagos THP-1 ( $p < 0,05$ ), enquanto concentrações maiores de extrato (3, 5 e 10  $\mu\text{M}$ ) aumentaram a atividade. Resultados semelhantes foram encontrados para o ácido clorogênico (1 e 3  $\mu\text{M}$ ), enquanto o ácido caféico aumentou somente a atividade e não a expressão da PON2. No estudo *in vivo*, a ingestão aguda das infusões de erva-mate verde ou tostada aumentou a expressão gênica e as atividades arilesterase e lactonase da PON2 nos monócitos

do sangue periférico ( $p < 0,05$ ). O consumo de erva-mate verde ou tostada durante sete dias elevou a expressão gênica da PON2 nos monócitos e nos macrófagos derivados de monócitos ( $p < 0,05$ ) e aumentou de forma não significativa a atividade da PON2. A ingestão de erva-mate verde e tostada, de forma aguda ou por 7 dias, aumentou a atividade da PON1 no plasma ( $p < 0,05$ ). Em geral, não houve diferença entre os dois tipos de erva-mate estudados. Com base nos resultados do presente estudo, podemos sugerir que a erva-mate verde ou tostada modulou positivamente a expressão gênica e a atividade da enzima PON2 em monócitos e macrófagos, indicando, assim, possível proteção contra o estresse oxidativo celular.

**Palavras chave:** *Ilex paraguariensis*, erva-mate, enzima paroxonase, expressão gênica, atividade enzimática, aterosclerose.

## ABSTRACT

### **Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on gene modulation and activity of the enzyme paraoxonase2: *in vitro* and *in vivo* studies.**

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*), plant species used in the preparation of beverages such as mate, *tererê* and roasted mate tea, has antioxidant, hypocholesterolemic and vasodilating properties, which may prevent cardiovascular diseases (CVD). The paraoxonase2 (PON2) is an antioxidant enzyme whose activity is inversely associated with cellular oxidative stress and may be modulated by diet. Therefore, the aim of this study was to examine whether yerba mate – green or roasted – may modulate the gene expression and the enzyme activity of PON2 *in vitro*, in cultured macrophages, and *in vivo*, in monocytes and macrophages obtained after ingestion of mate infusions by healthy women. In the *in vitro* study, THP-1 cells were incubated with extracts of yerba mate green or roasted and with either chlorogenic or caffeic acids, major phenolic compound of mate and plasma metabolite of chlorogenic acid. The *in vivo* study was divided into acute and short-term (seven days). In the acute study, 20 women ingested 500 mL of green or roasted mate infusions, or water as control, and blood samples were collected before and 2 h after ingestion. In the short-term study, 20 participants ingested 330 mL of mate infusions or water, 3 times/day for 7 days, and blood samples were collected before and after seven days, after 12-14 h fasting. Differences were evaluated by Student's paired *t* test, Wilcoxon or Mann-Whitney tests, considering  $p < 0.05$  as significant. According to the results obtained in the *in vitro* study, extracts of green or roasted yerba mate (0.8 and 2.4  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , or 1 and 3  $\mu\text{M}$  equiv. chlorogenic acid/L) increased the gene expression of PON2 in THP-1 macrophages ( $p < 0.05$ ), while increase of enzyme activity was found with high amount of mate (3, 5 and 10  $\mu\text{M}$ ). Similar results were observed for chlorogenic acid (1 and 3  $\mu\text{M}$ ), though caffeic acid increased the activity but not the expression of PON2. In the *in vivo* study, acute ingestion of green or roasted mate infusions increased PON2 gene expression and enzyme activity in peripheral blood monocytes ( $p < 0.05$ ). The consumption of green or roasted mate for seven days increased PON2 gene expression in monocytes and macrophages ( $p < 0.05$ ) and enhanced not significantly the PON2 activity. The acute and short-term intake of green or roasted mate increased the activity of PON1 in plasma ( $p < 0.05$ ). In general, there was no significant difference between both types of yerba mate studied. Based on the results of this study, we

suggest that green or roasted yerba mate positively modulate gene expression and enzyme activity of PON2 in monocytes and macrophages, thereby indicating possible protection against oxidative stress.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*, yerba mate, paraoxonase, gene expression, enzyme activity, and atherosclerosis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Efeito da adição de erva-mate verde ou tostada na expressão gênica da enzima PON2 em macrófagos THP-1, após 24 h.....	56
Figura 2.	Expressão gênica da enzima PON2, em macrófagos THP-1, após 24 h de incubação com erva-mate .....	57
Figura 3.	Efeito do ácido clorogênico e do ácido caféico na expressão gênica da enzima PON2 em macrófagos THP-1, após 24 h.....	58
Figura 4.	Expressão gênica da enzima PON2, em linhagem de macrófagos THP-1, após 24 h de incubação com o ácido clorogênico ou ácido caféico .....	58
Figura 5.	Atividade arilesterase (A) e lactonase (B) da enzima PON2 em macrófagos THP-1, 24 h após a adição de erva-mate verde ou tostada.....	60
Figura 6.	Atividade arilesterase (A) e lactonase (B) da enzima PON2 em macrófagos THP-1, 24 h após a adição de ácido clorogênico ou de ácido caféico.....	62
Figura 7.	Expressão gênica da enzima PON2 em monócitos do sangue periférico obtidos antes (basal) e 2 h após a ingestão de 500 mL de água (controle) ou 500 mL de erva-mate verde ou tostada.....	67
Figura 8.	Expressão gênica da enzima PON2 em monócitos obtidos antes (basal) e 2 h após a ingestão de 500 mL de água (controle) ou 500 mL de erva-mate verde ou tostada.....	67
Figura 9.	Efeito da ingestão aguda de 500 mL de erva-mate verde ou tostada ou 500 mL de água (controle) na atividade arilesterase e lactonase da enzima PON2 em monócitos obtidos 2 h após as ingestões das bebidas ..	69
Figura 10.	Efeito da ingestão aguda de erva-mate verde ou tostada ou de água (controle) na atividade arilesterase e lactonase da enzima PON1 no plasma.....	71
Figura 11.	Expressão gênica da enzima PON2 em monócitos obtidos antes (basal) e após 7 dias da ingestão diária de 1 L de água ou 1 L de erva-mate verde ou tostada...	72

Figura 12. Expressão gênica da enzima PON2 em monócitos obtidos antes (basal) e após 7 d da ingestão diária de 1 L de água (controle) ou de 1 L de erva-mate verde ou tostada.....	73
Figura 13. Expressão gênica da enzima PON2 em macrófagos derivados de monócitos obtidos antes (basal) e após 7 dias da ingestão diária de 1 L de água (controle) ou 1 L de erva-mate verde ou tostada .....	73
Figura 14. Expressão gênica da enzima PON2 em macrófagos derivados de monócitos obtidos antes (basal) e após 7 d da ingestão de água ou erva-mate verde ou tostada.....	74
Figura 15. Efeito do consumo diário de 1 L de erva-mate verde ou tostada ou de água (controle), durante sete dias, na atividade arilesterase da enzima PON2 em monócitos e macrófagos derivados de monócitos.....	75
Figura 16. Efeito da ingestão diária de 1 L de água (controle) ou de 1 L de erva-mate verde ou tostada, durante sete dias, na atividade lactonase da enzima PON1 no plasma.....	76



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Conteúdo de fenóis totais, ácido clorogênico e capacidade antioxidante total da erva-mate .....	55
Tabela 2.	Características biodemográficas e clínicas das participantes no início do estudo.....	64
Tabela 3.	Hábitos alimentares das participantes.....	65
Tabela 4.	Composição da dieta das voluntárias do dia prévio ao período basal.....	66



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
AP-1	Proteína ativadora 1
AhR	Receptor Aril hidrocarboneto
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DCV	Doença cardiovascular
DEPC	Água dietil pirocarbonato
DHC	Dihidrocumarina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diaminotetra acético
FRAP	Potencial antioxidante redutor férrico
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PKA	Proteína quinase A
PMA	Forbol miristato acetato
PON	Enzima paroxonase
PPAR- $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator activated receptor-gamma</i> (Receptor ativado por proliferadores do peroxisoma)
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Transcrição reversa
SER	<i>Like sterol responsive element</i> (elemento responsivo a esterois)
SREBP2	<i>Sterol regulatory element binding protein 2</i> (proteína de ligação ao elemento de resposta a esterois)
TBARS	Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico
THP-1	<i>Human acute monocytic leukemia cell line</i> (linhagem de células de leucemia monocítica aguda humana)

uPA           Ativador de plasminogênio da urokinase  
VLDL         Lipoproteína de densidade muito baixa  
WHO         *World Health Organization* (Organização mundial da  
saúde)

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Protocolo experimental do estudo agudo e de curto prazo <i>in vivo</i> .....	49
---	----



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	29
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	31
2.1	<i>Ilex paraguariensis</i> .....	31
2.1.1	<b>Constituição química.....</b>	32
2.1.2	<b>Propriedades biológicas da <i>Ilex paraguariensis</i>.....</b>	34
2.2	PROCESSO INFLAMATÓRIO E OXIDATIVO DA ATEROSCLEROSE.....	35
2.3	ENZIMA PAROXONASE (PON).....	37
2.3.1	<b>Modulação da PON.....</b>	38
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	41
3.1	OBJETIVO GERAL.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	43
4.1	MATERIAL VEGETAL E REAGENTES.....	43
4.2	MÉTODOS.....	43
4.2.1	<b>Determinação do conteúdo de fenóis totais da erva- mate.....</b>	43
4.2.2	<b>Capacidade antioxidante total da erva-mate.....</b>	44
4.2.3	<b>Caracterização dos estudos.....</b>	44
4.2.4	<b>Protocolo experimental do estudo <i>in vitro</i>.....</b>	44
4.2.5	<b>Amostra dos estudos <i>in vivo</i>.....</b>	45
4.2.6	<b>Aspectos éticos da pesquisa.....</b>	46
4.2.7	<b>Instrumentos e técnicas de coleta de dados do estudo <i>in vivo</i>.....</b>	46
4.2.7.1	Avaliação Clínica e Antropométrica.....	46
4.2.8	<b>Protocolos experimentais dos estudos <i>in vivo</i>.....</b>	47
4.2.8.1	Estudo Agudo.....	47
4.2.8.2	Estudo de Curto Prazo.....	47
4.2.8.3	Isolamento de monócitos do sangue periférico .....	48
4.2.9	<b>Modulação da expressão da paroxonase2 pela erva- mate <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>.....</b>	50
4.2.9.1	Extração do RNA total dos monócitos, macrófagos e células THP-1.....	50
4.2.9.2	Transcrição reversa (RT).....	51

4.2.9.3	Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	51
4.2.10	<b>Medida da atividade arilesterase da enzima PON2.....</b>	52
4.2.11	<b>Medida da atividade lactonase da enzima PON2.....</b>	52
4.2.12	<b>Determinação das proteínas totais nas células THP-1, monócitos e macrófagos.....</b>	53
4.2.13	<b>Atividade arilesterase da enzima paroxonase1 (PON1) no plasma.....</b>	53
4.2.14	<b>Atividade lactonase da enzima PON1 no plasma.....</b>	53
4.2.15	<b>Análise Estatística.....</b>	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	55
5.1	ANÁLISE DO CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS, ÁCIDO CLOROGÊNICO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA ERVA-MATE.....	55
5.2	ESTUDOS <i>IN VITRO</i> .....	56
5.2.1	<b>Efeito da erva-mate na expressão gênica da enzima PON-2 <i>in vitro</i>.....</b>	56
5.2.2	<b>Efeito da erva-mate na atividade da enzima PON2 em macrófagos THP-1 <i>in vitro</i>.....</b>	59
5.3	ESTUDOS <i>IN VIVO</i> .....	63
5.3.1	<b>Características biodemográficas e clínicas das participantes do estudo.....</b>	63
5.3.2	<b>Efeito da ingestão aguda de erva-mate na expressão gênica da PON2 em monócitos.....</b>	66
5.3.3	<b>Efeito da ingestão aguda de erva-mate na atividade da PON2 em monócitos.....</b>	68
5.3.4	<b>Efeito da ingestão aguda de erva-mate na atividade da PON1 no plasma.....</b>	70
5.3.5	<b>Efeito da ingestão de erva-mate por sete dias na expressão gênica da PON2 em monócitos e macrófagos.....</b>	72
5.3.6	<b>Efeito da ingestão diária de erva-mate durante sete dias na atividade da PON2 em monócitos e em macrófagos.....</b>	74
5.3.7	<b>Efeito da ingestão de erva-mate por sete dias na atividade da PON1 no plasma.....</b>	75
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	77
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	87
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	89
	<b>APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e</b>	107



<b>Esclarecido.....</b>	
<b>APÊNDICE B – Questionário – Avaliação Clínica.....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.....</b>	<b>115</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis*, St. Hill., popularmente conhecida como erva-mate, é uma planta cultivada em alguns países da América do Sul. Suas folhas são utilizadas para o preparo de bebidas muito apreciadas pelo seu sabor amargo característico, como o chimarrão, o tererê e o chá mate tostado. Na região sul do Brasil, o chimarrão e o chá mate são as bebidas mais populares e seu consumo é considerado uma forma de interação social. A erva-mate possui muitos compostos bioativos, como ácidos fenólicos, saponinas, xantinas, minerais e vitaminas. Várias pesquisas já relacionaram o efeito desses compostos às propriedades hipocolesterolêmica, diurética, estimulante do sistema nervoso central, vasodilatadora, antioxidante, protetora do sistema cardiovascular e, inclusive, propriedade de inibir a progressão da aterosclerose experimental em coelhos. A aterosclerose é uma das principais causas de morbi-mortalidade da população mundial, com grande participação de reações oxidativas e inflamatórias na gênese e progressão da doença. Nesse contexto, de acordo com estudos epidemiológicos, a ingestão de alimentos vegetais com elevado conteúdo de compostos antioxidantes está inversamente associada ao desenvolvimento da aterosclerose.

Os seres humanos possuem elaborados sistemas de defesa antioxidante constituídos de enzimas e substâncias redutoras endógenas e exógenas. Além das enzimas antioxidantes clássicas, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, encontra-se também a enzima paroxonase (PON), cuja atividade está inversamente associada à aterosclerose. Existem três isoformas da paroxonase, PON1, PON2 e PON3, sendo que a PON1 é transportada na circulação ligada às lipoproteínas de alta densidade (HDL), contribuindo para a manutenção do transporte reverso do colesterol e inibindo a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), enquanto a PON2 está localizada no meio intracelular, particularmente importante nos monócitos e macrófagos das lesões ateroscleróticas e a PON3 está presente no fígado e rins. A atividade e a expressão gênica da PON podem ser moduladas por constituintes ambientais, genéticos e dietéticos. Recentemente, foi demonstrado que o suco de romã, rico em compostos fenólicos, aumentou a expressão gênica e a atividade da PON2 em macrófagos. Além disso, a ingestão de erva-mate promoveu aumento na atividade da PON1 no plasma. Acredita-se que isso pode ser devido à grande quantidade de antioxidantes presente nesses alimentos. Porém, não

existem informações sobre o efeito da erva-mate na expressão gênica da PON2 em macrófagos *in vitro* ou em monócitos e macrófagos de seres humanos.

Desta maneira, o objetivo do presente trabalho foi verificar se a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) – verde ou tostada – apresenta a propriedade de modular a expressão gênica e a atividade da enzima PON2 *in vitro*, em cultura de macrófagos, e *in vivo*, em monócitos e macrófagos derivados de monócitos obtidos após a ingestão das infusões de erva-mate por voluntárias saudáveis.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Ilex paraguariensis*

A *Ilex paraguariensis*, conhecida popularmente como erva-mate, é uma planta pertencente à família *Aquifoliaceae*, a qual apresenta cerca de 600 espécies, sendo 220 nativas da América do Sul, das quais 68 ocorrem no Brasil (RESENDE et al., 2000). A árvore de *Ilex paraguariensis* pode atingir 18 m de altura, floresce entre os meses de outubro a novembro e produz frutos de março a junho. Ela exige chuva em torno de 1200 mm durante o ano e temperatura de 21 a 22°C. É uma planta originária da Ásia e da região subtropical da América do Sul, e está presente no sul do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai. A maior produção se concentra na Argentina, seguida pelo Brasil e Paraguai (HECK; DE MEJIA, 2007). A produção anual de erva-mate no Brasil é de aproximadamente 230 mil toneladas (IBGE, 2009).

As folhas de *Ilex paraguariensis* são usadas para o preparo de bebidas que são consumidas na forma de infusão há centenas de anos pelas civilizações Pré-Colombianas, antes mesmo da chegada dos europeus na América do Sul, e cujo uso permanece até a sociedade atual. As bebidas são popularmente conhecidas como chimarrão, mate *cocido*, tererê e chá mate. O chimarrão e o mate *cocido* são consumidos no Sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Paraguai, enquanto o tererê é consumido no centro-oeste do Brasil e Paraguai. O chimarrão e o tererê são preparados com as folhas verdes, secas e moídas da erva-mate, as quais são colocadas dentro de um recipiente denominado “cuia” – feito a partir do fruto da poronga (*Lagenaria vulgaris*) – acrescidas de água quente ou fria, respectivamente, e consumidos por aspiração do líquido através de um canudo de metal, chamado “bomba”. O mate *cocido* refere-se à infusão preparada com folhas secas e moída de erva-mate verde, normalmente comercializada em sachês e consumida em xícara, de forma similar a outros chás, principalmente na Argentina. O chá mate, por sua vez, é feito a partir das folhas tostadas da erva-mate e consumido na região sudeste e sul do Brasil na forma de chá tradicional (chá mate) ou como bebida refrescante, tipo *ready to drink* (MAZZAFERA, 1997). As infusões de *Ilex paraguariensis* são consumidas em torno de um a dois litros por dia e constitui a principal alternativa para o café e o chá preto para milhares de pessoas. Além disso, o uso da erva-mate vem se difundindo nos Estados Unidos e na

Europa nos últimos anos (revisado por BASTOS et al., 2007; HECK; DE MEJIA, 2007).

O processamento da erva-mate é composto por três diferentes etapas: *i*) secagem rápida chamada "sapeco", feita no prazo de 24 h após a colheita, com o objetivo de inibir a atividade das enzimas polifenol-oxidases e diminuir a umidade das folhas; *ii*) secagem parcial, fase denominada "secado", que reduz a umidade para o nível entre 3 e 6% que normalmente ocorre em rotação, dentro de tambores aquecidos pela queima de madeira ou gás e; *iii*) secagem adicional e, posteriormente, fase de trituração, que consiste na fragmentação da erva-mate seca, chamada "cancheamento" (ESMELINDRO et al., 2002; BASTOS et al., 2006). As condições durante o processamento, como tempo e temperatura de secagem e outros parâmetros como sexo da planta, variabilidade genética e tipo de solo podem variar entre os diversos plantios e têm influência na qualidade, características sensoriais e quantidade de substâncias bioativas do produto final (RESENDE et al., 2000; ESMELINDRO et al., 2002).

Os primeiros trabalhos publicados sobre a erva-mate e saúde pública versam sobre dados epidemiológicos entre a relação de consumo de chimarrão e câncer de esôfago. Essa alta incidência de câncer esofágico na população está fortemente relacionada à temperatura da água e ao uso concomitante de cigarro e álcool; não às substâncias naturalmente presentes na planta. O mesmo fato é observado na Ásia, onde populações que ingerem grande quantidade de chá em temperatura elevada apresentam a mesma doença (revisado por BASTOS et al., 2007). Apenas na década de 1990, foi feito o primeiro estudo sobre o efeito antioxidante da erva-mate (GUGLIUCCI; STAHL, 1995) e a partir dessa época o interesse pelos efeitos biológicos da planta aumentou expressivamente na América do Sul.

### **2.1.1 Constituição química**

Em 1987, Alikaridis revisou a constituição química do gênero *Ilex*, incluindo as espécies nativas principalmente da Ásia e América do Sul, e relatou a presença de ácidos fenólicos, saponinas, xantinas, aminoácidos e outros compostos nitrogenados, ácidos graxos, antocianinas, flavonóides, compostos terpênicos, alcanos e álcoois, carboidratos, vitaminas e carotenóides (ALIKARIDIS, 1987).

O principal ácido fenólico presente na erva-mate é o ácido clorogênico, pertencente à família dos ácidos cinâmicos, que

compreende uma série de ácidos propenóicos com diferença apenas na substituição do anel benzênico (revisado por BASTOS et al., 2007). Em média, a quantidade de ácido clorogênico presente na erva-mate é de 92 mg por grama de folhas secas (DALL'ORTO et al., 2005). Estes compostos fenólicos estão amplamente distribuídos como conjugados na planta. Além do ácido clorogênico, outros compostos fenólicos também são encontrados no mate, como o ácido caféico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido p-cumárico, epicatequina e galocatequina (MORAIS et al., 2009). O teor de compostos fenólicos no extrato aquoso de erva-mate é maior que o do chá verde ou do vinho tinto (BIXBY et al., 2005). Porém, os compostos fenólicos encontrados na erva-mate apresentam diferença estrutural daqueles do chá verde, pois na erva-mate é maior a concentração de ácido clorogênico e não de catequinas (CHANDRA; de MEJIA, 2004).

