

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

**EFEITOS DO CHIMARRÃO (*Ilex paraguariensis*) NA
ABSORÇÃO DE FLAVONÓIDES, NA CONCENTRAÇÃO
DOS LIPÍDIOS E SOBRE A CIRCULAÇÃO**

ZAÍRA TRONCO SALERNO

Porto Alegre

março de 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

**EFEITOS DO CHIMARRÃO (*Ilex paraguariensis*) NA
ABSORÇÃO DE FLAVONÓIDES, NA CONCENTRAÇÃO
DOS LIPÍDIOS E SOBRE A CIRCULAÇÃO**

**Dissertação apresentada por Zaíra Tronco Salerno
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares**

Orientador: Prof. Dr. Waldomiro Carlos Manfroi

**Co-orientadores:
Valquíria Link Bassani
José Cláudio Moreira**

Porto Alegre

março, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Renata Cristina Ramos

Prof^a. Dr^a. Carise Polanski

Prof^a Dr^a Helga Winge

Salerno, Zaíra T

EFEITOS DO CHIMARRÃO (*Ilex paraguariensis* St. Hil) NA ABSORÇÃO DE FLAVONÓIDES, NA CONCENTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS E SOBRE A CIRCULAÇÃO

/Zaíra T Salerno – Porto Alegre: UFRGS, 2007. – 110 p.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares

AGRADECIMENTOS

Ao meu namorado, marido, amigo, incentivador e grande amor... Ricardo –
sempre buscando palavras e maneiras de tornar minhas tarefas mais suaves.

Aos meus filhos...

Thiago, pelo exemplo de enfrentar uma dor física e transformá-la em crescimento pessoal.

Guilherme, que com sua insuperável inteligência participou intensamente de meu crescimento pessoal.

Aos meus pais...

Obrigada pela educação, amor e incentivo para buscar objetivos ousados; pelos ensinamentos em relação ao respeito para com a vida e para com os outros assim como pelo incentivo para trilhar o caminho do bem e força para alcançar os objetivos propostos.

Aos meus sogros...

Por geraram e criaram uma das pessoas mais importantes da minha vida.

Às minhas amigas...

Sirlei, que sempre acolheu minhas palavras nos momentos de felicidade e aflição.
Marilene Sgarbi, por ser esta pessoa maravilhosa e amiga que sempre me apoiou.

Analu, que sempre esteve disponível em várias horas para a pesquisa.

Aos orientadores...

Prof. Dr. Waldomiro Carlos Manfroi, acreditou, confiou, incentivou e participou intensamente no meu desenvolvimento profissional.

Prof^a Valquíria Bassani, pela sua leveza e carinho em atender às demandas da pesquisa.

Prof. José Cláudio Moreira, pela colaboração do seu laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação, professores e colegas...

Obrigada à Dr^a Nadine Clausell, por dedicar sua vida ao desenvolvimento da pesquisa, e um especial agradecimento às colegas e amigas Nêmora Cabistani e Carine Callegaro, que muito me apoiaram e incentivaram para a conclusão deste estudo.

Laboratório do Centro de pesquisa de Patologia Clínica no HCPA

Obrigada pelo apoio da Prof^a Carmen Pilla e seus colaboradores no desenvolvimento e realização do método da pesquisa.

Ao Serviço de Nutrição e Dietética do Hospital de Clínicas...

Pelo atendimento carinhoso e permissão para a realização deste estudo em suas instalações.

À Unidade e Métodos Não-Invasivos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre...

Sempre mantiveram e acolheram com bom-humor todos os participantes.

Ao Sindimate...

Parabéns por estarem confiando na ciência.

À Cassi...

Obrigada por viabilizar as trocas de horários que muito colaboraram na conclusão desse estudo

Aos médicos, nutricionistas, residentes e funcionários de Ambulatório de Cardiopatia Isquêmica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre...

O apoio do Dr. Ricardo Stein, Dr^a Carise Polanski e Nut Magda Cammer em permitir-me convidar e orientar os pacientes sobre os objetivos do estudo o tornando possível a realização da pesquisa.

Aos participantes deste estudo...

A vocês dedico esta minha pesquisa. Que todos estejam com saúde.

Ao GPPG...

A todos desejo felicidades, pois merecem o meu respeito e meu carinho, pelas tantas vezes que me oportunizaram ter estado buscando orientação.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1:	Características basais dos participantes do estudo	43
Tabela 2:	Resultados das variáveis laboratoriais, antropométrica e de ingestão energética antes e após o período do “washout”	44
Tabela 3:	Variáveis laboratoriais, antropométrica e de ingestão energética antes e após 5 dias de intervenção utilizando chimarrão preparado com <i>Ilex paraguariensis St Hil</i>	45
Figura 1:	Resultado da análise do flavonóide quercetina no plasma, antes e após a intervenção com chimarrão (<i>Ilex paraguariensis St Hil</i>)	45
Figura 2:	Efeitos do uso de chimarrão na pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca. PAS = pressão arterial sistólica, PAD = pressão arterial diastólica, FC = frequência cardíaca	48

LISTA DE ABREVIATURAS

DAC	= doença arterial coronária
LDL	= lipoproteína de baixa densidade
HDL	= lipoproteína de alta densidade
TG	= Triglicerídios
CT	= Colesterol Total
FR	= Fator de risco
AHA	= American Heart Association
IMC	= índice de massa corpórea
IAM	= Infarto Agudo do Miocárdio
HÁS	= hipertensão arterial sistêmica
HCPA	= Hospital de Clínicas de Porto Alegre
SND	= Serviço de Nutrição e Dietética
UFRGS	= Universidade Federal do Rio Grande do Sul
TBARS	= Substância reativa de ácido tiobarbitúrico
Bpm	= batimentos por minuto
ECG	= Eletrocardiograma
PA	= Pressão arterial
nmol	= nanomol
<i>μmol</i>	= <i>micromol</i>
CLAE	= sistema analítico para cromatografia líquida
PAS	= pressão arterial sistólica
PAD	= pressão arterial diastólica
FC	= frequência cardíaca
IP	= <i>Ilex paraguariensis Saint Hilaire</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	10
3	OBJETIVOS	18
4	REFERÊNCIAS	19
5	ARTIGO EM PORTUGUÊS	24
	RESUMO	25
	INTRODUÇÃO	26
	MATERIAIS E MÉTODOS	28
	RESULTADOS	42
	DISCUSSÃO	49
	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55
6	ARTIGO EM INGLÊS	60
	ABSTRACT	61
	INTRODUCTION	62
	METHODS	64
	RESULTS	78
	DISCUSSION	85
	CONCLUSIONS	90
	REFERENCES	91
7	ANEXOS	96
7.1	Termo de Consentimento Informado	97
7.2	Protocolo de Investigação	99
7.3	Questionários de hábitos alimentares	103
7.4	Fluxograma 01	106
7.5	Lista de alimentos que não devem ser ingeridos durante os dias da pesquisa	107
7.6	Protocolo para o preparo do chimarrão com <i>Ilex paraguariensis</i> St Hil	108
7.7	Protocolo para a verificação da pressão arterial	109

1. INTRODUÇÃO

A Doença Arterial Coronária (DAC) é responsável por 50% de todas as causas de mortes cardíacas. Trabalhos científicos, realizados sistematicamente, têm demonstrado haver uma possível relação de proteção para DAC no consumo de frutas, vegetais e chás. Estudos epidemiológicos sugerem que os flavonóides presentes na dieta podem estar envolvidos na prevenção da aterosclerose por inibirem a oxidação das LDL, diminuindo sua aterogenicidade e, conseqüentemente, o risco de DAC.

