



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM
MESTRADO EM ENFERMAGEM

**A UTILIZAÇÃO DO MATE (*Ilex paraguariensis* St Hill) – UM
ANTIOXIDANTE NATURAL COMO ESTRATÉGIA PARA A
PROMOÇÃO DA SAÚDE: UM ESTUDO EXPERIMENTAL**

Sirlei Kowalczyk

**RIO GRANDE (RS)
2004**

SIRLEY KOWALCZYK

**A UTILIZAÇÃO DO MATE (*Ilex paraguariensis* St Hill) – UM
ANTIOXIDANTE NATURAL COMO ESTRATÉGIA PARA A
PROMOÇÃO DA SAÚDE: UM ESTUDO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Área de Concentração: Enfermagem e Saúde

Orientação: Dra. Ana Luiza Muccillo Baisch

RIO GRANDE (RS)
2004

K75u KOWALCZYK, Sirlei.

A utilização do mate (*Ilex paraguariensis* St Hill) – um antioxidante natural, como estratégia para a promoção da saúde: um estudo experimental / Sirlei Kowalczyk – Rio Grande: Rua Caxias do Sul, 184 – Cassino, 2004. Ssp. 67 il. – (Tese Enfermagem)

Inclui Bibliografia

1. *Ilex paraguariensis* 2. Antioxidante 3. Promoção da Saúde 4. Experimental

CDU: 616-083

Ao meu filho Yuri e minha mãe Francisca, por serem as razões da minha vida. Agradeço o amor, a compreensão, a paciência e a dedicação incansáveis que vocês continuam me oferecendo – e que certamente eu não tive condições

de perceber e retribuir na mesma intensidade.

HOMENAGEM ESPECIAL

Esta é uma homenagem aos professores que possuem um ideal e respeito pela arte de ensinar.

À ***Prof^a Dr^a Ana Luiza Muccillo Baisch***, Professora Adjunta da Disciplina de Farmacologia do Departamento de Ciências Fisiológicas, e Professora Orientadora do Mestrado em Enfermagem do Departamento de Enfermagem da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, que com sua dedicação, paciência e carinho, ensinou-me o caminho do aperfeiçoamento e valorização da vida. Agradeço o tempo dedicado, pois certamente ele não será desperdiçado. O meu reconhecimento pela grandeza que só os verdadeiros mestres têm.

À ***Prof^a Dr^a Maria Cristina Flores Soares***, Professora Adjunta do Departamento de Ciências Fisiológicas e Professora Orientadora do Mestrado em Enfermagem, do Departamento de Enfermagem da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, pelo muito que contribuiu para a realização desta dissertação, pelo apoio e lição “de garra” em busca de um ideal.

À ***Prof^a Dr^a Susi Heliene Lauz Medeiros***, Professora Adjunta do Departamento de Cirurgia da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, pelo incentivo constante e pela contribuição no trilhar do mundo científico.

À ***Prof^a Dr^a Eliana Baldiale Furlong***, Professora Titular do Departamento de Química, Chefe do Laboratório de Micotoxina da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, pela acolhida tão carinhosa e de fundamental contribuição para a

realização desta dissertação, demonstrando de maneira simples que o conhecimento está à disposição para quem ousa adquiri-lo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À **Profª Drª Marta Regina Cezar Vaz**, Professora Titular do Departamento de Enfermagem e Coordenadora do Mestrado de Enfermagem da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, minha gratidão pela oportunidade da realização desta dissertação, fazendo o elo entre o conhecimento científico e a promoção da saúde coletiva.

A **Todos os Professores** do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem – Mestrado e Enfermagem da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, que fomentam o conhecimento científico incansavelmente, repassando-os para nós – seus fiéis discípulos.

Às **Colegas** que dividiram suas vidas e conviveram de maneira harmoniosa, deixando saudades.

A **Todos os Funcionários** do Laboratório Central do Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Jr., da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, que sempre solícitos acolheram o material enviado, realizando as provas bioquímicas sempre dedicados, indo além do dever para compartilhar com a pesquisa.

À **Profª Msc. Eli Sinnott Silva**, Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, pelo apoio dedicado e, principalmente, pelo seu exemplo de vida dedicada à pesquisa, fazendo de si um exemplo a ser seguido.

À Técnica do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, **Maricler Ávila**, pela valiosa contribuição para a realização deste trabalho – agradeço o apoio nas horas difíceis e pela amizade sincera.

Aos Técnicos de Zootecnia, **Fábio Moreno** e **Luiz Carlos Acosta**, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, pela dedicação incansável e carinho dispensado aos animais de experimentação, possibilitando esta dissertação.

Ao **Prof. Dr. Tabajara Lucas de Almeida**, por fazer da estatística uma ciência compreensível. Agradeço o carinho e o prazer do convívio, mas, principalmente, o aprendizado sobre a vida.

Ao **Prof. Ms. Deoclécio Teixeira**, pelas palavras amigas e encorajadoras que inúmeras vezes fizeram parte dos meus pensamentos.

Ao Acadêmico de Ciências Biológicas da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, **Nicolas Múrcia**, pelo trabalho dedicado junto à fase inicial desta dissertação.

À Patologista **Ane Mary Filgueiras** e à Técnica em Patologia **Maria Antonieta da Silva**, ambas da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, pela contribuição no preparo do material para o estudo histológico e micrografia.

À amiga **Maria Amélia Goretti Estima Marasciulo**, pela amizade e solidariedade incansável nesta grande jornada. Amigo é para se guardar no lado esquerdo do peito.

RESUMO

A alimentação assume um papel determinante na saúde da população, principalmente quando os alimentos são empregados para prevenir ou tratar doenças. Neste trabalho investigou-se a utilização do mate (*Ilex paraguariensis*) e sua propriedade de antioxidante natural, como estratégia para promoção da saúde a partir de um estudo experimental. Foram utilizados 67 (sessenta e sete) ratos machos, da linhagem Wistar-FURG, distribuídos em dois grupos. Grupo I, com 40 (quarenta) ratos adultos, subdivididos em quatro subgrupos (A, B, C, D), com 10 (dez) ratos em cada grupo respectivamente. O Grupo II, com 27 ratos velhos, subdivididos em três subgrupos (A, B, C), com 10 (dez), 7 (sete), 10 (dez) ratos em cada subgrupo, respectivamente. Os ratos adultos que receberam tratamento com um inibidor de NO-sintase (L-Name), que favorece o aparecimento de espécies reativas de oxigênio (radicais livres), foram submetidos ao extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, sendo evidenciado pelas provas bioquímicas e histológicas o efeito deletério do L-Name e a proteção celular realizada pelo extrato aquoso da *Ilex paraguariensis*. Os ratos velhos submetidos ao extrato aquoso da *Ilex paraguariensis* apresentaram também proteção celular hepática, com efeito antioxidante desta substância, bem como efeito hipoglicêmico nos ratos velhos quando tratados com o extrato aquoso da *Ilex paraguariensis* por um período mais longo, bem como com taxas reduzidas de triglicédeos. Os resultados obtidos permitiram concluir que o hábito de utilizar a erva-mate, principalmente para realizar o chimarrão, pode trazer benefícios para a saúde de quem o consome, reforçando o papel de uma alimentação saudável, convergindo para a interação entre o ser humano, a promoção da saúde e o meio ambiente.

Unitermos: *Ilex paraguariensis*; Erva-mate; Promoção da saúde; Antioxidante; Radicais livres; Meio ambiente;

ABSTRACT

Feeding represents a determinant role in population health, especially when food is used to prevent or treat diseases. This work investigates the use of maté, or Paraguay tea (*Ilex paraguariensis*), and its natural anti-oxidant property as a health-promotion strategy from an experimental study. Sixty-seven Wistar-FURG rats were used and distributed in two groups. Group I had forty adult rats, subdivided into four groups (A, B, C, and D), where each subgroup had ten rats. Group II had twenty-seven old rats, subdivided into three groups (A, B, C) with ten, seven and ten in each subgroup, respectively. The adult rats that received treatment with a NO-synthase (L-Name), which favors the appearing of reactive oxygen species (free radicals), were afterwards submitted to an *Ilex paraguariensis* water extract. Biochemical and histological tests evinced both the harmful effect of L-Name and the subsequent cell protection caused by the *Ilex paraguariensis* water extract. The old rats submitted to the *Ilex paraguariensis* water extract also presented hepatic cell protection, with the antioxidant effect of this substance, as well as hypoglycemic in the old rats, when treated with *Ilex paraguariensis* water extract for a longer period, and reduced triglyceride ratios. Results allowed to conclude that the regional habit of having Paraguay tea may be beneficial for the consumer's health, strengthening the role of a healthy diet, converging to interaction between the human being, health promotion and environment.

Keywords: *Ilex paraguariensis*; Paraguay tea; Health promotion; Antioxidant; Free radicals; Environment.

RESUMEN

La alimentación tiene un rol determinante en la salud de la población, principalmente cuando los alimentos son empleados para prevenir o tratar dolencias. En este trabajo se ha investigado la utilización del mate (*Ilex paraguariensis*) y sus propiedades de antioxidante natural, como estrategia para la promoción de la salud a partir de un estudio experimental. Fueron utilizados 67 (sesenta y siete) ratones machos, de la linaje Wistar-FURG, distribuidos en dos grupos. Grupo I con 40 (cuarenta) ratones adultos, subdivididos en cuatro grupos (A, B, C, D), con 10 ratones en cada grupo respectivamente. Grupo II, con 27 (veinte siete) ratones viejos, subdivididos en tres subgrupos (A, B, C) con 10 (diez), 7 (siete), 10 (diez) ratones en cada subgrupo, respectivamente. Los ratones adultos que recibieron tratamiento con un inhibidor de NO-sintase (L-Name), que favorece el apareamiento de especies reactivas al oxígeno (radicales libres), fueron sometidos al extracto acuoso de *Ilex paraguariensis*, siendo evidenciado por las pruebas bioquímicas e histológicas el efecto deletéreo del L-Name y la protección celular realizada por el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis*. Los ratones viejos sometidos al extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* presentaron también protección celular hepática, con efecto antioxidante de esta sustancia, bien como efecto hipoglicémico en los ratos viejos cuando tratados con el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* por un período más largo, bien como con las tasas reducidas de triglicéridos. Los resultados obtenidos permitieron concluir que el hábito del mate puede traer beneficios para la salud de quien lo consume, reforzando el rol de una alimentación saludable, convergiendo para la interacción entre el ser humano, la promoción de la salud y del medio ambiente.

Palabras-claves: *Ilex paraguariensis*; Hierba mate; Promoción de la salud; Antioxidante; Radicales Libres; Medio ambiente.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato amino transferase
BD	bilirrubina direta
BI	bilirrubina indireta
BT	bilirrubina total
CAT	catalase
°C	grau(s) Celsius
DH	doenças hepáticas
DHL	desidrogenase láctica
dL	decilitro (s)
DNA	Ácido dexoxiribonucleico
g	grama (s)
H	hora
H.E.	hematoxilina-eosina
HSLe	fração esterificada do colesterol
H ₂ O ₂	água oxigenada, peroxide de hidrogênio
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
KCl	cloreto de potássio
Kg	quilograma (s)
L	Litro (s)
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginine methyl ester
L-NMNA	N ^G -monomethyl-L-arginine methyl ester
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro (s)
mmHg	milímetro de mercúrio
N	número
NO	óxido nítrico
NO ₂	óxido nitroso
O ₂ ⁻	radical hidroxila
OH	radical superóxido
ONOO	peróxido nitrito
ROS	reactive oxygen species
SOD	superóxido dismutase
TGO	glutamate-oxalacetato-transaminase
TGP	glutamate-piruvato-transaminase
U/L	unidade por litro

μL	microlitro
μm	micromolar
V.O.	via oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografias de campos parciais dos subgrupos A, B, C, D, mostrando parênquima hepático	47
Figura 2. Micrografias de campos parciais dos subgrupos A, B, C, D, sendo os três primeiros representando os subgrupos A, B, e C de ratos velhos e o último representando o grupo D com ratos adultos jovens mostrando parênquima hepático	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da concentração sérica de bilirrubinas	44
Tabela 2. Atividade enzimática sérica hepáticas	45
Tabela 3. Atividade de decomposição do peróxido de hidrogênio no tecido hepático em ratos adultos	46
Tabela 4. Efeito da <i>Ilex paraguariensis</i> sobre a atividade enzimática sérica de ratos velhos	48
Tabela 5. Atividade enzimática sérica	50
Tabela 6. Atividade de decomposição do peróxido de hidrogênio no tecido hepático em ratos velhos	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito da administração do extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> sobre a pressão arterial média (PAM)	40
Gráfico 2. Efeito da administração do extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> sobre os níveis séricos de triglicerídeos	42
Gráfico 3. Efeito da administração do extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> sobre a glicemia	43
Gráfico 4. Efeito da administração do extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> sobre os níveis séricos de triglicerídios	49
Gráfico 5. Efeito da administração do extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> sobre a glicemia	50

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
RESUMEN	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE GRÁFICOS	xiv
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Teoria do dano oxidativo: papel dos radicais livres	19
1.2 As defesas antioxidantes	21
1.3 Dano hepático: avaliação	24
1.4 Erva-Mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	26
1.5 Relevância do tema proposto	29
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Animais	33
3.2 Delineamento experimental	33
3.3 Drogas e reagentes	34
3.4 Material vegetal	34
3.5 Procedimentos para o preparo do extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> utilizado por via oral (V.O.)	34
3.6 Procedimentos para a avaliação do efeito do extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> quando inibida a da produção de NO, com a	

utilização do L-NAME – estudo em ratos adultos – 5 e 6 meses de idade	35
3.7 Procedimentos para a avaliação do efeito do extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> administrado por V.O. - estudo em ratos velhos – 18 a 24 meses de idade	36
3.8 Procedimentos gerais para a coleta de sangue e remoção do fígado	37
3.9 Análise bioquímica	38
3.10 Determinação da capacidade de decomposição do peróxido de hidrogênio	38
3.11 Estudo histopatológico	39
3.12 Análise estatística	39
4. RESULTADOS	40
4.1 Efeito da administração do extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> sobre o aumento da pressão média arterial (PAM) induzido pelo inibidor de NO sintase (L-NAME)	40
4.2 Efeitos da administração do extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> e solução aquosa de L-NAME – perfil bioquímico e histopatológico	41
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

RESUMO

A alimentação assume um papel determinante na saúde da população, principalmente quando os alimentos são empregados para prevenir ou tratar doenças. Neste trabalho investigou-se a utilização do mate (*Ilex paraguariensis*) e sua propriedade de antioxidante natural, como estratégia para promoção da saúde a partir de um estudo experimental. Foram utilizados 67 (sessenta e sete) ratos

machos, da linhagem Wistar-FURG, distribuídos em dois grupos. Grupo I, com 40 (quarenta) ratos adultos, subdivididos em quatro subgrupos (A, B, C, D), com 10 (dez) ratos em cada grupo respectivamente. O Grupo II, com 27 ratos velhos, subdivididos em três subgrupos (A, B, C), com 10 (dez), 7 (sete), 10 (dez) ratos em cada subgrupo, respectivamente. Os ratos adultos que receberam tratamento com um inibidor de NO-sintase (L-Name), que favorece o aparecimento de espécies reativas de oxigênio (radicais livres), foram submetidos ao extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, sendo evidenciado pelas provas bioquímicas e histológicas o efeito deletério do L-Name e a proteção celular realizada pelo extrato aquoso da *Ilex paraguariensis*. Os ratos velhos submetidos ao extrato aquoso da *Ilex paraguariensis* apresentaram também proteção celular hepática, com efeito antioxidante desta substância, bem como efeito hipoglicêmico nos ratos velhos quando tratados com o extrato aquoso da *Ilex paraguariensis* por um período mais longo, bem como com taxas reduzidas de triglicérides. Os resultados obtidos permitiram concluir que o hábito de utilizar a erva-mate, principalmente para realizar o chimarrão, pode trazer benefícios para a saúde de quem o consome, reforçando o papel de uma alimentação saudável, convergindo para a interação entre o ser humano, a promoção da saúde e o meio ambiente.

Unitermos: *Ilex paraguariensis*; Erva-mate; Promoção da saúde; Antioxidante; Radicais livres; Meio ambiente;

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos assumem um papel central no nosso cotidiano e fazem parte das nossas relações sociais. Isto faz com que as crenças e as práticas associadas à dieta sejam perpetuadas, edificando uma cultura relacionada à prática alimentar, a qual sofre pouca mudança no decorrer do tempo.

Segundo os antropólogos, as diferenças entre os grupos culturais são marcadas através das suas crenças e práticas relacionadas à dieta (comida). A comida, dieta de um grupo social (sociedade) não deve ser vista apenas como uma forma de nutrição, pois traz consigo significados simbólicos importantes, os quais expressam e criam as relações entre os seres humanos e sua existência, interagindo com o ambiente. Não se pode ver a comida/dieta de uma sociedade dissociada dos aspectos sócios culturais (Helman, 2003).

As crenças e hábitos alimentares caracterizam de maneira própria os grupos sociais, sendo que possuem características peculiares nas formas de cultivo, colheitas, preparo, apresentação e consumo dos alimentos. E, na maioria das vezes, estas características não se fundem entre os diferentes grupos sociais, mantendo a definição de culinária e nutrição de cada povo inalteradas (Levi-Strauss, 1970).

Levi-Strauss (1970) diz que toda a sociedade humana tem uma linguagem falada, e todo o grupo humano processa seus suprimentos alimentares por meio de cozimento.

Esta mesma cultura pode também categorizar os alimentos como remédios e/ou os remédios com alimentos. Neste sentido, teríamos como exemplo o estudo de Etkin e Ross (1982), realizado no norte da Nigéria, com um povo chamado Hausa – que mastiga a castanha de caju para tratar vermes intestinais, diarreias e azia. Entretanto, o mesmo produto é usado como tempero de pratos com legumes. Na comprovação científica das propriedades medicinais e alimentares da castanha de caju, pode-se estimar o valor dos dois empregos.

Na França é baixa a taxa de mortalidade causada por doenças coronárias, apesar da prevalência de dieta rica em gordura e fumo. O chamado paradoxo francês (Renaud ; De Lorgeril, 1992) foi atribuído em parte ao consumo de vinho tinto. Muitos estudos têm mostrado os resultados benéficos do consumo de vinho tinto na prevenção da doença aterosclerose, através da inibição da oxidação das lipoproteínas e de um efeito anti-agregante plaquetário (Seigneur ; Dorian ; Benchimol, 1990) ; (Gaziano ; Buring ; Breslow, 1993).

Hoje a alimentação assume um papel determinante na saúde da população, e existe um grande interesse, cada vez mais crescente, pelos nutricêuticos ou funcionais, entendidos por alimentos ou suprimentos nutricionais empregados para evitar ou tratar uma variedade de problemas. Quando incluídos na dieta alimentar, oferecem benefícios à saúde.

Assim sendo, podemos dizer que a saúde está ligada aos hábitos alimentares que, por sua vez, possuem raízes emaranhadas: sensoriais, emotivas, familiares, sociais, culturais, intelectuais. Através da alimentação balanceada, nosso organismo terá a possibilidade de se restabelecer, paulatinamente modificando o comportamento e metabolismo e, em consequência, o meio e toda a sociedade.

Fatores dietéticos têm um papel preponderante no desenvolvimento da doença crônica, e as organizações de saúde reforçam a idéia do consumo de frutas e vegetais para melhorar a saúde pública (Bloch ; Langseth, 1994). Recentemente ocorreu o “explosivo” interesse pelo uso de substâncias antioxidantes vegetais como suplemento nutricional (Aruoma, 1994).

O efeito protetor contra as doenças cardiovasculares, câncer, doenças hepáticas crônicas, bem como os processos de envelhecimento, entre outras, tem sido atribuído, ao menos em parte, à presença de nutrientes antioxidantes, tais como a vitamina C e β -caroteno, carotenóis, substâncias fenólicas como os flavonóides e fenilpropanóides presentes nas plantas (Rice-Evans, 1996).

O envelhecimento humano desafia a ciência cotidianamente. Atualmente, existem diversas teorias discutindo os mecanismos básicos para explicar o fenômeno do envelhecimento celular. Estas teorias afirmam ser o organismo humano um conjunto complexo de sistemas integrados, onde o processo de envelhecimento ocorre de forma generalizada (Comfort, 1979).

1.1 TEORIA DO DANO OXIDATIVO: PAPEL DOS RADICAIS LIVRES

A teoria do dano oxidativo, ou estresse oxidativo, postula que a maior parte das mudanças fisiológicas relacionadas com a idade pode ser atribuídas ao dano intracelular causado por radicais livres, sendo o dano ao DNA o exemplo mais importante e, conseqüentemente, danifica as células podendo levá-las à morte. Esse processo é provocado pelos radicais livres, que são produzidos pelas próprias

células quando protegem o corpo de infecções e de substâncias tóxicas (Olszewer, 1997).

As principais espécies reativas de oxigênio (ROS), vinculadas ao estresse oxidativo, são representadas pelos seguintes radicais: radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($\cdot OH$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Dawson, V.L. ; Dawson, T.M., 1996).