O sabor amargo e a formação de espuma, característicos do chimarrão, são devidos à presença de saponinas. Saponinas são substâncias pertencentes ao grande grupo de glicosídeos amplamente distribuídos em plantas superiores. Elas se dissolvem facilmente em água para formar soluções coloidais que sob agitação formam espuma. As aplicações biológicas das saponinas são geralmente baseadas na formação de complexos com esteróides e ácidos biliares (revisado por BASTOS et al., 2007). Além disso, muitas das saponinas encontradas na espécie *Ilex* parecem possuir propriedade antiparasitária (TAKETA et al., 2004).

Os principais alcalóides purínicos (xantinas) da erva-mate são a cafeína e a teobromina, sendo que a teofilina está presente em menor quantidade (HECK; de MEJIA, 2007). A concentração de cafeína na erva-mate é semelhante àquela presente no café. Ou seja, um copo de 150 mL de chimarrão contém 78 mg de cafeína e a mesma quantidade de café apresenta em torno de 85 mg de cafeína (MAZZAFERA, 1997).

O conteúdo dos minerais presentes nas folhas da erva-mate é influenciado drasticamente pelas práticas agrícolas, uso de fertilizantes e tipo de solo. Assim, esses fatores exercem um impacto importante na quantidade dos minerais, dentre os quais se encontram o nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, cobre, ferro, manganês, níquel, zinco, alumínio, bário, cádmio, cobalto, cromo, sódio, chumbo e silício (revisado por BASTOS et al., 2007).

### 2.1.2 Propriedades biológicas da *Ilex paraguariensis*

Na medicina popular, a erva mate é indicada para o tratamento de várias desordens, como artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de fluidos, hipertensão, digestão lenta e doenças hepáticas (ANESINI et al., 2006).

Com base nos resultados de estudos científicos vêm-se demonstrando inúmeras propriedades da *Ilex paraguariensis* com potenciais benefícios à saúde humana, como por exemplo, estimulante do sistema nervoso central e diurética (GONZALEZ et al., 1993), hepatoprotetora (FILIP; FERRARO, 2003), redução de peso (ANDERSEN; FOGH, 2001; PITTLER; ERNST, 2004; OPALA et al., 2006), efeito anti-inflamatório (LANZETTI et al., 2008) e anti-viral (MÜLLER et al., 2007), ação vasodilatadora (MUCCILO-BAISCH et al., 1998; FELLIPI et al., 2006), estimulante do sistema cardiovascular (SCHINELLA et al., 2005), efeito hipocolesterolêmico em animais (PAGANINI-STEIN et al., 2005; PANG et al., 2008) e em seres humanos (MORAIS et al., 2009). Além disso, a erva-mate apresenta elevado potencial antioxidante *in vitro* (CAMPOS, 1996; CARINI et al., 1998; FILIP et al., 2000; SCHINELLA et al., 2000; VANDERJAGT et al., 2002; CHANDRA; MEJIA, 2004; BASTOS et al., 2006b), inibindo, inclusive, a oxidação *in vitro* e *ex vivo* do plasma e da LDL (GUGLIUCCI; STAHL, 1995; GUGLIUCCI, 1996; BRACESCO et al., 2003; SILVA et al., 2008).

A atividade antioxidante da erva-mate está associada ao seu conteúdo de polifenóis, particularmente de ácido clorogênico (SCHINELLA et al., 2000; FILIP et al., 2001). Foi demonstrado que após a ingestão, os compostos antioxidantes da erva-mate são absorvidos e aparecem no plasma circulante onde continuam a exercer o seu potencial antioxidante (GUGLIUCCI, 1996; SILVA et al., 2008). Em estudo de Silva e colaboradores (2008), demonstrou-se que a ingestão aguda da infusão de erva-mate por voluntários saudáveis aumentou a capacidade antioxidante do plasma e exerceu proteção *ex vivo* contra a peroxidação da LDL, indicando que os compostos antioxidantes permaneceram aderidos às partículas de LDL isoladas do plasma.

O extrato aquoso de erva-mate também tem o potencial de inibir a progressão da aterosclerose *in vivo*, em coelhos alimentados com colesterol (MOSIMANN et al., 2006). Além disso, em camundongos com aterosclerose, os quais apresentam disfunção



endotelial semelhante aos pacientes com doença arterial coronariana, a administração prolongada do extrato de erva-mate melhorou de forma significativa a reatividade vascular *ex vivo* (FELIPPI et al., 2006). Ou seja, a erva-mate reverteu a inibição da contração e do relaxamento vascular verificada nos animais com aterosclerose. Muccillo-Baisch e colaboradores (1998) já haviam demonstrado o efeito vasodilatador *in vitro* para o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em artéria mesentérica de ratos. Esses resultados foram confirmados utilizando anéis isolados de artéria aorta de ratos (FELIPPI et al., 2005). O fornecimento do extrato de erva-mate a ratos hipercolesterolêmicos também aumentou o relaxamento arterial *ex vivo* (PAGANINI-STEIN et al., 2005). O efeito ocorreu através do aumento da concentração de óxido nítrico, ou outro composto relacionado, o qual induziu o vasorelaxamento, bem como diminuiu a disfunção miocárdica provocada pela isquemia e reperfusão (SCHINELLA et al., 2005). Em seres humanos, foi demonstrado que a erva-mate melhorou o perfil lipídico sérico, principalmente pela redução da concentração de LDL-colesterol e aumento de HDL-colesterol em indivíduos dislipidêmicos (MORAIS et al., 2009), e diminuiu a concentração da glicemia de jejum e da hemoglobina glicada em pacientes diabéticos (KLEIN et al., 2010). Em pacientes hipercolesterolêmicos sob tratamento com estatina, a ingestão de erva-mate apresentou efeito sinérgico com este medicamento na redução do LDL-colesterol (MORAIS et al., 2009), bem como foi mais efetiva na melhora dos parâmetros lipídicos séricos quando associada com orientação nutricional (STEFANUTO et al., 2010).

Assim, tem sido sugerido que a erva-mate pode ser benéfica para o ser humano, aumentando a capacidade antioxidante e contribuindo para inibir a gênese e a progressão da aterosclerose.

## 2.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO E OXIDATIVO DA ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (SPOSITO et al., 2007). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO - *World Health Organization*), estima-se que 17 milhões de pessoas morrem de doenças cardiovasculares (DCV) a cada ano,

especialmente ataques cardíacos e acidente vascular cerebral. No Brasil, estima-se que houve 139 milhões de mortes devido às DCV no ano de 2002 (WHO, 2009b). Os principais fatores de risco para as DCV são valores elevados de colesterol sérico, particularmente LDL-colesterol, hipertensão arterial, diabetes, predisposição genética, tabagismo, idade avançada, dieta inadequada e sedentarismo (WHO, 2009c).

O processo inflamatório da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devido a diversos fatores de risco, como a elevação da concentração sérica de lipoproteínas aterogênicas (LDL; IDL – Lipoproteína de densidade intermediária; VLDL – Lipoproteína de densidade muito baixa). Como consequência, ocorre um aumento na permeabilidade da íntima favorecendo a entrada das lipoproteínas plasmáticas no espaço subendotelial e a oxidação das partículas de LDL por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. O depósito de lipoproteínas na parede arterial é o processo-chave no início da aterogênese de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma. Além de aumentar a permeabilidade, ocorre o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, processo estimulado pela presença de LDL oxidada. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial. Induzidos por proteínas quimiotáticas, os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, os quais por sua vez captam as LDL oxidadas (SPOSITO et al., 2007).

A LDL oxidada promove, assim, a formação da placa aterosclerótica através do recrutamento dos monócitos para a parede dos vasos, do aumento da captação dessas lipoproteínas aterogênicas pelos macrófagos e pela conseqüente formação das células espumosas (STOLCKER; KEANEY, 2004). As células espumosas, ou macrófagos repletos de lipídeos, são os principais componentes das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais e avançadas da aterosclerose (SPOSITO et al., 2007). As placas ateroscleróticas podem se calcificar e diminuir a luz do vaso sanguíneo. As lesões avançadas podem sofrer rompimento da camada fibrosa que recobre o núcleo lipídico, promovendo a migração de plaquetas e formação de trombos, os quais podem obstruir a luz do vaso causando complicações clínicas, como o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral (LUSIS, 2000).

Para diminuir o processo aterogênico é importante a ação da HDL, responsável pelo transporte reverso do colesterol, isto é, removendo o excesso de colesterol particularmente dos macrófagos e células espumosas no interior da íntima arterial, e transportando esse

colesterol para excreção via hepática. Além disso, a HDL possui efeito anti-inflamatório e antioxidante inibindo principalmente a oxidação da LDL (LUSIS, 2000; LINSEL-NITSHKE; TALL, 2005). O efeito antioxidante se deve principalmente à enzima paroxonase (PON), que contribui para o efeito anti-aterosclerótico (NG et al., 2005), protegendo, inclusive, a própria HDL, a LDL e os macrófagos contra o estresse oxidativo (SCHMIDT et al., 1999; AVIRAM; ROSENBLAT, 2004).

### 2.3 ENZIMA PAROXONASE (PON)

A paroxonase (PON; E.C.3.1.8.1 Arildialquilfosfatase) é uma enzima pertencente à família multigênica constituída pelos genes PON1, PON2 e PON3, os quais estão localizados no cromossomo 7q21.3-22.1 (PRIMO-PARMO et al., 1996). A PON é composta por 354 aminoácidos, possui peso molecular de aproximadamente 45 kDa e é dependente de cálcio (VAN LENTEN et al., 2001). A ação fisiológica da PON não está totalmente elucidada (VAN LENTEN et al., 2001; DRAGANOV; LA DU, 2004). No entanto, sabe-se que a enzima é responsável pela hidrólise do “paroxon” (de onde se origina seu nome), um produto do catabolismo do inseticida “paration”. Além disso, a PON é capaz de hidrolisar outros substratos, como acetato de fenila, ácidos carboxílicos aromáticos, compostos organofosforados, peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos presentes na LDL e em lesões ateroscleróticas humanas (WATSON et al., 1995; MACKNESS et al., 1996; NAVAB et al., 1997; AVIRAM et al., 1998; AVIRAM et al., 2000). Além disso, a PON parece oferecer propriedades protetoras em relação à intoxicação por compostos organofosforados e contra a doença cardiovascular (GOUÉDARD; BAROUKI; MOREL, 2004a).

A enzima PON1 encontra-se distribuída em vários órgãos, como fígado, rins e intestino, assim como no plasma, onde está associada à HDL (TOMÀS et al., 2004). Por outro lado, a enzima PON3 está presente no fígado e nos rins e a PON2 está amplamente distribuída em vários tecidos e células, como fígado, pulmão, placenta, testículo, coração, monócitos e macrófagos, porém está ausente no plasma (NG et al., 2001; ROSENBLAT et al., 2003; NG et al., 2005).

Dentre as três isoenzimas, a isoforma PON1 é a que possui quantidade maior de informações na literatura científica, porém todas as três enzimas apresentam atividade antioxidante, são moduladas por

diferentes mecanismos e parecem atuar em conjunto contra as situações deletérias do estresse oxidativo (NG et al., 2001; REDDY et al., 2001).

De acordo com inúmeros estudos, a PON1 parece diminuir a incidência de DCV, impedindo a oxidação da LDL e HDL, hidrolisando o fator de ativação plaquetária, fosfolípídeo bioativo envolvido no desenvolvimento da doença vascular, além de ser um antioxidante na circulação (AVIRAM et al., 1998; JAKUBOWSKI, 2000; RODRIGO et al., 2001; NG et al., 2006).

A expressão da enzima PON2 aumenta durante a diferenciação de monócitos para macrófagos, como resultado da ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e este efeito é mediado parcialmente pelo fator de transcrição da proteína ativadora 1 (AP-1) (SHINER; FUHRMAN; AVIRAM, 2004). Assim, enquanto o efeito antioxidante da isoforma PON1 ocorre no plasma e fluido intersticial, a PON2 atua intracelularmente reduzindo o estresse oxidativo, inibindo, inclusive, a oxidação da LDL e atenuando a resposta inflamatória (NG et al., 2006). Todos estes efeitos são considerados protetores contra a aterosclerose.

### **2.3.1 Modulação da PON**

A PON pode ser modulada por diversos fatores, como dieta, ingestão de álcool, medicamentos, tabagismo, idade e certas condições fisiopatológicas (COSTA et al., 2005). Desordens metabólicas como o diabetes *mellitus* e a hipercolesterolemia diminuem a atividade da PON1 (BOEMI et al., 2001; MACKNESS et al., 2002). Redução da atividade da PON1 também foi demonstrada em pacientes com doença renal (DANTOINE et al., 1998), artrite reumatóide (TANIMOTO et al., 2003), hipertireoidismo (RAISZADEH et al., 2004), Alzheimer (PARAGH et al., 2002), doenças hepáticas, cirrose (FERRÈ et al., 2002) e doenças cardiovasculares, como a aterosclerose (MACKNESS et al., 2000). Neste último caso, a diminuição da atividade da PON1 ocorreu, provavelmente, devido ao aumento do estresse oxidativo e da elevação do colesterol plasmático (AVIRAM; ROSENBLAT, 2005). De fato, Kabaroglu e colaboradores (2004) observaram diminuição na atividade da PON1 associada com o aumento do estresse oxidativo em pacientes com síndrome coronariana aguda e Tsuzura e colaboradores (2004) associaram a atividade diminuída da PON1 em pacientes com diabetes tipo 2 com a concentração elevada de LDL oxidada no plasma e

complicações vasculares. A ingestão de dieta rica em lipídeos, gordura saturada e *trans* diminuiu a atividade arilesterase da PON1 em seres humanos (SUTHERLAND et al., 1999) e em 60% em ratos (SHIH et al., 1996). O tabagismo também inibiu a atividade plasmática da PON1 (NISHIO; WATANABE, 1997) e trabalhadores expostos à radiação ionizante há mais de cinco anos apresentaram diminuição da atividade da PON (SERHATLIOGLU et al., 2003). Além disso, mulheres no período de pós-menopausa sem terapia de reposição hormonal também apresentaram atividade diminuída da PON1, em comparação com as mulheres que realizaram a terapia de reposição hormonal (SUTHERLAND et al., 2001). Por outro lado, a ingestão de álcool em doses moderadas aumentou a atividade da PON1 (van der GAAG et al., 1999; SIERKSMA et al., 2002), enquanto o consumo de doses elevadas diminuiu a atividade da enzima (RAO et al., 2003). Alguns medicamentos também podem modular a enzima PON. A aspirina promoveu elevação da atividade arilesterase e da expressão gênica da PON1 no plasma e hepatócitos de camundongos (JAICHANDER et al., 2008) e o tratamento com estatinas aumentou a atividade da PON1 no plasma de pacientes hipercolesterolêmicos (NAGILA et al., 2009; HARANGI et al., 2009) ou diabéticos (ABDIN et al., 2010). Pacientes com hipercolesterolemia apresentaram redução na expressão do RNAm da PON2 nos macrófagos, a qual foi normalizada pela terapia com atorvastatina, um tipo de estatina (ROSENBLAT et al., 2004).

A atividade da PON também depende das condições fisiológicas do indivíduo, ocorrendo alterações durante os diferentes ciclos de vida. Por exemplo, bebês prematuros apresentaram menor atividade plasmática da PON em comparação com bebês a termo (ECOBICHON; STEPHENS, 1973). Nos idosos, a atividade da PON1 diminui, provavelmente, devido ao aumento do estresse oxidativo, sendo que ambos os efeitos estão associados à incidência de aterosclerose (SENTI et al., 2001; SERES et al., 2004). Já foi demonstrado que durante a gravidez a atividade da PON1 encontra-se reduzida, tanto em animais como em seres humanos (WEITMAN; VODICNIK; LECH, 1983).

Por outro lado, os compostos bioativos de alimentos, plantas e extratos vegetais modulam positivamente a PON e vêm sendo considerados como alternativa interessante contra as doenças vasculares (SCHRADER et al., 2010). Assim, pesquisadores relataram que os antioxidantes dietéticos reduzem o grau de estresse oxidativo e, paralelamente, aumentam a atividade e a expressão gênica da PON1 em

ratos (AVIRAM, 2003). O consumo de antioxidantes dietéticos, como as vitaminas C e E, os polifenóis, ou o azeite de oliva extra-virgem e o ácido graxo ômega-3 aumentou a atividade da PON1 em seres humanos (WALLACE, et al., 2001; AVIRAM; FUHRMAN, 2002; JARVIK et al., 2002; ROSENBLAT et al., 2008).

Além de suas propriedades antioxidantes e da indução da atividade, os compostos polifenólicos, incluindo flavonóides, também possuem a capacidade de modular a expressão gênica da PON *in vitro*. Foi demonstrado que o suco de romã (KHATEEB et al., 2010), o resveratrol (GOUÉDARD; BAROUKI; MOREL, 2004a; CURTIN et al., 2008) e a quercetina (GOUÉDARD; BAROUKI; MOREL, 2004b; GONG et al., 2009; GARIGE et al., 2010) aumentaram a expressão da PON1 em linhagem de células hepáticas. Além disso, o suco de romã (SHINER; FUHRMAN; AVIRAM, 2007) e a quercetina (BOESCH-SAADATMANDI et al., 2009) elevaram a atividade e a expressão gênica da PON2 em macrófagos.

Em relação ao potencial efeito da erva-mate na enzima paroxonase, Menini e colaboradores (2007) relataram aumento na atividade sérica da PON1 após a ingestão de 500 mL de infusão de *Ilex paraguariensis* por indivíduos saudáveis. Mais recentemente, Bastos e Gugliucci (2009) descreveram que o ácido clorogênico – principal constituinte fenólico na erva-mate – preservou a PON1 contra degradações oxidativas *in vitro*. Com base em resultados de nosso laboratório, também verificamos que a ingestão prolongada de infusão de erva-mate verde (tipo chimarrão) ou tostada aumentou a atividade da PON1 no plasma de indivíduos dislipidêmicos (MORAIS, 2009; BOAVENTURA, 2010). No entanto, ainda não existem informações sobre a atividade e a modulação gênica da PON2 pela erva-mate *in vitro* ou em seres humanos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) – verde ou tostada – possui a propriedade de modular a expressão gênica e a atividade da enzima PON2 *in vitro*, em cultura de macrófagos, e *in vivo*, após a ingestão da infusão de erva-mate por voluntários saudáveis.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a expressão gênica da enzima PON2 *in vitro* em linhagem de macrófagos THP-1, incubados na presença e na ausência de concentrações crescentes do extrato de erva-mate verde ou tostada;
- Medir a atividade da enzima PON2 em macrófagos THP-1, cultivados na presença e na ausência de concentrações crescentes do extrato de erva-mate verde ou tostada;
- Verificar a expressão gênica da enzima PON2 em monócitos isolados de sangue periférico e em macrófagos derivados dos monócitos, antes e após a ingestão de infusão de erva-mate verde ou tostada por mulheres saudáveis;
- Medir a atividade da enzima PON2 em monócitos isolados de sangue periférico e em macrófagos derivados dos monócitos, obtidos antes e após a ingestão de infusão de erva-mate verde ou tostada por mulheres saudáveis;
- Medir a atividade da enzima PON1 no plasma das participantes, antes e após a ingestão das infusões de erva-mate verde ou tostada.





## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL VEGETAL E REAGENTES

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*), verde ou tostada, e os extratos secos obtidos por *spray-drying* foram fornecidos pela empresa Leão Júnior S.A. – Curitiba-PR. A espécie da planta foi identificada como autêntica *Ilex paraguariensis* pelo Prof. Dr. Daniel de Barcelos Falkenberg, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina.

As substâncias relacionadas a seguir foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha ou St. Louis, EUA): ácido clorogênico, ácido caféico, HISTOPAQUE<sup>®</sup>-1077, água dietil pirocarbonato (DEPC), acetato de fenila e dihidrocoumarina (DHC). O meio de cultura RPMI 1640 foi obtido da empresa Gibco Laboratories, Grand Island, NY, EUA. O soro fetal bovino foi comprado da Biotecnologia São Paulo – Brasil, o TRIzol<sup>®</sup> da empresa Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. Os kits utilizados para a RT e para a PCR Improm-II Reverse transcriptase e GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix, respectivamente, foram adquiridos da empresa Promega, USA.