Nas investigações fitoquímicas de *Ilex paraguariensis* St.Hil encontram-se muitas classes de constituintes químicos, como “purine alkaloids” (cafeína), aminoácidos, polifenóis (ácidos clorogênicos) e flavonóides (quercetina, rutina e campferol). Polifenóis e flavonóides têm sido implicados no papel de proteção na ação dos extratos contra muitas doenças. As partes aéreas dessas plantas são largamente usadas para o preparo de uma bebida típica, semelhante a um tipo de chá, o chimarrão (infusão ou decocção), muito apreciada por seu peculiar sabor, pelas propriedades estimulantes e por seu conteúdo de cafeína, teobromina e flavonóides.

O hábito de beber mate, que tem séculos de costume, é mantido em larga escala na Argentina, no Paraguai, no Uruguai e no Brasil. Schinella sugere que a ingestão do mate pode ser um caminho muito efetivo e econômico para fornecer uma quantidade importante de compostos que ativam o sistema de defesa antioxidante do organismo. Também, reporta a necessidade de novos estudos para examinar a atividade biológica dos extratos de *Ilex paraguariensis*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A Doença Arterial Coronária (DAC) é multifatorial e sua prevenção passa pela identificação e controle, não só das dislipidemias, mas do conjunto dos fatores de risco.^{1,2,3,4,5} A morbidade e a mortalidade, associadas, embora ocorram com maior frequência em pessoas acima de 65 anos de idade, a tornam um grande problema de saúde pública, com custos elevados.² Os níveis epidêmicos de DAC tiveram início em torno de 1920, quando ficou constatado que essa tornara-se a principal causa de morte nos Estados Unidos; o índice elevou-se até a metade dos anos 60, quando começaram a declinar as taxas de mortalidade.³ Nos Estados Unidos, a doença arterial coronariana (DAC) causa 500 mil mortes e 12 bilhões de dias de internações hospitalares por ano, sendo que 25% de todos os eventos cardiovasculares graves, como isquemia coronariana e infarto do miocárdio, levam à morte no primeiro evento.⁶ No Brasil, a situação não é diferente: dos 1.024.073 óbitos ocorridos no ano de 2004, 285.543 (27,88%) foram por doenças do aparelho circulatório, tendo a Hipertensão Arterial como seu principal fator de risco.⁷ Dados mais consistentes sobre a doença surgiram a partir do Estudo de Framingham, prospectivo e não-invasivo, iniciado em 1949, sob a coordenação do Dr. William Castelli, que envolveu adultos entre 30 e 62 anos de idade que moravam na cidade industrial de Framingham, Massachusetts.¹ Em seis anos de acompanhamento, os pesquisadores reconheceram a influência da hipertensão arterial e da hipercolesterolemia no desenvolvimento da DAC, bem como a ligação destes fatores e da obesidade na progressão da aterosclerose cardíaca.⁴

A incidência prematura da doença é mais freqüente em homens na idade de 35 a 44 anos em relação à mulher na mesma idade; para as mulheres, o risco maior vem após a menopausa.^{1,8,9} Inúmeros estudos sistemáticos de intervenção sobre os fatores de risco (prevenção primária e secundária) têm demonstrado significativa redução de eventos isquêmicos do coração, redução de intervenções invasivas, melhoria da qualidade de vida e maior sobrevivência.^{10,11,12} Um dos fatores de risco modificáveis é a obesidade, sendo avaliada pelo índice de massa corpórea (IMC) igual ou maior a 30kg/m².^{2,13,14,15} Dados epidemiológicos iniciais apontavam a obesidade como importante fator de risco para DAC.¹ Análises recentes do Framingham Heart Study sugeriram que a obesidade é, na verdade, um fator de risco primário, que atua independente de outros fatores. Em um estudo prospectivo, que avaliou mais de 1 milhão de adultos americanos, homens e mulheres, brancos e negros, durante 14 anos, demonstrou aumento da mortalidade para DAC, com aumento de IMC.¹⁶ Mulheres com o IMC mais alto demonstraram associação no aumento dos níveis de triglicerídios de 0,68 para 0,74 mmol/L (61 para 65mg/dL) e diminuição nos níveis de HDL de 0,23 para 0,13 mmol/L (9 para 5 mg/dL) em todos os grupos estudados.¹⁷

Estudos clínicos e observacionais demonstraram que a redução nos níveis de colesterol, especificamente LDL-c, atua na prevenção da DAC.^{9,18,19} O estudo dos sete países, que avaliou homens de 40 a 59 anos, acompanhados por 15 anos, demonstrou que o consumo de ácidos graxos saturados apresentava forte correlação com níveis plasmáticos de colesterol. O maior consumo de gordura saturada apresentou maiores níveis colesterol e de mortalidade para DAC.¹⁹

Diversas doenças crônicas são exacerbadas por desequilíbrio ou perturbações no metabolismo dos ácidos graxos. Os ácidos graxos são compostos formados por cadeias de átomos de carbono ligados ao hidrogênio, presentes em gorduras e óleos. Podem ser classificados de acordo com o tamanho da cadeia (curta, média, longa) ou com o tipo de ligação da cadeia hidrocarbonada (saturadas, monoinsaturadas e poliinsaturadas). A gordura saturada, em função da sua estrutura retilínea, permite maior entrada de colesterol nas partículas de LDL. Dieta rica em ácidos graxos saturados, em geral, são lipogênicas e o efeito varia, dependendo da quantidade de ingestão de ácidos graxos.² A ingestão de gordura saturada é a principal causa alimentar de elevação do colesterol do plasma. Os ácidos graxos monoinsaturados identificados pelo ω -9 (ácido oléico e palmitoléico) é o precursor de todos os ácidos graxos insaturados e é representativo por diminuir a colesterolemia sem, no entanto, diminuir o HDL-c e provocar oxidação lipídica. Os ácidos graxos poliinsaturados representados pelo ω -6 (ácido linoléico e araquidônico) e ω -3 (ácido linolênico, eicosapentaenóico-EPA e docosahexaenóico-DHA). O ácido linoléico é essencial e é o precursor dos demais ácidos graxos poliinsaturados da série ômega-6, reduzindo o colesterol total e o LDL-c plasmáticos, por vários mecanismos, sendo os principais: menor produção e maior remoção de LDL e alteração da estrutura da LDL, de forma a diminuir o conteúdo de colesterol da partícula. Os ácidos graxos ômega-3 diminuem a trigliceridemia plasmática por reduzirem a secreção hepática de VLDL.² A ingestão dietética de ácidos graxos, distribuída adequadamente, é preventiva nas alterações que envolvem os distúrbios das lipoproteínas.^{2,3}

A aterogênese geralmente envolve uma seqüência de reações que podem levar vários anos para manifestar-se clinicamente.²⁰ Ela pode ser iniciada por uma injúria ou lesão do endotélio, induzida possivelmente via peroxidação dos lipídios.²¹ Está bem estabelecido que radicais oxidados estão envolvidos em patologias cardiovasculares. Algumas substâncias antioxidantes presentes nos tecidos humanos e providas pela dieta, principalmente vindas das plantas, poderiam proteger o corpo do dano dos radicais oxidados. Em alguns países, a alta ingestão de gordura saturada está relacionada com um aumento para DAC; entretanto, a França apresenta baixa mortalidade para DAC e alta ingestão de gordura animal. O Paradoxo Francês foi investigado pelo alto consumo de vinho tinto relacionado com álcool (20-30g/dia), que poderia reduzir o risco para DAC em até 40%.^{22,23} Outro estudo relacionando à inibição da LDL com uso de vinho tinto mostrou que os compostos fenólicos do vinho tinto tinham propriedades antioxidantes, inibindo a oxidação da LDL em humanos.²⁴ Vários estudos têm sido realizados investigando a dieta cardioprotetora^{25,26,27}, inclusive buscando diferentes marcadores bioquímicos de flavonóides.^{28,29} Nesse sentido, há vários trabalhos que caracterizam as propriedades antioxidantes dos polifenóis, flavonóides e catequinas. Trabalhos científicos, realizados sistematicamente, têm demonstrado haver uma possível relação de proteção para DAC no consumo de frutas e vegetais. Em um estudo de coorte, onde se acompanhou profissionais da área de saúde americana, 84.251 mulheres entre 34 a 59 anos foram acompanhadas por 14 anos. E 42.180 homens entre 40 a 75 anos, que foram acompanhados, concluiu-se que a ingestão de vegetais de folhas verdes e frutas cítricas com grandes concentrações de vitamina C possuem efeitos de proteção na DAC.³⁰ Estudo epidemiológico realizado com a participação de 9.608 adultos