O estresse oxidativo promove a perda funcional no envelhecimento, bem como a patogênese das doenças crônicas, particularmente as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, entre elas a aterosclerose, doença de Alzheimer e diabetes. Tais preceitos estão embasados em evidências bioquímicas e biomoleculares, *in vitro* e *in vivo*, bastante contundentes. Também parecem ser um dos principais fatores responsáveis por mudanças corporais características da idade e da senescência (Olszewer, 1997)

O processo de envelhecer, ou seja, tornar-se antigo no tempo, está associado com a redução na maioria das funções fisiológicas, na lentidão celular e, em particular, com a diminuição da habilidade que o organismo tem de manter a homeostase durante episódios de estresse agudo, corroborando para o aumento de formação de radicais livres, propiciando o aparecimento de doenças (Pereira e Pereira, 1998).

Gugliucci, com suas recentes descobertas sobre os efeitos protetores a partir dos flavonóides (antioxidantes vegetais) sobre as células, ascende no conhecimento dos mecanismos de prolongar a vida, com o intuito também de proporcionar melhor qualidade no processo de longevidade. O controle de substâncias deletérias para o organismo humano, em especial a síntese de radicais livres com capacidade de inibir o processo oxidativo, constitui uma esperança para retardar o envelhecimento celular.

Portanto, a teoria de que os radicais livres estão associados ao envelhecimento considera que existe uma causa básica, modificada por fatores

genéticos e ambientais, e postula que a utilização do oxigênio tão essencial à manutenção da vida pode estar relacionada ao processo de envelhecimento pela toxicidade dos subprodutos formados nos processos de oxidação e formação dos radicais livres (Gray ; Burger ; Franslang, 1999).

Os radicais livres são formados a partir de processos fisiológicos ou patológicos. As chamadas espécies ativas de oxigênio (EAO) estão ligadas ao processo de geração de estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento constante de intermediários reativos de O_2 , ou gerados em excesso ou acumulados no organismo pela incapacidade das defesas antioxidantes (Dawson e Dawson, 1996 ; Vannucchi ; Iglesias, 1998). Os radicais livres ocorrem em todas as organelas celulares, como mitocôndrias, peroxissomos, lisossomos e nas membranas citoplasmáticas, nuclear e do retículo endoplasmático. Os mecanismos antioxidantes de defesa, primários e auxiliares extra e intracelulares, apresentam localização celular e funções específicas (Vannucchi ; Iglesias, 1998).

À medida que o ser humano envelhece, o sistema antioxidante também envelhece, ocorrendo maior formação de radicais livres e, conseqüentemente, acelerando o processo de envelhecimento. (Hayflyck, 1980, 1998 ; Holbrook ; Martin ; Lockshin, 1996; Roy ; Chatterjee, 1984).

1.2 AS DEFESAS ANTIOXIDANTES

O organismo é dotado de defesas antioxidantes naturais, para minimizar o dano representado pelo excesso de radicais livres (Olszewer, 1997). A primeira linha de defesa é formada pelas enzimas antioxidantes intracelulares. A enzima superóxido dismutase remove o superóxido (O_2^-) e a glutathione peroxidase e a catalase removem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Sies, 1993). Na segunda linha de defesa, aparecem os antioxidantes endógenos como a vitamina E e C e os carotenóides (Block; Langseth, 1994) e os exógenos como os flavonóides, constituintes fenólicos das frutas e tecidos vegetais (Olszewer, 1997).

Os antioxidantes primários agrupam as seguintes substâncias: alfa-tocoferol (vitamina E), beta caroteno (provitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), glutatona, ubiquinonas, urato, carnosina, anserina e enzimas detoxificantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase, glutatona peroxidase/transferase e glutatona redutase (Vannucchi; Iglesias, 1998).

Vitaminas antioxidantes, enzimas ou outros seqüestradores de espécies reativas atuam principalmente diminuindo a concentração ou neutralizando as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ou por inibirem a sua formação ou por facilitarem seu desaparecimento (Hogg, Kalyanaraman, Joseph, 1994 ; Tampo, Yonaha, 1990 ; Walker, 1995).

Os flavonóides são compostos fenólicos, amplamente encontrados em frutas, chás, verduras, vinho tinto e erva mate (*Ilex paraguariensis*), fazendo parte da alimentação diária do ser humano. Contém um número variável de grupos hidroxila fenólicos, com capacidade de atuar como agente antioxidante, com potencial terapêutico em enfermidades, por exemplo, protetor de cardiopatias. Estas propriedades combatem os radicais livres, atuando sobre espécies altamente reativas de oxigênio e nitrogênio envolvidas com o início da peroxidação lipídica (Cook; Samman, 1996), assim como inibidores da produção de óxido nítrico e da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos (Gaston, 1999 ; Moncada, Palmer ; Higgs, 1991).

Níveis aumentados ou geração acelerada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produtos tóxicos da peroxidação lipídica têm sido evidenciados no plasma de indivíduos com doença crônica. O dano hepático produzido na cirrose pode ter um fator de prevenção a partir de modificações na produção de óxido nítrico, visto que o óxido nítrico é um importante regulador de uma gama de funções biológicas, entre elas como agente vasodilatador e importante neurotransmissor. Entretanto, o óxido nítrico pode ser produzido pelos tecidos a partir de nitrito, em condições que o meio torna-se ácido e altamente redutor, como por exemplo, na isquemia (Nagazaki ; Nakano, 1998).

As células são capazes de tolerar o estresse oxidativo de média intensidade, para tal respondem com aumento da síntese nos sistemas de defesa antioxidante de modo a restaurar o equilíbrio. No entanto, o estresse oxidativo pode produzir alterações interdependentes do metabolismo celular, de grande importância, culminando com a morte celular (Cochrane, 1991 ; Murphy, 1999).

Desta forma, esclarecendo-se os mecanismos de ocorrência da lesão, pode-se alterar sua evolução empregando-se estratégias de proteção ao órgão e à célula. Dentre estas, destaca-se o emprego de substâncias que, por diferentes mecanismos de ação, promovem uma redução do dano celular, seja atuando como antioxidante ou minimizando a ação dos produtos decorrentes da fase isquêmica ou na vigência de uma doença crônica, reduzindo o dano hepático e contribuindo para melhorar a função hepática (Pastor ; Sánchez, 1996-1997).

O NO, óxido nítrico, é um radical livre produzido endogenamente por uma série de tipos celulares. O radical foi demonstrado participar de reações fisiológicas que envolvem a regulação do tônus vascular, a neurotransmissão, a função do sistema imune e a agregação plaquetária. (Palmer, Ferrige, Moncada, 1987 ; Ignarro, Byrns, Wood, 1988).

Paradoxalmente, o mesmo radical NO pode ser tóxico tanto para humanos quanto para animais. Elevadas concentrações de NO na atmosfera e a exposição a elevadas concentrações podem ser letais (Clutton, Brack, Stavent, 1990).

A geração endógena ou a administração exógena de NO pode iniciar ou contribuir para reações citotóxicas em vários órgãos ou tecidos (Cazevielle, Muller, Meynier, Bonne, 1993 ; Dawson, V.L., Dawson, T.M., 1991).

O precursor da síntese de NO é o aminoácido L-arginina, demonstrado nas células endoteliais vasculares (Palmer, Rees, Asthon, Moncada, 1988). O NO é formado pela oxidação da L-arginina sob a influência de uma enzima, a NO sintase e na presença de O₂ e de NADPH (Vane, Anggard, Boting, 1990). Inúmeros análogos de L-arginina são inibidores específicos da síntese de NO. Substâncias

como L-NAME (Palmer, Moncada, 1989 ; Mayer, Schimidt, Humbert, 1989) inibem competitivamente a liberação do NO pelas células endoteliais (Palmer et al., 88 b) e tecidos vasculares (Rees, Asthon, Moncada, 1989 ; Mezcua, Palmer, Souza, Moncada, 1989).

Também a L-NIO (N-iminoethyl-L-ornithidine), L-NA (N^G-nitro-L arginina) e o L-NAME (N^G-nitro-L.arginina methyl éster) são inibidores específicos da NO Sintase, induzindo efeitos *in vivo* e *in vitro* (Rees, Palmer, Schule, Moncada, 1990).

Em condições normais, quando a geração orgânica de NO excede a produção de O₂⁻, a reação do NO com o radical livre é muito rápida e forma o peroxinitrito. A conjugação ácida deste forma o ácido peroxinitroso (NOOH), extremamente lábil e rapidamente decomposto para formar os nitratos (NO₃) (Grisham, 1995).

A utilização de inibidores da NO sintase tais como o L-NAME, a relação O₂/NO aumenta e o O₂ é espontaneamente ou enzimaticamente deslocado para a reação de dismutação e a formação de H₂O₂ (Grisham, 1995).

1.3 DANO HEPÁTICO: AVALIAÇÃO

Em decorrência do fígado apresentar-se como um órgão onde suas funções são múltiplas e com repercussão no organismo, as provas de função hepática avaliam a atividade do fígado para análise do grau de deterioração funcional. A extrema reserva funcional do órgão pode produzir resultados normais mesmo diante de lesões extensas, devendo ser de grande importância os achados anatomopatológicos e a correlação clínica. As funções do fígado podem ser avaliadas pelo estudo das proteínas plasmáticas, estudo dos lipídios plasmáticos, determinação da bilirrubina no soro e dosagem de enzimas no soro, entre outras, porém a especificidade das enzimas traduz as lesões de isquemia do parênquima hepático (Medeiros, 2001 ; Tampo, Yonaha, 1990)

Tem-se mostrado de grande valor clínico a dosagem de enzimas hepáticas, sendo representadas no soro para fins de avaliação do grau de disfunção hepatocelular no decurso de doenças hepáticas. Baseia-se esse tipo de exame no conceito de que o achado no soro de teores anormalmente elevados de enzimas intracelulares significa existir alteração funcional ou orgânica das células que as contêm, o que permite fuga das enzimas e sua passagem para o meio circulante. A lesão mínima capaz de permitir a saída de enzimas do interior das células é a alteração da permeabilidade da membrana celular. Quanto mais grave for a lesão celular, passará a afetar o citoplasma, organelas e o núcleo progressivamente. As enzimas celulares são indicadoras de lesão hepatocitária, são glutamato-oxalato-transaminase ou aspartato-transaminase (TGO, ALT), glutamato-piruvato-transaminase ou alanina –transaminase (TGP, ALT), Desidrogenase Lática (DHL). Por ser uma enzima intracelular, níveis elevados de DHL são indicativos de dano tissular. A DHL aumenta desta forma em doenças que cursam com injúria celular, tais como as doenças hepáticas. As enzimas ligadas à membrana são indicadoras de colestase e são representadas pela fosfatase alcalina, leucina-aminopeptidase, 5'Nucleotidase e gama-Glutamil-transferase. As enzimas específicas do plasma indicadoras da capacidade de síntese do fígado são a colinesterase e os fatores de coagulação (Miller ; Gonçalves, 1991).

A dosagem da glicemia e do colesterol e sua porção esterificada (HDL) assumem papel importante, visto que a hiperglicemia também decorre da alteração de glicogênese nas doenças hepáticas, sendo que a partir de lesões parenquimatosas do fígado resultam as alterações nos níveis de colesterol e suas frações. As taxas de colesterol estão aumentadas na icterícia obstrutiva, colelitíase e cirrose. Na senilidade extrema é comum encontrar níveis de colesterol abaixo do normal, e níveis baixos também são encontrados na insuficiência hepática. As lipoproteínas de alta densidade são responsáveis pelo transporte reverso do colesterol das células periféricas para o fígado (Miller ; Gonçalves, 1991).

A bilirrubina é um pigmento resultante do catabolismo da hemoglobina após a sua destruição (normal ou patológica) das hemácias. Ao passar pelo interior do

hepatócito, a bilirrubina conjuga-se com o ácido glicurônico, transformando-se em monoglicurônio e diglicurônio de bilirrubina sob a ação da enzima glicuronittransferase. Assim, a bilirrubina encontra-se no plasma na forma solúvel em água, fração direta, que será escretada pelo fígado e posteriormente para o rim. A bilirrubina livre, fração indireta, é insolúvel em água e fortemente ligada às proteínas plasmáticas, não sendo eliminada nem pelo fígado e nem pelo rim (Miller ; Gonçalves, 1991). Disfunções no metabolismo do pigmento biliar refletem na maioria das vezes doenças hepáticas. Bilirrubina Total (BT) (do latim bilis = bile + ruber = vermelho): mede a intensidade da cor amarelada. Teste útil no diagnóstico diferencial das icterícias e lesões hepáticas. Representa a soma das bilirrubinas indiretas e diretas. Bilirrubina Direta (BD): representa a bilirrubina conjugada com ácido glicurônico valores elevados de bilirrubina direta são encontrados em hepatites, colelitíase, colangites, neoplasias e obstruções biliares de origem hepática. Bilirrubina Indireta (BI): Representa alterações produzidas como conseqüências de afecções totalmente distintas como defeitos na conjugação hepática das bilirrubinas e em obstruções causadas por cálculos biliares ou por neoplasmas (como os cânceres).

Os lipídios são substâncias orgânicas formadas por vários compostos, cuja principal característica consiste em sua insolubilidade na água. Os lipídios mais abundantes no plasma são representados pelo colesterol, gorduras neutras (triglicerídeos), fosfolipídios, ácidos graxos livres, glicolipídios, hormônios e vitaminas lipídicas.

A catalase é uma hemoproteína peroxidase específica para o H_2O_2 , presente em todos os tipos de células dos mamíferos, amplamente distribuída nos órgãos tais como fígado rins, cérebro e eritrócitos (Cross ; Halliwell ; Borish, 1987). A atividade da catalase no controle do H_2O_2 formado pela dismutação do radical superóxido, está na transformação em água e oxigênio molecular. A atividade da enzima, medida da velocidade de consumo do peróxido de hidrogênio, responde às condições que aumentam o estresse oxidativo, aumentando a sua atividade.

1.4 ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)

A investigação fitoquímica das espécies de *Ilex* (Alikaridis, 1987), incluindo *I. paraguariensis*, mostra que essa planta contém muitas classes de constituintes químicos incluindo flavonóides como quercetina e rutina (Roberts, 1956), terpenóides (ácido ursólico) nas folhas (Nooyen, 1920 ; Mendive, 1940), alcalóides (cafeína) nas sementes e folhas (Lendner, 1918 ; Bohinc, Kobar-Smid, 1978), aminoácidos (alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, triptofano, tirosina e valina) nas folhas (Cascon, 1955), ácidos graxos (láurico, palmitoleico, oleico, linoleico) nas sementes (Cattaneo, De Sutton, Rodriguez, 1952) carboidratos (Chlamtac, 1955), vitaminas, carotenóides (Villela, 1938-1939), triterpenóides e saponinas (Gosman, 1989-1995).

O gênero *Ilex* consiste de cerca de 400 espécies sob a forma de árvores ou arbustos. Suas folhas são simples e alternadas, isoladas ou agrupadas com pequenas flores e frutos vermelhos ou amarelos (Alikaridis, 1987).

Entre as espécies desse gênero pode-se destacar *I. Aquifolium* (Europa), *I. Opaca* (América), *I. Cornuta* (China) e *I. Cremata* (Japão). No Brasil a espécie mais cultivada é *I. Paraguariensis* (*I. Paraguayensis*, *I. paraguensis*), onde suas folhas são usadas para preparar uma tradicional bebida chamada “mate” ou “chimarrão”.

A erva mate, *Ilex paraguariensis* St. Hill, pertencente à família Aquifoliaceae, nativa do sul do Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (Pio Correa, 1984). Foi classificada pelo naturalista francês August de Saint Hillaire (St Hill), em 1822.

Conhecida há mais de 3.000 anos, torna-se cada vez mais popular no mundo inteiro. No Brasil, os índios Guaranis tinham o hábito de tomar uma bebida chamada chimarrão. O ato de “matear” é uma herança de Tupã aos índios Guaranis, e, em mística, supera o cachimbo da paz dos índios pelas vermelhas do Norte dos Estados Unidos da América, já que este ritual é singular e ocasional, enquanto que o

chimarrão está incorporado à vida cotidiana dos gaúchos, catarinenses, paranaenses, uruguaios, paraguaios e argentinos. (Fagundes, 1981).

O chimarrão no Brasil, popularizado no estado do Rio Grande do Sul, é bebida típica dos estados sulistas e no passado, por volta de 1853, desempenhou papel fundamental e de influência na separação do Paraná de São Paulo, constituindo o ciclo da Erva Mate. A aceitação do mate como bebida vai se universalizando por suas apreciáveis qualidades gustativas e medicinais (Mazuchowski, 1989). O chimarrão é uma bebida preparada a partir da infusão de erva-mate, *Ilex paraguariensis*, com água em temperatura entre 80-100 graus centígrados, tendo como produto um mate amargo que se toma em cuia de porongo por uma bomba de metal (Berkai ; Braga, 2000).

Popularmente, atribui-se ao chimarrão propriedades desintoxicantes, particularmente eficazes numa alimentação rica em carnes (Berkai ; Braga, 2000). Usado também como diurético (Mazzafera, 1994), para pessoas com problemas de circulação e varizes (Cruz, 1982), excitante e tônico do sistema nervoso, facilitando o trabalho intelectual. Graham (1984) relatou que o mate é a primeira fonte de metilxantinas na dieta de alguns grupos da América do Sul. Devido ao seu alto conteúdo de purinas (Baltassat ; Dorbour ; Ferry, 1984) atribuem-se às ações depurativas e diuréticas das folhas de *I. paraguariensis*.

Estudos recentes demonstram que o extrato aquoso preparado a partir da infusão da *Ilex paraguariensis* apresenta propriedades relaxantes sobre o músculo liso vascular, e que este efeito vasodilatador é diminuído na presença de inibidores da NO sintase, implicando um mecanismo dependente do NO e do endotélio vascular (Muccilo-Baisch ; Johnston ; Paganini Stein, 1998).

A determinação dos níveis de compostos fenólicos foi também objeto de estudo no que diz respeito à erva-mate. Estudos realizados na FURG (Fundação Universidade Federal do Rio Grande) avaliaram e quantificaram os teores de fenóis de amostras vegetais de erva-mate e comprovaram seu conteúdo, explicando suas propriedades antioxidantes (Furlong ; Colla ; Bortolato ; Baisch ; Souza, 2003).

As propriedades antioxidantes de substâncias encontradas no chimarrão exercem um efeito protetor direto nas células, e a erva mate é capaz de inibir o processo de oxidação do LDL (mau colesterol) e pode ajudar a prevenir doenças cardiovasculares, conforme sugeriram vários estudos (Gugliucci, Stahl, 1995 ; Gugliucci, 1996 ; Schinella, 2000).

Na FURG, os resultados obtidos no trabalho de dissertação de mestrado (Paganini Stein, 2002) permitiram evidenciar a redução dos níveis de colesterol e de triglicerídeos e o comprovar o efeito vasodilatador das frações ricas em compostos fenólicos, mesmo diante da doença aterosclerótica induzida experimentalmente (Lauz ; Muccillo-Baisch et al. 2002).

Considerando as propriedades comprovadas popularmente e pelos recentes estudos científicos a respeito dos efeitos da *Ilex paraguariensis* como substância antioxidante, considerou-se a hipótese desta atuar impedindo a no envelhecimento celular e também desempenhar um papel de proteção hepática tanto nas lesões agudas, exemplificando as lesões de isquemia, quanto em doenças crônicas, como a cirrose (McCord, 1983, 1991, 1992 ; Medeiros, 2001).

1.5 RELEVÂNCIA DO TEMA PROPOSTO

O envelhecimento e as doenças crônicas, de um modo geral, são fatores de grande influência na vida do ser humano. O fato de envelhecer com saúde oferece dignidade e bem estar. As doenças crônicas acometem grande número de indivíduos e representam uma parcela considerável de gastos ao Sistema de Saúde. Tanto o envelhecimento biológico quanto o patológico apresentam grande complexidade, e atuar na prevenção e no tratamento das mesmas implica em papel importante na saúde coletiva.

A compreensão dos mecanismos envolvidos nos modelos experimentais de danos hepáticas e o comportamento do envelhecimento frente à utilização da erva

mate (*Ilex paraguariensis*) servirão para a compreensão do mecanismo de estresse oxidativo e formação de radicais livres, tornando possível, com o entendimento destas reações metabólicas, instituir medidas preventivas e terapêuticas para o equilíbrio do organismo.

Sendo que a *Ilex paraguariensis*, erva mate, usada para fazer o chimarrão está enraizada à cultura do povo do Rio Grande do Sul, este trabalho tem o compromisso de estudar os efeitos desta erva junto ao maior órgão metabólico do nosso organismo, o fígado, bem como evidenciar sua ação antioxidante diante do envelhecimento. Importante é fundamentar esta pesquisa para comungar com a saúde e o bem estar deste povo nas rodas de chimarrão.