O clorofórmio, isopropanol, etanol 75%, TRIS, citrato de sódio, cloreto de cálcio e os demais reagentes foram adquiridos de outras marcas nacionais. Todas as soluções foram preparadas com água destilada ou deionizada, com sais de pureza analítica.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Determinação do conteúdo de fenóis totais da erva-mate

O teor de fenóis totais na erva-mate foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, segundo metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999). Alíquotas do extrato aquoso de erva-mate verde ou tostada (50 µL) foram misturadas com 150 µL de etanol (95%), 800 µL de água destilada e 80 µL de Folin-Ciocalteu (50%). Após 5 min, foram adicionados 150 µL de carbonato de sódio 5% e a mistura permaneceu à temperatura

ambiente por 1 h, na ausência de luz. A leitura da absorbância do produto colorido foi realizada em comprimento de onda de 765 nm. O ácido clorogênico foi usado como padrão e os resultados foram expressos em mg equiv. ácido clorogênico por mililitro da infusão ou mmol equiv. ácido clorogênico por litro da bebida.

#### **4.2.2 Capacidade antioxidante total da erva-mate**

Tendo em vista a importância do potencial antioxidante de bebidas e alimentos na modulação da expressão e da atividade da PON2, a capacidade antioxidante total da erva-mate verde ou tostada utilizada no presente estudo foi confirmada através da medida do potencial antioxidante redutor férrico (FRAP – *ferric reducing antioxidant potential*). Neste ensaio, os antioxidantes presentes nas infusões foram avaliados como redutores do  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ , o qual é quelado pela 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo  $\text{Fe}^{+2}$ -TPTZ com absorção máxima em 593 nm (Benzie e Strain, 1996). Os resultados foram calculados utilizando Trolox como padrão, um análogo hidrossolúvel da vitamina E, e expressos como mmol equiv. Trolox por mililitro de infusão.

#### **4.2.3 Caracterização dos estudos**

O estudo *in vitro* se caracterizou como experimental, enquanto o estudo *in vivo* como do tipo experimental de intervenção e foi dividido em: *i*) estudo agudo com a ingestão de uma única dose de infusão de erva-mate e; *ii*) estudo de curto prazo, com a ingestão diária de infusão de erva-mate durante 7 dias. Em ambos os estudos, *in vivo* e *in vitro*, foram avaliados dois tipos de erva mate, verde (chimarrão) e tostada (chá mate).

#### **4.2.4 Protocolo experimental do estudo *in vitro***

As células da linhagem THP-1 ( $10^6$  células /mL) foram diferenciadas em macrófagos aderentes pela ação de forbol miristato

acetato (PMA; Sigma - St. Louis, MO, USA), (50 ng/mL) durante 48 h. Em seguida, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes (1–50  $\mu\text{M}$  de fenóis totais, equiv. ácido clorogênico) de erva-mate verde ou tostada por 24 h. Para verificar se os extratos de erva-mate poderiam afetar a viabilidade celular, a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Foi verificado que a erva-mate não diminuiu a viabilidade celular até a concentração de 10  $\mu\text{M}$ , porém nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  houve redução de 30 e 50%, respectivamente. Dessa forma, para o estudo *in vitro* foi utilizada a erva-mate verde ou tostada até a concentração de 10  $\mu\text{M}$ .

Após a diferenciação das células THP-1, os macrófagos foram incubados em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute* - Gibco Laboratories, Grand Island, NY, EUA) com concentrações crescentes de erva-mate verde ou tostada (0,8; 2,4; 4,0 e 8,0  $\mu\text{g/mL}$ , ou 1, 3, 5 e 10  $\mu\text{M}$  equiv. ácido clorogênico), ou com ácido clorogênico ou ácido caféico (1 - 10  $\mu\text{M}$ ), por 24 h. Após esse período, os macrófagos aderidos foram retirados com o uso de *cell scrap* (SPL Ciencor Scientific, São Paulo, SP) e transferidos para tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL. Após centrifugação (700 x g, 10 min, 25 °C), as células foram re-suspensas em TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para a extração do ácido ribonucléico (RNA) total. Além disso, alíquotas de células foram re-suspensas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 para a análise da atividade da PON2.

#### 4.2.5 Amostra dos estudos *in vivo*

Nos estudos *in vivo*, a amostra foi composta por 20 indivíduos saudáveis do sexo feminino, com idade entre 19 e 50 anos. As participantes foram recrutadas dentre as estudantes de graduação e de pós-graduação em Nutrição e Farmácia da UFSC e dentre as profissionais nutricionistas do HU-UFSC.

Foram excluídas do estudo as participantes com índice de massa corporal (IMC) inferior a 18,5  $\text{kg/m}^2$  ou superior a 24,9  $\text{kg/m}^2$ , tabagistas, portadoras de doenças cardíacas, hepáticas, renais ou gastrointestinais, com neoplasias, hipotireoidismo ou hipertireoidismo, dislipidemias, diabetes ou alcoolismo, atletas com atividade física intensa, presença de gravidez ou estado pós-menopausa ou, ainda,

aquelas que apresentaram qualquer anormalidade nos resultados dos exames laboratoriais de rotina realizados no primeiro encontro. Além disso, após o início do estudo foram excluídas as participantes que apresentaram intolerância à erva-mate ou que interromperam a ingestão de mate por mais de um dia.

Durante todo o período do estudo, as participantes foram instruídas a manter os seus hábitos regulares de vida, como a prática moderada de exercícios físicos e a alimentação de costume. Porém, elas se abstiveram de ingerir chimarrão, chá mate ou qualquer bebida ou produto à base de erva-mate nos 30 dias que antecederam o início do estudo. Da mesma forma, durante o período de intervenção, as participantes não consumiram erva-mate além daquela fornecida. Além disso, três dias antes de cada coleta sanguínea e durante o período do estudo foi solicitada a suspensão da ingestão de café, chás à base de *Camellia sinensis*, bebidas alcoólicas e sucos ricos em compostos antioxidantes.

#### **4.2.6 Aspectos éticos da pesquisa**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC, sob número 743/10 (Anexo A). A participação das voluntárias no estudo ocorreu mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1).

#### **4.2.7 Instrumentos e técnicas de coleta de dados do estudo *in vivo***

##### **4.2.7.1 Avaliação Clínica e Antropométrica**

Inicialmente, as participantes responderam um questionário com dados sócio-demográficos, história clínica, história familiar, alterações gastrointestinais, tabagismo, uso de medicamentos e atividade física (Apêndice 2).

Foram monitorados os parâmetros antropométricos (peso e altura). Para a aferição do peso, foi utilizada a balança digital da marca Marte® PP180 (Santa Rita do Sapucaí - MG) com capacidade máxima de 180 kg e sensibilidade de 0,1 kg. Os indivíduos, descalços ou usando

meias e vestindo roupas leves, permaneceram de pé sobre a plataforma, com os pés unidos, com o peso igualmente distribuído em ambos os pés e os braços pendentes ao lado do corpo (WHO, 1995).

A altura foi aferida através do antropômetro da marca Seca® com altura máxima de 220 cm e escala de 0,1 cm. As participantes permaneceram em pé, com os braços pendentes ao lado do corpo, colocando a superfície posterior dos calcanhares, as nádegas e a região occipital em contato com a parede. A cabeça foi posicionada de modo que a linha da visão ficasse perpendicular ao corpo. A régua foi posicionada até o ponto mais alto da cabeça com uma pressão suficiente para comprimir o cabelo (WHO, 1995). O IMC foi calculado por meio da razão peso (kg)/altura (m<sup>2</sup>) e classificado de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2000).

## **4.2.8 Protocolos experimentais dos estudos *in vivo***

### 4.2.8.1 Estudo Agudo

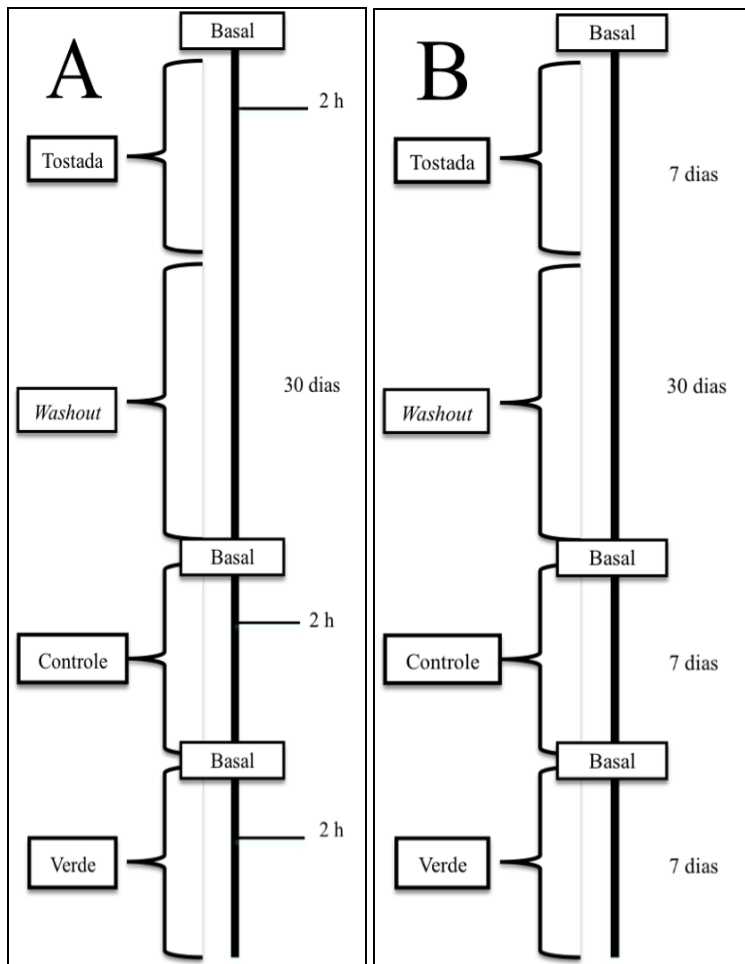
Vinte participantes em jejum de 12 h ingeriram 500 mL de infusão de erva-mate verde, erva-mate tostada ou água como controle. Imediatamente antes e após 2 h da ingestão, foram feitas coletas de sangue venoso em tubos com ou sem o anticoagulante ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA), utilizando-se sistema a vácuo (Vacuntainer-BD, São Paulo-SP), para o isolamento dos monócitos e do soro para posterior avaliação da expressão gênica e medida da atividade da paroxonase. Entre a ingestão dos dois tipos de erva-mate e da água foram mantidos intervalos de 30 dias.

### 4.2.8.2 Estudo de Curto Prazo

No estudo de curto prazo, os mesmos vinte indivíduos do estudo agudo continuaram a ingerir aproximadamente 1 litro diário de infusão de erva-mate comercial, verde ou tostada, durante sete dias. Cada participante recebeu 21 pacotes contendo 25 g de folhas secas e moídas de erva-mate verde ou 10 g de erva-mate tostada, fornecidas pela empresa Leão Júnior de Curitiba-PR. As participantes foram

instruídas a preparar as bebidas na proporção usual consumida pela população, adicionando 500 mL de água quente (85-90 °C) sobre o conteúdo de cada pacote. Após infusão por 10 min, as bebidas foram filtradas em coador para chás e as participantes ingeriram 330 mL das infusões, três vezes ao dia, por uma semana. Entre o período de consumo de cada tipo de erva-mate, foi mantido um tempo de *washout* de 30 dias, sendo que na quarta semana deste período o estudo foi repetido com a ingestão de água, como controle.

Antes e após os sete dias de cada período de intervenção ou de controle, amostras de sangue venoso foram coletadas, após jejum de 12 h, em tubos com ou sem EDTA, para o isolamento dos monócitos e do soro para a medida da expressão gênica e da atividade da paroxonase. Além disso, durante essas visitas, as participantes forneceram os formulários contendo o registro alimentar de três dias, o qual foi preenchido antes do início de cada etapa do estudo. O registro alimentar foi analisado no *software* DietPro<sup>®</sup> 5i – Software de Avaliação Nutricional e Prescrição Dietética (Universidade Federal de Viçosa – UFV – MG). As variáveis alimentares consideradas nesta análise foram o valor calórico total, carboidrato, proteína, lipídio, vitamina C e vitamina E.



**Esquema 1.** Protocolo experimental do estudo agudo (A) e de curto prazo (B) *in vivo*.

#### 4.2.8.3 Isolamento de monócitos do sangue periférico

As células mononucleares foram isoladas do sangue total por separação com gradiente de densidade com HISTOPAQUE<sup>®</sup>-1077 (densidade 1,077 g/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) do total de células recuperadas, os monócitos encontram-se na proporção de 95%

(BRANDT et al., 2003). Para tanto, 3 mL de sangue foram pipetados cuidadosamente sobre o 3 mL de histopaque. Os tubos foram centrifugados durante 20 min, 750 x g, e a camada de células foi aspirada com micropipeta. Em seguida, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e re-suspensas em 2 mL de PBS, as quais foram subdivididas em três alíquotas, sendo uma delas usada para quantificar a atividade da PON2, outra para medir a expressão gênica da PON2 e a terceira para os monócitos se diferenciarem em macrófagos.

Para a transformação em macrófagos, os monócitos foram cultivados em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, em garrafas de poliestireno de 75 cm<sup>2</sup> (TPP® - Suíça) na presença de 50 µL de PMA.

#### **4.2.9 Modulação da expressão da PON2 pela erva-mate *in vitro* e *in vivo***

##### **4.2.9.1 Extração do RNA total dos monócitos, macrófagos e células THP-1**

O RNA total das células foi extraído com TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), clorofórmio, isopropanol, etanol 75% e água dietil pirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) de acordo com metodologia descrita por Chomczynski e Sacchi (1987). Em resumo, 1 mL de TRIzol foi adicionado aos monócitos, macrófagos derivados de monócitos ou células THP-1 (máximo de 1 x 10<sup>6</sup> células) e a mistura foi mantida à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foi adicionado clorofórmio, o tubo foi agitado por 15 s e centrifugado a 12000 x g, por 15 min, a 4 °C. A fase aquosa foi coletada, misturada com isopropanol e mantida à temperatura ambiente por 10 min. Após centrifugação (12000 x g por 10 min, a 4 °C), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 75% e centrifugado novamente a 7500 x g, por 5 min, a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o tubo deixado aberto para total evaporação do etanol. Após esse período, foi adicionado 50 µL de água DEPC e a mistura foi incubada a 56 °C por 10 min. O conteúdo de RNA total foi quantificado por espectroscopia (NanoDrop 3300, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), com leituras de absorvância em 260 e 280 nm. Amostras com valores de



absorbâncias que forneceram razão superior a 1,8 foram utilizadas (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). O RNA total foi armazenado a -70°C para posterior transcrição e polimerização.

#### 4.2.9.2 Transcrição reversa (RT)

Alíquotas de RNA foram submetidas à reação de transcrição reversa para obtenção do cDNA, utilizando-se o sistema de reagentes *Improm-II Reverse Transcriptase* (PROMEGA – Madison, Wisconsin, USA). Inicialmente, 900 ng de RNA foi desnaturado com oligoDt e água *free nuclease*. Em seguida, o RNA foi misturado com ImProm-II™ 5X Reaction Buffer, cloreto de magnésio, desorribonucleotídeo trifosfatado (dNTP) e enzima transcriptase. A mistura foi incubada em termociclador (Mastercycler Personal, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 5 min a 25 °C e 60 min a 42 °C, seguida de inativação da enzima a 72 °C por 5 min. Após a síntese, o cDNA foi armazenado a -20 °C.

#### 4.2.9.3 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Para a realização da PCR, foi utilizado o sistema de reagentes GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA – Madison, Wisconsin, USA). Os seguintes *primers* foram utilizados para avaliar a expressão dos genes das enzimas PON2 e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH): PON2 sense, 5'-GGAGGAATACTAATGATGGATC-3'; anti-sense, 5'-CTGAATCAAATCCTTCTGCTAC-3'; GAPDH sense, 5'-CGTCTTACCACCATGGAGAA-3'; anti-sense, 5'-GAGGCAGGGATGATGTTCTG-3'.

A reação foi iniciada pela mistura de cDNA com os *primers sense* e *antisense* (10 mM cada), GoTaq® Green Master Mix e água *free nuclease* em volume final de 25 µL. Após desnaturação inicial a 94 °C por 30 s, seguida de 40 ciclos de desnaturação para o gene PON2 e 30 ciclos para o GAPDH a 94 °C por 30 s, foi feito o pareamento de cada par de *primer* por 30 s, 60 °C para o PON2 e 57 °C para o GAPDH, extensão a 72 °C por 30 s, seguida de extensão final a 72 °C por 10 min.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% a 60 V por 30 min e corados com brometo de etídio. As

bandas foram visualizadas em transiluminador sob luz UV em 320 nm e a intensidade das bandas foi quantificada com o auxílio do programa de análise digital NIH ImageJ1.40 (*National Institute of Health website*). O resultado da expressão gênica da PON2 foi apresentado em função da expressão do gene da GAPDH, como controle.

#### **4.2.10 Medida da atividade arilesterase da enzima PON2**

A atividade arilesterase da enzima PON2 nas células THP-1 e nos monócitos e macrófagos dos participantes do estudo *in vivo* foi determinada de acordo com o método descrito por Gouédard, Barouki e Morel (2004). As células foram lisadas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NP40 0,5% e inibidores de proteínas (*Protease Inhibitor Cocktail* – Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A reação foi iniciada com a adição de 100  $\mu$ L das células lisadas ( $1 \times 10^6$  células/mL), em 1 mL de tampão Tris HCl 50 mmol/L, pH 8,0, contendo  $\text{CaCl}_2$  1 mmol/L e o substrato acetato de fenila 5 mmol/L. A cinética da reação de formação do fenol foi monitorada com leituras a cada minuto, em comprimento de onda de 270 nm (Spectrum SP2000 – Xangai, China), a 25 °C. Para corrigir a hidrólise espontânea do acetato de fenila, foi incluído um branco da reação. Para o cálculo da atividade, se considerou o coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) de  $1,31 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . O resultado foi expresso em U/mg de proteína de células, sendo que uma unidade arilesterase corresponde a 1  $\mu$ mol de acetato de fenila hidrolisado por minuto, por mg de proteínas.

#### **4.2.11 Medida da atividade lactonase da enzima PON2**

A atividade lactonase da PON2 nas células THP-1 e nos monócitos e macrófagos foi avaliada conforme metodologia descrita por Shiner, Fuhrman e Aviram (2004). A reação foi iniciada com a adição de 50  $\mu$ L de células lisadas ( $1 \times 10^6$  células/mL) em 700  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, contendo  $\text{CaCl}_2$  1 mmol/L e o substrato dihidroocumarina (DHC) 1 mM. A cinética da reação de hidrólise foi monitorada com leituras a cada minuto após a adição do substrato, em comprimento de onda de 270 nm, a 25 °C. Para corrigir a hidrólise espontânea do DHC, foi incluído um branco da reação. Para o cálculo da

atividade, se considerou o coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) de  $1,295 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . O resultado foi expresso em unidade lactonase, a qual corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de DHC hidrolisado por minuto, por miligrama de proteína.

#### **4.2.12 Determinação das proteínas totais nas células THP-1, monócitos e macrófagos**

As proteínas totais foram determinadas segundo o método de Bradford (1976), utilizando a albumina bovina como padrão. Alíquotas dos lisados celulares (50  $\mu\text{L}$ ) foram adicionadas em 1 mL de azul de Coomassie e mantidas em ambiente escuro, à temperatura ambiente, por 5 min e a leitura da absorbância foi realizada em 595 nm.

#### **4.2.13 Atividade arilesterase da enzima paroxonase1 (PON1) no plasma**

A atividade arilesterase da enzima PON1 no plasma foi determinada de acordo com o método descrito por Gan e colaboradores (1991). A reação foi iniciada com a adição de 20  $\mu\text{L}$  de plasma diluído, em 2 mL de tampão Tris HCl 20 mmol/L, pH 8,0, contendo  $\text{CaCl}_2$  1 mmol/L e acetato de fenila 1 mmol/L, usado como substrato. A cinética da reação de formação do fenol foi monitorada durante 2 min, em comprimento de onda de 270 nm, a 25 °C. Para corrigir a hidrólise espontânea do substrato foi incluído um branco na reação. Para o cálculo da atividade, considerou-se o coeficiente de absorvidade molar de  $1,31 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . O resultado foi expresso em U/mL, sendo que uma unidade arilesterase corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de acetato de fenila hidrolisado por minuto, por mililitro de plasma.

#### **4.2.14 Atividade lactonase da enzima PON1 no plasma**

A atividade lactonase da PON1 no plasma foi medida de acordo com a metodologia descrita por Rock e colaboradores (2008). A reação foi iniciada com a adição de 60  $\mu\text{L}$  de plasma em 1 mL de tampão Tris-

HCl 50 mmol/L, pH 8,0, contendo  $\text{CaCl}_2$  1 mM e DHC 1 mmol/L, usado como substrato. A reação de hidrólise foi acompanhada por 1 min, a 25 °C, em comprimento de onda de 270 nm. Para o cálculo da atividade, considerou-se o coeficiente de absortividade molar ( $\epsilon$ ) do DHC em 270 nm de  $1,295 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . O resultado foi expresso em U/mL, sendo que uma unidade de atividade lactonase é equivalente à hidrólise de 1  $\mu\text{mol}$  de DHC por minuto, por mililitro de plasma.