(25-74anos), livres de DAC e acompanhados durante 19 anos, também demonstrou uma menor incidência de eventos de DAC em pacientes que consumiam regularmente frutas e verduras.³¹ O The Lyon Diet Heart Study acompanhou por 46 meses o efeito cardioprotetor da dieta Mediterrânea com a progressão da DAC, em pacientes de alto risco. Este estudo demonstrou que, além das frutas e verduras, outros componentes da dieta, como frutas oleaginosas e azeite de oliva, também demonstraram fator protetor para pacientes com DAC.²⁶ Um estudo posterior, que além de frutas e vegetais associou a relação da ingestão de grãos integrais e de grãos refinados para identificar eventos isquêmicos cardíacos e cerebrais em uma população de 15.792 pessoas (45-64 anos), acompanhadas durante 14 anos, demonstrou o efeito protetor de vegetais, frutas e grãos para eventos isquêmicos cardíacos, mas não para eventos cerebrovasculares.³² Outro estudo posterior realizado na Finlândia, incluindo 2.641 homens (42-62 anos), acompanhados durante 12,8 anos, avaliou mortalidade por qualquer causa e comprovou que o uso sistemático de frutas e verduras pode prolongar a longevidade dos homens.³³ Outro estudo duplo-cego para dieta, incluindo frutas e verduras, padrão *versus* placebo, demonstrou que o grupo da intervenção aumentou a atividade antioxidante natural.³⁴ Posteriormente, foi avaliado, entre 1974 e 2002, a relação da ingestão de frutas, vegetais e administração oral de antioxidantes sobre a mortalidade por DAC e todas as formas de Câncer (CA) em uma comunidade populacional no Condado de Washington. Fica demonstrando que na maior ingestão de frutas e verduras prevalecia uma menor incidência de DAC e CA, e que a ingestão de vitamina C e E e os betacarotenos não tinham mostrado efeitos protetores.³⁵

Os flavonóides, caracterizados pelo núcleo flavan, representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os elementos do reino vegetal e são uma classe secundária de plantas com propriedades antioxidantes e quelantes.³⁶ Na dieta humana, eles se encontram mais nas frutas, vegetais, vinhos, chás e cacau, sob a forma β -glicosídeos ou agliconas.^{36,37} Seus efeitos protetores se baseiam na capacidade de inibir a peroxidação lipídica, quelante e atividade redox de metais, e atenuam outros processos envolvendo espécies de oxigênio reativo.³⁷ Mais de 4.000 tipos de flavonóides têm sido identificados no reino vegetal. Um número extenso de estudos envolve os flavonóis (rutina, quercetina, campferol, mirecitina, apinegina). Sua absorção ainda necessita ser mais investigada.^{36,37} A quercetina representa o maior flavonol da subclasse dos flavonóides, com a forma aglicona (livre), e absorve mais rápido; parece ocorrer por transporte passivo ou por carreadores. Na circulação são encontradas quantidades muito baixas de quercetina. Alguns estudos sugerem que se encontra como glucoronídeos e sulfatados. Investiga-se se a absorção ocorre após ação enzimática de glucoronidase e sulfatase. Os compostos da quercetina são excretados pela bile e urina na forma de conjugados e sulfatados. Alguns estudos demonstram que glicosídeos da quercetina (rutina) poderiam ser absorvidos intactos. Outros sugerem que, por serem altamente lipofílicos, devem ser metabolizados antes, para liberar a aglicona. Há estudos que abordam as dificuldades da absorção intestinal de flavonóides devido a sua instabilidade em pH alcalino, mas outros referem que são quimicamente estáveis em pH 6,8 e 1,2.³⁸ A quercetina representa o maior flavonol da subclasse dos flavonóides. Os compostos da quercetina são excretados pela bile e urina na forma de conjugados e sulfatados. O flavonóide rutina é de forma glicosilada (com 2 glicídios: glicose e

ramanose). Sua absorção é mais lenta e pode ser hidrolisada por enzimas presentes na microflora intestinal (intestino delgado e cólon). A quercetina, quando originada da hidrólise da rutina, é absorvida mais rapidamente que a forma aglicona.³⁹ Estudos epidemiológicos sugerem que os flavonóides presentes na dieta podem estar envolvidos na prevenção da aterosclerose por inibirem a oxidação da LDL, diminuindo sua aterogenicidade e, conseqüentemente, o risco de DAC. A mortalidade por DAC está inversamente associada com a ingestão de flavonóis e flavonas, conforme o Zutphen Elderly Study.⁴⁰ O Seven Countries Study, entre outros, investigou a influência da ingestão de flavonóides através de frutas, verduras, chás e vinhos como fator protetor para DAC.^{41,42,43,44,45,46}

O hábito da ingestão de chás tem séculos de costumes, e a história refere que os índios guaranis de Guaira (Paraná) eram mais fortes do que os guaranis de qualquer outra região, também mais alegres, dóceis e acolhedores. Entre seus hábitos, havia o uso de uma bebida feita com folhas fragmentadas, tomadas em um pequeno porongo, por meio de um canudo de taquara, tendo na base um trançado de fibras, para impedir que partículas de folhas fossem ingeridas. Os guaranis chamavam-na de *caá-í* (água de erva saborosa) e diziam que seu uso fora transmitido por Tupã. Os conquistadores provaram a bebida e realmente a acharam saborosa e alguns poucos goles dava uma sensação de bem-estar ao organismo.⁴⁷ No século passado, o naturalista francês Auguste de Saint-Hilaire, em viagem pela América, esteve várias vezes no Brasil⁴⁹, e classificou botanicamente a erva-mate, dentro do gênero *illex* e com designativo *paraguariensis*.⁴⁸ Ainda hoje, o chimarrão (bebida à base de erva-mate) é hábito fortemente arraigado não apenas no sul do Brasil (Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), mas também em parte da Bolívia e do Paraguai e

em todo o Uruguai e a Argentina.^{49,50,51,52,53,54} É possível que o mate possa conter uma importante carga de antioxidantes para o corpo. A presença de rutina, quercetina e campferol, ambos livres e como glicosídeos, em algumas espécies de *Ilex*, incluindo a *Ilex paraguariensis*, pode também ser em parte responsável pela ação antioxidante do mate.⁵¹ Comparando outras variedades do gênero *Ilex*, a *I. paraguariensis* exibiu a maior atividade antioxidante. A preparação comercial em análise mostrou similar atividade antioxidante também na extração não-comercial da amostra dos extratos da planta de *I. paraguariensis*. Esses achados indicam que a industrialização do material da planta, incluindo o aquecimento, não afeta atividade antioxidante da mesma.⁴⁹