ABSTRACT

Feeding represents a determinant role in population health, especially when food is used to prevent or treat diseases. This work investigates the use of maté, or Paraguay tea (*Ilex paraguariensis*), and its natural anti-oxidant property as a health-promotion strategy from an experimental study. Sixty-seven Wistar-FURG rats were used and distributed in two groups. Group I had forty adult rats, subdivided into four groups (A, B, C, and D), where each subgroup had ten rats. Group II had twenty-seven old rats, subdivided into three groups (A, B, C) with ten, seven and ten in each subgroup, respectively. The adult rats that received treatment with a NO-synthase (L-Name), which favors the appearing of reactive oxygen species (free radicals), were afterwards submitted to an *Ilex paraguariensis* water extract. Biochemical and histological tests evinced both the harmful effect of L-Name and the subsequent cell protection caused by the *Ilex paraguariensis* water extract. The old rats submitted to the *Ilex paraguariensis* water extract also presented hepatic cell protection, with the antioxidant effect of this substance, as well as hypoglycemic in the old rats, when treated with *Ilex paraguariensis* water extract for a longer period, and reduced triglyceride ratios. Results allowed to conclude that the regional habit of having Paraguay tea may be beneficial for the consumer's health, strengthening the role of a healthy diet, converging to interaction between the human being, health promotion and environment.

Keywords: *Ilex paraguariensis*; Paraguay tea; Health promotion; Antioxidant; Free radicals; Environment.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, em animais de experimentação adultos saudáveis, adulto com doença hepática e velhos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar as alterações bioquímicas, hemodinâmicas e histopatológicas de ratos que receberam o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e foram submetidos a um tratamento com um inibidor da NO sintase, que favorece o aparecimento de espécies ativas de oxigênio (radicais livres), promovendo lesão hepatocelular, estudo realizado em ratos adultos.
- ✓ Identificar a influência do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre o tecido hepático de ratos velhos, com análise bioquímica e histopatológica.
- ✓ Identificar o provável efeito protetor da *Ilex paraguariensis* sobre as células hepáticas dos animais de experimentação.
- ✓ Identificar a capacidade do extrato hepático de ratos tratados com o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em decompor o peróxido de hidrogênio, tanto em animais adultos quanto em animais velhos.

RESUMEN

La alimentación tiene un rol determinante en la salud de la población, principalmente cuando los alimentos son empleados para prevenir o tratar dolencias. En este trabajo se ha investigado la utilización del mate (*Ilex paraguariensis*) y sus propiedades de antioxidante natural, como estrategia para la promoción de la salud a partir de un estudio experimental. Fueron utilizados 67 (sesenta y siete) ratones machos, de la linaje Wistar-FURG, distribuidos en dos grupos. Grupo I con 40 (cuarenta) ratones adultos, subdivididos en cuatro grupos (A, B, C, D), con 10 ratones en cada grupo respectivamente. Grupo II, con 27 (veinte siete) ratones viejos, subdivididos en tres subgrupos (A, B, C) con 10 (diez), 7 (siete), 10 (diez) ratones en cada subgrupo, respectivamente. Los ratones adultos que recibieron tratamiento con un inhibidor de NO-sintase (L-Name), que favorece el apareamiento de especies reactivas al oxígeno (radicales libres), fueron sometidos al extracto acuoso de *Ilex paraguariensis*, siendo evidenciado por las pruebas bioquímicas e histológicas el efecto deletéreo del L-Name y la protección celular realizada por el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis*. Los ratones viejos sometidos al extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* presentaron también protección celular hepática, con efecto antioxidante de esta sustancia, bien como efecto hipoglicémico en los ratos viejos cuando tratados con el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* por un período más largo, bien como con las tasas reducidas de triglicéridos. Los resultados obtenidos permitieron concluir que el hábito del mate puede traer beneficios para la salud de quien lo consume, reforzando el rol de una alimentación saludable, convergiendo para la interacción entre el ser humano, la promoción de la salud y del medio ambiente.

Palabras-claves: *Ilex paraguariensis*; Hierba mate; Promoción de la salud; Antioxidante; Radicales Libres; Medio ambiente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

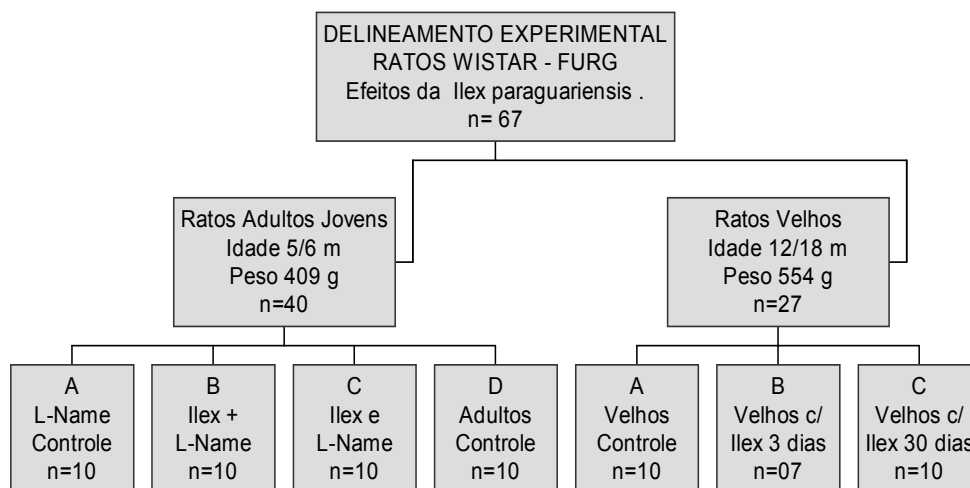
3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos, Wistar, com peso de 409 g \pm 11,2 (n=40), com idade entre 5 e 6 meses, e ratos com peso de 554 g \pm 22,3 (n=27), com idade de 12/18 meses.

Os animais foram provenientes do Biotério Central da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e mantidos nas dependências do Departamento de Ciências Fisiológicas sob condições controladas de temperatura (20-22°C), de umidade (55 \pm 1%) e de fotoperíodo (12 h claro/12h escuro). Os

animais foram alimentados com dieta comercial (Nuvital, Colombo, PR) e água *ad libitum*.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



3.3 DROGAS E REAGENTES

N^G-L-nitroarginina methyl ester (L-NAME) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ambas provenientes da Sigma (St. Louis, MO, USA) e dois anestésicos xilazina (Rhonpun®) e quetamina (ketalar®).

3.4 MATERIAL VEGETAL

Foi usada uma amostra comercial (Erva Mate Seiva do Mate) da cidade de Ilópolis (RS), a partir da qual foram preparados os extratos para administração por via oral (V.O.) nos tratamentos crônicos.

3.5 PROCEDIMENTOS PARA O PREPARO DO EXTRATO AQUOSO DE *ILEX PARAGUARIENSIS* UTILIZADO POR VIA ORAL (V.O.):

Do produto comercial foram utilizadas 110g, diluídas em 1L de água destilada. A mistura foi levada ao aquecimento, em Banho-maria, durante 15 minutos

com temperatura que não ultrapassou 80°C. O extrato bruto foi então filtrado e determinado seu peso seco (AD-4714, MOISTURE BALANCE, USA), sendo que o rendimento do extrato de *Ilex paraguariensis* foi de 72% e a concentração final variou entre 36 e 40 mg/ml.

Os animais receberam o extrato bruto de *Ilex paraguariensis* diluído em água, na proporção de 150 ml de extrato/150 ml de água, durante o tempo previsto para cada protocolo. O extrato foi administrado por via oral no lugar da água, utilizando-se o bebedouro da gaiola.

A avaliação do efeito hipertensor provocado pela ingestão de L-Name, foi realizada a partir dos estudos referenciados segundo Smith (1999), que relatou em sua pesquisa com ratos o efeito de vasoconstrição na parede dos vasos resultando em aumento da pressão arterial a partir da ingestão de L-Name. Para evidenciar e controlar a eficácia lesiva do L-Name mensuramos e monitoramos os animais de experimentação antes da introdução da substância e imediatamente à última dose ingerida. Foram monitorados os animais dos grupos que receberam o L-Name (Grupo I), subgrupos A, B, C, sendo que o grupo D não utilizou L-Name, porém foi o controle para os animais saudáveis. Foram colhidas 10 medidas para cada animal antes do L-Name e mais 10 medidas após a última dose de L-Name.

Foram realizados períodos de treinamento anterior ao experimento para dominar a técnica de mensuração, e a medida foi procedida na cauda do rato. Foram realizadas dez medidas para cada animal por vez.

3.6 PROCEDIMENTOS PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *ILEX PARAGUARIENSIS* QUANDO INIBIDA A DA PRODUÇÃO DE NO, COM A UTILIZAÇÃO DO L-NAME - ESTUDO EM RATOS ADULTOS – 5 E 6 MESES DE IDADE

Para o grupo I foram utilizados 40 ratos. Os animais foram divididos em quatro subgrupos:

Subgrupo A, os animais foram tratados com solução oral de L-NAME (100 mg/kg), administrada em substituição à água *ad libitum*, por um período de 30 dias. Estes animais foram controlados nos seus valores pressóricos antes, e depois do tratamento com L-Name.

Subgrupo B, os animais foram tratados com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (100 mg/kg), administrada em substituição à água *ad libitum*, durante um período de 30 dias. Decorrido este período, suspendeu-se o extrato de *Ilex paraguariensis* e estes animais iniciaram a beber a solução oral de L-Name (100 mg/kg) por mais 30 dias. Estes animais foram controlados nos seus valores pressóricos antes, e imediatamente ao último dia de ingestão da solução oral com L-Name. O objetivo na mensuração dos valores pressóricos foi avaliar o comportamento dos níveis pressóricos diante do uso via oral desta substância, visto que com o L-Name sabe-se que ocorre aumento dos níveis tensionais em consequência da vasoconstrição capilar e destruição hepática.

Subgrupo C, os animais receberam durante 30 dias o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (100 mg/Kg) misturada à solução oral de L-NAME (100 mg/kg), administrada em substituição à água *ad libitum*. Estes animais foram controlados nos seus valores pressóricos antes e depois do tratamento com o L-Name.

Subgrupo D, constituiu-se no grupo controle, onde os animais utilizados para comparação não receberam nenhum tratamento específico. Ao fim do período de observação (30 dias), os animais foram anestesiados e foi coletada uma amostra de sangue. Ao término, os animais foram sacrificados e o fígado retirado para pesagem análise histológica e bioquímica; Este grupo de ratos adultos e sadios serviu como grupo controle tanto para o Grupo I quanto para o grupo II (sendo que no grupo II, os animais adultos sadios e aos animais idosos que beberam o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*).

3.7 PROCEDIMENTOS PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *ILEX PARAGUARIENSIS* ADMINISTRADO POR V.O. – ESTUDO EM RATOS VELHOS – 18 A 24 MESES DE IDADE

Para a avaliação da ação da *Ilex paraguariensis* frente o envelhecimento biológico foi constituído o grupo II com 27 ratos, machos, (18 a 24 meses) considerados idosos, distribuídos nos seguintes subgrupos:

Subgrupo A, os dez ratos considerados velhos que constituíram este grupo, não receberam tratamento prévio, permaneceram com a alimentação e ingesta hídrica normal.. Foram submetidos à operação, coleta de sangue e retirada do fígado.

Subgrupo B, este grupo com sete ratos velhos, os quais foram tratados por via oral no período de três dias com o extrato de *Ilex paraguariensis* substituindo a água, foram submetidos à operação, coleta de sangue e retirada do fígado.

Subgrupo C, este grupo formado por dez ratos velhos, submetidos a tratamento por via oral por trinta dias com o extrato de *Ilex paraguariensis* substituindo a água. Foram submetidos à operação, coleta de sangue, eutanásia e retirada do fígado.

3.8 PROCEDIMENTOS GERAIS PARA A COLETA DE SANGUE E REMOÇÃO DO FÍGADO

Os animais foram anestesiados, via intramuscular, com uma associação de fármacos, xilazina 25 mg/Kg de peso e quetamina 50 mg/Kg de peso. Os animais foram considerados anestesiados após a perda do reflexo córneo-palpebral e ausência do reflexo de retirada ao estímulo doloroso por pressão da pata traseira. Procedeu-se à tricotomia da região abdominal e a anti-sepsia com solução de álcool iodado na delimitação da área operatória. A seguir foi realizada laparotomia mediana, incisando-se com lâmina de bisturi n.15 abrangendo a linha mediana até a abertura do peritônio. Com a cavidade abdominal aberta, foram identificadas as seguintes estruturas: fígado, veia cava caudal, localizada imediatamente abaixo das veias renais. Após o reconhecimento das estruturas, foi coletada a primeira amostra de sangue (1,5 mL) diretamente da veia cava caudal, com seringa de vidro de 5 mL, com agulha 30x18. Posteriormente a estes procedimentos, os animais foram sacrificados por exsanguinação e os fígados foram retirados, pesados e divididos em amostras, identificadas e pesadas, separadas individualmente para posterior análise bioquímica e histológica.

3.9 ANÁLISE BIOQUÍMICA

3.9.1 Tecido Sanguíneo

As amostras de sangue retiradas dos animais de experimentação foram enviadas imediatamente ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (HU da FURG), para serem determinados os valores da aspartato amino transferase (TGO), alanina aminotransferase (TGP), desidrogenase láctica (DHL), a concentração total de bilirrubinas (BT), bilirrubina direta (BD), bilirrubina indireta (BI) e amilase, HDL, colesterol, triglicerídeos e glicemia.

3.9.2 Tecido Hepático

O fígado foi separado em quatro porções. A primeira amostra foi destinada para o preparo do homogeneizado a fresco para posterior congelamento e determinação da atividade da catalase (CAT), e as porções B e C foram armazenadas em congelação de auto freezer a -80 graus Celsius . A amostra D foi destinada ao estudo histológico.

3.10 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE DECOMPOSIÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O fígado foi homogeneizado em KCl (1,15%, 1:10) e centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos. A seguir, o sobrenadante foi recolhido e diluído com 2 mL de água destilada. Em seguida, para a determinação da atividade enzimática, foram colocados em um tubo de ensaio 5 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e acrescentados 5 mL do sobrenadante e deixado à temperatura ambiente. Após passado este período, foi adicionado ácido sulfúrico a 10% (H_2SO_4), deixado em repouso por 5 minutos. Por fim foi feita a determinação do H_2O_2 por titulometria. Os resultados serão expressos em mg de H_2O_2 /min. (BOVERIS E CHANCE, 1979, modificado por Plummer, 1978).

3.11 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

As amostras de fígado foram fixadas em formaldeído a 10% para posterior análise histológica. Foram utilizados os métodos de coloração com Hematoxilina-Eosina e Citocromo.

Para quantificação das lesões provocadas pelos radicais livres foi estabelecido um padrão de análise histopatológica a partir de quatro campos observados, classificadas como alterações ausentes, discretas, moderadas, intensas. Foram submetidas a este critério as alterações do parênquima hepático como fibrose, congestão, necrose, dano da arquitetura hepatocelular e lobular e

conseqüente dano hepático em sua magnitude. Também foram avaliados os espaços periportais quanto à presença de infiltrado inflamatório, e observação dos sinusóides quanto à presença das células de Kupfer cujo papel é de fagocitose (Didoné, Cerski, Kalil, 2002).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados serão apresentados como média \pm erro-padrão da média. A análise estatística foi feita através do programa STATISTIC, versão 2000/2002, empregando-se os testes de análise de variância e o teste complementar de Tukey, para determinar diferenças significativas entre os grupos e dentro do próprio grupo de animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁGUILA, M.B. ; LOUREIRO, C.C. ; PINHEIRO, A.R. ; MANDARIM-de-LACERDA, C.A. *Metabolismo Lipídico de ratos alimentados com diferentes tipos de lipídios*. Arq. Brás Cardiol, v78(n.1), 25-31, 2002.

ALIKARIDIS, F. *Natural Constituents of Ilex species*. Journal of Ethnopharmacology 20, 121-144, 1987.

AMEZCUA, J.L. ; PALMER, R.M.J. ; SOUZA, B.M. ; MONCADA, S. *Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation on the rabbit*. British Journal of Pharmacology 97, 1119-1124, 1989.

ARUOMA, O.I. *Characterization of drugs as antioxidant prophylactics*. Free Radical Biology & Medicine, 20(5), 675-705, 1996.

BALTASSAT, F. ; DORBOUR, N. ; FERRY, S. *Study on the purine level in caffeine drugs*. Plantes Medicinales et Phytoterapie 18, 195-263, 1984.

BATRA, S. ; RAKUSAN, K. *Capillary length, tortuosity, and spacing in rat myocardium during cardiac cycle*. Am J Physiol , 32 (Heart Circulation Physiol 32): H1369-H76, 1992.

BERKAI, D. ; BRAGA, C.A. *500 anos de história da erva mate*. Canoas (RS), Cone Sul, 2000.

BLOCK, G. ; LANGSETH, L. *Antioxidant vitamins and disease prevention*. Food Technology, 48 (7), 80-84, 1994.

BOVERIS, A. ; CHANCE, B. *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide*. Biochem. J.134;707-716.1973.

BOVERIS, A. ; LLESUY,S.e FRAGA, C.G. *Increased liver chemiluminescence in tumorbearing mice*. Free Rad. Biol. Med. 1, 131-138, 1985.

BRUCKDORFER, K.R. ; DEE, G. ; JACOBS, M. ; RICE-EVANS, C. (1990). *The protective action of nitric oxide against membrane damage induced by myoglobin radicals*. Biochemical Society Transactions 18, 286-287.

BULT, H. ; HERMAN, A.G. ; MATTHYS, K.E. *Antiatherosclerotic activity of drugs in relation to nitric oxid function*. European Journal of Pharmacology 375, 157-176, 1999.

BURDET, R. ; CRISCIONE, L. Use of the isolated, perfused mesenteric bed of the rat in vascular pharmacology. In: *Isolated perfused organ preparation 5th*, Freiburg Focus on Biomeasurment February, 27th and 28th Publisher Gessellschaft fur ERFAHRUNGSTRANFER IN DER Biomesstechnik e.v. Weihermattenweg 11 D-7801 Buchenback, Germany, 144-158, 1989.

CASCON, C.S. *Amino acids in Ilex paraguariensis*. Boletín del Instituto de Química Argentina (Rio de Janeiro) 38, 7-15, 1955.

CATTANEO, P. ; DE SUTTON, K.G. ; RODRIGUEZ, M.L. *Chemical composition of the seed oil of Ilex paraguariensis*. Anales de la Direccion Nacional de Quimica (Buenos Aires) 5 (9), 9-12, 1952.

CHEN, C.W. ; HO, H.T. *Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black tea*. Journal of Food Lipids 2, 35-38, 1995.

CHEN, G. ; SUZUKI, H. ; WESTON, A.H. *Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessel*. British Journal of Pharmacology 95,1165-1174, 1998.

CHIEN K.R. ; FARBER, J.L. *Microsomal dysfunction in ischemic rat liver cells*. Arch Biochem Biophys; 180: 191-98,1997.

CHLAMTAC, E.B. *Sugars in Ilex paraguariensis*. Boletín del Instituto de Química Argentina (Rio de Janeiro) 38, 17-24, 1955.

COCHRANE, C.G. *Mechanisms of oxidant injury of cells*. Mol Aspects Med;12:137-147, 1991.

COMFORT, A. *The biology of senescence*. 3.ed. New York: Elsevier, 1979, 414 p.

COOK, N.C. ; SAMMAN, S. *Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources*. Elsevier Science Inc. New York, 1996.

CRUZ, G.L. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*. 2.ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1982, 599 pp.

DAWSON, V.L. ; DAWSON, T.M. *Free radical and neuronal cell death*. Cell Death and differentiation, V.3 p71-78, 1996.

DIDONÉ, E.C. ; CERSKI, C.T. ; KALIL, A.N. *N-acetilcisteína diminui a congestão hepática na lesão de isquemia e reperfusão - estudo experimental*. Porto Alegre: FFFCMPA/ISCOMPA, 2002.

DUNNE, J.B. ; DAVENPORT, M. ; WILLIAMS, R. ; TREDGER, J.M. *Evidence that S-Adenosylmethionine and N-Acetylcysteine reduce injury from sequential cold and warm ischemia in the isolated perfused rat liver*. Transplantation, 57:1161-68, 1994.
EPSTEIN, F.H. *Oxygen - derived free radicals in post ischemic tissue injury*. The New Engl. J. Med.; 312: 159-163, 1985.

FAGUNDES, G. *Cevando mate*. Porto Alegre, 1999.

FARIA, J.L. *Anatomia Patológica Geral*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977.

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

GASTON, B. *Nitric oxide and thiol groups*. Bioch Bioph Acta-Bioenergetics; 1411: 323-33, 1999.

GONZALES, Y. ; MACHADO, M.C.C. *Isquemia hepática e glicogênio: estudo experimental*. Rev. Hosp. Clínicas Fac. Med. São Paulo.; 34: 74-9, 1979.

GRAHAN, H.N. *Maté*. Progress in Clinical and Biological Research: 158, 179-183, 1984.

GAZIANO, J.M. ; BURING, J.E. ; BRESLOW, J.L. *Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions and decreased risk of myocardial infarction*. N England J Med , 329:1829-34 1993.

GRAY, M.W. ; BURGER, G. ; FRANSLANG, B. *Mitochondrial Evolution*. Science, v283, p.1476-1481, 1999.