#### 4.2.15 Análise Estatística

A estatística descritiva foi apresentada na forma de média e desvio-padrão ou erro padrão da média, enquanto os dados categóricos estão apresentados na forma de frequência absoluta e relativa. O número de participantes do estudo foi baseado em estudos semelhantes descritos na literatura (ROSENBLAT et al., 2004; ROCK et al., 2008; BOESCH-SAADATMANDI et al., 2009). O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliar a normalidade das variáveis contínuas e, quando necessário, utilizou-se a transformação logarítmica dos dados. Aos dados com distribuição gaussiana, aplicou-se o teste *t* pareado de Student para detectar as diferenças temporais do consumo da erva-mate ou de água (comparações intra-grupos) e a análise de variância (ANOVA *one way*) e teste complementar de Student-Newman-Keuls para as comparações inter-grupos. Nos dados que apresentaram distribuição não-gaussiana foi utilizado o teste de Wilcoxon (*Wilcoxon Signed Rank Test*) para comparações intra-grupos e a Kruskal-Wallis ANOVA *on Ranks* e teste complementar de Dunn para comparações inter-grupos. Às variáveis do estudo *in vitro* foi aplicado o teste *t* de Student ou o teste de Mann-Whitney para dados com distribuição normal ou não gaussiana, respectivamente. Para detectar as diferenças entre as variáveis categóricas foi aplicado o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Para todas as análises, foi considerado o nível de significância menor ou igual a 5% e utilizou-se o software *Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 12.0, para o tratamento estatístico dos dados.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS, ÁCIDO CLOROGÊNICO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA ERVA-MATE

Os resultados referentes ao teor de fenóis totais e ácido clorogênico e à capacidade antioxidante total presentes nas infusões de erva-mate verde e tostada, preparadas na proporção de 50 mg/mL e 20 mg/mL, respectivamente, estão representados na Tabela 1. As determinações foram feitas em duplicata em 8-10 diferentes infusões (extrações). Como é possível observar, com base no mesmo volume das bebidas, a erva-mate verde contém maior concentração de fenóis totais e ácido clorogênico e, por consequência, maior capacidade antioxidante, do que a erva-mate tostada (aproximadamente 2-3 vezes para as três variáveis;  $p < 0,001$ ). Os extratos secos de erva-mate verde ou tostada, os quais foram usados nos estudos *in vitro*, também contêm quantidades diferentes de fenóis totais e ácido clorogênico (cerca de 10% a mais no extrato de mate verde em relação ao mate tostado), porém isto não foi suficiente para modificar a capacidade antioxidante total dos extratos.

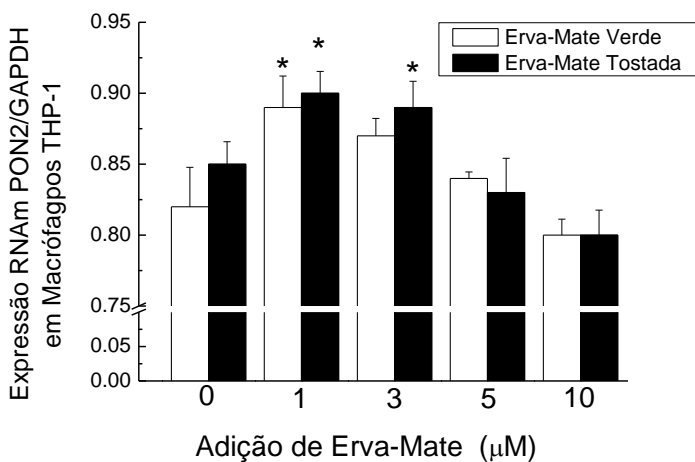
**Tabela 1-** Conteúdo de fenóis totais, ácido clorogênico e capacidade antioxidante total da erva-mate.

Erva-Mate	Fenóis Totais	Ácido Clorogênico <sup>1</sup>	CAT (FRAP)
Infusão	(mg/mL)	(mg/mL)	( $\mu$ mol/L)
Verde	4,78 $\pm$ 0,12	0,695 $\pm$ 0,04	22,8 $\pm$ 1,09
Tostada	1,25 $\pm$ 0,04*	0,121 $\pm$ 0,01*	6,9 $\pm$ 0,25*
Extrato Seco	(mg/g)	(mg/g)	( $\mu$ mol/g)
Verde	304,5 $\pm$ 0,01	39,8 $\pm$ 5,9	1,5 $\pm$ 0,07
Tostado	271,9 $\pm$ 0,01*	35,9 $\pm$ 4,5*	1,5 $\pm$ 0,05

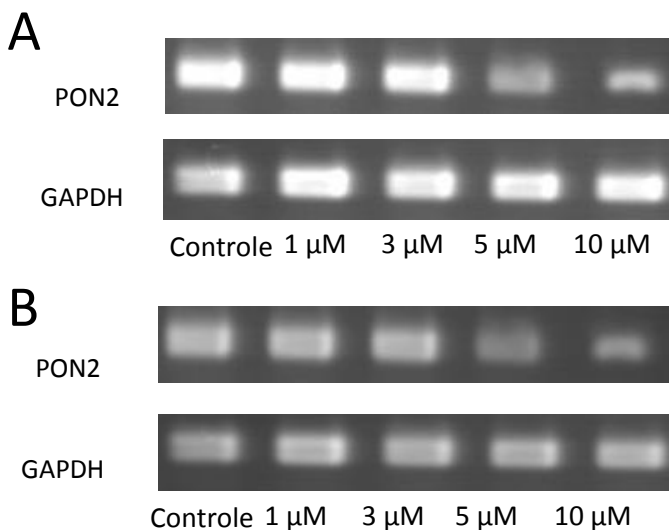
Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro-padrão de 8-10 determinações de diferentes extrações, em duplicata. \* $p < 0,001$  comparado à erva-mate verde. CAT = Capacidade antioxidante total; FRAP = *Ferric reducing antioxidant potential*. <sup>1</sup>Quantificação feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pela aluna Fernanda de Andrade e supervisão do Prof. Dr. Marcelo Maraschin do CCA-UFSC.

5.2 ESTUDOS *IN VITRO*5.2.1 Efeito da erva-mate na expressão gênica da enzima PON2 *in vitro*

Os macrófagos THP-1 foram incubados na ausência (controle) ou na presença de concentrações crescentes de erva-mate verde ou tostada (1 – 10  $\mu\text{M}$  fenóis totais equiv. ácido clorogênico) e a expressão gênica da enzima PON2 foi quantificada. Somente as concentrações menores de erva-mate (1 e 3  $\mu\text{M}$ ) foram efetivas no aumento da expressão gênica da PON2. Na presença de 1  $\mu\text{M}$  de erva-mate verde ou tostada houve elevação da expressão gênica em 6,1 e 8,5%, respectivamente ( $p < 0,05$ ; Figs. 1 e 2). Com a adição de 3  $\mu\text{M}$  de erva-mate foi observado aumento na expressão gênica da PON2 somente com a erva-mate tostada, em 4,7% ( $p < 0,05$ ).

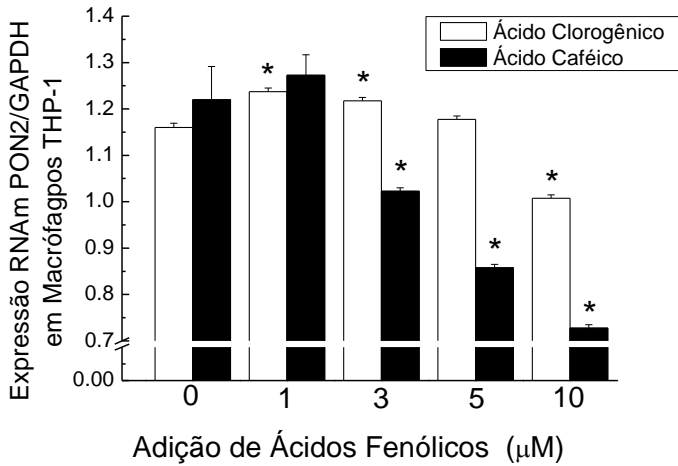


**Figura 1** – Efeito da adição de erva-mate verde ou tostada na expressão gênica da enzima PON2 em macrófagos THP-1, após 24 h. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão ( $n=4$ ). \* $p < 0,05$  comparado ao controle (0  $\mu\text{M}$ ).

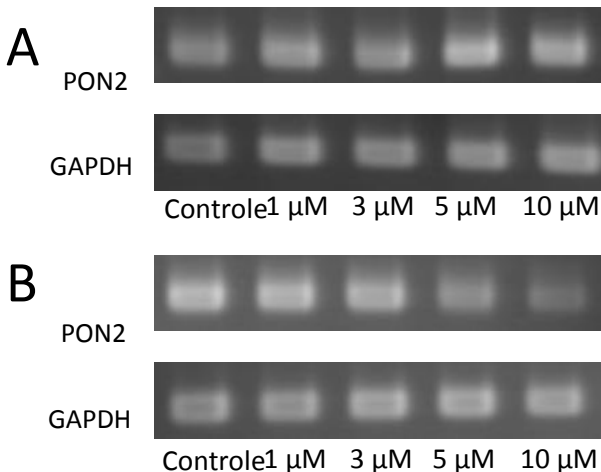


**Figura 2** – Expressão gênica da enzima PON2, em macrófagos THP-1, após 24 h de incubação com erva-mate verde (A) ou erva-mate tostada (B).

Na tentativa de verificar a participação de um dos principais compostos fenólicos da erva-mate, ou de seu metabólito plasmático, no aumento da expressão gênica da enzima PON2, as células THP-1 foram incubadas por 24 h com o ácido clorogênico e com o ácido caféico. Pelos resultados apresentados nas Figuras 3 e 4 pode-se observar que somente o ácido clorogênico promoveu aumento na expressão da PON2 nas concentrações 1 e 3  $\mu$ M (cerca de 6,7% e 5%, respectivamente;  $p < 0,05$ ). Além disso, o ácido clorogênico na concentração de 10  $\mu$ M e o ácido caféico nas concentrações de 3, 5 e 10  $\mu$ M modularam negativamente a expressão gênica da PON2 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3** – Efeito do ácido clorogênico e do ácido cafêico na expressão gênica da enzima PON2 em macrófagos THP-1, após 24 h. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão (n=4). \*p < 0,05 comparado ao controle.



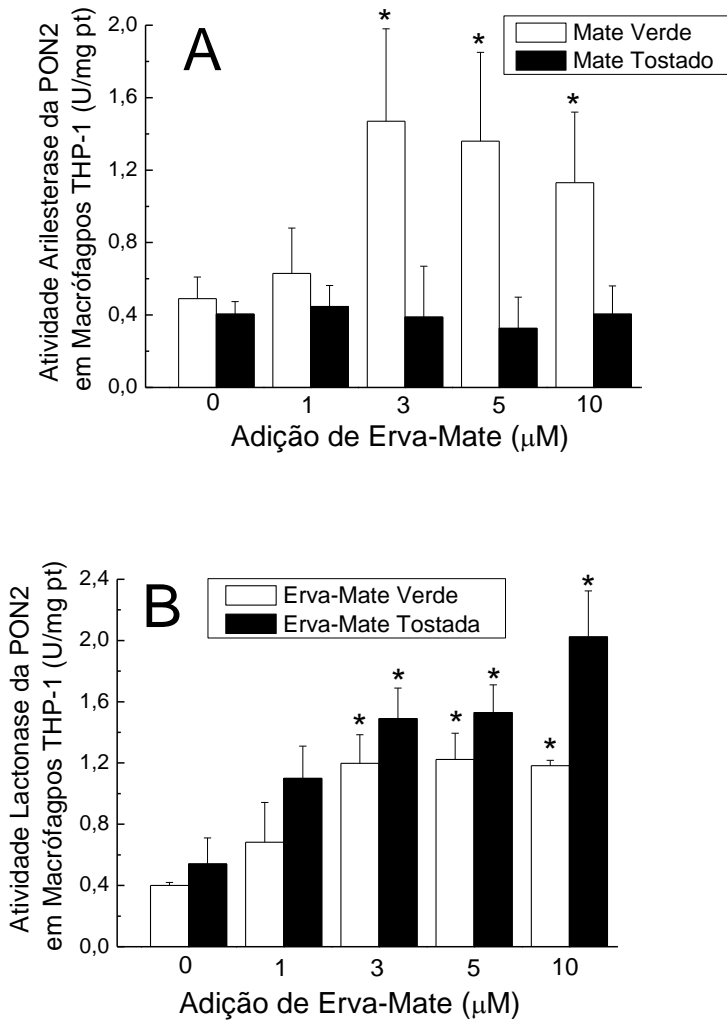
**Figura 4** – Expressão gênica da enzima PON2, em linhagem de macrófagos THP-1, após 24 h de incubação com o ácido clorogênico (A) ou com o ácido cafêico (B).



### **5.2.2 Efeito da erva-mate na atividade da enzima PON2 em macrófagos THP-1 *in vitro***

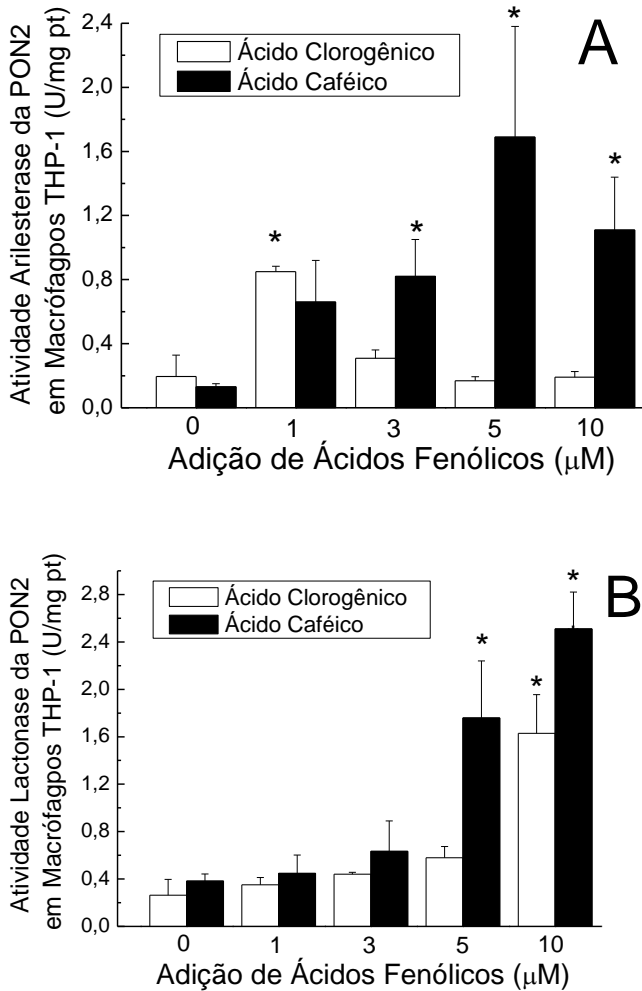
Os resultados da atividade arilesterase e lactonase nas células THP-1 incubadas com a erva-mate verde ou tostada estão representados na Figura 6. A adição de erva-mate verde nas concentrações de 3, 5 e 10  $\mu\text{M}$  equiv. ácido clorogênico promoveu elevação significativa na atividade arilesterase da PON2 de 230% (ou 3,3 vezes), 48% e 74%, respectivamente (Fig. 5A;  $p < 0,05$ ), enquanto a adição de erva-mate tostada não teve efeito na atividade arilesterase.

Da mesma forma, a adição de erva-mate verde nas concentrações de 3, 5 e 10  $\mu\text{M}$  equiv. ácido clorogênico aumentou a atividade lactonase da enzima PON2 nas células THP-1 em cerca de 200% para cada concentração (Fig. 5B;  $p < 0,05$ ). A erva-mate tostada nas concentrações de 3, 5 e 10  $\mu\text{M}$  também aumentou a atividade lactonase, em média, em 175, 185 e 275%, respectivamente (Fig. 5B;  $p < 0,05$ ).



**Figura 5** – Atividade arilesterase (A) e lactonase (B) da enzima PON2 em macrófagos THP-1, 24 h após a adição de erva-mate verde ou tostada. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão (n = 4). \*p < 0,05 comparado ao respectivo controle (0  $\mu$ M).

Os resultados relativos à atividade arilesterase e lactonase da PON2 nos macrófagos THP-1 após a adição do ácido clorogênico ou do ácido caféico estão representados na Figura 6. O ácido clorogênico na concentração de 1  $\mu\text{M}$  elevou significativamente a atividade arilesterase da PON2 em aprox. 4,2 vezes (ou 325%), enquanto o ácido caféico promoveu elevação significativa de 6,3; 13,0 e 8,5 vezes, com as concentrações de 3, 5 e 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 6A;  $p < 0,05$ ). Para a atividade lactonase da PON2 nos macrófagos THP-1 foi possível observar efeito positivo dos ácidos clorogênico e caféico somente com as maiores concentrações. A adição do ácido clorogênico na concentração de 10  $\mu\text{M}$  promoveu aumento significativo de 6,2 vezes na atividade lactonase, enquanto o ácido caféico nas concentrações 5 e 10  $\mu\text{M}$  elevou a atividade lactonase da PON2 em 4,6 vezes (360%) e 6,6 vezes (560%), respectivamente ( $p < 0,05$ ; Fig. 6B).



**Figura 6** – Atividade arilesterase (A) e lactonase (B) da enzima PON2 em macrófagos THP-1, 24 h após a adição de ácido clorogênico ou de ácido cafáico. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão (n = 4). \*p < 0,05 comparado ao respectivo controle (0  $\mu\text{M}$ ).

### 5.3 ESTUDOS *IN VIVO*

#### **5.3.1 Características biodemográficas e clínicas das participantes do estudo**

Vinte mulheres saudáveis, com idade de  $26,1 \pm 7,6$  anos e IMC de  $21,8 \pm 2,8 \text{ kg/m}^2$  participaram da pesquisa. No entanto, no estudo de curto prazo, cinco voluntárias não completaram a pesquisa com a erva-mate verde devido a efeitos colaterais, tais como taquicardia, insônia, ansiedade e irritação estomacal. Assim, 20 voluntárias participaram efetivamente do estudo agudo e 15 do estudo de curto prazo com ambos os tipos de erva-mate. As características biodemográficas e clínicas das participantes de cada estudo estão descritas na Tabela 2. Durante os períodos dos estudos as participantes não apresentaram variações significativas no peso corporal e IMC e no grau de sedentarismo. Aproximadamente 34% das voluntárias eram sedentárias, não praticando nenhum tipo de atividade física. Como também pode ser observado, não houve diferença nos parâmetros bioquímicos das participantes das diferentes fases do estudo e, inclusive, os parâmetros do perfil lipídico e glicêmico encontram-se dentro da faixa desejável ou de valores de referência, confirmando os critérios de inclusão.

**Tabela 2-** Características biodemográficas e clínicas das participantes no início do estudo.

	<b>Estudo Agudo</b>	<b>Estudo de Curto Prazo</b>	
	Erva-mate verde ou tostada	Erva-mate verde	Erva-mate tostada
Participantes (n)	20	15	20
Idade (anos)	26,3 ± 7,8	26,8 ± 8,7	26,3 ± 7,8
Peso (kg)	58,4 ± 8,9	59,4 ± 9,6	57,3 ± 9,0
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	21,9 ± 2,8	22,0 ± 2,9	21,6 ± 2,7
Sedentarismo (n)	7 (35%)	5 (33,3%)	7 (35%)
Colesterol Total (mg/dL)	160,5 ± 28,8	158,8 ± 34,8	160,3 ± 24,4
HDL-colesterol (mg/dL)	54,6 ± 13	58,2 ± 13,1	53,7 ± 11,8
LDL-colesterol (mg/dL)	67,5 ± 21,9	76,2 ± 34,2	71,5 ± 17,4
Triglicérides (mg/dL)	84,4 ± 32	79,2 ± 34,2	72,1 ± 34,8
Glicose (mg/dL)	78, 4 ± 3,9	73, 5 ± 3,1	72,2 ± 5,6

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão. n = número de participantes; IMC = Índice de massa corporal.

As participantes foram questionadas sobre o hábito de consumir erva-mate ou outras fontes de alimentos antioxidantes e os resultados estão descritos na Tabela 3. Em torno de 60% das participantes tinha o hábito de consumir erva-mate verde ou tostada, pelo menos uma vez na semana. Essa ingestão foi suspensa 30 dias antes do início do estudo. As participantes também tinham o hábito de consumir café, chás de *Camellia sinensis* ou de frutas, chocolate, suco, óleo de oliva e frutas cítricas, pelo menos uma vez na semana. Os resultados referentes à ingestão de vinho e de frutas oleaginosas, como castanha-do-Pará, castanha de caju, amêndoas e nozes, se referem ao consumo de pelo menos uma vez ao mês.