Em um estudo utilizando extrato de *Ilex paraguariensis* St.Hil (IP), foi investigado a oxidabilidade da LDL do plasma de três sujeitos saudáveis, antes e após a ingestão do extrato. Concluíram que o extrato de IP era capaz de inibir a oxidação lipoprotéica de baixa densidade cobre-induzida *in vivo* no plasma humano. Tal efeito foi atribuído aos polifenóis e flavonóides presentes no extrato. Embora não se possa definir exatamente a quantidade absorvida destes antioxidante importantes, evidências indicam que quantidades de substâncias dos componentes são absorvidas e alcançam níveis no plasma suficientemente altos para inibir a oxidação lipoprotéica.⁵⁵ Outro estudo posterior examinou os efeitos do extrato de IP nas alterações pós-isquêmicas de 20 min de isquemia global e 30 min de reperfusão. Foram isolados corações de ratos tratados com extrato de IP 10 min antes da isquemia e também nos primeiros 10 min de reperfusão. O extrato de IP demonstrou resultados significativos na atenuação na disfunção miocárdica provocada por isquemia e reperfusão.⁵³ Contudo, pouco é conhecido sobre propriedades antioxidantes e/ou varredura de radicais livres dos extratos de

IP. Dentre as substâncias usadas através dos séculos, pesquisas têm tentado relacionar a *Ilex paraguariensis* St. Hil como protetora para a saúde. Nos últimos estudos, ficou demonstrado que, embora não existam malefícios ou benefícios em relação à DAC e pelo fato de terem sido encontrados flavonóides na análise da composição química do produto, resta-nos saber se os flavonóides são incorporados no organismo, através da corrente sangüínea, após sua ingestão em forma de chimarrão, e se este tem algum efeito sobre a Dinâmica Cardiovascular.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Avaliar os efeitos da ingestão de chimarrão, sobre a concentração sanguínea de flavonóides, de lipídios, da pressão arterial sistêmica, da circulação em pacientes com doença arterial coronária.

Objetivos específicos:

- Avaliar a concentração sangüínea de flavonóides após ingestão de chimarrão.
- Avaliar a concentração dos lipídios após ingestão de chimarrão.
- Acompanhar as variações da pressão arterial e freqüência cardíaca após ingestão de chimarrão.

REFERÊNCIAS

1. Castelli WP. Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham Study. *Am J Med* 1984; 76 (2A):4-12.
2. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Bras. Cardiol* 2001; 77, supl.3: 1-48.
3. Krauss RM, Eckel RH, et all. AHA Dietary Guidelines, Revision 2000: A Statement for Healthcared Professionals From the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation* 2000; 102:2284-2299.
4. Sytrowski PA, Kannel WB, D'Agostino RB. Changes in risk factors and the decline in mortality from cardiovascular disease: The Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990; 322:1635.
5. Manfro, W. C.. et all. Correlação entre a extensão da aterosclerose coronária e a dislipidemia. *Arq. Bras. Cardiol*, São Paulo 1982; 39(1), p.11-15.
6. Pignone MP, Phillips CJ, et all. Screening and Treating Adults for Lipid Disorders. *Am J Prev Med* 2001; 20(3S):77-89.
7. Ministério da Saúde. *Uma análise da mortalidade no Brasil e Regiões*. Secretaria de Vigilância em Saúde – MS – Brasil 2004 – www.saude.gov.br/principal.htm.
8. Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in sexes: A 26-year follow-up of the Framingham population. *J Am Heart* 1986; February 383-90.
9. Haskell WL, et all. Effects of Intensive Multiple Risk Factor Reduction on Coronary Atherosclerosis and Clinical Cardiac – Events in Men and Women with Coronary Artery Disease. *Circulation* 1994; 89:975-90.
10. Kannel WB, Castelli WP et all. An investigation of coronary disease in families: the Framingham Offspring Study. *Am J Epidemio*. 1979; 110:281-90.
11. Goldman L, Cook EF. The decline in ischemic heart disease mortality rates: An analysis of the comparative effects of medical intervention and changes in lifestyle. *Ann Intern Med* 1984; 101:825.

12. Ornish MD, Scherwitz LW et al. Intensive Lifestyle Changes for Reversal of Coronary Heart Disease. *JAMA* 1998;280:2001-7.
13. Willett WC, Dietz WH, Colditz GA. Guidelines for healthy weight. *N Engl J Med* 1999; 341: 427-34.
14. Gallagher D, Visser M, et al. How useful is body mass index for comparison of body fatness across age, sex, and ethnic groups? *Am J Epidemiol* 1996; 143:228-39.
15. International Obesity Task Force. *About Obesity*. Available from: URL: <http://www.obesite.chaire.ulavf.ca/iotf.htm>. Acessada em: 20 de dezembro de 2006.
16. Calle EE, Thun MJ et al. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 1999; 341:1097-105.
17. Denke MA, Sempos CT, Grundy SM. Excess body weight. An under-recognized contributor to dyslipidemia in white American women. *Arch Intern Med* 1994; 154:401.
18. NIH Consensus Conference. Triglyceride, high-density lipoprotein, and coronary heart disease. *JAMA* 1993; 269:505.
19. Keys A, Menotti A, et al. The diet 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 1986 Dec; 124(6):903-15.
20. McGill HC, McMahan A et al. Determinants of Atherosclerosis in the Young. *Am J Cardiol* 1998; 82:30T-36T.
21. Ross R. Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
22. Renaud S, Lorigeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339:1523-26.
23. Kinsella JE., Frankel E., German B., Kanner J. Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. *Food Technology* 1993; April 85-9.
24. Frankel EN, German JB. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993, 341:454-7.

25. Leaf A. Dietary Prevention of Coronary Heart Disease, The Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99:733-35.
26. Lorgeil M, Salen P et al. Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications After Myocardial Infarction – Final Report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99:779-85.
27. Djoussé L, Pankow JS, et al. Relation between dietary linolenic acid and coronary artery disease in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study¹⁻³. *Am J Clin Nutr* 2001; 74:612-9.
28. Krogholm KS, Haraldsdóttir J et al. Urinary Total Flavonoid Excretion but Not 4-Pyridoxic Acid or Potassium Can Be Used as a Biomarker for the Intake of Fruits and Vegetables. *Nutri* 2004; 134:445-51.
29. Young JF, Nielsen SE, et al. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status¹⁻³. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:87-4.
30. Joshipura KJ, Hu FB, Manson JE et al. The Effect of Fruit and Vegetable Intake on Risk for Coronary Heart Disease. *Ann Intern Med* 2001; 134:1106-14.
31. Bazzano LA et al. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study¹⁻³. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:93-9.
32. Steffen LM, Jacobs Jr DR, et al. Associations of whole-grain, refined-grain, and fruit and vegetable consumption with risks of all-cause mortality and incident coronary artery disease and ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study¹⁻³. *Am J Clin Nutr* 2003; 78:383-90.
33. Rissanen TH, Voutilainen S, Virtanen JK et al. Low Intake of Fruits, Berries and Vegetables Is Associated with Excess Mortality in Men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) Study¹. *J Nutr* 2003; 133:199-204.
34. Dragsted LO, Pedersen A, Hermetter A et al. The 6-a-day study: effects of fruit and vegetables on markers of oxidative stress and antioxidative defense in healthy nonsmokers. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:1060-72.
35. Genkinger JM, Platz EA, Hoffman SC et al. Fruit, Vegetable, and Antioxidant Intake and All-Cause, Cancer, and Cardiovascular Disease Mortality in a Community-dwelling Population in Washington County, Maryland. *Am J Epidemiol* 2004; 160:1223-33.