GRISHAM, M.B. *Interaction between nitric oxide and superoxide: role in modulating leucocyte adhesion in the postschemic microvasculature*. Transplant Proc. V 27(5) pg. 2842-2843, 1995.

GUGLIUCCI, A. *Antioxidant effects of Ilex paraguariensis; induction of decreased oxidizability of human LDL in vivo*. Bioch Biop Res Commun; 224:338-344, 1996.

GUGLIUCCI, A. ; STAHL, A.J. *Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of Ilex paraguariensis*. Biochemical Molecular Biological Interactions; 35: 47-56, 1995.

HALLIWELL, B. *Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence?* Lancet 344, 721-724, 1994.

HAM, A.W. Tratado de Histologia. 6.ed. Nueva Editorial Interamericana, S.A de C.V., L 06894, 1970.

HAYFLYCK, L. *Cell Biology of Human Aging*. Scient Americ, v. 242, p58-65, 1980.
HAYFLYCK, L. *Biology of ageing: a review*. Australian Journal on Ageing, v.17, 1, p. 29-32, 1998.

HOGG, N. ; SINGH, R.J. et al. *The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide*. FEBS Lett; 382:233-28, 1996.

HOGG, N. ; KALYANARAMAN, B. ; JOSEPH J. ; STRUCK, A. ; PARTHASARATHY, S. *Inhibition of low density lipoprotein oxidation by nitric oxide*. FEBS Letters 334, 170-174, 1993.

HOLBROOK, N.J. ; MARTIN, G.R. ; LOCKSHIN, R.A. *Cellular aging and cell death*. New York: Wiley-liss, v.16, 319 p. , 1996.

IGNARRO L.J. ; KADOWITZ, P.J. *The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 25, 171-191, 1985.

IGNARRO, L.J. ; BYRNS, R.E. ; WOOD, K.S. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical . In: *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and endothelium*. Ed. by P. M. Vanhoutte, Raven Press, New York, pp. 427-436, 1988.

LAUZ, S.H.M. *Avaliação da lesão isquêmica normotérmica do fígado: papel da oclusão do ducto biliar principal e a modulação pela N-acetil cisteína*. São Paulo: Escola Paulista de Medicina. [Tese de Doutorado em Medicina], 2001.

LAUZ, S.H.M. ; MUCCILLO-BAISCH, A.L. et al. *O papel de um flavonóide – Ilex paraguaiensis – comparado com a N-acetilsisteína na isquemia normotérmica do fígado*. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. Rio de Janeiro: CBC, 2004.

LENDNER, A. The seeds of *Ilex paraguariensis*. St. Hilaire. Schweizerische Apotheker-Zertung 56, 565-569, 1918.

KERRY, N. ; RICE-EVANS, C. *Inhibition of peroxynitrite - mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships*. J Neurochem, 73:247-253, 1999.

MASINI, E. ; SALVEMINI, D. ; NDISANG, P.G. ; BERNI, L. ; MONCINI, M. ; BIANCHI, S. ; MANNAIONI, P.F. *Cardioprotective activity of endogenous and exogenous nitric oxide on ischaemia reperfusion injury in isolated guinea pig hearts*. Inflammation Research, 48, 561-568, 1999.

MARUBAYASHI, S. et al. *Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: Prevention of damage by alpha-tocopherol administration* vol. 90, n.2, 1985.

MAYER, B. ; SCHMIDT, K. ; HUMBERT, R. ; BOHNE, E. *Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca⁺⁺ dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase*. Bio chemical and Biophysical Research Communications 164, 678-685, 1989.

MAZUCHOWSKI, J.Z. *Manual da erva-mate (Ilex paraguaiensis ST, Hill.)*. Curitiba: Empresa Paranaense Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER), 1989. 104 p.

MAZZAFERA, P. *Caffeine, theobromine and theophylline distribution in Ilex paraguariensis*. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 6(2), 149-151, 1994.

MCCORD, J.M. *Oxygen - derived free radicals in postischemic tissue injury*. The New Engl. J. Med.; 312: 159-63, 1985.

MCCORD, J.M. *The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology*. Surgery; 94: 412-14, 1983.

MENDIVE, J.R. *Isolation of α -amyrin and ursolic acid in the leaves of Ilex paraguariensis*. Journal of Organic Chemistry 5, 235-237, 1940.

MONCADA, S. ; PALMER, R.M.J. ; HIGGS, E.A. *Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology*. Pharmacol Revs; 43:109-42, 1991.

MUCCILLO BAISCH, A.L. ; JOHNSTON, K.B. ; PAGANINI STEIN, F. *Endothelium - dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of Ilex paraguariensis on mesenteric arterial bed of rats*. Journal of Ethnopharmacology 60, 133-139, 1998.

MURPHY, M.P. *Nitric oxide em and cell death*. Bioch. Acta-Bioenergéticos, 1411:401, 1999.

NAGASAKI, H. ; NAKANO, H. et al. *Efficacy of preconditioning wiht N-acetylcysteine against reperfusion injury after prolonged cold ischaemia in rats liver in which glutathione had been reduced by buthionine sulphoxime*. Eur J Surg; 164:139-46, 1998.

OLSZEWER, E. *Tratado de Medicina Ortomolecular*. 2.ed. São Paulo: Nova Linha, 1997.

PAGANINI STEIN, F.L. ; BOURSCHEID, A.B. ; SOUZA SOARES, L.A. ; FURLONG, E.B. ; MUCCILLO BAISCH, A.L. *Endothelium - dependent vasorelaxing activity of flavonoid-rich extract from Ilex paraguariensis on mesenteric arterial bed of rats (2002 submitted)*.

PALMER, P.M.J. ; MONCADA, S.A. *A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells*. Biochemical and Biophysical. Research. Communications 158, 348-352, 1989.

PALMER, R.M.J. ; REES, D.D. ; ASHTON, D.S. ; MONCADA, S. *L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation*. Biochemical and Biophysical. Research. Communications 153, 1251-1256, 1988.

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

PALMER, R.M.J. ; RESS, D.D. ; ASHTON, D.S. ; MONCADA, S. *L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation*. Biochemical and Biophysical Research Communications 153 (3), 1251-1256, 1988.

PASTOR, A. ; SÁNCHEZ COLLADO, P. et al. *Microsomal function in biliary obstructed rats: effects of S adenosylmethionine*. J. Hepatol. 24, 353-359, 1996.

PASTOR, A. ; SÁNCHEZ COLLADO, P. et al. *Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of S- adenosylmethionine*. J. Hepatol. 27, 363-367, 1997.

PEREIRA, J.S. ; PEREIRA, A.L. *Envelhecimento: um desafio multidisciplinar*. Recife: Neurobiol. 61; 1: 9-16, março 1998.

PEREZ-TAMAYO, R. *Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 and adequate model of human cirrhosis?* Hepatology, 3, 112-120, 1983.

PIO CORRÊA, M. In: *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Vol III, pp395, 1984.

REES, D.D. ; PALMER, R.M.J. ; SCHULE, R. ; HODSON, H.F. ; MONCADA, S. *Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo*. British Journal of Pharmacology 101, 746-752, 1990.

RENAUD, S. ; DE LORGERIL, M. *Wine, alcohol, platelets and the French Paradox for coronary Heart disease*. Lancet 339, 1523-1526, 1992.

RESS, D.D. ; PALMER, R.M.J. ; MONCADA, S. *Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure*. Proceedings of the National Academy of the United States of America 86, 3375-3378, 1989.

RICE-EVANS, C. ; MILLER, N.J. ; BOLWELL, G.P. ; BRAMLEY, P.M. ; PRIDHAM, J.B. *The relative antioxidant activities of plant - derived polyphenolic flavonoids*. Free Radical Research. 22, 375-383, 1995.

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

ROBERTS, E.A.H. *Chlorogenic acids of tea and maté*. Chemistry and Industry 37, 985, 1956.

ROBERTS, I.D. ; POLANER, D.M. ; SANG, P. ; ZAPOL, W.M. *Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn*. Lancet: 818-819, 1992.

ROSSAIN, R. ; FALKE, K.J. ; LOPEZ, F. ; SLAMA, K. ; PISON, U. ; ZAPOL, W.M. ; ROY, A.K. ; CHATTERJEE, B. *Molecular basis of aging*. London: 993. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. N. England Journal Med. 328:399-405, 1990. Academic Press, 1984.

SCHINELLA, G.R. ; TROIANI, G. ; DAVILA, V. ; BUSCHIAZZO, P.M. ; TOURNIER, H.A. *Antioxidant effects of an aqueous extract of Ilex paraguariensis*. Biochem Biophys Res Comm; 269:357-360, 2000.

SEIGNEUR, M. ; BONNET, J. ; DORIAN, B. ; BENCHIMOL, D. ; DROUILLET, F. ; GOUVERNEUR, G. ; LARRUE, J. ; CROCKETT, R. ; BOISSEAU, M. ; GAYON, R. ; BRICAUS, H. *Effect of the consumption of alcohol white wine, and red wine on platelet function and serum lipids*. Journal of Applied Cardiology 5, 215-222, 1990.

SIES, H. *Strategies of antioxidant defense*. European Journal of Biochemistry 215, 213-219, 1993.

STEIN, Y. ; STEIN, O. *Interaction between serum lipoproteins and cellular components of the arterial wall*. Biochem Atherosclerosis 7, 313-344, 1979.

STEIN, F.L.P. *Estudo comparativo da reatividade vascular de ratos normais e hipercolesterolêmicos (rattus norvegicus, variedade Wistar) ao extrato de Ilex paraguariensis St. Hill*. [Tese de Mestrado defendida no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas] Fisiologia Animal Comparada. 2002.

TAMPO Y. ; YONAH, M. *Vitamin E and Glutathione are Required for Preservation of Microsomal Glutathione S-Transferase from Oxidative Stress in Microsomes, Farmacology e Toxicology.* 66,259-265,1990.

VANE, J.R. ; ANGGÄRD, E.E. ; BOTTING, R.M. *Regulatory functions of the vascular endothelium.* The New England Journal of Medicine 323, 27-34, 1990.

VANNUCCHI, H. ; IGLESIAS, A.C.R.G. *Determinação de Radicais Livres em Ensaio Biológicos - Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia.* Cap.12, pág. 160-170, 1998.

WALKER, M.W. *Nitric Oxide - Induced Cytotoxicity: Involvement of Cellular Resistance to Oxidative Stress and the Role of Glutathione in Protection,* vol.37m n.01, 1995.

YUTING, C. ; RONGLIANG, Z. ; ZHONGJIAN, J. ; YONG, J. *Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants.* Free Radical Biology and Medicine: 19, 19-21, 1990.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *ILEX PARAGUARIENSIS* SOBRE O AUMENTO DA PRESSÃO MÉDIA ARTERIAL (PAM) INDUZIDO PELO INIBIDOR DE NO SINTASE (L-NAME)

Para avaliar a eficácia do efeito hipertensor com o L-NAME (V.O.), foram observados os valores médios de pressão arterial, antes e 30 dias após o início do uso do inibidor L-Name. Os animais de experimentação que participaram do controle das pressões foram os três subgrupos (A, B, C) que utilizaram o inibidor L-Name, sendo que o controle é a primeira medida, pois esta não sofreu influência do inibidor porque este ainda não estava sendo administrado.

A ingesta de L-Name via oral por 30 dias aumentou a pressão arterial média dos animais do subgrupo A. Os valores passaram de $130,3 \pm 5,5$ para $208,6 \pm 9,3$ mmHg.

No entanto, o subgrupo B que recebeu o L-Name após a ingesta do extrato de *Ilex paraguariensis* pelo mesmo período (30) trinta dias apresentou pequeno

aumento nos níveis pressóricos, não oferecendo significância estatística, quando comparado com o grupo C.

Do mesmo modo, o subgrupo C apresentou comportamento com os níveis tensionais semelhantes ao grupo B, pois o L-Name foi administrado misturado ao extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* por 30 dias, e os resultados não apresentaram diferenças significativas, como podem ser vistos no Gráfico 1.

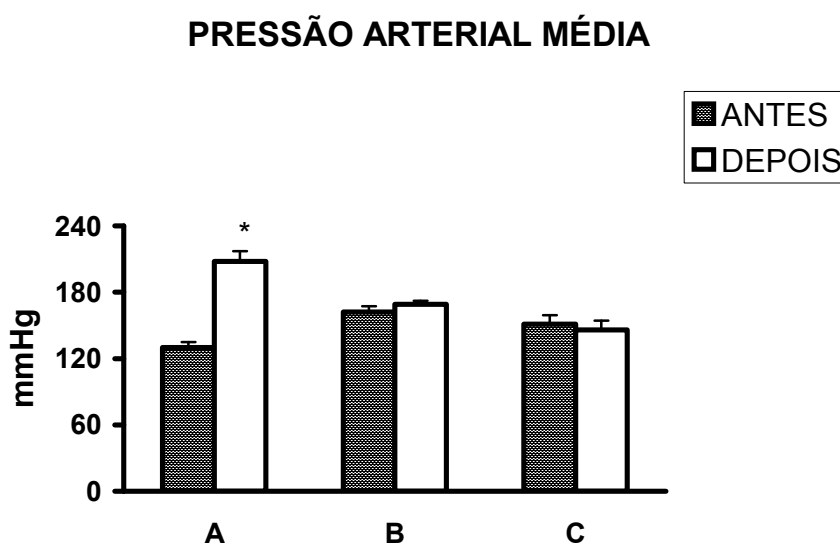


Gráfico 1. Efeito da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre a pressão arterial média (PAM). Cada valor representa a média \pm S.E.M., A, subgrupo que recebeu L-NAME (100mg/kg) por V.O. durante um período de 30 dias; B, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* por 30 dias e após este período o extrato foi substituído por solução aquosa de L-NAME por mais 30 dias; C, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e L-NAME durante um período de 30 dias. Antes (barras brancas) e depois (barras hachuradas). *diferente dos grupos B e C representando a diferença significativa em relação a media das pressões anterior do subgrupo A e significativamente diferente entre a media das pressões dos subgrupos B e C. $p < 0,05$.

4.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *ILEX PARAGUARIENSIS* E SOLUÇÃO AQUOSA DE L-NAME – PERFIL BIOQUÍMICO E HISTOPATÓGICO

4.2.1 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre os níveis de triglicerídeos nos animais que utilizaram L-NAME – inibidor da NO sintase

A administração de L-NAME (V.O.) provocou aumento significativo dos níveis séricos de triglicerídeos. Os valores podem ser vistos no gráfico 2. O tratamento com o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, V.O., inibiu o aumento dos valores de triglicerídeos (subgrupos B e C) de maneira significativa ($p < 0.05$) conforme pode ser visto no Gráfico 2.

Cabe salientar que os valores para triglicerídeos nos dois subgrupos tratados com *Ilex paraguariensis* apresentam o mesmo perfil do que os animais controle (subgrupo D). Estes resultados são vistos, igualmente, no Gráfico 2.

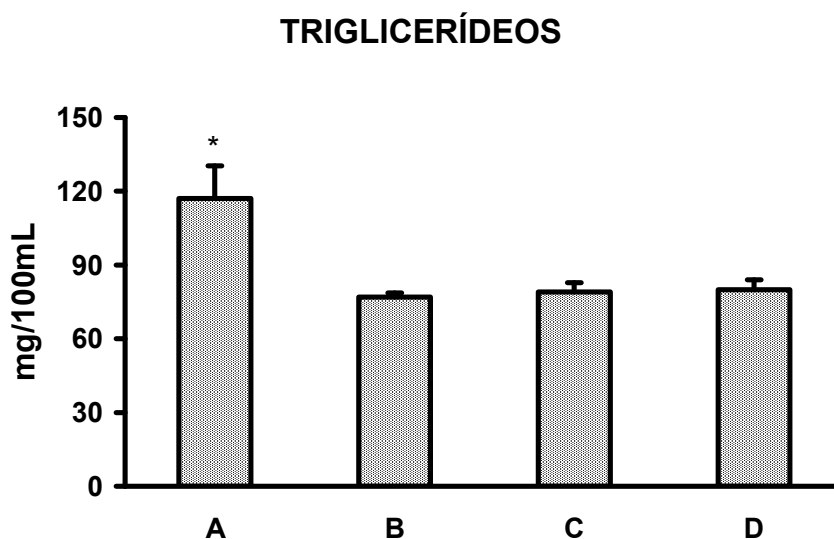


Gráfico 2. Efeito da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre os níveis séricos de triglicerídeos. Cada valor representa a média \pm S.E.M., A, subgrupo que recebeu L-NAME (100mg/kg) por V.O. durante um período de 30 dias; B, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* por 30 dias e após este período o extrato foi substituído por solução aquosa de L-NAME por mais 30 dias; C, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e L-NAME durante um período de 30 dias; D, subgrupo controle com ingesta hídrica.

*diferente dos grupos B, C e D (significando que A apresenta elevações nos níveis de triglicerídeos significativamente maiores quando comparados aos grupos controle e que usaram a *Ilex paraguariensis*). $p < 0,05$.

4.2.2 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre os níveis glicêmicos nos animais que utilizaram L-NAME

O Gráfico 3 apresenta os resultados da glicemia dos animais de experimentação dos quatro subgrupos A, B, C e D. Como pode ser observado, a administração de L-NAME (V.O.) aumentou os níveis séricos de glicose, ao serem comparados com os animais do grupo controle (subgrupo A) ($p < 0.05$). Também, os tratamentos com o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (subgrupos B e C), impediu este aumento, ficando os valores próximos aos valores de referência dos animais do grupo controle (subgrupo D).

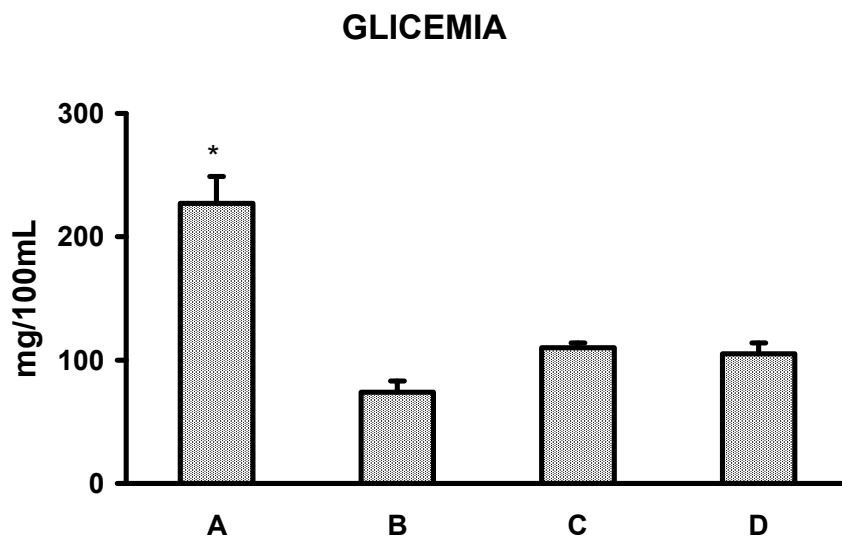


Gráfico 3. Efeito da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre a glicemia. Cada valor representa a média \pm S.E.M. A, subgrupo que recebeu L-NAME (100mg/kg) por V.O. durante um período de 30 dias; B, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 30 dias e após este período o extrato foi substituído por L-NAME; C, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e L-NAME durante um período de 30 dias; D, subgrupo controle com ingesta hídrica. *diferente dos grupos B, C e D, $p < 0,05$.

4.2.3 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre os níveis séricos de bilirrubinas totais, direta e indireta nos animais que utilizaram L-NAME – inibidor da NO sintase

No que diz respeito às bilirrubinas totais a administração de *Ilex*

Tratamentos	Bilirrubinas (mg/100mL)		
	Total	Direta	Indireta
A	0,53±0,16*	0,11±0,02	0,41±0,14
B	0,12±0,01	0,04±0,01	0,08±0,01
C	0,13±0,01	0,06±0,01	0,08±0,01
D	0,25±0,02	0,13±0,01	0,11±0,01

paraguariensis diminuiu de maneira significativa ($p<0.05$) os valores quando comparados com o subgrupo A que recebeu L-NAME. Os valores podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Resultado da concentração sérica de bilirrubinas

Cada valor representa a média±S.E.M. A, subgrupo que recebeu L-NAME (100mg/kg) por V.O. durante um período de 30 dias; B, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 30 dias e após este período o extrato foi substituído por L-NAME; C, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e L-NAME durante um período de 30 dias; D, subgrupo controle com ingestão hídrica.

*diferente dos grupos B, C e D, $p<0,05$.

4.2.4 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (V.O.) sobre as alterações enzimáticas provocadas pela utilização do L-NAME (V.O.)

Foram dosadas as enzimas TGO, TGP, DHL. Os valores encontrados não revelaram diferenças significativas entre os grupos para a DHL. A Tabela 2 nos mostra estes resultados. Quanto às enzimas TGO e TGP encontramos valores significativamente menores nos grupos que receberam *Ilex paraguariensis* por via oral.