**Tabela 3** – Hábitos alimentares das participantes.

	<b>Estudo Agudo</b>		<b>Estudo de Curto Prazo</b>	
	Erva-mate verde n (%)	Erva-mate tostada n (%)	Erva-mate verde n (%)	Erva-mate tostada n (%)
Erva-mate <sup>1</sup>	12 (60)	13 (61,9)	9 (60)	12 (60)
Café <sup>1</sup>	19 (95)	19 (90,5)	14 (93,3)	19 (95)
Chás <sup>1</sup>	17 (85)	18 (85,7)	13 (86,7)	16 (80)
Chocolate <sup>1</sup>	19 (95)	20 (95,2)	14 (93,3)	19 (95)
Sucos <sup>1</sup>	19 (95)	20 (95,2)	14 (93,3)	19 (95)
Óleo de oliva <sup>1</sup>	14 (70)	15 (71,4)	11 (73,3)	14 (70)
Frutas cítricas <sup>1</sup>	17 (85)	18 (85,7)	13 (86,7)	18 (90)
Sementes oleaginosas <sup>2</sup>	8 (40)	9 (42,3)	7 (46,7)	9 (42,9)
Vinho <sup>2</sup>	5 (25)	5 (23,8)	3 (20)	5 (25)

Os resultados estão expressos como frequência (n) e porcentagem (%) dos participantes. <sup>1</sup>Consumo semanal; <sup>2</sup>Consumo mensal. Não houve diferenças significativas entre os diferentes grupos.

O consumo alimentar das participantes no dia anterior ao início de cada fase do estudo (período basal) foi avaliado através do registro alimentar. Posteriormente, foi analisado o valor calórico e o consumo de carboidrato, proteína e gordura, assim como a ingestão de algumas vitaminas antioxidantes (Tabela 4). O valor calórico total (VCT), carboidrato e lipídio não apresentaram diferenças nos três períodos. No entanto, o consumo de proteínas foi significativamente maior no dia anterior ao consumo da infusão de erva-mate tostada em comparação ao período controle. A ingestão de vitamina E foi abaixo do recomendado pelas DRIs (15 mg/d), assim como também o consumo de vitamina C (DRIs = 75 mg/d) durante o período de ingestão da erva-mate tostada.

**Tabela 4** – Composição da dieta das voluntárias do dia prévio ao período basal.

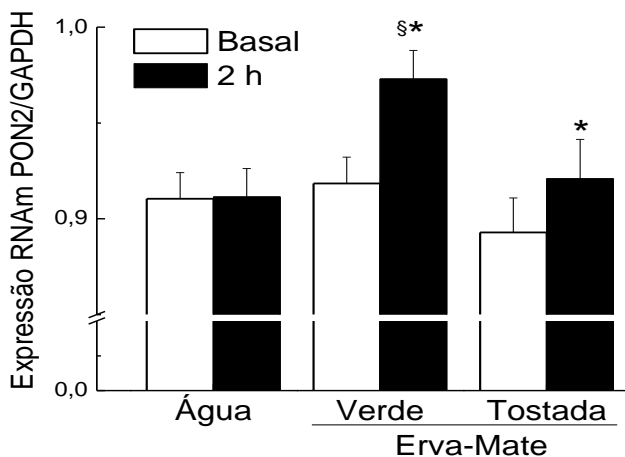
	<b>Controle</b>	<b>Erva-mate Verde</b>	<b>Erva-mate Tostada</b>
VCT (kcal)	1914,2 ± 295,1	2027,3 ± 476,1	1901,8 ± 325,2
Carboidrato (%)	57 ± 7,6	55,6 ± 9,6	47,8 ± 10,2
Proteína (%)	12,4 ± 3,4	14,4 ± 3,8	19,9 ± 2,6*
Lipídio (%)	30,6 ± 5,1	30 ± 5,7	32,3 ± 3,7
Vitamina E (mg)	8,79 ± 2,1	12,3 ± 1,9	12,1 ± 1,8
Vitamina C (mg)	98,5 ± 28,7	143,1 ± 57,8	67,1 ± 16,4

Os resultados estão expressos como média e desvio-padrão. VCT, valor calórico total. \*p < 0,05 comparado ao período controle.

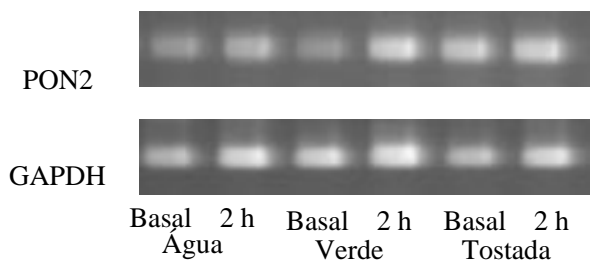
### 5.3.2 Efeito da ingestão aguda de erva-mate na expressão gênica da PON2 em monócitos

Os resultados da expressão gênica da enzima PON2 antes e 2 h após a ingestão de erva-mate verde ou tostada ou de água (controle) estão apresentados na Figura 7 e 8. Pode-se observar aumento significativo na expressão gênica após a ingestão da erva-mate verde em comparação ao respectivo basal e ao grupo controle (cerca de 6%; p < 0,05). A ingestão de erva-mate tostada também aumentou significativamente a expressão da PON2 (aprox. 3,5%; p < 0,05). Por outro lado, a ingestão de água não modificou a expressão da enzima. Quando os resultados foram comparados intergrupos, houve diferença significativa entre erva-mate verde e o grupo controle, 2 h após a ingestão das bebidas (p < 0,05; Fig. 7). Os dois tipos de erva-mate não apresentaram diferença significativa entre si, nem tampouco os períodos basais.





**Figura 7** – Expressão gênica da enzima PON2 em monócitos do sangue periférico obtidos antes (basal) e 2 h após a ingestão de 500 mL de água (controle) ou 500 mL de erva-mate verde ou tostada. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão ( $n = 20$ ). \* $p < 0,05$  comparado ao respectivo basal; § $p < 0,05$  comparado com o grupo controle (água).

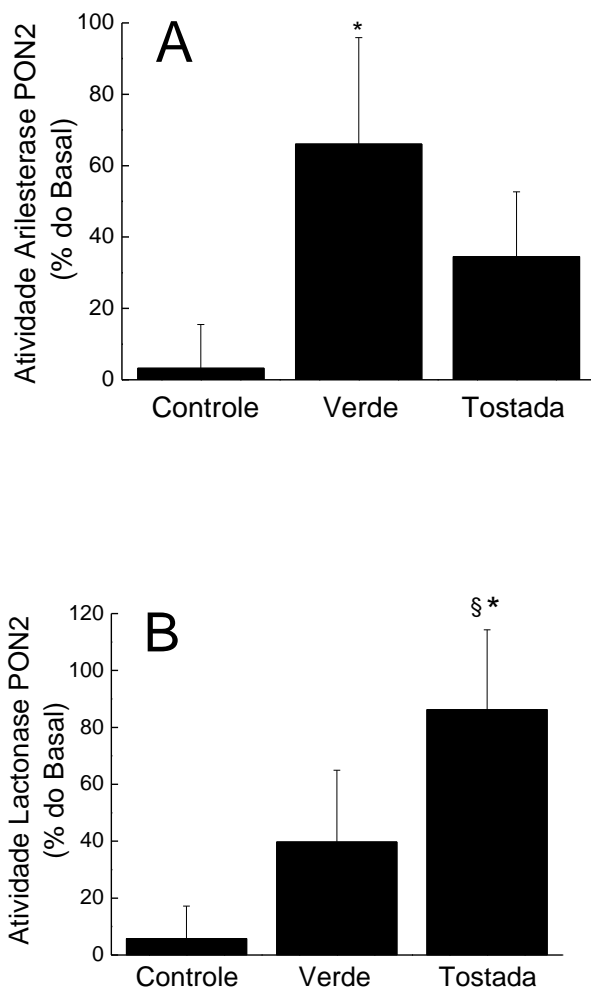


**Figura 8** – Expressão gênica da enzima PON2 em monócitos obtidos antes (basal) e 2 h após a ingestão de 500 mL de água (controle) ou 500 mL de erva-mate verde ou tostada.

### **5.3.3 Efeito da ingestão aguda de erva-mate na atividade da PON2 em monócitos**

Os resultados da atividade da enzima PON2 em monócitos obtidos 2 h após a ingestão de erva-mate estão apresentados na Figura 9. A ingestão das infusões de erva-mate verde promoveu elevação significativa de aproximadamente 60% na atividade arilesterase da PON2 em relação ao basal e ao grupo controle ( $p = 0,05$ ), cuja ingestão de água não modificou significativamente a atividade da PON2. Da mesma forma, o consumo de 500 mL de infusão de erva-mate tostada elevou a atividade arilesterase da PON2 em cerca de 30%, porém sem atingir diferença significativa (Fig. 9A). Vale destacar, no entanto, que 11 das 20 participantes que ingeriram a erva-mate tostada apresentaram aumento de 85%, em média, na atividade arilesterase da PON2 em relação ao período basal ( $p < 0,05$ ).

A atividade lactonase da PON2 também apresentou aumento de aproximadamente 40 e 85% nos monócitos após a ingestão das infusões de erva-mate verde (diferença não significativa) e tostada ( $p = 0,05$ ), respectivamente (Fig. 9B). Apesar da ausência de diferença significativa após a ingestão da erva-mate verde, foi observado que 10 dos 20 participantes apresentaram elevação de 95%, em média, na atividade lactonase da PON2 após o consumo do mate verde ( $p < 0,05$ ).

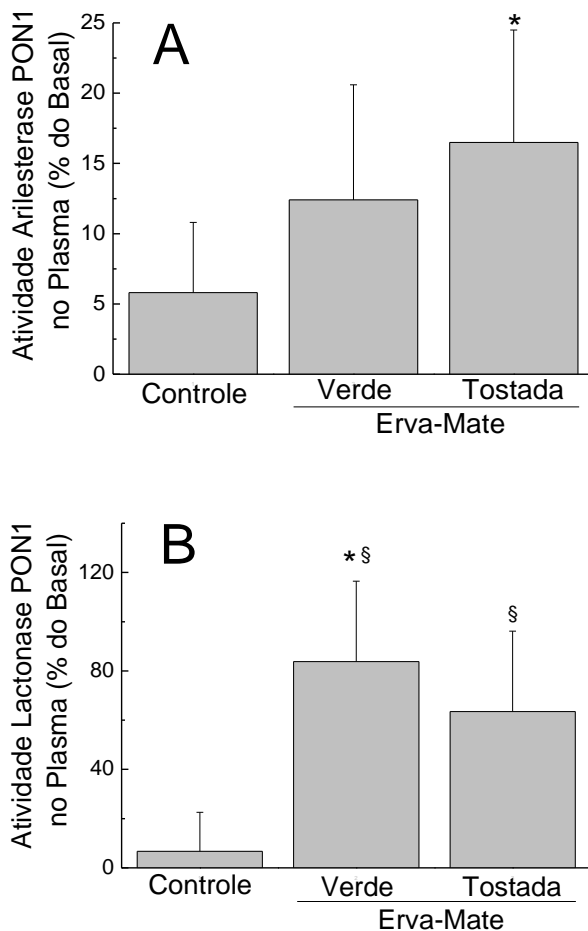


**Figura 9** – Efeito da ingestão aguda de 500 mL de erva-mate verde ou tostada ou 500 mL de água (controle) na atividade arilesterase (A) e lactonase (B) da enzima PON2 em monócitos obtidos 2 h após as ingestões das bebidas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão em relação ao período basal (antes das ingestões). \* $p = 0,05$  comparado ao grupo controle; § $p = 0,05$  comparado ao respectivo basal.

### **5.3.4 Efeito da ingestão aguda de erva-mate na atividade da PON1 no plasma**

A atividade da enzima PON1 foi igualmente determinada utilizando-se os substratos acetato de fenila (atividade arilesterase) e dihidrocoumarina (atividade lactonase) no plasma. Pode-se observar que houve tendência de aumento na atividade arilesterase após o consumo de água (5,8%) e da erva-mate verde (12,4%) e aumento significativo após a ingestão da infusão de erva-mate tostada (16,5%;  $p < 0,05$ ), em relação aos valores basais (Fig. 10A).

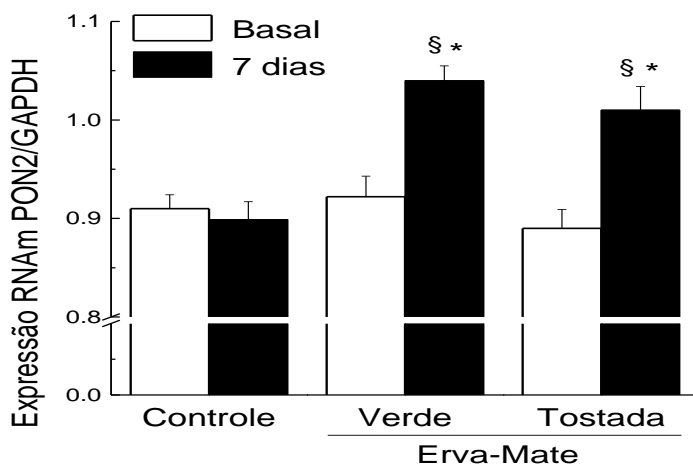
A ingestão aguda de erva-mate verde aumentou significativamente a atividade lactonase da PON1 em 84% em relação ao respectivo basal e ao controle ( $p < 0,05$ ), enquanto a erva-mate tostada promoveu elevação de 63,5% na atividade, com diferença significativa em relação ao controle (Fig 10B).



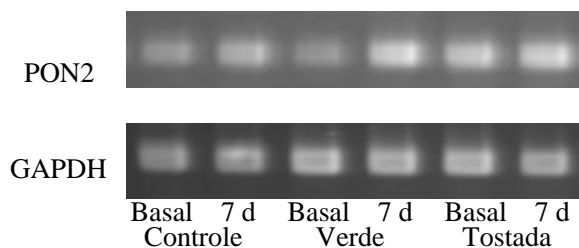
**Figura 10** – Efeito da ingestão aguda de erva-mate verde ou tostada ou de água (controle) na atividade arilesterase (A) e lactonase (B) da enzima PON1 no plasma. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão. \* $p < 0,05$  comparado ao respectivo basal. §  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.

### 5.3.5 Efeito da ingestão de erva-mate por sete dias na expressão gênica da PON2 em monócitos e macrófagos

Os resultados apresentados na Figura 11 e 12 mostram o efeito da ingestão de erva-mate verde ou tostada ou de água (controle) por sete dias na expressão gênica da enzima PON2 nos monócitos do sangue periférico. A ingestão da erva-mate verde ou tostada aumentou a expressão gênica da PON2 em comparação ao respectivo basal (13% e 13,5%, respectivamente;  $p < 0,05$ ), e em relação ao grupo controle, após a ingestão de água ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, a ingestão de água não modificou a expressão da enzima.

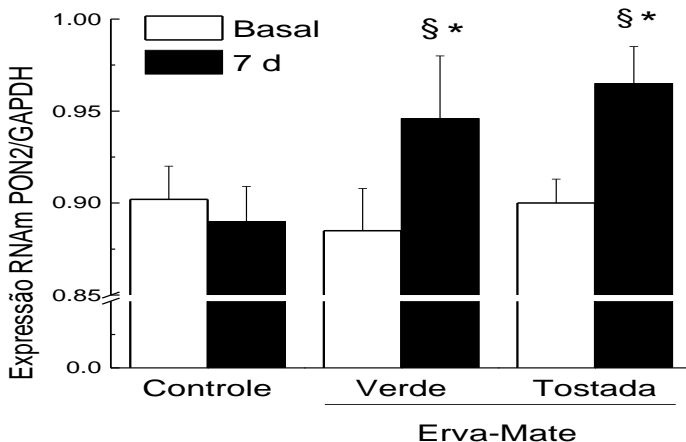


**Figura 11** – Expressão gênica da enzima PON2 em monócitos obtidos antes (basal) e após 7 dias da ingestão diária de 1 L de água ou 1 L de erva-mate verde ou tostada. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão. \* $p < 0,05$  comparado ao respectivo basal; §  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.

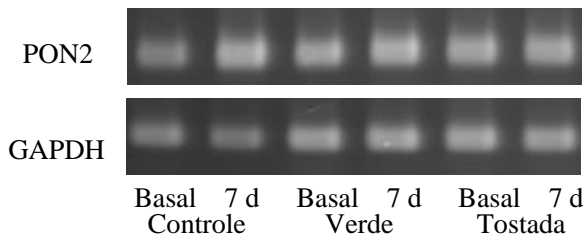


**Figura 12** – Expressão gênica da enzima PON2 em monócitos obtidos antes (basal) e após 7 d da ingestão diária de 1 L de água (controle) ou de 1 L de erva-mate verde ou tostada.

A ingestão da infusão de erva-mate verde ou tostada também aumentou a expressão gênica da PON2 nos macrófagos derivados de monócitos, tanto em relação ao respectivo basal como em comparação ao grupo controle, com elevação de aproximadamente 7% (Fig. 13).



**Figura 13** – Expressão gênica da enzima PON2 em macrófagos derivados de monócitos obtidos antes (basal) e após 7 dias da ingestão diária de 1 L de água (controle) ou 1 L de erva-mate verde ou tostada. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão. \* $p < 0,05$  comparado ao respectivo basal; §  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.



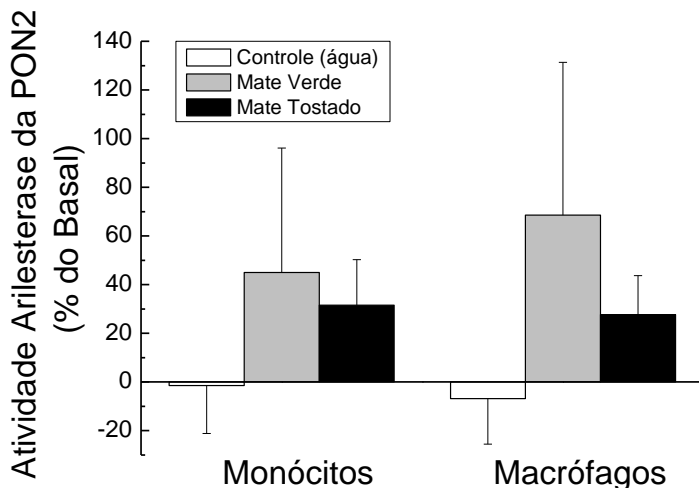
**Figura 14** – Expressão gênica da enzima PON2 em macrófagos derivados de monócitos obtidos antes (basal) e após 7 d da ingestão de água ou erva-mate verde ou tostada.

### 5.3.6 Efeito da ingestão diária de erva-mate durante sete dias na atividade da PON2 em monócitos e em macrófagos

No estudo de curto prazo (sete dias), a ingestão das infusões de erva-mate verde ou tostada não promoveu aumento significativo na atividade arilesterase da PON2 nos monócitos e nos macrófagos derivados de monócitos, provavelmente devido à grande dispersão dos dados (Fig. 15). No entanto, pode-se observar tendência de aumento na atividade arilesterase nos monócitos e macrófagos após a ingestão das infusões de erva-mate verde (45 e 68%, respectivamente) ou tostada (32 e 27%, respectivamente) em relação ao período basal, enquanto a ingestão de água (controle) promoveu tendência de diminuição da atividade. Além disso, para 11 das 20 participantes que ingeriram a erva-mate verde ou tostada houve aumento significativo de 92%, em média, na atividade arilesterase da PON2 nos monócitos. Enquanto oito e 11 participantes que consumiram erva-mate verde ou tostada apresentaram elevação significativa de 80 e 135%, respectivamente, na atividade arilesterase nos macrófagos ( $p < 0,05$ ).

A atividade lactonase nos monócitos aumentou em cerca de 40%, em média, somente após a ingestão da erva-mate tostada, embora sem atingir diferença significativa. Porém, nove dentre 20 participantes tiveram aumento significativo de 120% ( $p < 0,05$ ). Os resultados referentes à atividade lactonase da PON2 nos macrófagos foram inconclusivos devido a problemas metodológicos (resultados não mostrados).

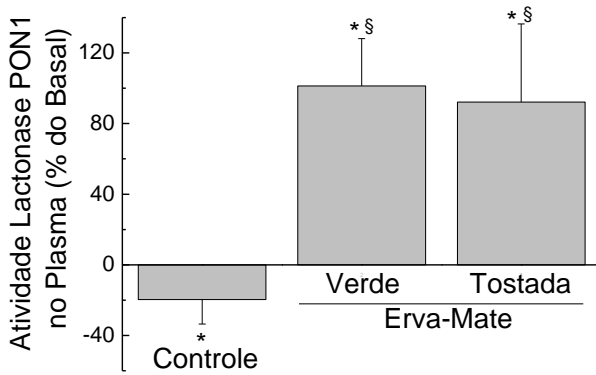




**Figura 15** – Efeito do consumo diário de 1 L de erva-mate verde ou tostada ou de água (controle), durante sete dias, na atividade arilesterase da enzima PON2 em monócitos e macrófagos derivados de monócitos. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro-padrão.