36. Hollman PCH e Katan MB. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food Chem Toxicol* 1999; 37:337-42.
37. Hein KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002; 13:527-84.
38. Hollman PCH, Gaag MVD, et al. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radical Biol Med* 1996; 21(5):703-7.
39. Erlund I, Kosonen T, et al. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56:545-53.
40. Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., et al. Dietary antioxidant flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342: 1007-11.
41. Hertog MGL., Kromhout D., et al. Flavonoid Intake and Long-term Risk of Coronary Heart Disease and Cancer in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med* 1995; 155:381-6.
42. Rimm EB., Katan MB., et al. Relation between Intake of Flavonoids and Risk for Coronary Heart Disease in Male Health Professionals. *Ann Int Med* 1996; 125(5):384-9.
43. Knekt P, Järvinen, R., Reunanen, A., Maatela, J. Flavonoid intake and Coronary Mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 1996; 312: 478-81.
44. Geleijnse JM, Launer LJ, et al. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 2002; 75:880-6.
45. Sesso HD., Gazian, JM., et al. Coffee and Tea Intake and Risk of Myocardial Infarction. *Am J Epidemiol* 1999; 149(2):162-7
46. Ishikawa T, Suzukawa M, et al. Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification^{1,2}. *Am J Clin Nutr* 1997; 66:261-6.
47. Lessa, LCB. *História do chimarrão*. 3.ed. Porto Alegre: Sulina, 1986. p 7-41.

48. Fagundes, GCP. *Cevando o mate*. 6.ed. Porto Alegre: Quêrência, 1983. p 26-32.
49. Filip R, Lotito SB, et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutr Res* 2000; 20(10):1437-46.
50. Schinella GR., Troiani G., et all. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Bioph Res Com* 2000. 269:357-60.
51. Filip R, Lopez P, et all. Phenolic compounds em seven South American Ilex species. *Fitoterapia* 2001; 72:774-8.
52. Gorzalcany S, Filip R, et all. Choloretic effect and intestinal propulsion of "mate" (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *J Ethnopharmacology* 2001; 75:291-4.
53. Schinella G, Fantinelli JC, Mosca SM. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. *Clin Nut* 2005; 24:360-6.
54. Mosimann ALP, Wilhelm-Filho D, Silva EL. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *BioFactors* 2006; 26:59-70.
55. Gugliucci A. Antioxidant Effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of Decreased Oxidability of Human LDL *in Vivo*. *Biochem Bioph Res Comm* 1996; 224:338-44.

**EFEITOS DO CHIMARRÃO (*Ilex paraguariensis* St. Hil)
NA ABSORÇÃO DE FLAVONÓIDES, NA CONCENTRAÇÃO
DOS LIPÍDIOS E SOBRE A CIRCULAÇÃO**

**Zaíra T. Salerno
Waldomiro Carlos Manfroi
Valquiria Linck Bassani
José Cláudio Moreira
Carmen Pilla**

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil. Apoiado em parte por concessões do Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) e Sindicato do Mate do Rio Grande do Sul (SINDIMATE)

**Endereço de Correspondência:
Waldomiro Carlos Manfroi
Serviço de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350, sala 2060
Porto Alegre, RS, Brasil – CEP 90035-003
Fone/Fax (51)21018621
e-mail: wmanfroi@hcpa.ufrgs.br**

RESUMO

Introdução: O chimarrão (mate) é um preparado com folhas secas de *Ilex paraguariensis* St. Hil (IP); é hábito milenar do sul do Brasil, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Argentina. Os extratos da IP possuem compostos polifenóis, flavonóides, saponinas, metilxantinas. Estudos sugerem que os flavonóides presentes na dieta podem estar envolvidos na prevenção da aterosclerose, por inibirem a oxidação das LDL.

Objetivo: Avaliar os efeitos da ingestão de chimarrão sobre a concentração plasmática de flavonóides, sobre os lipídios e sobre a circulação.

Material e Métodos: Ensaio clínico experimental não-randomizado, realizado com 19 pacientes entre 50 a 80 anos, de ambos os sexos, acompanhados no Ambulatório de Cardiopatia Isquêmica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O período de *washout* durou 4 dias, seguidos de mais 5 dias de intervenção com chimarrão. A dieta oferecida foi restrita de alimentos com flavonóides. A coleta de dados foi realizada entre 2003 a 2004. Foram avaliados concentração sanguínea de flavonóides, perfil lipídico, substância reativa de ácido tiobarbitúrico (TBARS) ingestão alimentar, Índice de Massa Corporal (IMC), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e história familiar de doença cardiovascular. As variáveis foram analisadas utilizando-se o teste *t* de Student, Exato de Fischer e ANOVA

Resultados: Após 4 dias de *washout*, foi detectado aumento significativo do colesterol LDL-c (chimarrão: $26,7 \pm 30$ mg/dL e controle: $8,2 \pm 19$ mg/dL) e da relação CT/HDL (chimarrão: $0,4 \pm 0,8$ e controle: $0,51 \pm 0,36$), semelhante em ambos os grupos. Os efeitos do uso do chimarrão apresentaram uma diminuição significativa da relação CT/HDL (chimarrão: $0,2 \pm 0,2$ e controle: $0,3 \pm 0,5$, $P=0,016$) e para TG (chimarrão: 34 ± 36 mg/dL e controle: 29 ± 26 mg/dL, $P= 0,001$), semelhante em ambos os grupos. Após o uso do chimarrão, os valores de TBARS apresentaram diferença significativa ($P=0,001$) para o tempo. Em ambos os grupos, foram detectadas diferenças significativas em relação a uma diminuição para IMC ($P=0,001$) e para Ingestão de Energia ($P=0,001$).

Conclusão: Após 12h do uso de chimarrão, não foram detectados dados significativos na concentração de flavonóides na corrente sanguínea. Ocorreram alterações na pressão arterial sistêmica e na frequência cardíaca

INTRODUÇÃO

O chimarrão (mate) é um hábito arraigado, não apenas no sul do Brasil (Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), mas também em parte da Bolívia e do Paraguai e em todo o Uruguai e a Argentina.¹ É um preparado com erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil), geralmente sorvido quente, que consiste em folhas e ramos finos, secos e triturados, passados em peneira grossa, de cor verde.² Na América do Sul, aproximadamente 30% da população bebe mais de 1 litro/dia dessa bebida.⁴

A história refere que os índios guaranis de Guairá (Paraná) eram mais fortes, alegres, dóceis e acolhedores do que os guaranis de qualquer outra região. Entre seus hábitos, havia o uso de uma bebida feita com folhas fragmentadas, tomadas em um pequeno porongo, por meio de um canudo de taquara, chamada de *caá-í* (água de erva saborosa).³ Em 1823, Auguste de Saint-Hilaire classificou, botanicamente, a erva-mate, dentro do gênero *Ilex* e com designativo *paraguariensis* pertencente à família das aquifoliáceas.² As espécies do gênero da ordem *Ilex* (Aquifoliaceae) são árvores médias a grandes, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais.^{4,5,6}

Essas espécies são conhecidas por ter gosto amargo, serem provavelmente hepatoprotetivas, coloréticas, hipocolesterolêmicas, antioxidantes, anti-reumáticas, diuréticas, glicogenolíticas e com propriedades lipolíticas.^{1,4,5,6} Os extratos da *Ilex paraguariensis* (IP) possuem ácidos fenólicos (ácido clorogênico)^{4,5,6,7}, flavonóides⁵, saponinas⁸, metilxantinas⁹. Estudos com os fitoquímicos da IP demonstraram ação antioxidante sobre a oxidação da LDL.^{7,10}

Os flavonóides rutina, luteolina, quercetina e campeferol foram detectados em preparo de IP.⁵