Tratamentos	Atividade das enzimas séricas (U/mL)		
	TGO	TGP	DHL
A	158,9±15,2	124,7±12,9	937±19,9
B	200,4±27	91,9±20,4	927±27
C	93,1±10,9* ^a	68,7±9,5*	628,±14
D	174,5±8,9	75,6±5,5	939,7±27

Tabela 2. Atividade enzimática sérica hepáticas

Cada valor representa a média±S.E.M. A, subgrupo que recebeu L-NAME (10mg/kg) por V.O. durante um período de 30 dias; B, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 30 dias e após este período o extrato foi substituído por L-NAME; C, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e L-NAME durante um período de 30 dias; D, subgrupo controle com ingesta hídrica.

*diferente do grupo A, $p < 0,05$.

^a diferente do grupo B, $p < 0,05$

4.2.5 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (V.O.) sobre a produção de radicais livres – medida da produção de peróxido de hidrogênio no tecido hepático

Foi medida a atividade enzimática para a decomposição do peróxido de hidrogênio. Os resultados mostram que nos animais que receberam a solução oral de L-NAME, houve uma maior formação de H₂O₂, quando comparados com o grupo controle e os grupos que receberam o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. Os

valores podem ser vistos na Tabela 3. Por outro lado, podemos observar que os extratos hepáticos dos animais tratados com *Ilex*, apresentam uma maior atividade

Tratamentos	Atividade de decomposição do H ₂ O ₂		
	T ₀ μMH ₂ O ₂	T _g μMH ₂ O ₂	mg H ₂ O ₂ /min
A	459,5±1,7*	382±7,1	7,75
B	399,2±1,8	317,2±7,4	8,2**
C	443±18,6	335,5±5,6	10,75**
D	408±6,04	342±11,4	6,6

de decomposição do H₂O₂.

Tabela 3. Atividade de decomposição do peróxido de hidrogênio no tecido hepático em ratos adultos

Cada valor representa a média±S.E.M. A, subgrupo que recebeu L-NAME (100mg/kg) por V.O. durante um período de 30 dias; B, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 30 dias e após este período o extrato foi substituído por L-NAME por mais 30 dias; C, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e L-NAME durante um período de 30 dias; D, subgrupo controle com ingesta hídrica;

*diferente do grupo B, C, D, $p<0,05$. ** diferente do grupo A, D e E, $p<0,05$

4.2.6 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre o parênquima hepático nos animais que utilizaram L-NAME – inibidor da NO sintase

4.2.6.1 Estudo histopatológico

O estudo histopatológico nos revela discreta fibrose encontrada nos subgrupos A e B, e ausente nos subgrupos C e D. Constatou-se a presença de moderado infiltrado inflamatório no espaço periportal em mais de três campos nos

subgrupos A e B e discreto infiltrado inflamatório no espaço periportal no subgrupo C e ausente no D.

Também nos subgrupos que utilizaram a L-NAME somente e no grupo que utilizou a *Ilex paraguariensis* e após utilizou L-NAME (V.O.) por mais 30 dias constatou-se intenso desarranjo na arquitetura hepatocelular e lobular (subgrupos A e B), com presença de discreta necrose e acentuado dano hepático, marcado pela congestão acentuada onde existe o desaparecimento do tecido hepático, ausência inclusive do núcleo nos mostra a Figura 1.

Figura 1. Micrografias de campos parciais dos subgrupos A, B, C, D, mostrando parênquima hepático. Imagem dos subgrupos A e B revelam presença de arquitetura hepática destruída com acentuada congestão e necrose. A imagem dos subgrupos C e D mostra a arquitetura hepática e lobular com aspecto conservado, com acentuada quantidade de células de Kupfer em sinusóides, processo inflamatório discreto em espaço periportal,

citoplasma e núcleos normais. A, B, D com aumento de 200x e C com aumento de 400x. Coloração pela H.E.

4.2.7 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* por curto período (3 dias) e longo período (30 dias) nos animais considerados velhos

4.2.7.1 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre os níveis de triglicerídeos, colesterol, HDLe, frente ao envelhecimento biológico

Quando comparados os dois subgrupos de ratos velhos que receberam o extrato por V.O., não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre eles para os valores de HDLe e colesterol. Os animais que receberam o extrato por 03 dias apresentaram valores para HDLe de $35,8 \pm 1,8$, $39,3 \pm 3,6$ e $44,3 \pm 3,3$ respectivamente para os grupos A, B, C e D. Quanto ao colesterol, os valores foram de $80,6 \pm 4,3$, $88,1 \pm 10,4$, $92,0 \pm 6,7$, $53,0 \pm 2,62$, respectivamente para os grupos A, B, C e D. O grupo D apresentou diferença significativa quando comparado aos demais grupos em relação a taxa de colesterol. No entanto, ao compararmos os subgrupos A e D, verificamos que existe diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre ambos. Também evidenciada diferença significativa entre o grupo D com animais adultos saudáveis com os idosos saudáveis e que utilizaram *Ilex paraguariensis* por via oral (Tabela 4). Por outro lado, os tratamentos com o extrato aquoso promoveram uma

Tratamentos	Perfil lipídico (U/mL)		
	HDLe	Colesterol	Triglicerídios
A	$35,8 \pm 1,8$	$80,6 \pm 4,3$	$125,6 \pm 15,5^{**}$
B	$39,3 \pm 3,6$	$88,1 \pm 10,4$	$73,1 \pm 7,3$
C	$44,3 \pm 3,0$	$92,0 \pm 6,7$	$81,9 \pm 8,9$
D	$31,0 \pm 1,9$	$53,0 \pm 2,6^*$	$80,0 \pm 8,4$

diminuição nos valores de triglicerídios, que foram menores do que os encontrados para os animais idosos do grupo A, e semelhantes aos resultados encontrados para o grupo D com animais adultos saudáveis. Obtivemos $125,6 \pm 15,5$, $73,1 \pm 7,3$ e $81,9 \pm 8,9$ respectivamente para o subgrupo A, B, C e D, conforme Gráfico 4.

Tabela 4. Efeito da *Ilex paraguariensis* sobre a atividade enzimática sérica de ratos velhos

Cada valor representa a média±S.E.M. A, subgrupo controle de ratos velhos que recebeu ingesta hídrica; B, subgrupo de ratos velhos que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 03 dias; C, subgrupo de ratos velhos que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 03 dias ; D, subgrupo controle de ratos adultos que recebeu ingesta hídrica.

*diferente dos grupos A, B e C, $p<0,05$.

** diferente dos grupos B, C e D, $p<0,05$

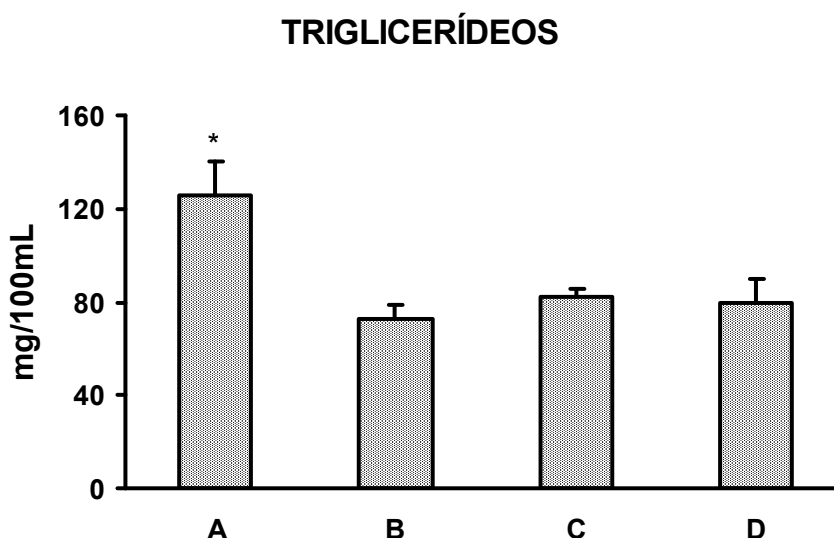


Gráfico 4. Efeito da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre os níveis séricos de triglicerídios. Cada valor representa a média±S.E.M. A, subgrupo de ratos velhos controle; B, subgrupo de ratos velhos que receberam o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 03 dias; C, subgrupo de ratos velhos que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 30 dias; D, subgrupo controle de animais adultos jovens. *diferente dos grupos B, C e D, $p<0,05$.

4.2.7.2 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre os níveis glicêmicos provocadas pelo envelhecimento biológico

Os níveis de glicemia encontram-se significativamente diminuídos no grupo C que utilizou a solução de *Ilex* por 30 dias na população de ratos velhos, apresentando valor médio de $58,4 \pm 8,8$, sendo comparada com as médias dos grupos A, B e D, com valores $73 \pm 10,52$, $97,85 \pm 13,0$, $105,1 \pm 7,0$ respectivamente. Os valores dos três grupos acima não apresentaram diferença significativa entre si. Podemos comprovar os resultados obtidos no Gráfico 5.

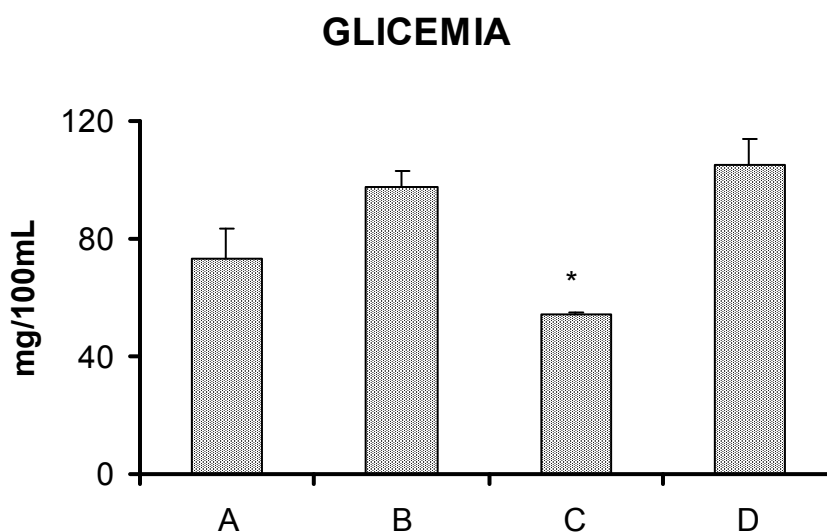


Gráfico 5. Efeito da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre a glicemia. Cada valor representa a média \pm S.E.M. A, subgrupo de ratos velhos controle; B, subgrupo de ratos velhos que receberam o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 03 dias; C, subgrupo de ratos velhos que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 30 dias; D, subgrupo controle de animais adultos. ns.

*diferente dos grupos A, B e D, $p < 0,05$.

4.2.7.3 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (V.O) sobre as enzimas hepáticas provocadas pelo envelhecimento

Tabela 5. Atividade enzimática sérica

A Tabela 5 mostra os principais parâmetros analisados. Nela podemos destacar que o DHL mostrou-se significativamente menor nos grupos que utilizaram a *Ilex paraguariensis* e entre eles não apresentando diferenças significativas.

Cada valor representa a média±S.E.M. A, subgrupo controle de ratos velhos que recebeu ingesta hídrica; B, subgrupo de ratos velhos que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 03 dias; C, subgrupo de ratos velhos que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 03 dias ; D, subgrupo controle de ratos adultos que recebeu ingesta hídrica. *diferente do grupo B, C e D, $p < 0,05$.

4.2.7.4 Efeitos da administração da solução aquosa da *Ilex paraguariensis* sobre a capacidade hepática de decompor o peróxido de hidrogênio

Foi medida da atividade enzimática para a decomposição do peróxido de hidrogênio. Os resultados podem ser vistos na Tabela 3 e demonstram que os valores tanto de formação de H_2O_2 quanto da atividade enzimática assemelham-se aos valores obtidos para os ratos controle ou normais. Cabe chamar a atenção para

Tratamentos	Atividade de decomposição do H_2O_2
Tratamentos	Atividade das enzimas séricas (U/mL)
	DHL
A	3683,5±922,8*
B	446,6±90,9
C	450,1±95,7
D	900,4±56,8

o fato dos animais velhos terem ingerido o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*.

Tabela 6. Atividade de decomposição do peróxido de hidrogênio no tecido hepático em ratos velhos

	T ₀ μMH ₂ O ₂	TgμMH ₂ O ₂	mg H ₂ O ₂ /min
A	395±3,5	340±3,5	5,5
B	383±4,6	318,2±7,1	6,5**
C	378±5,6	290,5±1,8	9,8**

Cada valor representa a Média ± S, E, M. A, subgrupos de ratos velhos, sem tratamento, sadios, controle dos ratos velhos. B, subgrupo de ratos velhos que ingeriram extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* por 3 (três) dias. C, subgrupo de ratos velhos que ingeriram extrato aquoso por 30 (trinta) dias. * diferente do grupo A e B p<0,05.

4.2.7.5 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre o parênquima hepático, frente ao envelhecimento biológico

O estudo histopatológico nos revela a ausência de fibrose em todos os subgrupos de ratos velhos. Constatou-se a presença de discreto infiltrado inflamatório à custa de linfócitos no espaço periportal em mais de 4 campos nos subgrupos C e D, e ausente nos subgrupos A e D. Também nos subgrupos que utilizaram a *Ilex paraguariensis*, por via oral, a arquitetura hepatocitária e lobular encontrava-se preservada semelhante ao subgrupo controle dos ratos velhos e controle dos adultos jovens. Encontramos também a presença de moderada quantidade de células fagocitárias de Kupfer em todos os subgrupos dos ratos velhos, sem sinais de congestão, necrose ou mesmo dano celular hepático mínimo (Figura 2).

Figura 2. Micrografias de campos parciais dos subgrupos A, B, C, D, sendo os três primeiros representando os subgrupos A, B, e C de ratos velhos e o último representando o grupo D com ratos adultos jovens mostrando parênquima hepático. Imagem dos subgrupos A e B, C e D revelam arquitetura hepática e lobular preservada, sem congestão ou necrose, sem dano hepático. A imagem dos subgrupos B e C mostra discreto processo inflamatório em espaço periportal e moderada quantidade de células de Kupfer em sinusóides. Nos subgrupos A e D o processo inflamatório é discreto em espaço periportal, e celularidade com citoplasma e núcleos normais nos quatro subgrupos. A imagem A, B, C e D apresentam aumentos de 100, 400, 200, 200 vezes respectivamente para demonstrar nos diversos aumentos o padrão de normalidade encontrados nestes grupos. Coloração pela H.E.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *ILEX PARAGUARIENSIS* SOBRE O AUMENTO DA PRESSÃO MÉDIA ARTERIAL (PAM) INDUZIDO PELO INIBIDOR DE NO SINTASE (L-NAME)

Para avaliar a eficácia do efeito hipertensor com o L-NAME (V.O.), foram observados os valores médios de pressão arterial, antes e 30 dias após o início do uso do inibidor L-Name. Os animais de experimentação que participaram do controle das pressões foram os três subgrupos (A, B, C) que utilizaram o inibidor L-Name, sendo que o controle é a primeira medida, pois esta não sofreu influência do inibidor porque este ainda não estava sendo administrado.

A ingestão de L-Name via oral por 30 dias aumentou a pressão arterial média dos animais do subgrupo A. Os valores passaram de $130,3 \pm 5,5$ para $208,6 \pm 9,3$ mmHg.

No entanto, o subgrupo B que recebeu o L-Name após a ingestão do extrato de *Ilex paraguariensis* pelo mesmo período (30) trinta dias apresentou pequeno aumento nos níveis pressóricos, não oferecendo significância estatística, quando comparado com o grupo C.

Do mesmo modo, o subgrupo C apresentou comportamento com os níveis tensionais semelhantes ao grupo B, pois o L-Name foi administrado misturado ao extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* por 30 dias, e os resultados não apresentaram diferenças significativas, como podem ser vistos no Gráfico 1.

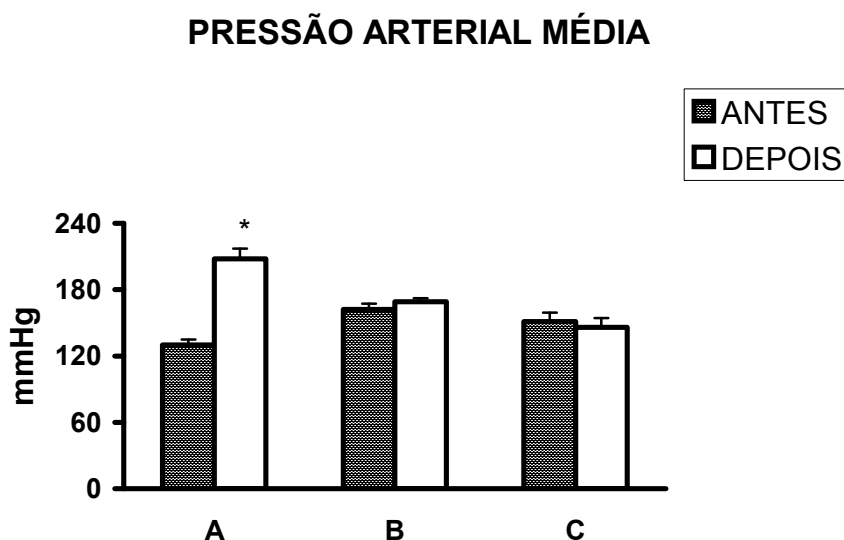


Gráfico 1. Efeito da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre a pressão arterial média (PAM). Cada valor representa a média \pm S.E.M., A, subgrupo que recebeu L-NAME (100mg/kg) por V.O. durante um período de 30 dias; B, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* por 30 dias e após este período o extrato foi substituído por solução aquosa de L-NAME por mais 30 dias; C, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e L-NAME durante um período de 30 dias. Antes (barras brancas) e depois (barras hachuradas). *diferente dos grupos B e C representando a diferença significativa em relação a média das pressões anterior do subgrupo A e significativamente diferente entre a média das pressões dos subgrupos B e C. $p < 0,05$.

4.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *ILEX PARAGUARIENSIS* E SOLUÇÃO AQUOSA DE L-NAME – PERFIL BIOQUÍMICO E HISTOPATÓGICO

4.2.1 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre os níveis de triglicérides nos animais que utilizaram L-NAME – inibidor da NO sintase

A administração de L-NAME (V.O.) provocou aumento significativo dos níveis séricos de triglicerídeos. Os valores podem ser vistos no gráfico 2. O tratamento com o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, V.O., inibiu o aumento dos valores de triglicerídeos (subgrupos B e C) de maneira significativa ($p < 0.05$) conforme pode ser visto no Gráfico 2.

Cabe salientar que os valores para triglicerídeos nos dois subgrupos tratados com *Ilex paraguariensis* apresentam o mesmo perfil do que os animais controle (subgrupo D). Estes resultados são vistos, igualmente, no Gráfico 2.

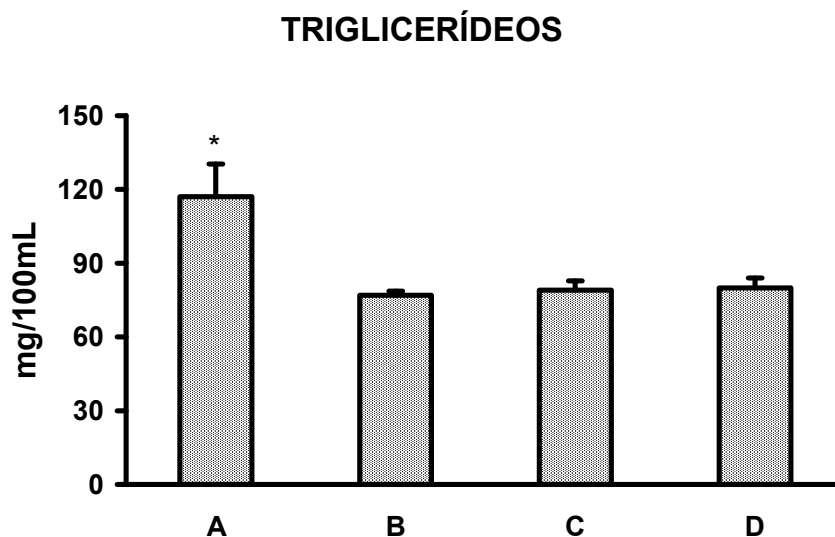


Gráfico 2. Efeito da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre os níveis séricos de triglicerídeos. Cada valor representa a média \pm S.E.M., A, subgrupo que recebeu L-NAME (100mg/kg) por V.O. durante um período de 30 dias; B, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* por 30 dias e após este período o extrato foi substituído por solução aquosa de L-NAME por mais 30 dias; C, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e L-NAME durante um período de 30 dias; D, subgrupo controle com ingesta hídrica.
*diferente dos grupos B, C e D (significando que A apresenta elevações nos níveis de triglicerídeos significativamente maiores quando comparados aos grupos controle e que usaram a *Ilex paraguariensis*). $p < 0,05$.

4.2.2 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre os níveis glicêmicos nos animais que utilizaram L-NAME

O Gráfico 3 apresenta os resultados da glicemia dos animais de experimentação dos quatro subgrupos A, B, C e D. Como pode ser observado, a administração de L-NAME (V.O.) aumentou os níveis séricos de glicose, ao serem comparados com os animais do grupo controle (subgrupo A) ($p < 0.05$). Também, os tratamentos com o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (subgrupos B e C), impediu este aumento, ficando os valores próximos aos valores de referência dos animais do grupo controle (subgrupo D).