### 5.3.7 Efeito da ingestão de erva-mate por sete dias na atividade da PON1 no plasma

A ingestão da infusão de erva-mate verde ou tostada durante sete dias não modificou a atividade arilesterase no plasma (dados não mostrados). No entanto, a erva-mate verde promoveu aumento significativo de 101% na atividade lactonase da PON1 no plasma, enquanto a erva-mate tostada elevou a atividade em 92% em relação ao basal ou 120 e 112%, respectivamente, em relação ao controle ( $p < 0,05$ ; Fig. 16). Além disso, a ingestão de água (controle) promoveu diminuição significativa de 20% na atividade lactonase da PON1.



**Figura 16** - Efeito da ingestão diária de 1 L de água (controle) ou de 1 L de erva-mate verde ou tostada, durante sete dias, na atividade lactonase da enzima PON1 no plasma. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão. \* $p < 0,05$  comparado ao respectivo basal. § $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.

## 6 DISCUSSÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é a matéria prima para o preparo de bebidas popularmente consumidas em vários países da América do Sul. Considera-se que o elevado consumo de chimarrão seja a causa da relativa baixa incidência de doenças cardiovasculares na população do Rio Grande do Sul (BRASIL, 2008) e do Uruguai (FERREIRA et al., 1997), apesar da ingestão elevada de dieta rica em gordura saturada e colesterol. Os mecanismos bioquímicos sugeridos para este potencial efeito anti-aterosclerótico da erva-mate vêm sendo estudados e os efeitos antioxidante, hipocolesterolêmico e vasorelaxante podem estar dentre os mais prováveis.

A capacidade antioxidante da erva-mate foi uma das primeiras atividades biológicas descritas para a planta na literatura científica e vem sendo demonstrada desde meados dos anos 1990, quando Gugliucci e Stahl relataram em seu estudo pioneiro que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* inibiu a oxidação da LDL *in vitro* (GUGLIUCCI; STAHL, 1995). Seguidamente, diversos autores continuam a reportar a elevada atividade antioxidante de *Ilex paraguariensis* utilizando vários sistemas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* e por diferentes mecanismos, como seqüestro de radicais livres, inibição de radicais lipídicos e aumento da atividade de enzimas antioxidantes, dentre outros (revisado por BASTOS et al., 2007; HECK; DE MEJIA, 2007; BRACESCO et al., 2010). De particular importância é o aumento da atividade da enzima antioxidante PON1 plasmática após a ingestão aguda de infusão de erva-mate (MENINI et al., 2007). Mais recentemente, e na mesma linha de investigação, observamos que o consumo prolongado de erva-mate também elevou a atividade da PON1 em indivíduos dislipidêmicos (MORAIS, 2009; BOAVENTURA, 2010).

No entanto, até o presente momento, não existem estudos relacionando a erva-mate com a PON2, isoforma intracelular da enzima paroxonase. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial da erva-mate em modular a expressão gênica e/ou a atividade da enzima PON2 *in vitro*, em macrófagos da linhagem THP-1, e *in vivo*, em monócitos do sangue periférico e macrófagos derivados de monócitos obtidos após a ingestão aguda ou por sete dias de infusões de erva-mate verde (tipo chimarrão) ou tostada (chá mate) por mulheres saudáveis. Com base nos resultados do presente estudo, estamos demonstrando pela primeira vez que a erva-mate e o ácido clorogênico, seu principal composto fenólico constituinte, podem aumentar a expressão do RNAm

da PON2 e a atividade da enzima em macrófagos *in vitro*, enquanto o ácido caféico – metabólito do ácido clorogênico no plasma – não teve efeito na expressão gênica, porém aumentou a atividade da enzima. Além disso, e mais importante, a ingestão de infusões de erva-mate também elevou a expressão gênica e a atividade da PON2 em monócitos e macrófagos de mulheres saudáveis *in vivo*.

O extrato aquoso, ou infusão, de erva-mate contém inúmeros compostos fenólicos antioxidantes, principalmente derivados cafeoil-quinicos – como o ácido clorogênico – e polifenóis, e apresenta, inclusive, atividade antioxidante mais potente que o vinho tinto ou que os chás verde e preto (BIXBY et al., 2005; CAMPOS; SCOBAR; LISSI, 1996). Os extratos de erva-mate utilizados no presente estudo *in vitro* contêm cerca de 280 mg/g de fenóis totais e 37 mg/g de ácido clorogênico, enquanto as infusões de erva-mate verde e tostada ingeridas pelas participantes contêm, respectivamente, 4,8 e 1,25 mg/mL de fenóis totais e 0,70 e 12,0 mg/mL de ácido clorogênico (Tabela 1). A biodisponibilidade do ácido clorogênico em seres humanos não está totalmente elucidada. Porém, de acordo com Olthof, Hollman e Katan (2001), cerca de um terço do ácido clorogênico ingerido é absorvido no intestino delgado e o restante atinge o cólon, onde enzimas bacterianas hidrolisam o ácido clorogênico a ácido caféico e ácido quínico, sendo que o ácido caféico é altamente absorvido. Após a ingestão de café, bebida rica em ácido clorogênico, Monteiro e colaboradores (2007) detectaram a presença de ácido clorogênico e de seus isômeros no plasma, indicando sua absorção e metabolismo. Por outro lado, outros autores relataram que o ácido caféico foi o único ácido fenólico encontrado no plasma depois da ingestão de café (NARDINI et al., 2002). Dessa forma, além dos extratos de erva-mate, também investigamos neste trabalho os efeitos dos ácidos clorogênico e caféico na modulação e atividade da PON2.

No estudo *in vitro*, a incubação dos macrófagos THP-1 com os extratos de erva-mate verde ou tostada nas menores concentrações avaliadas, 1 e 3  $\mu\text{M}$  de fenóis totais (ou 0,8 e 2,4  $\mu\text{g/mL}$ ), provocou aumento na expressão do RNAm da enzima PON2, com elevações pequenas, porém significativas, de aproximadamente 5 a 8,5% (Figs. 1 e 2). No entanto, é interessante notar que o efeito positivo na expressão gênica não foi dependente da concentração de erva-mate utilizada, apresentando, inclusive, tendência à diminuição desta expressão com as concentrações mais elevadas, 5 e 10  $\mu\text{M}$ . Resultados semelhantes foram observados com a adição de ácido clorogênico ao meio de cultura dos macrófagos, enquanto a adição de 1  $\mu\text{M}$  de ácido caféico apresentou

efeito nulo e, até mesmo, nas concentrações de 3, 5 e 10  $\mu\text{M}$  houve inibição significativa da expressão da PON2 (Figs. 3 e 4). Dessa forma, embora não tenhamos avaliado o efeito dos demais compostos fenólicos da erva-mate, podemos concluir que o ácido clorogênico teve participação importante na modulação da expressão do RNAm da PON2 em macrófagos THP-1 pela erva-mate, promovendo elevação em concentrações menores e sendo responsável, pelo menos em parte, pela tendência à redução da expressão gênica quando quantidades elevadas de mate foram utilizadas. Não foram observadas diferenças significativas em relação ao tipo de erva-mate, verde ou tostada.

Corroborando os nossos resultados, outros autores reportaram que o suco de romã, rico em compostos fenólicos antioxidantes, ou o flavonóide quercetina aumentaram a expressão gênica da PON2 em macrófagos murinos *in vitro* (SHINER; FUHRMAN; AVIRAM, 2007; BOESCH-SAADATMANDI et al., 2009). Porém, contrário em parte aos resultados aqui apresentados, Shiner, Fuhrman e Aviram (2007) também demonstraram que o efeito de indução da expressão foi dependente da dose do extrato vegetal (até 50  $\mu\text{M}$  de polifenóis totais) e, inclusive, com maior grau de elevação na expressão gênica. Estas diferenças podem ser devidas aos tipos de células utilizadas nos vários estudos e/ou às características estruturais dos diferentes constituintes químicos presentes nos extratos vegetais. Além disso, considerando a gama de diferentes compostos presentes na erva-mate (BASTOS et al., 2007; HECK; DE MEJIA, 2007), não se pode descartar a possibilidade de que alguns constituintes, quando presentes em alta concentração no sistema, exerçam efeitos inibitórios na expressão do RNAm da PON2. Este poderia ser o caso para o ácido caféico, cujo teor na erva-mate é relativamente baixo (MORAIS et al., 2009), e que, em concentrações elevadas, inibiu a expressão gênica da PON2 *in vitro* (Figs. 3 e 4). Boesch-Saadatmandi et al. (2009) também reportaram que a adição do flavonóide quercetina na concentração de 20  $\mu\text{M}$  não aumentou a expressão da PON2 em macrófagos em relação à concentração de 10  $\mu\text{M}$ .

A adição dos extratos de erva-mate verde ou tostada e dos ácidos clorogênico ou caféico ao meio de cultura dos macrófagos THP-1 também promoveu aumento na atividade da PON2 (Figs. 5 e 6). Geralmente, tal elevação foi condizente com o aumento na expressão do RNAm verificado com as concentrações de 1 e 3  $\mu\text{M}$  de mate ou dos ácidos fenólicos, embora diferenças significativas nem sempre foram observadas, provavelmente devido à variação dos dados. Resultados semelhantes aos nossos foram descritos nos estudos com suco de romã e

quercetina (SHINER; FUHRMAN; AVIRAM, 2004; SHINER; FUHRMAN; AVIRAM, 2007; BOESCH-SAADATMANDI et al., 2009). Porém, curiosamente as concentrações maiores de mate ou dos ácidos fenólicos (5 e 10  $\mu\text{M}$ ), as quais apresentaram efeito nulo ou negativo na expressão gênica, também foram efetivas na elevação da atividade da PON2. No presente estudo, outros mecanismos de regulação da atividade da PON2 além da expressão do RNAm não foram avaliados, porém é possível sugerir que a elevação da atividade da PON2 pela erva-mate ou pelos ácidos fenólicos nas maiores concentrações, particularmente o ácido caféico, pode ter sido através da estabilização da proteína PON2, ou através do aumento da taxa translacional, mas não pelo aumento na expressão do RNAm da PON2.

A atividade da PON2 foi avaliada com dois substratos, acetato de fenila e dihidrocoumarina, caracterizando-se como atividade arilesterase e lactonase, respectivamente. Em geral, as duas atividades foram moduladas diferentemente pelos dois tipos de extratos ou de infusão de mate. Por exemplo, a erva-mate verde foi capaz de aumentar principalmente a atividade arilesterase, enquanto a erva-mate tostada teve maior efeito na atividade lactonase da PON2 de macrófagos THP-1 (estudo *in vitro*) e de monócitos e macrófagos derivados de monócitos (estudo *in vivo*). Semelhante à erva-mate, no estudo *in vitro* o ácido clorogênico não aumentou a atividade arilesterase da PON2, exceto na concentração de 1  $\mu\text{M}$  – a qual também aumentou a expressão do RNAm – mas verificou-se elevação na atividade lactonase com 10  $\mu\text{M}$  de ácido clorogênico. No momento, não temos explicações para estas diferenças entre o mate verde e o tostado em relação aos substratos da PON2, inclusive porque as eventuais diferenças na concentração e tipo de constituintes químicos dos dois tipos de mate não foram totalmente esclarecidas. Segundo Shiner, Fuhrman e Aviram (2007), os diferentes efeitos de vários compostos fenólicos na regulação da atividade da PON2 podem ser devido às diferenças nas suas estruturas moleculares ou na via de sinalização celular que eles ativam. Com base em nossos resultados preliminares podemos acrescentar que, além das diferenças estruturais, a regulação da atividade da PON2 também parece ser dependente da concentração dos constituintes químicos no sistema. Porém, estudos adicionais deverão ser conduzidos com o objetivo específico de explicar os mecanismos de ação da erva-mate e de seus compostos constituintes na regulação da expressão gênica e da atividade da PON2, inclusive a importância da atividade antioxidante da erva-mate, a qual foi confirmada por ensaios *in vitro* (Tabela 1).

Considerando que os extratos de erva-mate verde ou tostada aumentaram a expressão do RNAm e a atividade da PON2 em macrófagos THP-1 *in vitro*, avaliamos se esses efeitos poderiam igualmente ocorrer em seres humanos após a ingestão aguda (2 h) ou por curto prazo (7 dias) das infusões de erva-mate. Vinte mulheres jovens e saudáveis aceitaram participar da pesquisa e, portanto, no presente estudo não temos resultados dos efeitos da erva-mate na expressão e atividade da PON2 em homens. Porém, em estudos anteriores foi observado que a ingestão da erva-mate modulou a atividade plasmática da PON1 igualmente em homens e mulheres (MORAIS, 2009; BOAVENTURA, 2010).

O consumo agudo de 500 mL de erva-mate verde ou tostada pelas participantes aumentou a expressão gênica da enzima PON2 nos monócitos do sangue periférico, sendo significativa após a ingestão da infusão de erva-mate verde, em aproximadamente 6%, em relação ao período basal ou ao grupo controle após a ingestão de água. A ingestão da erva-mate tostada também promoveu pequena, porém significativa, elevação de 3,5% em relação ao período basal (Figs. 7 e 8). Este aparente maior efeito da erva-mate verde na expressão do RNAm da PON2 em relação à erva-mate tostada, embora sem diferença significativa, pode ser devido a menor concentração de fenóis totais, incluindo do ácido clorogênico, na infusão de mate tostado (Tabela 1). Considerando a ingestão de 500 mL de infusão, as participantes consumiram 2,4 g de fenóis totais com o mate verde e 0,62 g com o tostado. Semelhante ao estudo *in vitro*, a ingestão das infusões de erva-mate também aumentou significativamente a atividade da PON2 nos monócitos. Mais especificamente, a erva-mate verde promoveu elevação de 60%, em média, na atividade arilesterase, enquanto o mate tostado aumentou a atividade lactonase em 85% (Fig. 9). Entretanto não houve diferença significativa entre as atividades dos dois tipos de mate, independente do substrato. Variações na regulação da atividade da PON2 podem ser explicadas pelas diferenças individuais na absorção e metabolismo dos compostos antioxidantes, como mostradas em estudos que determinaram o perfil de distribuição dos compostos e metabolitos do ácido clorogênico na urina e no plasma humano (MONTEIRO et al., 2007; NARDINI et al., 1995; NATELLA et al., 2002). De qualquer maneira e conforme mencionado anteriormente, neste momento não temos justificativas para os resultados das especificidades da erva-mate verde e tostada frente aos diferentes substratos da PON2. Vale notar, contudo, que o grau de magnitude na elevação da atividade da PON2 pela erva-mate foi expressivamente superior à indução da expressão do

RNA<sub>m</sub> da enzima, sugerindo a existência de mecanismos adicionais além da expressão gênica na regulação da atividade, semelhante ao que foi observado no estudo *in vitro*.

O consumo das infusões de erva-mate verde ou tostada por sete dias também promoveu elevações significativas e, inclusive, mais consistentes na expressão do RNA<sub>m</sub> (cerca de 13% para os dois tipos de mate; Figs. 11 e 12). Não foi possível encontrar diferenças significativas para a atividade da PON2 devido à grande dispersão dos dados (Fig. 15). Porém, é possível observar certa tendência à elevação da atividade após a ingestão das infusões de erva-mate. Considerando a ingestão diária de 1 L das infusões, cada participante consumiu diariamente cerca de 4,8 g de fenóis totais e 0,7 g de ácido clorogênico com a erva-mate verde e cerca de 1,2 g de fenóis totais e 0,12 g de ácido clorogênico com a erva-mate tostada. É interessante ressaltar que a ingestão das infusões durante uma semana eliminou a aparente diferença entre os dois tipos de erva-mate observada após a ingestão aguda, indicando que a concentração dos compostos bioativos na erva-mate tostada, mesmo em menor teor em comparação ao mate verde, foi suficiente para promover o efeito positivo na indução da expressão gênica.

Em conjunto, os resultados dos estudos *in vivo*, agudo e de curto prazo, confirmaram os achados do estudo *in vitro*, indicando dessa forma que os constituintes presentes nas infusões de erva-mate foram absorvidos, atingiram a circulação e foram captados pelos monócitos onde exerceram os efeitos regulatórios na PON2. Estes resultados são particularmente importantes, pois até o momento, foi encontrado na literatura apenas um estudo que tenha avaliado a expressão gênica da PON2 em monócitos do sangue periférico de seres humanos (BOESCH-SAADATMANDI, 2009). Neste estudo foi demonstrado que a ingestão do flavonóide quercetina, durante uma semana, não aumentou a expressão do RNA<sub>m</sub> da PON2, embora tenha promovido este efeito *in vitro*. Os autores justificaram a ausência de efeito *in vivo* com base na pequena concentração plasmática da quercetina, devido à baixa absorção e/ou elevado metabolismo do flavonóide (BOESCH-SAADATMANDI, 2009). Embora no presente estudo não tenhamos medido os compostos fenólicos ou os ácidos clorogênico e caféico no plasma das participantes, mas de acordo com a semelhança dos resultados de ambos os estudos *in vitro* e *in vivo*, principalmente do grau de indução da expressão gênica, podemos sugerir que a quantidade diária ingerida de ácido clorogênico (cerca de 2 mM no mate verde e 0,35 mM no tostado), o qual foi parcialmente metabolizado a ácido caféico (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN 2001; NARDINI et al., 2002;



MONTEIRO et al., 2007), foi suficiente e responsável pela indução da expressão gênica e atividade da PON2 nos monócitos *in vivo*. Condizente com os nossos resultados, foi demonstrado recentemente que a ingestão da erva-mate tostada durante uma semana também promoveu aumento significativo na expressão gênica das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase em leucócitos do sangue periférico de mulheres saudáveis (MATSUMOTO et al., 2009).

No presente estudo *in vivo*, verificamos também a expressão e atividade da PON2 nos macrófagos derivados dos monócitos do sangue periférico, após a transformação em cultivo por sete dias. Os macrófagos aderentes também apresentaram aumento na expressão do RNAm e tendência à elevação na atividade da PON2 após a ingestão das infusões de erva-mate (Figs. 13 e 15). De acordo com Shiner, Fuhrman e Aviram (2004), ocorre aumento na expressão gênica da PON2 durante a diferenciação de monócitos THP-1 a macrófagos pela adição de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3. Em nosso estudo, não observamos aumento da expressão da PON2 durante a transformação sem aditivos dos monócitos de sangue periférico em macrófagos. De qualquer maneira, não houve diminuição da expressão e durante a diferenciação em macrófagos praticamente foi mantido o grau de expressão do RNAm da PON2. Com base nestes resultados, confirmamos o efeito da erva-mate verde ou tostada na modulação gênica da enzima PON2, tanto em monócitos como em macrófagos.

O mecanismo de ação da erva-mate ou dos ácidos clorogênico e caféico na modulação da expressão gênica da PON2 em linhagem de macrófagos humanos ainda não foi descrito. Porém, Shiner, Fuhrman e Aviram (2007) relataram que o suco de romã aumentou a indução da expressão do RNAm e da proteína PON2 em macrófagos murinos por meio da ativação do receptor nuclear PPAR- $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*) e do fator de transcrição AP-1 (*activator protein 1*), o qual está presente na região promotora do gene PON2 (SHINER; FUHRMAN; AVIRAM, 2004), favorecendo, desta forma, a sua expressão gênica. Além disso, foi demonstrando que a ativação transcricional do gene PON2 em macrófagos de camundongos é regulado diretamente pelo complexo “glicococorticóide-receptor de glicocorticóides”, o qual, por sua vez, pode afetar a ativação da AP-1 (LIM; KIM, 2009). Vale notar que o suco de romã induziu a expressão do RNAm da PON2 em cerca de oito vezes mais do que o ativador sintético do PPAR- $\gamma$ , rosiglitazona, indicando que além do PPAR- $\gamma$  a bebida ativa outros sinalizadores celulares que afetam positivamente a expressão da PON2 (SHINER; FUHRMAN; AVIRAM, 2007).

Considerando que compostos fenólicos, como o ácido gálico, o qual também está presente na erva-mate (MORAIS et al., 2009), regulam positivamente e ativam a expressão do PPAR- $\gamma$  (HUANG et al., 2005; SHINER; FUHRMAN; AVIRAM, 2007), é plausível considerar que esta seja uma via pela qual os compostos fenólicos da erva-mate também podem aumentar a expressão do RNAm da PON2. Porém, estudos adicionais deverão ser realizados para esclarecer o mecanismo de ação da erva-mate e de seus constituintes na indução da expressão do RNAm da PON2.

A ativação do PPAR- $\gamma$  por compostos fitoquímicos já foi relatada em vários estudos e, inclusive, o suco de romã e seus principais constituintes, punicalagina e ácido gálico, também estimularam a expressão da isoforma PON1 em hepatócitos humanos *in vitro* por meio desta via (KHATEEB et al., 2010). Mediadores da ativação do PPAR- $\gamma$  incluem a proteína quinase A (PKA), a qual atua diretamente na adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e os autores mostraram que a ativação desta cascata sinalizadora, AMPc-PKA-PPAR- $\gamma$ , proporcionou o aumento na expressão do RNAm da PON1 (KHATEEB et al., 2010).