Mais de 4.000 tipos de flavonóides têm sido identificados no reino vegetal.¹¹ Um número extenso de estudos envolve os flavonóis (rutina, quercetina, campeferol, mirecitina, apinegina), caracterizados pelo núcleo flavan, que representam um dos grupos fenólicos com propriedades antioxidantes e quelantes.¹¹ Na dieta humana, eles são mais encontrados nas frutas, vegetais, vinhos, chás e cacau, sob a forma β -glicosídeos ou agliconas.^{11,12} Seus efeitos protetores começam a partir da habilidade de inibir a peroxidação lipídica, quelante e atividade redox de metais, e atenuam outros processos envolvendo espécies de oxigênio reativo.¹² Os mecanismos locais de absorção e biodisponibilidade têm avançado nas investigações em busca de novos marcadores bioquímicos, mas ainda requerem mais estudos.^{13,14,15} Estudos sugerem que os flavonóides presentes na dieta podem estar envolvidos na prevenção da aterosclerose, por inibirem a oxidação das LDL, diminuindo sua aterogenicidade e, conseqüentemente, o risco de Doença Arterial Coronária (DAC).^{15,16,17,18,19} O Zutphen Elderly Study demonstrou que a mortalidade por DAC estaria inversamente associada à ingestão de flavonóis e flavonas.²⁰ O Seven Countries Study, entre outros, investigou a influência da ingestão de flavonóides através de frutas, verduras, chás e vinhos como fator protetor para DAC.^{6,21,22,23,24,25,26}

Contudo, ainda se conhece pouco sobre as propriedades antioxidantes (sequestrante de radicais livres) dos extratos de *Ilex paraguariensis* St Hil. Dentre os produtos de origem vegetal usados através dos séculos, pesquisas têm

buscado caracterizar a IP como protetora da saúde. Em relação aos benefícios da IP sobre a DAC, não encontramos estudos pertinentes.

Em relação aos lipídios, estudos que utilizaram extrato de *Ilex paraguariensis* St. Hil (IP), em animais e no homem, mostram a sua eficiência em inibir a oxidação lipoprotéica de baixa densidade cobre-induzida *in vivo* no plasma humano.^{4,6,7,10} Essa ação tem sido relacionada à possível influência dos polifenóis e flavonóides presentes no extrato.^{10,27}

Portanto, não existem trabalhos que relacionam os efeitos da ingestão de chimarrão sobre o sistema cardiocirculatório e sobre a concentração dos lipídios plasmáticos em pacientes portadores da cardiopatia isquêmica. Sabe-se, através da literatura, que a ingestão aguda de líquidos determina a elevação da pressão arterial sistêmica e a redução da frequência cardíaca.^{28,29,30,31,32,33}

Face ao pouco conhecimento existente em relação aos efeitos do chimarrão em portadores de DAC e como na literatura não foram encontrados trabalhos que tivessem avaliado as concentrações sanguíneas de flavonóides no homem após as sessões de ingestão de chimarrão, bem como os efeitos sobre o sistema circulatório e nas concentrações dos lipídios, realizamos o presente trabalho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção da amostra

Trata-se de ensaio clínico experimental não-randomizado, do qual participaram 19 pacientes (10 no grupo de ingestão de chimarrão e 09 no grupo controle) com Cardiopatia Isquêmica, acompanhados no Ambulatório de Cardiopatia Isquêmica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram incluídos, no estudo, pacientes com idades entre 50 a 80 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de doença arterial coronária sintomática, e excluídos pacientes portadores de doença valvular, miocardiopatia primária, infarto do miocárdio recente (<3 meses), cirurgia de qualquer natureza (recente), acidente vascular cerebral (recente), angioplastia (recente), uso de estatinas e uso vitaminas A, E, C.

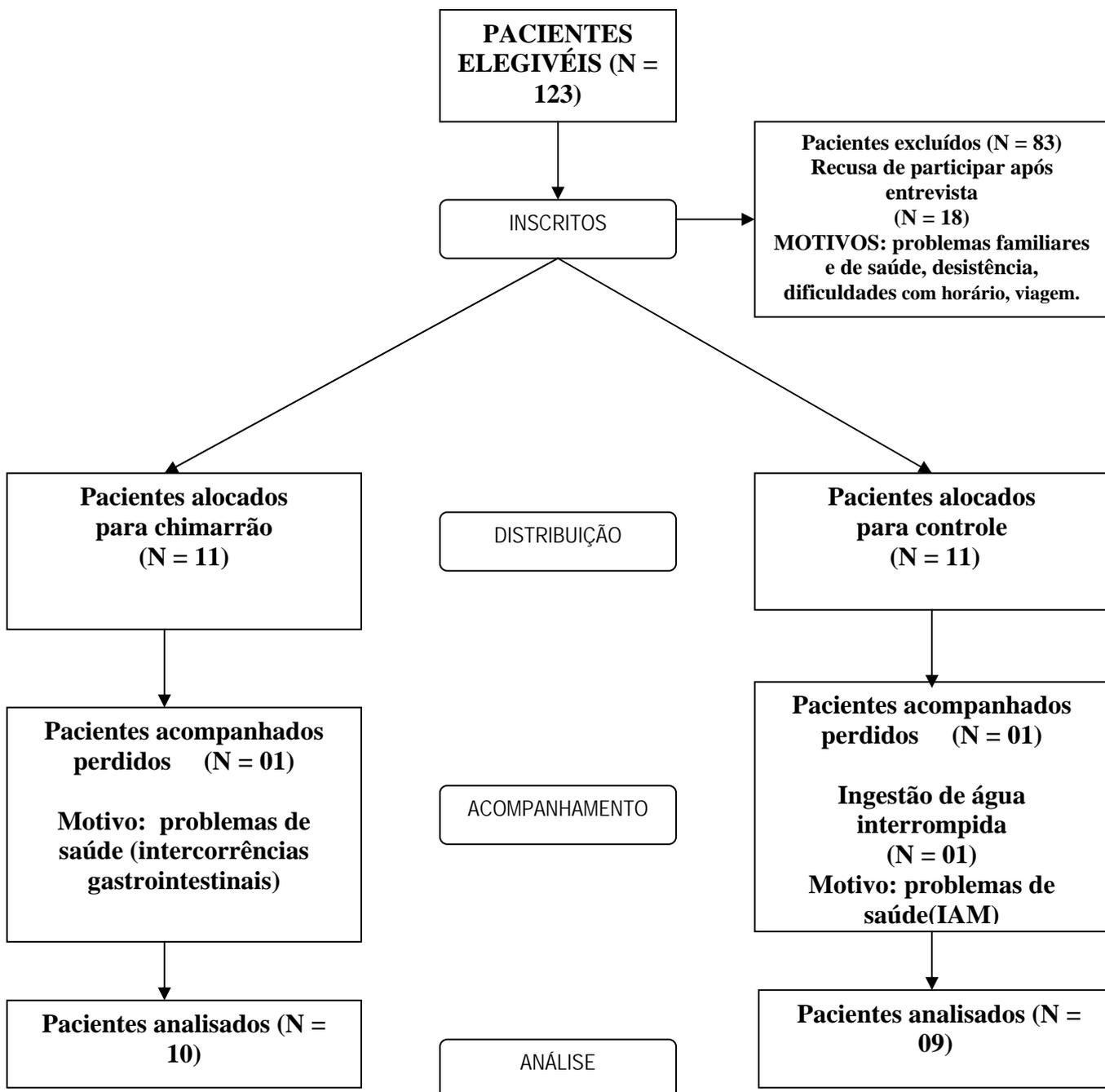
Todos os indivíduos participaram por livre vontade e assinaram o Termo de Consentimento Informado. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em fevereiro/2003.