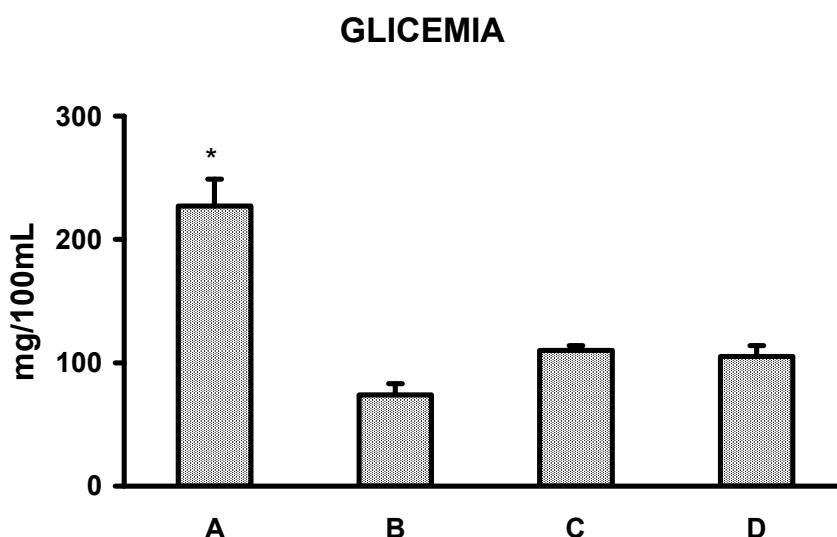


Gráfico 3. Efeito da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre a glicemia. Cada valor representa a média \pm S.E.M. A, subgrupo que recebeu L-NAME (100mg/kg) por V.O. durante um período de 30 dias; B, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 30 dias e após este período o extrato foi substituído por L-NAME; C, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e L-NAME durante um período de 30 dias; D, subgrupo controle com ingestão hídrica. *diferente dos grupos B, C e D, $p < 0,05$.

4.2.3 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre os níveis séricos de bilirrubinas totais, direta e indireta nos animais que utilizaram L-NAME – inibidor da NO sintase

Tratamentos	Bilirrubinas (mg/100mL)		
	Total	Direta	Indireta
A	0,53±0,16*	0,11±0,02	0,41±0,14
B	0,12±0,01	0,04±0,01	0,08±0,01
C	0,13±0,01	0,06±0,01	0,08±0,01
D	0,25±0,02	0,13±0,01	0,11±0,01

No que diz respeito às bilirrubinas totais a administração de *Ilex paraguariensis* diminuiu de maneira significativa ($p < 0.05$) os valores quando comparados com o subgrupo A que recebeu L-NAME. Os valores podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Resultado da concentração sérica de bilirrubinas

Cada valor representa a média±S.E.M. A, subgrupo que recebeu L-NAME (100mg/kg) por V.O. durante um período de 30 dias; B, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 30 dias e após este período o extrato foi substituído por L-NAME; C, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e L-NAME durante um período de 30 dias; D, subgrupo controle com ingesta hídrica.

*diferente dos grupos B, C e D, $p < 0,05$.

4.2.4 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (V.O.) sobre as alterações enzimáticas provocadas pela utilização do L-NAME (V.O.)

Foram dosadas as enzimas TGO, TGP, DHL. Os valores encontrados não revelaram diferenças significativas entre os grupos para a DHL. A Tabela 2 nos mostra estes resultados. Quanto às enzimas TGO e TGP encontramos valores significativamente menores nos grupos que receberam *Ilex paraguariensis* por via oral.

Tratamentos	Atividade das enzimas séricas (U/mL)		
	TGO	TGP	DHL
A	158,9±15,2	124,7±12,9	937±19,9
B	200,4±27	91,9±20,4	927±27
C	93,1±10,9* ^a	68,7±9,5*	628,±14
D	174,5±8,9	75,6±5,5	939,7±27

Tabela 2. Atividade enzimática sérica hepáticas

Cada valor representa a média±S.E.M. A, subgrupo que recebeu L-NAME (10mg/kg) por V.O. durante um período de 30 dias; B, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 30 dias e após este período o extrato foi substituído por L-NAME; C, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e L-NAME durante um período de 30 dias; D, subgrupo controle com ingesta hídrica.

*diferente do grupo A, $p < 0,05$.

^a diferente do grupo B, $p < 0,05$

4.2.5 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (V.O.) sobre a produção de radicais livres – medida da produção de peróxido de hidrogênio no tecido hepático

Foi medida a atividade enzimática para a decomposição do peróxido de hidrogênio. Os resultados mostram que nos animais que receberam a solução oral de L-NAME, houve uma maior formação de H₂O₂, quando comparados com o grupo

controle e os grupos que receberam o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. Os valores podem ser vistos na Tabela 3. Por outro lado, podemos observar que os

Tratamentos	Atividade de decomposição do H ₂ O ₂		
	T ₀ μMH ₂ O ₂	T _g μMH ₂ O ₂	mg H ₂ O ₂ /min
A	459,5±1,7*	382±7,1	7,75
B	399,2±1,8	317,2±7,4	8,2**
C	443±18,6	335,5±5,6	10,75**
D	408±6,04	342±11,4	6,6

extratos hepáticos dos animais tratados com *Ilex*, apresentam uma maior atividade de decomposição do H₂O₂.

Tabela 3. Atividade de decomposição do peróxido de hidrogênio no tecido hepático em ratos adultos

Cada valor representa a média±S.E.M. A, subgrupo que recebeu L-NAME (100mg/kg) por V.O. durante um período de 30 dias; B, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 30 dias e após este período o extrato foi substituído por L-NAME por mais 30 dias; C, subgrupo que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e L-NAME durante um período de 30 dias; D, subgrupo controle com ingesta hídrica;

*diferente do grupo B, C, D, $p < 0,05$. ** diferente do grupo A, D e E, $p < 0,05$

4.2.6 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre o parênquima hepático nos animais que utilizaram L-NAME – inibidor da NO sintase

4.2.6.1 Estudo histopatológico

O estudo histopatológico nos revela discreta fibrose encontrada nos subgrupos A e B, e ausente nos subgrupos C e D. Constatou-se a presença de moderado infiltrado inflamatório no espaço periportal em mais de três campos nos

subgrupos A e B e discreto infiltrado inflamatório no espaço periportal no subgrupo C e ausente no D.

Também nos subgrupos que utilizaram a L-NAME somente e no grupo que utilizou a *Ilex paraguariensis* e após utilizou L-NAME (V.O.) por mais 30 dias constatou-se intenso desarranjo na arquitetura hepatocelular e lobular (subgrupos A e B), com presença de discreta necrose e acentuado dano hepático, marcado pela congestão acentuada onde existe o desaparecimento do tecido hepático, ausência inclusive do núcleo nos mostra a Figura 1.

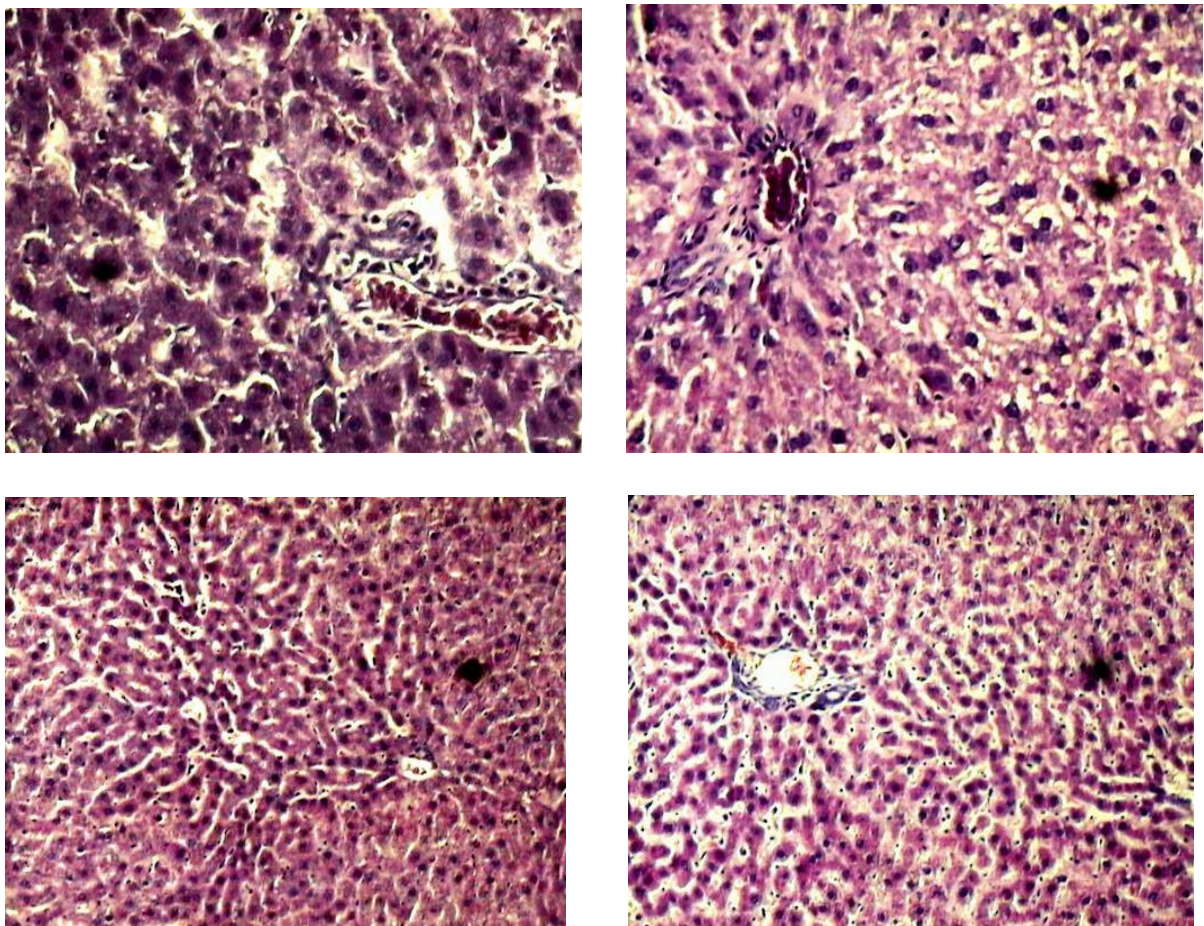


Figura 1. Micrografias de campos parciais dos subgrupos A, B, C, D, mostrando parênquima hepático. Imagem dos subgrupos A e B revelam presença de arquitetura hepática destruída com acentuada congestão e necrose. A imagem dos subgrupos C e D mostra a arquitetura hepática e lobular com aspecto conservado, com acentuada quantidade de células de Kupfer em sinusóides, processo inflamatório discreto em espaço periportal, citoplasma e núcleos normais. A, B, D com aumento de 200x e C com aumento de 400x. Coloração pela H.E.

4.2.7 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* por curto período (3 dias) e longo período (30 dias) nos animais considerados velhos

4.2.7.1 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre os níveis de triglicerídeos, colesterol, HDLe, frente ao envelhecimento biológico

Quando comparados os dois subgrupos de ratos velhos que receberam o extrato por V.O., não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre eles para os valores de HDLe e colesterol. Os animais que receberam o extrato por 03 dias apresentaram valores para HDLe de $35,8 \pm 1,8$, $39,3 \pm 3,6$ e $44,3 \pm 3,3$ respectivamente para os grupos A, B, C e D. Quanto ao colesterol, os valores foram de $80,6 \pm 4,3$, $88,1 \pm 10,4$, $92,0 \pm 6,7$, $53,0 \pm 2,62$, respectivamente para os grupos A, B, C e D. O grupo D apresentou diferença significativa quando comparado aos demais grupos em relação a taxa de colesterol. No entanto, ao compararmos os subgrupos A e D, verificamos que existe diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre ambos. Também evidenciada diferença significativa entre o grupo D com animais adultos sadios com os idosos sadios e que utilizaram *Ilex paraguariensis* por via oral (Tabela 4). Por outro lado, os tratamentos com o extrato aquoso promoveram uma diminuição nos valores de triglicerídios, que foram menores do que os encontrados

Tratamentos	Perfil lipídico (U/mL)		
	HDLe	Colesterol	Triglicerídios
A	$35,8 \pm 1,8$	$80,6 \pm 4,3$	$125,6 \pm 15,5^{**}$
B	$39,3 \pm 3,6$	$88,1 \pm 10,4$	$73,1 \pm 7,3$
C	$44,3 \pm 3,0$	$92,0 \pm 6,7$	$81,9 \pm 8,9$
D	$31,0 \pm 1,9$	$53,0 \pm 2,6^*$	$80,0 \pm 8,4$

para os animais idosos do grupo A, e semelhantes aos resultados encontrados para o grupo D com animais adultos sadios. Obtivemos $125,6 \pm 15,5$, $73,1 \pm 7,3$ e $81,9 \pm 8,9$ respectivamente para o subgrupo A,B,C e D, conforme Gráfico 4.

Tabela 4. Efeito da *Ilex paraguariensis* sobre a atividade enzimática sérica de ratos velhos

Cada valor representa a média±S.E.M. A, subgrupo controle de ratos velhos que recebeu ingesta hídrica; B, subgrupo de ratos velhos que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 03 dias; C, subgrupo de ratos velhos que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 03 dias ; D, subgrupo controle de ratos adultos que recebeu ingesta hídrica.

*diferente dos grupos A, B e C, $p<0,05$.

** diferente dos grupos B, C e D, $p<0,05$

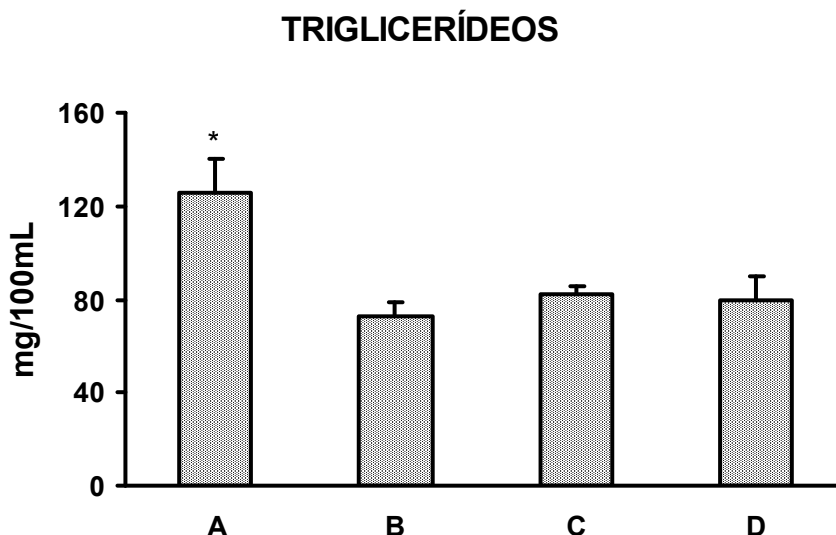


Gráfico 4. Efeito da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre os níveis séricos de triglicerídios. Cada valor representa a média±S.E.M. A, subgrupo de ratos velhos controle; B, subgrupo de ratos velhos que receberam o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 03 dias; C, subgrupo de ratos velhos que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 30 dias; D, subgrupo controle de animais adultos jovens. *diferente dos grupos B, C e D, $p<0,05$.

4.2.7.2 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre os níveis glicêmicos provocadas pelo envelhecimento biológico

Os níveis de glicemia encontram-se significativamente diminuídos no grupo C que utilizou a solução de *Ilex* por 30 dias na população de ratos velhos,

apresentando valor médio de $58,4 \pm 8,8$, sendo comparada com as médias dos grupos A, B e D, com valores $73 \pm 10,52$, $97,85 \pm 13,0$, $105,1 \pm 7,0$ respectivamente. Os valores dos três grupos acima não apresentaram diferença significativa entre si. Podemos comprovar os resultados obtidos no Gráfico 5.

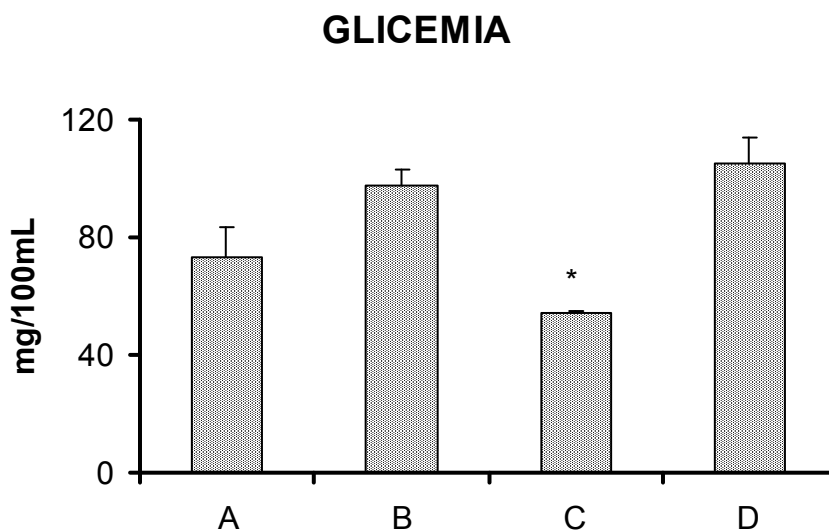


Gráfico 5. Efeito da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre a glicemia. Cada valor representa a média \pm S.E.M. A, subgrupo de ratos velhos controle; B, subgrupo de ratos velhos que receberam o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 03 dias; C, subgrupo de ratos velhos que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 30 dias; D, subgrupo controle de animais adultos. ns. *diferente dos grupos A, B e D, $p < 0,05$.

4.2.7.3 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (V.O) sobre as enzimas hepáticas provocadas pelo envelhecimento

Tabela 5. Atividade enzimática sérica

A Tabela 5 mostra os principais parâmetros analisados. Nela podemos destacar que o DHL mostrou-se significativamente menor nos grupos que utilizaram a *Ilex paraguariensis* e entre eles não apresentando diferenças significativas.

Cada valor representa a média±S.E.M. A, subgrupo controle de ratos velhos que recebeu ingesta hídrica; B, subgrupo de ratos velhos que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 03 dias; C, subgrupo de ratos velhos que recebeu extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* durante um período de 03 dias ; D, subgrupo controle de ratos adultos que recebeu ingesta hídrica. *diferente do grupo B, C e D, $p < 0,05$.

4.2.7.4 Efeitos da administração da solução aquosa da *Ilex paraguariensis* sobre a capacidade hepática de decompor o peróxido de hidrogênio

Foi medida da atividade enzimática para a decomposição do peróxido de hidrogênio. Os resultados podem ser vistos na Tabela 3 e demonstram que os valores tanto de formação de H_2O_2 quanto da atividade enzimática assemelham-se aos valores obtidos para os ratos controle ou normais. Cabe chamar a atenção para

Tratamentos	Atividade de decomposição do H_2O_2
Tratamentos	Atividade das enzimas séricas (U/mL)
	DHL
A	3683,5±922,8*
B	446,6±90,9
C	450,1±95,7
D	900,4±56,8

o fato dos animais velhos terem ingerido o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*.

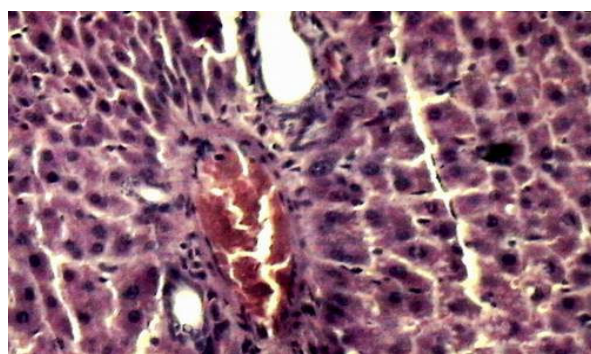
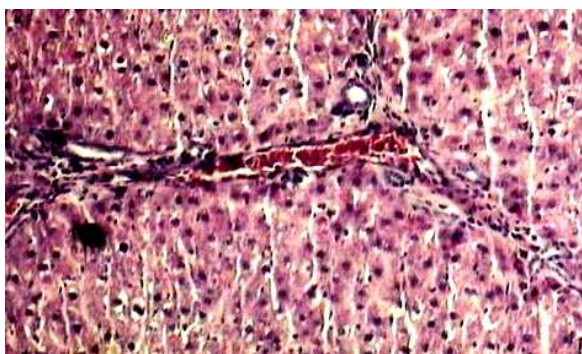
Tabela 6. Atividade de decomposição do peróxido de hidrogênio no tecido hepático em ratos velhos

	T ₀ μMH ₂ O ₂	TgμMH ₂ O ₂	mg H ₂ O ₂ /min
A	395±3,5	340±3,5	5,5
B	383±4,6	318,2±7,1	6,5**
C	378±5,6	290,5±1,8	9,8**

Cada valor representa a Média ± S, E, M. A, subgrupos de ratos velhos, sem tratamento, sadios, controle dos ratos velhos. B, subgrupo de ratos velhos que ingeriram extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* por 3 (três) dias. C, subgrupo de ratos velhos que ingeriram extrato aquoso por 30 (trinta) dias. * diferente do grupo A e B p<0,05.