A indução da expressão da PON1 em hepatócitos humanos *in vitro* também foi obtida por outros polifenóis, como o resveratrol (GOUÉDARD; BAROUKI; MOREL, 2004a; CURTIN et al., 2008) e a quercetina (GOUÉDARD; BAROUKI; MOREL, 2004b; GONG et al., 2009; GARIGE et al., 2010). Nestes casos, a indução gênica ocorreu por mecanismos alternativos. Por exemplo, Gouédard, Barouki e Morel (2004a; 2004b) descreveram que o efeito do resveratrol e da quercetina foi mediado pelo receptor aril-hidrocarboneto (AhR) e por outro elemento responsivo pouco convencional na região promotora do gene PON1. Garige et al. (2010), por sua vez, relataram que a quercetina aumentou a expressão gênica da PON1 em hepatócitos humanos *in vitro* por induzir a translocação da proteína SREBP2 (*sterol regulatory element binding protein 2*) do retículo endoplasmático para o núcleo, onde esta proteína se liga à sequência promotora do gene PON1 semelhante ao elemento responsivo a esterol (*SER-like sterol responsive element*) aumentando a regulação e a transcrição do gene PON1.

O nível de estresse oxidativo nos monócitos e macrófagos não foi avaliado em nosso estudo. No entanto, Fuhrman e colaboradores (2004) demonstraram que a diferenciação de monócitos a macrófagos é caracterizada por aumento no estresse oxidativo celular, devido à elevação na produção do ânion radical superóxido. Os macrófagos derivados de monócitos presentes na parede arterial exercem importante função na fase inicial da aterogênese e, sob estresse oxidativo, a

peroxidação lipídica afeta não apenas as lipoproteínas, mas também os lipídeos celulares, aumentando a aterogenicidade dessas células (FUHRMAN; OIKNINE; AVIRAM, 1994). De fato, os macrófagos oxidados exibem aumento na capacidade de oxidar a LDL e acumular colesterol, transformando-se, assim, em células espumosas, as quais são as principais células responsáveis pela formação das lesões ateroscleróticas iniciais (FUHRMAN; OIKNINE; AVIRAM, 1994; FUHRMAN et al., 1997; FUHRMAN; VOLKOVA; AVIRAM, 2002). É interessante notar que a expressão e a atividade da PON2 são induzidas pelo estresse oxidativo em macrófagos de camundongos, enquanto a atividade da PON3 diminui, de forma semelhante às características da PON1 associada à HDL no plasma (ROSENBLAT et al., 2003; SHINER; FUHRMAN; AVIRAM, 2007). O aumento do estresse oxidativo nos macrófagos, mediado pela NADPH oxidase, tem como resposta a elevação do ativador da plasminogênio-uroquinase (uPA) que ativa a expressão gênica da PON2 (FUHRMAN et al., 2008). Dessa maneira, o aumento na expressão da PON2 confere proteção contra o estresse oxidativo celular (ROSENBLAT et al., 2003; AVIRAM; ROSENBLAT, 2004), semelhante à diminuição do estresse oxidativo associada à elevação na expressão de enzimas antioxidantes observada em leucócitos após a ingestão de chá mate (MATSUMOTO et al., 2009). Portanto, o consumo de erva-mate poderia prevenir o estresse oxidativo nos monócitos e macrófagos – via aumento na expressão e atividade da PON2 – e, conseqüentemente, diminuir a formação das células espumosas que dão início à formação da placa aterosclerótica e às doenças cardiovasculares.

Para finalizar, no presente estudo também verificamos que a ingestão das infusões de erva-mate verde ou tostada, de forma aguda ou por sete dias, aumentou a atividade da PON1 no plasma, confirmando, assim, os achados anteriores de Menini e colaboradores (2007), Morais (2009) e Boaventura (2010). É curioso notar que, ao contrário da isoforma PON2, parece que a erva-mate verde foi mais efetiva para a atividade lactonase da PON1, enquanto a erva-mate tostada promoveu maior aumento na atividade arilesterase (Figs. 10 e 16). Outros pesquisadores já observaram aumento na atividade da PON1 após a ingestão das vitaminas C e E (JARVIK et al., 2002). A ingestão de suco de romã por indivíduos saudáveis e por pacientes com estenose da artéria também aumentou a atividade arilesterase da PON1 em associação com redução na quantidade de LDL oxidada (AVIRAM et al., 2000; AVIRAM et al., 2004). Conforme mencionado anteriormente em outros estudos, é provável que os compostos fenólicos da erva-mate

tenham igualmente aumentado a expressão gênica da PON1. A ingestão aguda da erva-mate aumentou a capacidade antioxidante do plasma e diminuiu a oxidação do plasma e da LDL (GUGLIUCCI, 1996; SILVA et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2009). Dessa forma, é plausível pensar que a elevação na atividade da PON1 tenha contribuído, pelo menos em parte, para esses achados.

Concluindo, embora a função fisiológica da PON2 não seja totalmente conhecida, vários estudos indicaram que a PON2 diminuiu o estresse oxidativo em macrófagos, atuando como potente antioxidante celular, sendo que inúmeros compostos fenólicos aumentaram a expressão gênica e a atividade da PON2. Da mesma forma, nosso estudo é o primeiro a mostrar que a erva-mate verde ou tostada induziu a expressão do RNAm e a atividade da PON2 em monócitos e macrófagos, *in vitro* e *in vivo*. A PON2, em nível celular, assim como a PON1 em nível plasmático e humoral, pode proteger contra a peroxidação lipídica pela hidrólise de certos lipídeos oxidados. Se um processo semelhante a este ocorre na parede arterial durante a aterogênese inicial, então o consumo de erva-mate promoveria elevação na expressão e atividade da PON2, a qual pode proteger contra o acúmulo de lipídeos oxidados na íntima arterial e aceleração da aterosclerose. No entanto, estudos epidemiológicos e/ou prospectivos deverão ser realizados a fim de investigar as propriedades anti-ateroscleróticas da erva-mate e confirmar a relevância do mecanismo de indução gênica da PON2 apresentada neste estudo.

## 7 CONCLUSÕES

A partir das análises das variáveis deste estudo, foi possível obter as seguintes conclusões:

### **Estudo *in vitro***

- A erva-mate verde ou tostada em pequenas concentrações (1 e 3  $\mu\text{M}$ ) aumentou a expressão do RNAm da enzima PON2 em macrófagos THP-1.
- Da mesma forma, o ácido clorogênico (principal composto fenólico da erva-mate) e o ácido caféico (metabólito plasmático do ácido clorogênico) também modularam a expressão gênica da PON2 nas concentrações de 1 e 3  $\mu\text{M}$ .
- A erva-mate verde ou tostada e os ácidos clorogênico e caféico aumentaram a atividade da PON2 em macrófagos THP-1, nas concentrações 3, 5 e 10  $\mu\text{M}$ .
- Em geral, não houve diferença entre os dois tipos de erva-mate na modulação da expressão gênica e da atividade da PON2 em macrófagos THP-1.

### **Estudos *in vivo***

- No estudo agudo, a ingestão de 500 mL da infusão de erva-mate verde ou tostada promoveu aumento significativo na expressão do RNAm da enzima PON2 em monócitos de sangue periférico de mulheres saudáveis.
- A ingestão das infusões de erva-mate verde ou tostada promoveu elevação na atividade arilesterase e lactonase da PON2 dos monócitos do sangue periférico, obtidos 2 h após o consumo.
- No estudo de curto prazo, a ingestão de 1 L diário das infusões de erva-mate verde ou tostada, durante uma semana, por mulheres saudáveis foi efetiva na indução da expressão do RNAm da PON2 em monócitos do sangue periférico e nos

macrófagos derivados de monócitos.

- A ingestão das infusões de erva-mate verde ou tostada promoveu elevação não significativa na atividade arilesterase da PON2 nos monócitos e macrófagos derivados de monócitos.
- A ingestão das infusões de erva-mate verde ou tostada promoveu, de forma aguda ou durante uma semana por mulheres saudáveis, aumentou a atividade arilesterase e lactonase da enzima PON1 no plasma.
- Em geral, não houve diferença entre a ingestão dos dois tipos de erva-mate na modulação da expressão gênica e da atividade da PON2 em monócitos e macrófagos derivados de monócitos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDIN, A.A.; HASSANIEN, M.A.; IBRAHIM, E.A.; EL-NOEMAN S.D. Modulating effect of atorvastatin on paraoxonase 1 activity in type 2 diabetic Egyptian patients with or without nephropathy. **J. Diab. Compl.**, v. 24, n. 5, p. 325-33, 2010.

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

ANDERSEN T, FOGH J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **J. Hum. Nutr. Diet.**, v. 14, p. 243–250, 2001.

ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Peroxidase-like activity *ilex paraguariensis*. **Food Chem.**, v. 97, n. 3, p. 459-464, 2006.

AVIRAM, M. Dietary antioxidants stimulate the expression of paraoxonases which provides protection against atherosclerosis development. **Curr. Topic. Nutr. Res.**, v. 1, p. 183–191, 2003.

AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 957, p. 146–161, 2002.

AVIRAM, M.; DORENFELD, L.; ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; COLEMAN, R. et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL and platelet aggregation: studies in humans and in the atherosclerotic apolipoprotein E deficient mice. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 1062–1076, 2000.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 16, p. 393–399, 2005.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 37, p. 1304–1316, 2004.

AVIRAM, M., ROSENBLAT, M., BISGAIER, C.L.; NEWTON, R.S.; PRIMO-PARMO, S.L.; LA DU, B.N. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions — a possible peroxidative role for paraoxonase. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 1581–1590, 1998.

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

BASTOS, D.H.M.; FORNARI, A.C.; QUEIROZ, Y.S.; TORRES, E.A.F. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 49, p. 399-404, 2006.

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

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

BASTOS, D.H.M.; OLIVEIRA, D.M.; MATSUMOTO, R.L.T.; CARVALHO, P.O.; RIBEIRO, M.L. Yerba maté: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. **Med. Aromat. Plant. Sci. Biotechnol.**, v. 1, n. 1, p. 27-46, 2007.

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

BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sci.**, v. 77, p. 345-58, 2005.



BOAVENTURA, B. **Avaliação do efeito antioxidante do chá mate (*Ilex paraguariensis*) e da intervenção dietética em indivíduos dislipidêmicos.** 2010. (Dissertação). Programa de Pós-graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Florianópolis. 2010.

BOEMI, M.; LEVIEV, I.; SIROLLA, C.; PIERI, C.; MARRA, M.; JAMES, R.W. Serum paraoxonase is reduced in type 1 diabetic patients compared to non-diabetic, first degree relatives. Influence on the ability of HDL to protect LDL from oxidation. **Atherosclerosis**, v. 155, p. 229–235, 2001.

BOESCH-SAADATMANDI, C.; POSPISSIL, R.T.; GRAESER, A.C.; CANALI, R.; BOOMGAARDEN, I.; DOERING, F. et al. Effect of quercetin on paraoxonase 2 levels in RAW264.7 macrophages and in human monocytes - role of quercetin metabolism. **Int. J. Mol. Sci.** v.10, p.4168-4177, 2009.

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

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **J. Ethnopharmacol.** (in press). 2010.

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

BRANDT, C.T.; LEITE, C.R.C.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; BRANDT FILHO, C.; CASTRO, C.M.M.B. Aderência e atividade microbicida de monócitos em portadores de esquistossomose mansônica cirúrgica. **Act. Cir. Bras.**, v.18, n.2, p.143-153, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Taxa de mortalidade específica por doenças do aparelho circulatório.** Disponível em: <

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2007/c08.def>>. Acesso em: 10 dez 2008.

CAMPOS, A.M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E.A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguariensis* extracts and red wine. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 7, p. 43-49, 1996.

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

CHANDRA, S.; MEJIA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v.162, n.1, p.156-159, 1987.

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

CURTIN, B.F.; SEETHARAM, K.I.; DHOIEAM, P.; GORDON, R.K.; DOCTOR, B.P.; NAMBIAR, M.P. Resveratrol induces catalytic bioscavenger paraoxonase 1 expression and protects against chemical warfare nerve agent toxicity in human cell lines. **J. Cell. Biochem.**, v. 103, p. 1524–1535, 2008.

DALL' ORTO, V.C.; VAGO, J.M.; CARBALLO, R.R.; REZZANO, I.N. Comparison of tyrosinase biosensor and colorimetric method for polyphenol analysis in different kinds of teas. **Anal. Lett.**, v. 38, n. 1, p. 19-33, 2005.

DANTOINE, T.F.; DEBORD, J.; CHARMES, J.P.; MERLE, L.; MARQUET, P.; LACHATRE, G. et al. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 9, 1998.

DIETPRO5I. Versão 5.0. Software de Avaliação Nutricional e Prescrição Dietética. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa: GrupoAgromidia; 2007.

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

DRI - INSTITUTE OF MEDICINE. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. Washington (DC): **National Academy Press**. 2000.

ECOBICHON, D.J.; STEPHENS, D.S. Perinatal development of human blood esterases. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 14, p. 41-47, 1973.

ESMELINDRO, M.C.; TONIAZZO, G.; WACZUCK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 22, n. 2, p. 193-204, 2002.

FELIPPI, R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; SILVA, E.L. Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na reatividade vascular de aorta torácica de ratos. In: **XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)**, Águas de Lindóia-SP, 24 a 27/08/2004. CD Rom, n. 44104, 2005.

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

FERRÈ, N.; CAMPS, J.; PRATS, E.; VILELLA, E.; PAUL, A.; FIQUERA, L. et al. Serum paraoxonase activity: a new additional test for improved evaluation of chronic liver damage. **Clin. Chem.**, v. 48, p. 261-268, 2002.

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

FILIP, R.; FERRARO, G.E. Researching on new species of "Mate": *Ilex brevicuspis*: phytochemical and pharmacology study. **Eur. J. Nutr.**, n. 42, p. 50–54, 2003.

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

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

FUHRMAN, B.; JUDITH, O.; KEIDAR, S.; BEN-YAISH, L.; KAPLAN, M.; AVIRAM, M. Increased uptake of LDL by oxidized macrophages is the result of an initial enhanced LDL receptor activity and of a further progressive oxidation of LDL. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 23, p. 34–46, 1997.

FUHRMAN, B.; KHATEEB, J.; SHINER, M.; NITZAN, O.; KARRY, R.; VOLKOVA, N., et al. Urokinase Plasminogen Activator Upregulates Paraoxonase 2 Expression in Macrophages Via an NADPH Oxidase-Dependent Mechanism. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 28, p. 1361-1367, 2008.

FUHRMAN, B.; OIKNINE, J.; AVIRAM, M. Iron induces lipid peroxidation in cultured macrophages, increases their ability to oxidatively modify LDL, and affects their secretory properties. **Atherosclerosis**, v. 111, p. 65–78, 1994.

FUHRMAN, B.; SHINER, M.; VOLKOVA, N.; AVIRAM, M. Cell-induced copper ion-mediated LDL oxidation increases during in vivo monocyte-to-macrophage differentiation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 37, p. 259–271, 2004.

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

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

GARIGE, M.; GONG, M.; VARATHARAJALU, R.; LAKSHMAN, M. R. Quercetin up-regulates paraoxonase 1 gene expression via sterol regulatory element binding protein 2 that translocates from the endoplasmic reticulum to the nucleus where it specifically interacts with sterol responsive element-like sequence in paraoxonase 1 promoter in HuH7 liver cells. **Metabolism**, v.59, p.1372–1378, 2010.

GONZALEZ, A.; FERREIRA, F.; VAZQUEZ, A.; MOYNA P; PAZ, E.A. Biological screening of Uruguayan medicinal-plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 39, p. 217–220, 1993.

GONG, M.; GARIGE, M.; VARATHARAJALU, R. MARMILLOT, P.; GOTTIPATTI, C.; LECKEY, L.C.; et al. Quercetin up-regulates paraoxonase 1 gene expression with concomitant protection against LDL oxidation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.379, p.1001–1004, 2009.

GOUEDARD, C.; BAROUKI, R.; MOREL, Y. Induction of the Paraoxonase-1 Gene Expression by Resveratrol. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 24, p. 2378-2383, 2004a.

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

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

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

HARANGI, MARIANN.; SERES, I.; HARANGI, J.; PARAGH G. Benefits and Difficulties in Measuring HDL Subfractions and Human Paraoxonase-1 Activity During Statin Treatment. **Cardiovasc. Drugs Ther.** v. 23, p. 501–510, 2009.

HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **J. Food Sci.**, v. 72, n. 9, p. R138-151, 2007.

HUANG, T.H.; PENG, G.; KOTA, B.P.; LI, G.Q.; YAMAHARA, J.; ROUFOGALIS, B.D.; et al. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: activation of PPAR-gamma and identification of an active component. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 207, p. 160–169, 2005.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2009). **Sistema IBGE de recuperação automática**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acessado em: 23/03/2010.

JAICHANDER, P.; SELVARAJAN, K.; GARELNABI, M.; PARTHASARATHY, S. Induction of paraoxonase 1 and apolipoprotein A-I gene expression by aspirin. **J. Lipid. Res.**, v. 49, p. 2142–2148, 2008.

JAKUBOWSKI, H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase a protective mechanism against protein N-homocysteinylolation. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 3957–3962, 2000.

JARVIK, G.P.; TSAI, N.T.; MCKINSTRY, L.A.; WANI, R.; BROPHY, V.H.; RICHTER, R.J. et al. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, p. 1329–1333, 2002.

KABAROGLU, C.; MUTAF, I.; BOYDAK, B.; OZMEN, D.; HABIF, S.; ERDENER, D. et al. Association between serum paraoxonase

activity and oxidative stress in acute coronary syndromes. **Act. Cardiol.**, v. 59, p. 606–611, 2004

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

KLEIN, G. **Efeito do consumo da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), associada ou não à intervenção dietética, no perfil glicêmico e lipídico de indivíduos pré-diabéticos e diabéticos tipo 2**. 2010. (Dissertação). Programa de Pós-graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Florianópolis. 2010.

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

LIM, J.A.; KIM, S.H. Transcriptional activation of an anti-oxidant mouse Pon2 gene by dexamethasone. **BMB Rep.**, v. 42, p. 421-426, 2009.

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

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N.; BOULTON, A.J.M.; HINE, D.; MACKNESS, M.I. Serum paraoxonase activity in patients with type I diabetes compared to healthy controls. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 32, p. 259–264, 2002.

MACKNESS, B.; MACKNESS, M.I.; DURRINGTON, P.N.; ARROL, S.; EVANS, A.E.; MCMASTER, D. et al. Paraoxonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 30, p. 4–10, 2000.

MACKNESS, B.; MACKNESS, M.I.; DURRINGTON, P.N.; CONNELLY, P.W.; HEGELE, R.A. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 7, p. 69-76, 1996.

MATSUMOTO, R.L.T.; BASTOS, D.H.M.; MENDONÇA, S.; NUNES, V.S.; JR BARTCHEWSKY, W.; RIBEIRO, M.L. et al. Effects of Mate´ Tea (*Ilex paraguariensis*) Ingestion on mRNA Expression of Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation, and Total Antioxidant Status in Healthy Young Women. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n. 5, p. 1775-1780, 2009.

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

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

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

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

MORAIS, E.C.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G.A.; BOAVENTURA, B.C.; ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E. et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraquariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 8316-8324, 2009.

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



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

MÜLLER, V.; CHÁVEZ, J.H.; REGINATTO, F.H.; ZUCOLOTTI, S.M.; NIERO, R.; NAVARRO, D. et al. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against Herpes Simplex Virus type 1 and Rabies Virus. **Phytother. Res.**, v. 21, n. 10, p. 970-974, 2007.

NAGILA, A.; PERMPONGPAIBOON, T.; TANTRARONGROJ, S.; PORAPAKKHAM, P.; CHINWATTANA, K. et al. Effect of atorvastatin on paraoxonase1 (PON1) and oxidative status. **Pharmacol. Rep.**, v. 61, n. 5, p. 892-898, 2009.

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

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

NATELLA, F.; NARDINI, M.; GIANNETTI, I.; DATTILO, C.; SCACCINI, C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 50, p. 6211–6216, 2002.

NAVAB, M.; HAMA-LEVY, S.; VAN LENTEN, B.J.; FONAROW, G.C.; CARDINEZ, C.J.; CASTELLANI, L.W. et al. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 2005-2009, 1997.

NG, C.J.; BOURQUARD, N.; GRIJALVA, V. Paraoxonase-2 Deficiency Aggravates Atherosclerosis in Mice Despite Lower Apolipoprotein-B-containing Lipoproteins. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 40, p. 29491–29500, 2006.

NG, C.J.; SHIH, D.M.; HAMA, A.Y.; VILLA, N.; NAVAB, M.; REDDY, S.T. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 38, p. 153–163, 2005.

NG, C.J.; WADLEIGH, D.J.; GANGOPADHYAY, A.; HAMA, S.; GRIJALVA, V.R.; NAVAB, M. et al. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidativemodification of lowdensity lipoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 48, p. 44444–44449, 2001.