Os 123 pacientes da amostra foram selecionados através dos 365 prontuários de pacientes acompanhados no ambulatório, entre 2003 e 2004, conforme o fluxograma 01, segundo The Consort.³⁴ Os convites foram feitos por telefone ou pessoalmente, quando o paciente vinha ao serviço para consulta de rotina; o mesmo participava de uma entrevista com o pesquisador e respondia aos protocolos relacionados aos aspectos psicossociais, hábitos de vida, história de doenças, medicações, hábitos de chimarrão e alimentar.³⁵ Após, o entrevistado recebia a orientação sobre data, hora, local do estudo, manutenção do tratamento medicamentoso prescrito e informações sobre alimentos que não faziam parte da sua alimentação durante o estudo. A lista de alimentos que informava sobre a restrição e permissão de ingestão alimentar foi elaborada seguindo análise

realizada para detectar o conteúdo de flavonóides nos alimentos identificados por Crozier et al., Hergot et al. e USDA Database for Flavonoid.^{36,37,38,39}

Foram entrevistados 38 pacientes, sendo 20 selecionados para o grupo controle e apenas 9 concluíram o estudo. Dos 11 pacientes alocados para o estudo, 2 não foram incluídos na análise devido a problemas de saúde, um por crise de gota e outro por alterações isquêmicas no ECG. Ambos foram encaminhados à Emergência do HCPA. Os outros 9 pacientes desistiram do estudo devido a problemas familiares, dificuldades de equacionar o horário de trabalho com a pesquisa, necessidade de viagem e problemas de saúde. No grupo chimarrão, dos 18 pacientes entrevistados, um total de 10 indivíduos foi analisado. Um dos pacientes apresentou reações gastrintestinais no segundo dia do estudo, sendo então encaminhado à Emergência do HCPA, e 7 pacientes, que também foram entrevistados, desistiram devido a dificuldades com deslocamento, problemas de saúde e questões familiares (Fluxograma 1).

Fluxograma 1: Pacientes da pesquisa



Delineamento da intervenção

Dieta

Com a intenção de homogeneizar os grupos, para medidas bioquímicas e ingestão alimentar de flavonóides, utilizamos um período *washout*, que foi elaborado conforme os estudos de Franco et al., Young et al., Krogholm e Hollman.^{35,40,41,42} O período de *washout* em nosso estudo durou 4 dias e os pacientes receberam dieta com restrição de alimentos ricos em flavonóides. No quinto dia, iniciou-se às 7h30min o período de intervenção, que se estendeu até o décimo dia às 8h, conforme o Fluxograma 2.

As refeições servidas durante o período de estudo (desjejum, almoço e jantar) foram elaboradas no Serviço de Nutrição e Dietética (SND) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A partir dessas preparações, o nutricionista pesquisador selecionou as que poderiam ser oferecidas durante o estudo, que eram compostas basicamente de pão branco, carne de boi ou carne de frango, arroz branco, feijão, leite, massa sem molho, creme vegetal, açúcar e aipim; foram excluídos os alimentos listados nas orientações iniciais.^{36,37,38,39} Durante as refeições, os pacientes eram acompanhados pelo pesquisador, que orientava o tamanho das porções e completava o registro alimentar. Nos 2º, 3º, 4º, 6º, 7º, 8º e 9º dias, o SND forneceu a porção do desjejum para os participantes levarem aos seus domicílios. Nos 1º, 5º e 10º dias, receberam o desjejum nas dependências do SND do HCPA, após a coleta de sangue e dos dados antropométricos. Durante o estudo, as orientações dietéticas para evitar alimentos contendo antioxidantes e flavonóides eram reforçadas sistematicamente. A

ingestão dietética foi calculada utilizando o Programa de Apoio à Nutrição®, Versão 1,5 – Departamento de Informática em Saúde – SPDM – Unifesp/EPM, 2002, CD-ROM, Universidade Federal de São Paulo.⁴³

Chimarrão e controle

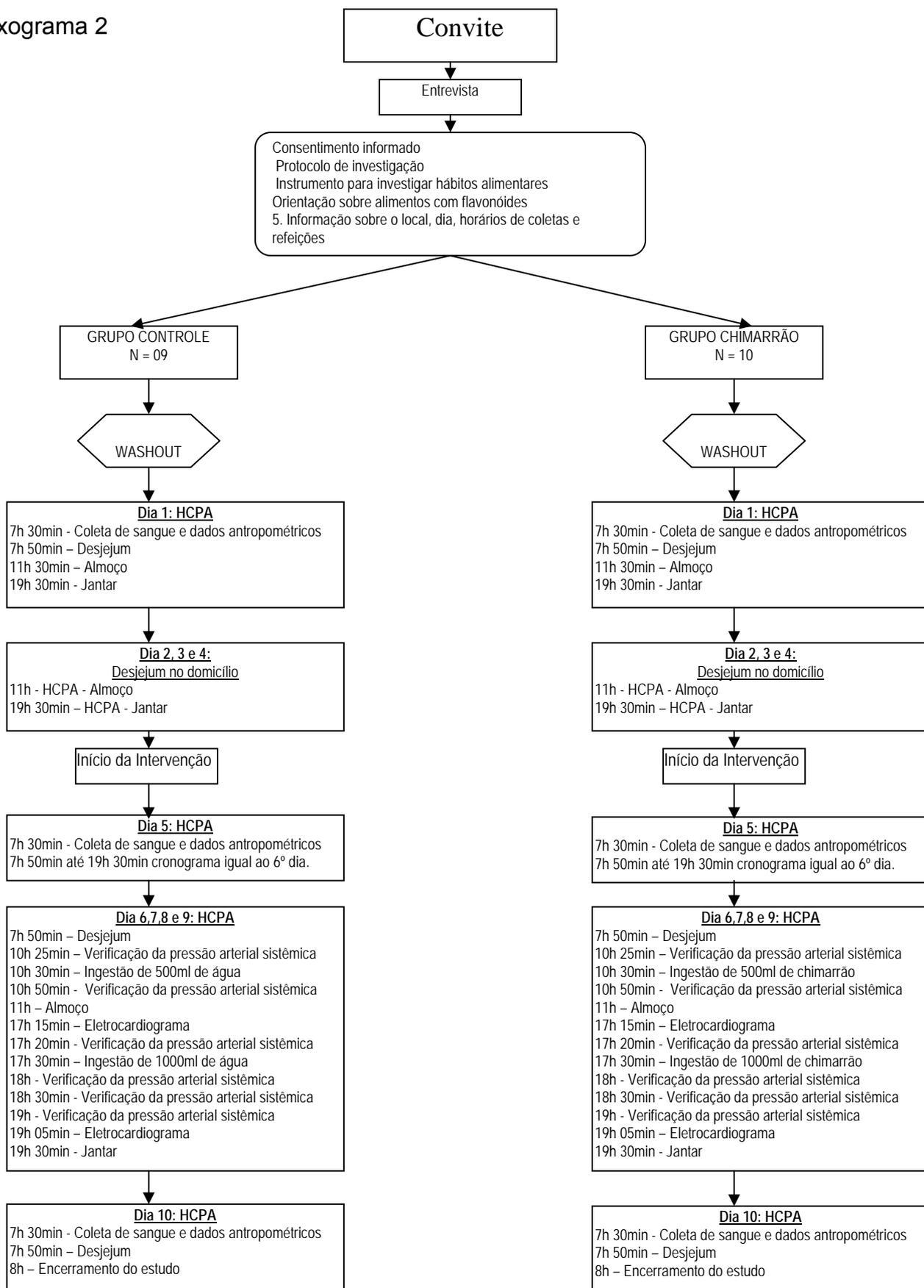
A ingestão do chimarrão ou água aconteceu no quinto dia do estudo, em uma sala do Serviço de Cardiologia do HCPA, devidamente climatizada. Os 21 participantes foram distribuídos em 8 pequenos grupos, mantendo uma média de 3 participantes/grupo, independente da intervenção (chimarrão/água). As bebidas foram preparadas pelo pesquisador. O chimarrão foi preparado com 95 g de folhas secas e moídas de *I. paraguariensis*, 100mL de água a 35°C/5min para intumescer a erva-mate e, para a infusão, 500 mL de água/65°C/porção, sendo oferecidas 3 porções/dia. A bebida utilizada para o grupo controle foi água, coletada no mesmo local do grupo chimarrão. Os pacientes do grupo controle ingeriram água à temperatura de 35°C e acompanharam o mesmo protocolo de horários e monitorização de dados utilizados para o grupo do chimarrão. Para conferir a temperatura da água do grupo chimarrão e do grupo controle, foi utilizado termômetro L.C.D Digital Multi-Stem®. Cada porção de chimarrão foi fracionada em 11, servidas com um tempo médio de 20min. A seleção e quantificação das folhas secas e moídas de *I. paraguariensis* St. Hil foi conduzida pelo laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFRGS. A pesquisadora recebeu do laboratório embalagens individuais contendo 95g de folhas secas e moídas. Cada participante do grupo chimarrão utilizou, durante o estudo, 15 embalagens, perfazendo um total de 1.450g folhas secas e moídas de