4.2.7.5 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre o parênquima hepático, frente ao envelhecimento biológico

O estudo histopatológico nos revela a ausência de fibrose em todos os subgrupos de ratos velhos. Constatou-se a presença de discreto infiltrado inflamatório à custa de linfócitos no espaço periportal em mais de 4 campos nos subgrupos C e D, e ausente nos subgrupos A e D. Também nos subgrupos que utilizaram a *Ilex paraguariensis*, por via oral, a arquitetura hepatocitária e lobular encontrava-se preservada semelhante ao subgrupo controle dos ratos velhos e controle dos adultos jovens. Encontramos também a presença de moderada quantidade de células fagocitárias de Kupfer em todos os subgrupos dos ratos velhos, sem sinais de congestão, necrose ou mesmo dano celular hepático mínimo (Figura 2).



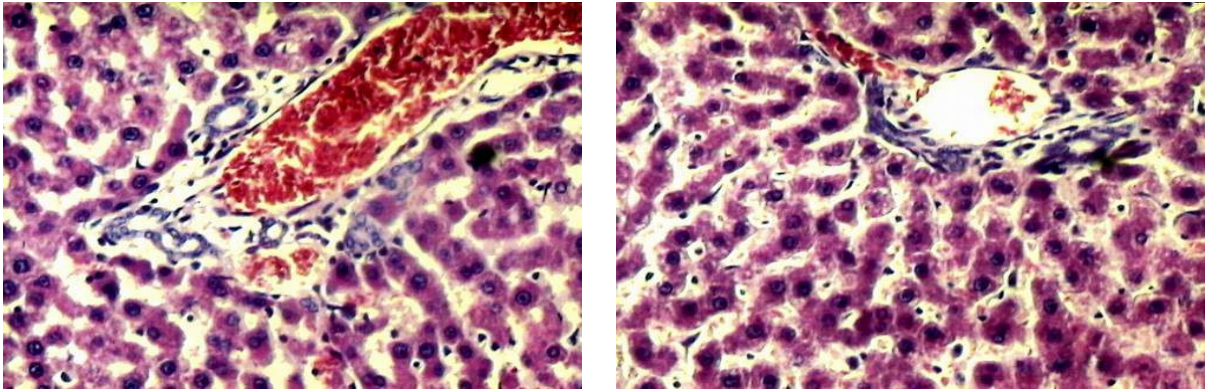


Figura 2. Micrografias de campos parciais dos subgrupos A, B, C, D, sendo os três primeiros representando os subgrupos A, B, e C de ratos velhos e o último representando o grupo D com ratos adultos jovens mostrando parênquima hepático. Imagem dos subgrupos A e B, C e D revelam arquitetura hepática e lobular preservada, sem congestão ou necrose, sem dano hepático. A imagem dos subgrupos B e C mostra discreto processo inflamatório em espaço periportal e moderada quantidade de células de Kupfer em sinusóides. Nos subgrupos A e D o processo inflamatório é discreto em espaço periportal, e celularidade com citoplasma e núcleos normais nos quatro subgrupos. A imagem A, B, C e D apresentam aumentos de 100, 400, 200, 200 vezes respectivamente para demonstrar nos diversos aumentos o padrão de normalidade encontrados nestes grupos. Coloração pela H.E.

5. DISCUSSÃO

O NO sintetizado pelas células endoteliais, macrófagos, neurônio cerebral entre outras células, tem uma ação relaxante sobre o músculo liso vascular e é reconhecidamente importante na regulação da pressão arterial (Rossaint, 1994).

A homeostase da pressão sanguínea normal é dependente de uma síntese basal de NO (Rees, Palmer, Moncada, 1989 ; Vallance, Collier, Moncada, 1989). A inibição desta liberação basal através da administração de um inibidor da NO sintase, o L-NAME, promove o aumento da pressão arterial verificada nos animais de experimentação. A presença de um análogo da L-arginina, o qual inibe a produção de NO, provoca aumento da pressão sanguínea acompanhado de um aumento da resistência total periférica e uma diminuição do débito cardíaco e velocidade do coração (Smith, 1999).

Este efeito pode ser visto nos animais que receberam L-NAME por V.O. durante o período de 30 dias, onde ocorreu aumento significativo da pressão arterial média. Este resultado pode ser comparado com um modelo de lesão isquêmica, uma vez que durante a isquemia ocorre a diminuição da geração de NO visto que a

NO sintase depende de O₂ para sintetizar o radical (Dunne, Davenport, Williams, Tredger, 1994). Porém, constatada a discreta elevação da pressão arterial nos animais que receberam extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* antes ou concomitante com a solução aquosa de L-Name, pode-se afirmar que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* protegeu o endotélio vascular impedindo níveis tensionais mais elevados.

Em um trabalho recente (Filip, 2000) investigou as propriedades antioxidantes do mate, preparado a partir da *Ilex paraguariensis* e outras *Ilex* spp de importância para a América do Sul, que são usadas como substitutos ou adulterantes das preparações comerciais.

Na América do Sul, aproximadamente 30% da população ingere mais de 1 L/dia ou na forma de chimarrão ou na de chá. O consumo se dá por simples hábito cultural ou na medicina popular como no tratamento de artrite, dificuldades na digestão, dores de cabeça, reumatismo, obesidade e doenças do fígado (Filip, 2000).

Avaliando as propriedades terapêuticas atribuídas ao vegetal, muitas delas estão relacionadas ao conteúdo cafeólico. Sabe-se que o ácido cafeico e seus derivados apresentam propriedades antioxidantes (Lolito, Fraga, 1999 ; Kerry, Rice-Evans, 1999).

Da mesma forma que o ácido cafeico, a quercitina, um flavonóide encontrado nas espécies de *Ilex* (Alikaridis, 1987), apresenta propriedades antirradicais livres, também atividade antioxidação lipídica e relaxante de anéis de aorta (Yuting, Rongliang, Zhongjian, Yong, 1990).

Vários estudos mostraram as propriedades antioxidantes dos extratos de *Ilex paraguariensis*, traduzidos pela diminuição da oxidabilidade das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Gugliuci, 1996 ; Gugliuci, Sthal, 1995). Estes efeitos foram atribuídos à presença de substâncias flavonóides no vegetal.

Os flavonóides são um grupo de substâncias de ocorrência natural e encontrados em frutas e vegetais. São conhecidos por suas propriedades antioxidantes usados nas doenças vasculares onde estão envolvidas inflamações da parede (Van Acker, Tromp, Haenen, 1995).

Este estudo mostrou que a utilização do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, previamente à administração do L-NAME ou concomitante com o inibidor da NO sintase, impediu o aumento da pressão arterial média (subgrupos B e C).

Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Muccillo-Baisch *et al.* (1998), que mostraram os efeitos vasodilatadores do extrato obtido a partir de folhas de *Ilex paraguariensis*, efeito dependente da presença do endotélio vascular. Utilizando o modelo de leito vascular arterial isolado, o leito mesentérico do rato, os autores evidenciaram um efeito relaxante do extrato de *Ilex paraguariensis*, sugerindo o envolvimento de um ou mais fatores derivados do endotélio vascular: ou o NO-GMPc ou outro fator o qual poderia estar relacionado com a via do AMPc (ou outra substância).

Também, a dissertação de mestrado de Fabiana Paganini-Stein (2002) mostrou que as frações semi-puras do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, principalmente a fração n-butanólica, rica em compostos flavonóides foi a fração que mais relaxou a musculatura lisa vascular. Este efeito relaxante, endotélio-dependente, foi antagonizado parcialmente pelos inibidores da NO sintase (L-NAME). No entanto, foi também evidenciado efeito vasodilatador mesmo na presença de disfunção endotelial como acontece na hipercolesterolemia experimental (Paganini-Stein, 2002).

O resultado aqui encontrado, isto é, a manutenção dos valores normais de pressão arterial mesmo na vigência do bloqueio do óxido nítrico (NO), fala em favor de outro fator relaxante diferente do NO, o qual pudesse estar sendo liberado pela presença do vegetal, justificando o efeito inibidor do aumento da pressão arterial induzido pela administração do L-NAME. Este resultado, fala em favor da hipótese

sugerida por Muccillo-Baisch (1998), de que um outro fator relaxante, talvez via AMPc pudesse estar sendo liberado e provocando o efeito relaxante.

Ao analisarmos os modelos experimentais de indução do diabetes, como por exemplo, através da utilização do haloxano, vemos que esta substância provoca a formação de radicais superóxidos que, junto com o peróxido de hidrogênio e a presença do íon ferroso, determinam a formação do radical hidroxila que irá lesar o tecido pancreático (células beta de Langerhans) com conseqüente inibição da síntese de pró-insulina e cursando com aumentos nos níveis de glicemia e radicais livres (Olszewer, 1997).

Os aumentos da glicemia decorrentes das alterações de glicogênio são indicativos de doença hepática (Aguila, Loureiro, 2002). Neste estudo a exposição ao L-NAME provocou aumento da glicemia. No entanto, nos animais que receberam o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, tanto antes quanto durante o inibidor da NO sintase, os valores da glicemia ficaram em torno dos valores encontrados para o subgrupo controle (D).

Portanto se a *Ilex paraguariensis*, por suas propriedades antioxidantes reduz a formação de radicais livres, também pode impedir a inibição da síntese de pró-insulina, sendo esta liberada para acoplar-se à molécula de carboidrato e penetrar na célula para desempenhar suas funções energéticas. Também em seu papel metabólico a neoglicogênese é beneficiada sem a formação de radicais livres, colaborando também para níveis glicêmicos baixos.

O nível de glicemia normalmente não se altera com a idade (Tucker 1997), porém pode ter influência da massa corporal, com ganho de peso. Em nosso estudo os animais velhos apresentaram ganho de peso, porém não aconteceu a correlação com o perfil glicêmico, visto que no grupo controle as glicemias mantiveram-se dentro dos valores aceitáveis como normais (70-110) e nos grupos com *Ilex*, cursaram com diminuição da glicemia significativa para os dois grupos. Correlacionando com o grupo que utilizou a L-NAME, observamos que a media dos

pesos entre os ratos adultos não apresentou diferença estatística, mantendo-se harmônica, porém neste grupo especificamente, ocorreu hiperglicemias.

Nas patologias onde ocorre lesão parenquimatosa do fígado, encontramos alterações dos níveis de colesterol e de suas frações. Também se salienta que concomitante com a alteração da função hepatocelular encontramos alteradas as enzimas TGO, TGP e triglicerídios. Neste trabalho, a utilização do L-NAME provocou aumento significativo das enzimas e também dos níveis de triglicerídios. As alterações histológicas observadas corroboram com a afirmação de que o L-NAME provoca lesão hepatocelular (orgânica ou funcional), sugerindo aumento da permeabilidade da membrana celular, e com isso o extravasamento destas enzimas do meio intracelular para o soro. Este resultado é reforçado pelo desarranjo na arquitetura do parênquima hepático conforme visto na histopatologia, com lesão grave do citoplasma, organelas e núcleo.

Com modelo de coração perfundido, (Masin, Salvemini, 1999) foi demonstrado que a liberação de nitratos (NO_2), produto da degradação do NO, está marcadamente reduzido durante a isquemia (por reperfusão) e associada com o dano ou lesão cardíaca, conforme indicam a liberação aumentada de DHL, a degradação mastocitária e a liberação de histamina.

Estes efeitos deletérios são agravados quando ocorre a perfusão com os inibidores da NO sintase (L-NAME ou L-NMNA), reforçando a proteção conferida pelo NO para o coração contra os eventos associados ao processo de isquemia/reperfusão.

Em nosso estudo não observamos diferença significativa nos níveis de DHL entre os animais que receberam L-NAME e *Ilex*, embora no grupo que ingeriu o extrato durante 30 dias, antes de associar o inibidor da NO sintase, observamos valores menores. Porém, o exame histopatológico revelou dano hepático acentuado nos animais que receberam apenas L-NAME. Por outro lado, nos animais que receberam o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, ao mesmo tempo em que o

inibidor da NO sintase, não são observadas alterações histopatológicas, tendo sido preservada a arquitetura hepática.

Um outro estudo analisou o mecanismo de proteção induzido pelo extrato não alcoólico do vinho tinto no modelo lesão induzida por isquemia/reperfusão (MOSCA; CINGOLANI, 2002). O tratamento dos animais de experimentação com o extrato do vinho tinto, impediu o aumento da DHL e a perfusão com L-NAME reverteu o efeito protetor conferido pelo extrato.

Nos animais com idade entre 18 e 24 meses (velhos), nossos resultados colaboram com os estudos citados anteriormente. A administração do extrato de *Ilex paraguariensis*, a exemplo do extrato do vinho tinto não alcoolizado (Mosca ; Cingolani, 2002) também exerceu um efeito protetor, pois impediu o aumento dos níveis de DHL, os quais ficaram semelhantes ao dos animais adultos.

Um trabalho recente (Chan ; Fiscus, 2004) mostrou que o envelhecimento pode afetar a habilidade das citocinas pró-inflamatórias (interleucina -1β) (IL- 1β) em induzir o aumento da produção de NO e dos níveis de RNAm de iNOS.

A IL- 1β aumenta 3,7 vezes nos animais velhos (fêmeas) e 6,7 (machos) a produção de NO. Os níveis basais de RNAm da iNOS foram dramaticamente aumentados na células lisas vasculares dos ratos velhos quando comparados com os jovens. As células musculares lisas vasculares tornaram-se muito mais sensíveis às ações do IL- 1β na indução da iNOS. Estes resultados justificam o aparecimento das doenças vasculares nos ratos velhos.

Nos animais velhos subgrupo controle (A), encontramos valores elevados para os níveis de DHL, o que poderia ser justificado pelo mecanismo acima citado e o tratamento com o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, ou por um mecanismo antioxidante ou por facilitar a liberação de NO, poderia reverter os níveis aumentados da enzima.

A utilização do L-NAME provocou uma diminuição da produção de NO. Sob condições normais, a geração orgânica do NO excede a produção de O₂, a reação do óxido nítrico com o radical livre é muito rápida e ocorre a formação do peroxinitrito (ONOO⁻) (Grisham, 1995). Porém, se a relação O₂/NO aumentar, ou por superprodução de superóxidos ou por diminuição da produção de NO como no caso dos inibidores da NO sintase (L-NAME), o O₂ é espontaneamente ou enzimaticamente deslocado para a reação de dismutação e formação de H₂O₂ (Grisham, 1995).

Com relação à taxa de colesterol do Grupo II, comparando os animais adultos saudáveis com animais velhos saudáveis observou-se diferença significativa para o grupo dos animais adultos, com taxas diminuídas de colesterol, com média de 53,0 +- 2,6, porém os animais idosos do sub-grupo A, B, C entre si não apresentaram diferença estatística, o que nos faz reportar à literatura que, com o aumento da idade, as taxas de colesterol são mais elevadas (Gugliucci) e neste caso o *extrato de Ilex paraguariensis* não apresentou influência nos períodos testados.

Quanto às taxas de triglicérides do Grupo II, constatou-se significância estatística com relação ao grupo de animais idosos saudáveis (subgrupo A), sendo que estes animais apresentaram níveis mais elevados de triglicérides em relação aos subgrupos B, C e D. Pode-se dizer que taxas menores de triglicérides são esperadas para os animais adultos saudáveis (subgrupo D), porém os subgrupos B e C utilizaram o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e são constituídos por animais idosos, demonstrando o efeito protetor em nível celular na presença da substância independente do período utilizado, pois entre o período curto e longo de utilização não houve significância estatística entre si.

Nossos resultados mostraram que ocorreu um aumento da quantidade de peróxido de hidrogênio no fígado dos animais que receberam o L-NAME. Por outro lado, tanto os animais adultos quanto os velhos que receberam o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, não apenas tiveram uma menor produção de radicais livres (H₂O₂) quanto uma maior atividade enzimática de decomposição do peróxido. Isto pode ser explicado ou por uma maior das enzimas antioxidantes ou a própria

atividade do extrato em reduzir os radicais livres formados. Esta atividade poderia estar ligada à presença das substâncias fenólicas antioxidantes tais como os flavonóides vegetais.

6. CONCLUSÃO

O óxido nítrico é um radical responsável pelos efeitos vasodilatadores e antiagregante plaquetário e, portanto, contribui para o controle da pressão arterial sistêmica. A inibição deste radical através da utilização do L-NAME pode ser comparada a um modelo de lesão isquêmica, onde ocorre a diminuição da geração do NO.

A partir dos resultados obtidos com este trabalho, podemos concluir que a administração crônica do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* é capaz de reverter o aumento da pressão arterial provocado pela inibição da síntese de NO. Este efeito fala em favor de um mecanismo de liberação de fatores relaxantes outros além do próprio NO. Além disso, demonstra que no vegetal possam existir substâncias facilmente extraíveis, capazes de provocar o relaxamento vascular.

O trabalho permitiu também identificar as alterações bioquímicas e histopatológicas nos animais de experimentação submetidos a um tratamento com um inibidor da NO sintase, o qual favorece o aparecimento de espécies ativas de oxigênio (radicais livres), e o efeito protetor do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* nos ratos que receberam esta substância, estudo realizado em ratos adultos. Neste sentido, identificamos efeitos compatíveis com os resultados descritos, na literatura, para o vegetal da presença de substâncias fenólicas (flavonóides) responsáveis pelos efeitos antioxidantes.

Igualmente permitiu identificar a capacidade do extrato hepático de ratos tratados com o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em decompor o peróxido de

hidrogênio, tanto em animais adultos quanto em animais velhos, comprovando o efeito protetor em nível celular.

Os resultados também mostraram um efeito hipoglicêmico atribuído ao extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, e que para o envelhecimento, para o qual não encontramos na literatura nenhuma referência, e que nos abre uma perspectiva de investigação para o futuro, podendo ser um coadjuvante no tratamento do diabetes.

Os dados obtidos com a utilização de ratos velhos, nos quais as defesas antioxidantes encontram-se diminuídas, permitem inferir que a utilização da erva mate (*Ilex paraguariensis*) poderia trazer benefícios para quem a consome, reforçando o papel de uma alimentação saudável, com alimentos funcionais (nutracêuticos) com o papel de prevenção de doenças crônico-degenerativas.

Portanto, com os resultados deste trabalho ressaltamos os efeitos deletérios do L-Name sobre o parênquima hepático com alterações igualmente constatados no perfil histológico e bioquímico, com elevações dos triglicerídeos, glicemia, bilirrubinas e maior formação de H₂O₂, ou seja, promovendo radicais livres em maior quantidade.

Apesar de não contarmos com estatísticas gaúchas sobre a maior ou menor incidência de problemas cardiovasculares, e de termos uma dieta rica em gordura e pobre em vegetais, quem sabe não estamos diante do “paradoxo gaúcho” à semelhança do francês, onde o consumo de vinho tinto protege a população; e com nossos hábitos de tomar chimarrão estamos fazendo o controlando o excesso de radicais livres, diminuindo o estresse oxidativo – conseqüentemente protegendo nosso organismo em nível celular dos efeitos deletérios encontrados na dieta gaúcha, que na gastronomia e culturalmente assume o churrasco como símbolo de uma dieta rica em gorduras.

A escolha de hábitos saudáveis e reeducação alimentar, adquiridos através da herança cultural ou por influência do ambiente social, converge para a interação

entre o ser humano e o meio ambiente, interagindo para a promoção da saúde e bem estar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁGUILA, M.B. ; LOUREIRO, C.C. ; PINHEIRO, A.R. ; MANDARIM-de-LACERDA, C.A. *Metabolismo Lipídico de ratos alimentados com diferentes tipos de lipídios*. Arq. Brás Cardiol, v78(n.1), 25-31, 2002.

ALIKARIDIS, F. *Natural Constituents of Ilex species*. Journal of Ethnopharmacology 20, 121-144, 1987.

AMEZCUA, J.L. ; PALMER, R.M.J. ; SOUZA, B.M. ; MONCADA, S. *Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation on the rabbit*. British Journal of Pharmacology 97, 1119-1124, 1989.

ARUOMA, O.I. *Characterization of drugs as antioxidant prophylactics*. Free Radical Biology & Medicine, 20(5), 675-705, 1996.

BALTASSAT, F. ; DORBOUR, N. ; FERRY, S. *Study on the purine level in caffeine drugs*. Plantes Medicinales et Phytoterapie 18, 195-263, 1984.

BATRA, S. ; RAKUSAN, K. *Capillary length, tortuosity, and spacing in rat myocardium during cardiac cycle*. Am J Physiol , 32 (Heart Circulation Physiol 32): H1369-H76, 1992.

BERKAI, D. ; BRAGA, C.A. *500 anos de história da erva mate*. Canoas (RS), Cone Sul, 2000.

BLOCK, G. ; LANGSETH, L. *Antioxidant vitamins and disease prevention*. Food Technology, 48 (7), 80-84, 1994.

BOVERIS, A. ; CHANCE, B. *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide*. Biochem. J.134;707-716.1973.