NISHIO, E.; WATANABE, Y. Cigarette smoke extracts inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 236, p. 289–293, 1997.

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

OPALA, T.; RZYMSKIP, P.; PISCHEL, I. WILCZAK, M, WOZNIAK, J. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects – a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. **Eur. J. Med. Res.**, v. 11, p. 343–350, 2006.

PAGANINI-STEIN, F. L.; SCHMIDT, B.; FURLONG, E. B.; SOARES, L.A.S., SOARES, M.C.F.; VAZ, M.A R.C. et al. Vascular responses to extractable fractions of *ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biol. Res. Nursing**, v. 7, n. 2, p. 146-156, 2005.

PANG, J.; CHO, Y.; PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 476, p. 178-185, 2008.

PARAGH, G.; BALLA, P.; KATONA, E.; SERES, I.; EGERHAZI, A.; DEGRELL, I. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. **Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.**, v. 252, p. 63–67, 2002.

PITTLER, M.H.; ERNST, E. Dietary supplements for body-weight reduction: a systematic review. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, n. 529–536, 2004.

PRIMO-PARMO, S.L.; SORENSON, R.C.; TEIBER, J.; LA DU, B.N. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. **Genomics**, v. 33, p. 498–507, 1996.

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

RAO, M.N.; MARMILLOT, P.; GONG, M.; PALMER, D.A.; SEEFF, L.B.; STRADER, D.B. et al. Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. **Metabolism**, v. 52, p. 1287–94, 2003.

REDDY, S.T.; WADLEIGH, D.J.; GRIJALVA, V.; NG, C.; HAMA, S.; GANGOPADHYAY, A. et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.21, p.542–7, 2001.

RESENDE, M.D.V. de; STURION, J.A; CARVALHO, A.P.; SIMEÃO, R.M.; FERNANDES, J.S.C. Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela EMBRAPA-Resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones. **Circular Técnica**, Colombo-PR, v. 43, p. 1-67, 2000.

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

RODRIGO, L.; MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N.; HERNANDEZ, A.; MACKNESS, M.I. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. **Biochem. J.**, v. 354, p. 1–7, 2001.

ROSENBLAT, M.; DRAGANOV, D.; WATSON, C.E.; BISGAIER, C.L.; LA DU, B.N.; AVIRAM, M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, p. 468–474, 2003.

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

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

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3<sup>a</sup> ed. Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SCHINELLA, G.R.; FANTINELLI, J.C.; MOSCA, S.M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clin. Nutr.**, v. 24, p. 36–366, 2005.

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; de BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 269, p. 357–360, 2000.

SCHMIDT, A. M.; YAN, S. D.; WAUTIER, J. L.; STERN, D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. **Circ. Res.**, n. 84, p. 489–497, 1999.

SCHRADER, C.; SCHIBORR, C.; FRANK, J.; RIMBACH, G. Curcumin induces paraoxonase 1 in cultured hepatocytes in vitro but not in mouse liver in vivo. **Br. J. Nutr.**, p. 1–4, 2010.

SENTI, M.; TOMAS, M.; VILA, J.; MARRUGAT, J.; ELOSUA, R.; SALA, J. et al. Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gen/Arg192 variants of the human paraoxonase 1 gene: the REGICOR study. **Atherosclerosis**, v. 156, p. 443–449, 2001.

SERES, I.; PARAGH, G.; DESCHENE, E.; FULOP, T.; KHALIL, A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. **Exp. Gerontol.**, v. 39, p. 59–66, 2004.

SERHATLIOGLU, S.; GURSU, M.F.; GULCU, F.; CANATAN, H.; GODEKMERDAN, A. Levels of paraoxonase and arylesterase activities and malondialdehyde in workers exposed to ionizing radiation. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 21, p. 371–375, 2003.

SUTHERLAND, W.H.F.; MANNING, P.J.; DE JONG, S.A.; ALLUM, A.R.; JONES, S.D.; WILLIAMS, S.M. Hormone-replacement therapy increases serum paraoxonase arylesterase activity in diabetic postmenopausal women. **Metabolism**, v. 50, p. 319–324, 2001.

SHIH, D.M.; GU, L.; HAMA, S.; XIA, Y.R.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M. et al. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. **J. Clin. Invest.**, v. 97, p. 1630–1639, 1996.

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

SHINER, M.; FUHRMAN, B.; AVIRAM, M. Paraoxonase 2 (PON2) expression is upregulated via a reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH)-oxidase-dependent mechanism during monocytes differentiation into macrophages. **Free Radic. Biol. Med.**, n. 37, p. 2052–2063, 2004.

SIERKSMA, A.; VAN DER GAAG, M.S.; VAN TOL, A.; JAMES, R.W.; HENDRIKS, H.F.J. Kinetics of HDL cholesterol and paraoxonase activity in moderate alcohol consumers. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 26, p. 1430–1435, 2002.

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

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

SPOSITO, A.C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F.A.H.; BERTOLAMI, M.C. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 88, Suplemento I, Abril 2007.

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

STOCKER, R.; KEANEY JR, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 1381–1478, 2004.

SUTHERLAND, W.H.F.; MANNING, P.J.; DE JONG, S.A.; ALLUM, A.R.; JONES, S.D.; WILLIAMS, S.M. Hormone-replacement therapy increases serum paraoxonase arylesterase activity in diabetic postmenopausal women. **Metabolism**, v. 50, p. 319–324, 2001.

SUTHERLAND, W.H.F.; WALKER, R.J.; DE JONG, S.A.; VAN RIJ, A.M.; PHILLIPS, V.; WALKER, H.L. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 1340–1347, 1999.

TAKETA, A.T.; GNOATTO, S.C.; GOSMANN, G.; PIRES, V.S.; SCHENKEL, E.P.; GUILLAUME, D. Triterpenoids from Brazilian *Ilex* species and their in vitro antitrypanosomal activity. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 10, p. 1697–1700, 2004.

TANIMOTO, N.; KUMON, Y.; SUEHIRO, T.; OHKUBO, S.; IKEDA, Y.; NICHIIYA, K. et al. Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis. **Life Sci.**, v. 72, p. 2877–2885, 2003.

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

TSUZURA, S.; IKEDA, Y.; SUCHIRO, T.; OTA, K.; OSAKI, F.; ARII, K. et al. Correlation of plasma oxidized low-density lipoprotein levels to vascular complications and human serum paraoxonase in patients with type 2 diabetes. **Metabolism**, v. 53, p. 297–302, 2004.

VAN DER GAAG, M.S.; VAN TOL, A.; SCHEEK, L.M.; JAMES, R.W.; HENDRIKS, H.F.J. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomized intervention study in middle-aged men. **Atherosclerosis**, v. 147, p. 405–410, 1999.

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

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

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

WATSON, A.D.; BERLINER, J.A.; HAMA, S.Y.; LA DU, B.N.; FAULL, K.F.; FOGELMAN, A.M. et al. Protection effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p. 2882-2891, 1995.

WEITMAN, S.D.; VODICNIK, M.J.; LECH, J.J. Influence of pregnancy on parathion toxicity and distribution. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 71, p. 215–224, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and manging the global epidemic.** Report of a WHO consultation on obesity. Geneva: WHO, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Phisical Status: the use and interpretation of anthropometry.** WHO technical report series 854. Geneva: WHO, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Atlas of Heart Disease and Stroke.** Disponível em: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/resources/atlas/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/). Acesso: 15 ago 2009.a

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Types of cardiovascular disease.** Disponível em: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/cvd\\_atlas\\_01\\_types.pdf](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_01_types.pdf). Acesso em: 15 ago 2009.c

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Data Table.** Disponível em: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/cvd\\_atlas\\_29\\_world\\_data\\_table.pdf](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_29_world_data_table.pdf). Acesso em: 15 ago 2009.b



## APÊNDICE

## Apêndice A



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

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Participante N° |\_|\_|\_|\_|

O(A) Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada “Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na modulação gênica da enzima paroxonase: estudos *in vitro* e *in vivo*”, de responsabilidade do pesquisador **Prof. Dr. Edson Luiz da Silva**. Neste estudo, pretende-se verificar a modulação da expressão gênica da enzima paroxonase 2, sob a influência da erva-mate. Este estudo é necessário porque evidências crescentes vêm demonstrando que a erva-mate exerce efeito cardioprotetor, acredita-se que seja devido seu potencial antioxidante. E a paroxonase2 é uma enzima antioxidante encontrada nos macrófagos protegendo contra a formação da placa de ateroma e assim prevenindo a aterosclerose. Para participar da pesquisa, precisamos da sua autorização para a realização de uma coleta de 16 mL de sangue (4 tubos), em jejum de 12 horas. Para esta coleta de sangue o(a) senhor(a) deverá não consumir nenhum produto ou bebida a base de erva-mate 30 dias antes e suspender a ingestão de antioxidantes, como: café, chá verde, preto e branco, três dias antes, poderá manter a prática de exercícios físicos regulares. Porém, recomendamos que a ingestão de bebidas alcoólicas e a prática de exercícios físicos intensos sejam suspensas 2 a 3 dias antes da coleta de sangue.

Esse protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (n° 743/10) e trará apenas o desconforto das coletas de sangue. Esperamos, entretanto, que esse estudo traga benefícios para a população, tais como a prevenção para a doença arterial coronariana. Esta pesquisa não oferece riscos maiores do que aquele citado acima, não tem fins lucrativos, é confidencial e o seu

nome será usado apenas no primeiro momento de coleta das amostras de sangue. Em seguida, as amostras serão identificadas pelo número do seu cadastro. Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas científicas, apresentados em congressos ou eventos científicos ou às autoridades sanitárias, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

O(A) senhor(a) poderá se beneficiar diretamente dos resultados obtidos no final do estudo, caso estes sejam de seu interesse. Sua participação é voluntária, podendo desistir desta pesquisa em qualquer momento. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelos telefones 3721-8053; 9114-0837. Se você estiver de acordo em participar, garantimos que as informações obtidas e o material coletado serão confidenciais e só serão utilizados neste trabalho.

Eu, abaixo assinado, concordo em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
*Nome do(a) participante*                      *Assinatura*                        /  /    
*Data*

Edson Luiz da Silva – Coordenador. Fone: 3721-8053;  
edson@ccs.ufsc.br

Elenise Stuker Fernandes – Pesquisadora - Fone: 9114-0837;  
elenisenutri@hotmail.com



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

**CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DESTE ESTUDO**

*Participante N°* |\_|\_|\_|\_|

Eu, \_\_\_\_\_ declaro que li e compreendi as informações contidas nesse documento. Fui devidamente informado(a) pelos pesquisadores – Prof. Dr. Edson Luiz da Silva e Elenise Stuker Fernandes - dos procedimentos que serão utilizados e da conduta deste estudo intitulado “Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na modulação gênica da enzima paroxonase: estudos *in vitro* e *in vivo*”, e concordo em participar da pesquisa como voluntário(a). Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) participante  
R.G. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edson Luiz da Silva  
Professor Coordenador

\_\_\_\_\_  
Elenise Stuker Fernandes  
Mestranda



**Apêndice B:**

Projeto de Pesquisa – EFEITO DA ERVA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) NA MODULAÇÃO GÊNICA DA ENZIMA PAROXONASE: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

**Questionário – Avaliação Clínica**

Participante N° |\_|\_|\_|\_|

Identificação:

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo:  masculino  feminino Estado civil: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_/\_\_/\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

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

Endereço: \_\_\_\_\_ N° \_\_\_\_\_

Dados Complementares: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Cep: \_\_\_\_\_ Telefone: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Ocupação profissional: \_\_\_\_\_

**Fatores de Risco:**1. Histórico Familiar de Diabetes  sim  não  
Parentesco:2. Histórico Familiar de Hipertensão  sim  não  
Parentesco:3. Antecedentes Familiares de Doença Arterial Coronariana  sim  
 não

Antecedentes de Morbidades (não cardiovasculares):

---



---



---

**Hábitos Alimentares:**1. Erva mate:  sim  não. Forma:  chimarrão  chá mate  tererê  mate cocido.Frequência:  Diariamente  semanalmente  eventualmente.

Quantidade:  ≤ 1 litro  1 – 2 litros  ≥ 2 litros.

2. Café:  sim  não.

Frequência:  Diariamente  semanalmente  eventualmente.

Quantidade:  1 xícara  1 – 3 xícaras  mais 3 xícaras.

3. Chás:  sim  não.

Frequência:  Diariamente  semanalmente  eventualmente.

4. Chocolate:  sim  não.

Frequência:  Diariamente  semanalmente  eventualmente.

5. Sucos:  sim  não.

Frequência:  Diariamente  semanalmente  eventualmente.

Quantidade:  1 copo  1 – 3 copos  mais 3 copos.

6. Óleo de oliva ou azeite de dendê:  sim  não.

Frequência:  Diariamente  semanalmente  eventualmente.

7. Vinho:  sim  não.

Frequência:  Diariamente  semanalmente  eventualmente.

8. Sementes oleaginosas:  sim  não.

Frequência:  Diariamente  semanalmente  eventualmente.

9. Frutas cítricas:  sim  não.

Frequência:  Diariamente  semanalmente  eventualmente.

### Hábitos:

1. Atividade Física  sim  não

Quantas vezes na semana: \_\_\_\_\_ Qual tipo de atividade física: \_\_\_\_\_

2. Bebida Alcoólica  sim  não Frequente  sim  não

Raramente  sim  não

3. Estresse  sim  não

4. Tabagista  sim  não N° cigarros/dia:

Eventualmente       Ex-fumante

Parou há:

5. Medicação em uso

- Nenhum       Diurético       Medicamentos \_\_\_\_\_
- Vit. A ou carotenóides       Vit. C       Vit. E
- Multivitaminas       cápsulas de chá branco;verde
- Extratos Vegetais       Óleo de peixe
- Antiinflamatórios não esteroidais
- Anticoncepcional       Oral       Injetável       Intradérmico
- Outras medicações regulares      Qual (is): \_\_\_\_\_





**ANEXO A:**

**Parecer do Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos da  
Universidade Federal de Santa Catarina**

**Parecer Consubstanciado Nº: 743/10****Data de Entrada no CEP:** 30/04/2010**Título do Projeto:** Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na modulação gênica da enzima paroxonase: estu vitro e in vivo**Pesquisador Responsável:** Edson Luiz da Silva**Pesquisador Principal:** Elenise Stuker Fernandes**Propósito:** Mestrado**Instituição onde se realizará:** Outras**Objetivos (Preenchido pelo pesquisador)**

Objetivos a) Verificar a expressão gênica da enzima paroxonase2 em macrófagos derivados de monócitos isolado sangue periférico antes e após a ingestão de infusão de erva-mate verde e tostada por indivíduos saudáveis. b) atividade da enzima paroxonase2 em macrófagos derivados de monócitos isolados de sangue periférico e no so antes e após a ingestão de infusão de erva-mate verde e tostada por indivíduos saudáveis.

**Sumário do Projeto (Preenchido pelo pesquisador)**

**Breve introdução/Justificativa:** A aterosclerose é uma das principais causas de morbi-mortalidade da popul mundial, com grande participação de reações oxidativas e inflamatórias. Estudos epidemiológicos demonstrar ingestão de alimentos ricos em antioxidantes está inversamente associada ao desenvolvimento da aterosclerose paroxonase (PON) tem atividade antioxidante e está inversamente associada à aterosclerose. Existem três isofor paroxonase, sendo que as PON1 e PON3 encontram-se no plasma, enquanto que a PON2 possui efeito antioxid intracelular, particularmente importante nos macrófagos das lesões ateroscleróticas. A atividade e a expressão PON podem ser moduladas por constituintes ambientais, genéticos e dietéticos. Foi demonstrado que a ingestã mate (*Ilex paraguariensis*) promoveu o aumento na atividade da PON1 no plasma. Porém, não existem informa o efeito da erva-mate na expressão gênica da PON2 em macrófagos de seres humanos após a ingestão de erva

**Tamanho da Amostra: (indique como foi estabelecido):** A utilização do número de indivíduos ou pacientes está baseada em dados da literatura e em método estatístico. O teste de hipótese depende da precisão, da vari esperada, dos parâmetros alfa e beta (probabilidade de se cometer erro do Tipo I e II, respectivamente). Consi que experimentos biológicos têm embutido um erro de 10% (resultantes de variações biológicas e analíticas), d entre dois grupos que sejam menores que 12% do valor da média de cada grupo podem significar uma probabi inaceitável de cometer erros do Tipo I ou do Tipo II. Da mesma forma, a dispersão média dos dados não pode s a 15% do valor da média do grupo. Para calcular o tamanho da amostra, empregamos a fórmula:  $n=2[(Za - Zb DP)^2]$ , onde n é o número de participantes, X1 -X2 é a diferença entre as médias que deve ser detectada, DP é o padrão estimado, Za - Zb são os valores de Z para um dado a ou b, respectivamente. O alf foi fixado em 5% e 80%

**Participantes / Sujeitos: (quem será o objeto da pesquisa):** Participarão do estudo os voluntários que com o protocolo experimental e preencherem o termo de consentimento. Serão incluídos voluntários de ambos entre 20 e 59 anos de idade. Serão excluídos do estudo indivíduos que apresentarem índice de massa corporal inferior a 18,5 kg/m<sup>2</sup> ou superior a 24,9 kg/m<sup>2</sup>, tabagistas, portadores de doenças cardíacas, hepáticas, renais gastrointestinais, neoplasias, hipo ou hipertireoidismo, dislipidemias, diabetes ou alcoolismo, atletas com atividade intensa, mulheres grávidas, mulheres em estado pós-menopausa. Após o início do estudo, serão excluídos, por voluntários que introduzirem ou modificarem o uso de medicamentos ou suplementos, que apresentarem intolerância à erva-mate ou que interromperem a ingestão da infusão por três dias consecutivos ou mais.

**Infraestrutura, do local onde será realizada a Pesquisa:** Os ensaios da expressão gênica serão desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias e no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias, e para determinação da atividade da PON2 no Laboratório de Pesquisa em Lipídeos, Antioxidantes e Aterosclerose localizados no Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os laboratórios são equipados com a infraestrutura necessária para o desenvolvimento do projeto, e os ensaios estarão sob a orientação do coordenador do projeto.

**Procedimentos / intervenções: (de natureza ambiental, educacional, nutricional, farmacológica):** As amostras de sangue serão coletadas utilizando sistema a vácuo, em tubos de EDTA, após jejum de 12 a 14 h para a isolamento de monócitos e posterior determinação da expressão gênica e da atividade da PON2. A coleta de sangue será realizada especificamente no Laboratório de Pesquisa em Lipídeos, Antioxidantes e Aterosclerose por técnico treinado.

**Parâmetros avaliados:** Medida da expressão gênica e da atividade da PON2. Instrumentos: conjunto de reagentes químicos, meio de cultura, fluxo, estufa, termociclador, eletroforese, centrífuga e espectrofotômetro.

**"Outcomes":** Inicialmente, esperamos que a erva-mate tenha um efeito positivo na modulação da expressão e atividade da enzima PON2 para poder associar esse mecanismo bioquímico ao potencial efeito benéfico da erva-mate na prevenção das doenças cardiovasculares. Hipótese 0: Aumento da expressão gênica e da atividade da enzima PON2 após a ingestão de erva-mate, em comparação com o período anterior ao consumo. Hipótese 1: Ausência de alteração na expressão gênica e na atividade da enzima PON2 após a ingestão de erva-mate, em comparação com o período anterior ao consumo.

**Comente sobre os riscos para os participantes deste estudo:** O estudo não apresenta riscos aos participantes, exceto a dor e possível formação de hematoma provocadas pelas coletas de sangue.

**Descreva como os participantes serão recrutados incluindo modos de divulgação e quem irá obter o consentimento:** Os participantes serão recrutados na comunidade universitária da UFSC, através de convites orais via correio eletrônico, Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFSC e cartazes fixados nos corredores do Hospital Universitário (HU) da UFSC. Em um segundo momento, será esclarecido oralmente aos participantes o delineamento do estudo e a importância do mesmo em relação à contribuição para a prevenção da doença arterial coronariana.

**Estão os participantes legalmente capacitados para assinar o consentimento? Sim**

**Quais os procedimentos que deverão ser seguidos pelos participantes/sujeitos se eles quiserem desistir em qualquer fase do estudo?** Consta na cópia do termo de consentimento informado o telefone de todos os pesquisadores envolvidos, os quais poderão ser utilizados para dirimir quaisquer dúvidas ou mesmo para informar o cancelamento da participação no estudo, não havendo, para tanto, necessidade de apresentar justificativa.

**Último Parecer enviado**

Enviado em: 29/05/2010

**Comentários**

---

A pesquisadora apresenta vasta fundamentação bibliográfica demonstrando as características químicas da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), popularmente conhecido por chimarrão, e os efeitos benéficos de uso como elemento natural antioxidante evitando desenvolvimento da aterosclerose e prevenção de doenças cardiovasculares.

**Parecer**

---

Aprovado

**Data da Reunião**

---

31/05/2010