BOVERIS, A. ; LLESUY,S.e FRAGA, C.G. *Increased liver chemiluminescence in tumorbearing mice*. Free Rad. Biol. Med. 1, 131-138, 1985.

BRUCKDORFER, K.R. ; DEE, G. ; JACOBS, M. ; RICE-EVANS, C. (1990). *The protective action of nitric oxide against membrane damage induced by myoglobin radicals*. Biochemical Society Transactions 18, 286-287.

BULT, H. ; HERMAN, A.G. ; MATTHYS, K.E. *Antiatherosclerotic activity of drugs in relation to nitric oxid function*. European Journal of Pharmacology 375, 157-176, 1999.

BURDET, R. ; CRISCIONE, L. Use of the isolated, perfused mesenteric bed of the rat in vascular pharmacology. In: *Isolated perfused organ preparation 5th*, Freiburg Focus on Biomeasurement February, 27th and 28th Publisher Gessellschaft fur ERFAHRUNGSTRANFER IN DER Biomesstechnick e.v. Weihermattenweg 11 D-7801 Buchenback, Germany, 144-158, 1989.

CASCON, C.S. *Amino acids in Ilex paraguariensis*. Boletín del Instituto de Química Argentina (Rio de Janeiro) 38, 7-15, 1955.

CATTANEO, P. ; DE SUTTON, K.G. ; RODRIGUEZ, M.L. *Chemical composition of the seed oil of Ilex paraguariensis*. Anales de la Direccion Nacional de Quimica (Buenos Aires) 5 (9), 9-12, 1952.

CHEN, C.W. ; HO, H.T. *Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black tea*. Journal of Food Lipids 2, 35-38, 1995.

CHEN, G. ; SUZUKI, H. ; WESTON, A.H. *Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessel*. British Journal of Pharmacology 95,1165-1174, 1998.

CHIEN K.R. ; FARBER, J.L. *Microsomal dysfunction in ischemic rat liver cells*. Arch Biochem Biophys; 180: 191-98,1997.

CHLAMTAC, E.B. *Sugars in Ilex paraguariensis*. Boletín del Instituto de Química Argentina (Rio de Janeiro) 38, 17-24, 1955.

COCHRANE, C.G. *Mechanisms of oxidant injury of cells*. Mol Aspects Med;12:137-147, 1991.

COMFORT, A. *The biology of senescence*. 3.ed. New York: Elsevier, 1979, 414 p.

COOK, N.C. ; SAMMAN, S. *Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources*. Elsevier Science Inc. New York, 1996.

CRUZ, G.L. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*. 2.ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1982, 599 pp.

DAWSON, V.L. ; DAWSON, T.M. *Free radical and neuronal cell death*. Cell Death an differentiation, V.3 p71-78, 1996.

DIDONÉ, E.C. ; CERSKI, C.T. ; KALIL, A.N. *N-acetilcisteína diminui a congestão hepática na lesão de isquemia e reperfusão - estudo experimental*. Porto Alegre: FFFCMPA/ISCMPA, 2002.

DUNNE, J.B. ; DAVENPORT, M. ; WILLIAMS, R. ; TREDGER, J.M. *Evidence that S-Adenosylmethionine and N- Acetylcysteine reduce injury from sequential cold and warm ischemia in the isolated perfused rat liver*. Transplantation, 57:1161-68, 1994.

EPSTEIN, F.H. *Oxygen* - derived free radicals in post ischemic tissue injury. The New Engl. J. Med.; 312: 159-163, 1985.

FAGUNDES, G. *Cevando mate*. Porto Alegre, 1999.

FARIA, J.L. Anatomia Patológica Geral. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977.

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

GASTON, B. *Nitric oxide and thiol groups*. Bioch Bioph Acta-Bioenergetics; 1411: 323-33, 1999.

GONZALES, Y. ; MACHADO, M.C.C. *Isquemia hepática e glicogênio: estudo experimental*. Rev. Hosp. Clínicas Fac. Med. São Paulo.; 34: 74-9, 1979.

GRAHAN, H.N. *Maté*. Progress in Clinical and Biological Research: 158, 179-183, 1984.

GAZIANO, J.M. ; BURING, J.E. ; BRESLOW, J.L. *Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions and decreased risk of myocardial infarction*. N England J Med , 329:1829-34 1993.

GRAY, M.W. ; BURGER, G. ; FRANSLANG, B. *Mitochondrial Evolution*. Science, v283, p.1476-1481, 1999.

GRISHAM, M.B. *Interaction between nitric oxide and superoxide: role in modulating leucocyte adhesion in the postschemic microvasculature*. Transplant Proc. V 27(5) pg. 2842-2843, 1995.

GUGLIUCCI, A. *Antioxidant effects of Ilex paraguariensis; induction of decreased oxidizability of human LDL in vivo*. Bioch Biop Res Commun; 224:338-344, 1996.

GUGLIUCCI , A. ; STAHL, A.J. *Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of Ilex paraguariensis*. Biochemical Molecular Biological Interations; 35: 47-56, 1995.

HALLIWELL, B. *Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence?* Lancet 344, 721-724, 1994.

HAM, A.W. Tratado de Histologia. 6.ed. Nueva Editorial Interamericana, S.A de C.V., L 06894, 1970.

HAYFLYCK, L. *Cell Biology of Human Aging*. Scient Americ, v. 242, p58-65, 1980.

HAYFLYCK, L. *Biology of ageing: a review*. Australian Journal on Ageing, v.17, 1, p. 29-32, 1998.

HOGG, N. ; SINGH, R.J. et al. *The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide*. FEBS Lett; 382:233-28, 1996.

HOGG, N. ; KALYANARAMAN, B. ; JOSEPH J. ; STRUCK, A. ; PARTHASARATHY, S. *Inhibition of low density lipoprotein oxidation by nitric oxide*. FEBS Letters 334, 170-174, 1993.

HOLBROOK, N.J. ; MARTIN, G.R. ; LOCKSHIN, R.A. *Cellular aging and cell death*. New York: Wiley-liss, v.16, 319 p. , 1996.

IGNARRO L.J. ; KADOWITZ, P.J. *The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 25, 171-191, 1985.

IGNARRO, L.J. ; BYRNS, R.E. ; WOOD, K.S. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical . In: *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and endothelium*. Ed. by P. M. Vanhoutte, Raven Press, New York, pp. 427-436, 1988.

LAUZ, S.H.M. *Avaliação da lesão isquêmica normotérmica do fígado: papel da oclusão do ducto biliar principal e a modulação pela N-acetil cisteína*. São Paulo: Escola Paulista de Medicina. [Tese de Doutorado em Medicina], 2001.

LAUZ, S.H.M. ; MUCCILLO-BAISCH, A.L. et al. *O papel de um flavonóide – Ilex paraguayensis – comparado com a N-acetilsisteína na isquemia normotérmica do fígado*. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. Rio de Janeiro: CBC, 2004.

LENDNER, A. *The seeds of Ilex paraguayensis*. St. Hilaire. Schweizerische Apotheker-Zertung 56, 565-569, 1918.

KERRY, N. ; RICE-EVANS, C. *Inhibition of peroxynitrite - mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships*. J Neurochem, 73:247-253, 1999.

MASINI,E. ; SALVEMINI, D. ; NDISANG, P.G. ; BERNI, L. ; MONCINI, M. ; BIANCHI, S. ; MANNAIONI, P.F. *Cardioprotective activity of endogenous and exogenous nitric oxide on ischaemia reperfusion injury in isolated guinea pig hearts*. Inflammation Research, 48, 561-568, 1999.

MARUBAYASHI, S. et al. *Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: Prevention of damage by alfa-tocopherol administration* vol. 90, n.2, 1985.

MAYER, B. ; SCHMIDT, K. ; HUMBERT, R. ; BOHNE, E. *Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca⁺⁺ dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase*. Bio chemical and Biophysical Research Communications 164, 678-685, 1989.

MAZUCHOWSKI, J.Z. *Manual da erva-mate (Ilex paraguaiensis ST, Hill.)*. Curitiba: Empresa Paranaense Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER), 1989. 104 p.

MAZZAFERA, P. *Caffeine, theobromine and theophylline distribution in Ilex paraguariensis*. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 6(2), 149-151, 1994.

McCORD, J.M. *Oxygen - derived free radicals in postischemic tissue injury*. The New Engl. J. Med.; 312: 159-63, 1985.

McCORD, J.M. *The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology*. Surgery; 94: 412-14, 1983.

MENDIVE, J.R. *Isolation of α -amyrin and ursolic acid in the leaves of Ilex paraguariensis*. Journal of Organic Chemistry 5, 235-237, 1940.

MONCADA, S. ; PALMER, R.M.J. ; HIGGS, E.A. *Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology*. Pharmacol Revivs,; 43:109-42, 1991.

MUCCILLO BAISCH, A.L. ; JOHNSTON, K.B. ; PAGANINI STEIN, F. *Endothelium - dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of Ilex paraguariensis on mesenteric arterial bed of rats*. Journal of Ethnopharmacology 60, 133-139,1998.

MURPHY, M.P. *Nitric oxide em and cell death*. Bioch. Acta-Bioenergéticos, 1411:401, 1999.

NAGASAKI, H. ; NAKANO, H. et al. *Efficacy of preconditioning wiht N-acetylcysteine against reperfusion injury after prolonged cold ischaemia in rats liver in which glutathione had been reduced by buthionine sulphoxime*. Eur J Surg; 164:139-46, 1998.

OLSZEWER, E. *Tratado de Medicina Ortomolecular*. 2.ed. São Paulo: Nova Linha, 1997.

PAGANINI STEIN, F.L. ; BOURSCHEID, A.B. ; SOUZA SOARES, L.A. ; FURLONG, E.B. ; MUCCILLO BAISCH, A.L. *Endothelium - dependent vasorelaxing activity of flavonoid-rich extract from Ilex paraguariensis on mesenteric arterial bed of rats (2002 submitted)*.

PALMER, P.M.J. ; MONCADA, S.A. *A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells*. Biochemical and Biophysical. Research. Communications 158, 348-352, 1989.

PALMER, R.M.J. ; REES, D.D. ; ASHTON, D.S. ; MONCADA, S. *L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation*. Biochemical and Biophysical. Research. Communications 153, 1251-1256, 1988.

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

PALMER, R.M.J. ; RESS, D.D. ; ASHTON, D.S. ; MONCADA, S. *L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation*. Biochemical and Biophysical Research Communications 153 (3), 1251-1256, 1988.

PASTOR, A. ; SÁNCHEZ COLLADO, P. et al. *Microsomal function in biliary obstructed rats: effects of S adenosylmethionine*. J. Hepatol. 24, 353-359, 1996.

PASTOR, A. ; SÁNCHEZ COLLADO, P. et al. *Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of S- adenosylmethionine*. J. Hepatol. 27, 363-367, 1997.

PEREIRA, J.S. ; PEREIRA, A.L. *Envelhecimento: um desafio multidisciplinar*. Recife: Neurobiol. 61; 1: 9-16, março 1998.

PEREZ-TAMAYO, R. *Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 and adequate model of human cirrhosis?* Hepatology, 3, 112-120, 1983.

PIO CORRÊA, M. In: *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Vol III, pp395, 1984.

REES, D.D. ; PALMER, R.M.J. ; SCHULE, R. ; HODSON, H.F. ; MONCADA, S. *Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo*. British Journal of Pharmacology 101, 746-752, 1990.

RENAUD, S. ; DE LORGERIL, M. *Wine, alcohol, platelets and the French Paradox for coronary Herat disease*. Lancet 339, 1523-1526, 1992.

RESS, D.D. ; PALMER, R.M.J. ; MONCADA, S. *Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure*. Proceedings of the National Academy of the United States of America 86, 3375-3378, 1989.

RICE-EVANS, C. ; MILLER, N.J. ; BOLWELL, G.P. ; BRAMLEY, P.M. ; PRIDHAM, J.B. *The relative antioxidant activities of plant - derived polyphenolic flavonoids*. Free Radical Research. 22, 375-383, 1995.

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

ROBERTS, E.A.H. *Chlorogenic acids of tea and maté*. Chemistry and Industry 37, 985, 1956.

ROBERTS, I.D. ; POLANER, D.M. ; SANG, P. ; ZAPOL, W.M. *Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn*. Lancet: 818-819, 1992.

ROSSAIN, R. ; FALKE, K.J. ; LOPEZ, F. ; SLAMA, K. ; PISON, U. ; ZAPOL, W.M. ; ROY, A.K. ; CHATTERJEE, B. *Molecular basis of aging*. London: 993. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. N. England Journal Med. 328:399-405, 1992. Academic Press, 1984.

SCHINELLA, G.R. ; TROIANI, G. ; DAVILA, V. ; BUSCHIAZZO, P.M. ; TOURNIER, H.A. *Antioxidant effects of an aqueous extract of Ilex paraguariensis*. Biochem Biophys Res Comm; 269:357-360, 2000.

SEIGNEUR, M. ; BONNET, J. ; DORIAN, B. ; BENCHIMOL, D. ; DROUILLET, F. ; GOUVERNEUR, G. ; LARRUE, J. ; CROCKETT, R. ; BOISSEAU, M. ; GAYON, R. ; BRICAUS, H. *Effect of the consumption of alcohol white wine, and red wine on platelet function and serum lipids*. Journal of Applied Cardiology 5, 215-222, 1990.

SIES, H. *Strategies of antioxidant defense*. European Journal of Biochemistry 215, 213-219, 1993.

STEIN, Y. ; STEIN, O. *Interaction between serum lipoproteins and cellular components of the arterial wall*. Biochem Atherosclerosis 7, 313-344, 1979.

STEIN, F.L.P. *Estudo comparativo da reatividade vascular de ratos normais e hipercolesterolêmicos (rattus norvegicus, variedade Wistar) ao extrato de Ilex paraguariensis St. Hill*. [Tese de Mestrado defendida no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas] Fisiologia Animal Comparada. 2002.

TAMPO Y. ; YONAHARA, M. *Vitamin E and Glutathione are Required for Preservation of Microsomal Glutathione S-Transferase from Oxidative Stress in Microsomes*, Farmacology e Toxicology. 66, 259-265, 1990.

VANE, J.R. ; ANGGÄRD, E.E. ; BOTTING, R.M. *Regulatory functions of the vascular endothelium*. The New England Journal of Medicine 323, 27-34, 1990.

VANNUCCHI, H. ; IGLESIAS, A.C.R.G. *Determinação de Radicais Livres em Ensaio Biológicos - Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia*. Cap.12, pág. 160-170, 1998.

WALKER, M.W. *Nitric Oxide - Induced Cytotoxicity: Involvement of Cellular Resistance to Oxidative Stress and the Role of Glutathione in Protection*, vol.37m n.01, 1995.

YUTING, C. ; RONGLIANG, Z. ; ZHONGJIAN, J. ; YONG, J. *Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants*. Free Radical Biology and Medicine: 19, 19-21, 1990.

4.2.7.5 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre o parênquima hepático, frente ao envelhecimento biológico

O estudo histopatológico nos revela a ausência de fibrose em todos os subgrupos de ratos velhos. Constatou-se a presença de discreto infiltrado inflamatório à custa de linfócitos no espaço periportal em mais de 4 campos nos subgrupos C e D, e ausente nos subgrupos A e B. Também nos subgrupos que utilizaram a *Ilex paraguariensis*, por via oral, a arquitetura hepatocitária e lobular encontrava-se preservada semelhante ao subgrupo controle dos ratos velhos e controle dos adultos jovens. Encontramos também a presença de moderada quantidade de células fagocitárias de Kupfer em todos os subgrupos dos ratos velhos, sem sinais de congestão, necrose ou mesmo dano celular hepático mínimo (Figura 2).

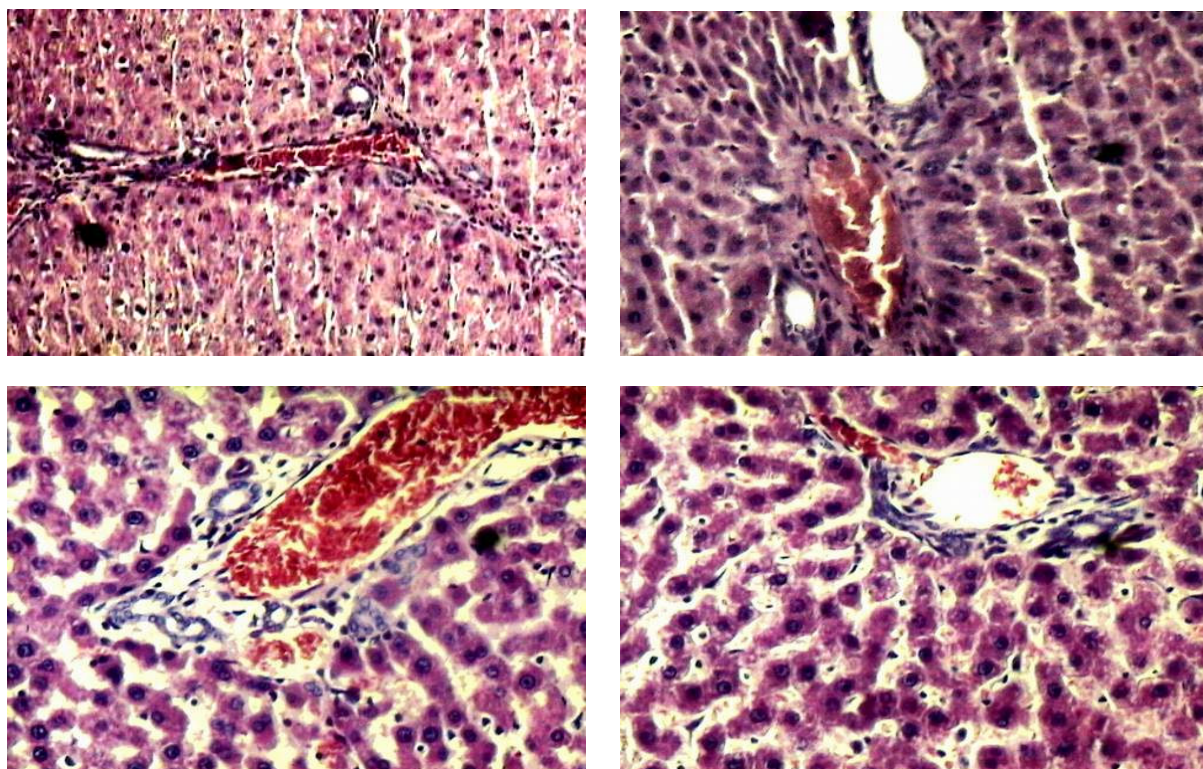


Figura 2. Micrografias de campos parciais dos subgrupos A, B, C, D, sendo os três primeiros representando os subgrupos A, B, e C de ratos velhos e o último representando o grupo D com ratos adultos jovens mostrando parênquima hepático. Imagem dos subgrupos A e B, C e D revelam arquitetura hepática e lobular preservada, sem congestão ou necrose,

sem dano hepático. A imagem dos subgrupos B e C mostra discreto processo inflamatório em espaço periportal e moderada quantidade de células de Kupfer em sinusóides. Nos subgrupos A e D o processo inflamatório é discreto em espaço periportal, e celularidade com citoplasma e núcleos normais nos quatro subgrupos. A imagem A, B, C e D apresentam aumentos de 100, 400, 200, 200 vezes respectivamente para demonstrar nos diversos aumentos o padrão de normalidade encontrados nestes grupos. Coloração pela H.E.

e B), com presença de discreta necrose e acentuado dano hepático, marcado pela congestão acentuada onde existe o desaparecimento do tecido hepático, ausência inclusive do núcleo nos mostra a Figura 1.

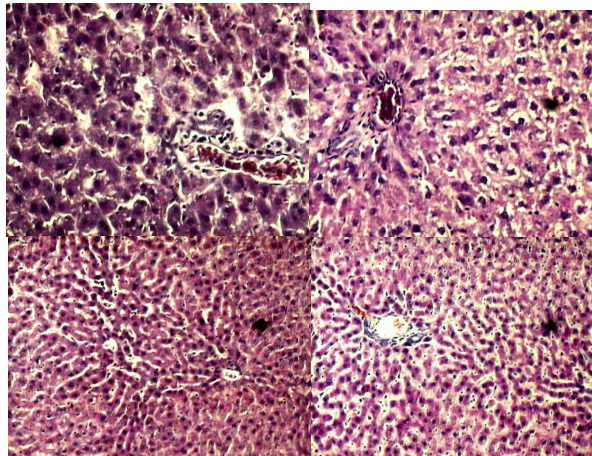


Figura 1. Micrografias de campos parciais dos subgrupos A, B, C, D, mostrando parênquima hepático. Imagem dos subgrupos A e B revelam presença de arquitetura hepática destruída com acentuada congestão e necrose. A imagem dos subgrupos C e D mostra a arquitetura hepática e lobular com aspecto conservado, com acentuada quantidade de células de Kupfer em sinusóides, processo inflamatório discreto em espaço periportal, citoplasma e núcleos normais. A, B, D com aumento de 200x e C com aumento de 400x. Coloração pela H.E.

4.2.7 Efeitos da administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* por curto período (3 dias) e longo período (30 dias) nos animais considerados velhos