I. paraguariensis St. Hil, para o período de 5 dias. A forma de preparo e a temperatura da água também foram orientadas pelo laboratório. Os equipamentos utilizados para administração do chimarrão foram compostos por cuia de material atóxico, bomba de inox, com a colocação de um filtro em sua borda inferior, e garrafa térmica. O material do chimarrão foi de uso individual e devidamente identificado. Os participantes selecionados para o grupo controle receberam o mesmo tratamento que os participantes do grupo do chimarrão, sendo utilizados 1.500mL/água/dia (Fluxograma 2).

Coletas de dados

A coleta de sangue para dados bioquímicos ocorreu em condições de jejum e em três momentos: no primeiro, no quinto e no décimo dia do estudo, tendo sido realizada na Unidade de Coleta do Serviço de Patologia Clínica (SPC) do HCPA e de forma cega. As dosagens foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do mesmo serviço, da seguinte forma: Colesterol Total (Kit colesterol Sera-Pak Bayer®)⁴⁴, frações Colesterol HDL (Kit HDL-c Immuno FS*Diasys® fluid stable®)⁴⁵, Colesterol LDL (cálculo Friedwald)⁴⁶, Triglicerídeos (Kit triglicerídeos Sera-Pak Bayer®)⁴⁷. Para as demais dosagens, substância reativa de ácido tiobarbitúrico (TBARS) e flavonóide, o plasma foi congelado a -80°C e, após, transportado para os laboratórios que realizaram as dosagens. A análise de TBARS^{48,49} foi realizada no Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS e a dosagem de Flavonóide^{42,50} no Laboratório do Centro de Pesquisa da Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do HCPA.

Fluxograma 2



O IMC (peso/altura²)^{51,52,53,54} foi verificado na Unidade de Coleta do SPC do HCPA nos primeiro, quinto e décimo dias do estudo, utilizando uma balança da marca Filizola®, com capacidade de 150 kg e intervalo de 100 g. Para essa coleta, foi solicitado aos participantes a retirada dos sapatos e que ficassem com o mínimo de roupas.

A verificação da pressão arterial acompanhou o protocolo da Sociedade Brasileira de Hipertensão Arterial; a primeira medida ocorreu no quinto dia, antes da ingestão de chimarrão e/ou água, após 30 e 60 minutos do término das intervenções.⁵⁵

O traçado eletrocardiográfico (ECG) foi realizado no Laboratório de Métodos Não-invasivos do HCPA, pelo Serviço de Cardiologia, antes da intervenção, e após 60 minutos do término de cada intervenção, por um período de 5 dias, sendo mensuradas as seguintes variáveis: ritmo cardíaco, frequência cardíaca, sobrecarga das cavidades, presença de arritmias cardíacas, presença de IAM (antigo ou recente), isquemia miocárdica (presença, agravamento, melhora e manutenção) e bloqueio de ramos. Um participante que apresentou bloqueio de ramo foi encaminhado ao cardiologista, no ambulatório de Cardiologia do HCPA, e retirado da pesquisa.

Flavonóides no plasma

A medida de flavonóides no plasma foi realizada no Laboratório de pesquisa de Patologia Clínica do HCPA. Quercetina, β -glucuronidase e sulfatase foram obtidos da Sigma (STO Lois), MO, USA®, ácido acético da Merck®, ácido

fosfórico 98% PA da Quimex, Acetonitrila grau CLAE da OmniSol (afiliada da Merck, Da, Germany). Foi usada água tipo II obtida por osmose reversa com sistema Mili-Q. A dosagem ocorreu de acordo com Manach⁵⁰ e foi utilizado um sistema analítico para cromatografia líquida (CLAE) Shimadzu® com um controlador SCL-10 A, bomba injetora LC-10 AD, detector UV-VIS SPD 10 A e um Chromatopac C-R6A. A coluna analítica foi de fase reversa da Supelco BDS Hypersil® C8, 15 X 4,6 mm X 5 µm, e guarda coluna UBondak® C18. A fase móvel consistiu de mistura de 73% de ácido fosfórico 0,5% e 27% de acetonitrila bombeada, num fluxo de 1,2 mL/min; a leitura do pico do flavonóide feita em detector UV em 370 nm; a coluna permaneceu na temperatura ambiente e o laboratório era climatizado a 20°C.^{42,50}

Uma solução estoque de quercetina foi preparada (5mg/mL) em metanol. A solução padrão de trabalho foi obtida diluindo a solução estoque até a concentração final de 0,100, 0,625, 1,25 e 5,0 nmol/L, para realizar uma curva de calibração. As soluções de trabalho foram adicionadas a uma amostra de soro, sem flavonóides, verificada previamente por CLAE.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados por punção braquial, em jejum. As amostras de plasma foram separadas por centrifugação e armazenados a -80°C até a data da realização da dosagem. No dia da dosagem, 0,5 mL de plasma foi tratado com 0,1 ml de ácido acético 0,58 mol/L, para evitar a instabilidade dos flavonóides em pH maior que 7,4 e incubadas com β-glucuronidase (5×10^6 unidades/L) e sulfatase ($2,5 \times 10^5$ unidades/L) a 37°C, por 60 minutos. Após, foram adicionados, nas amostras, 4,0 mL de acetona para precipitação de proteínas e extração do flavonóide. A mistura

foi homogeneizada em vortex por 30 segundos e depois centrifugada. O sobrenadante contendo o flavonóide foi separado e evaporado em uma centrífuga evaporadora a vácuo, (Labcomco®), por 30 minutos ou até a secura, e o resíduo foi dissolvido com 0,5 mL da fase móvel. A solução obtida foi injetada, diretamente, no equipamento de CLAE, com um *loop* de 20 ul. Nessas condições, foi identificado um pico de quercetina com tempo médio de retenção de 4,5 minutos.

TBARS no plasma

Em um primeiro conjunto de experimentos, as substâncias reativas ao *ácido tiobarbitúrico* (TBARS) presentes na amostra (0,5 mL de plasma ou 0,5 ml de salina e 30% de hemácias) foram determinadas. Resumidamente, 0,5 ml de amostra foi adicionada a uma mistura da reação contendo 2.0 mL de 1% de ácido fosfórico (pH 2.0) e 1.0 mL de solução aquosa de 0.6% de TBA, seguido de 30 minutos de aquecimento a 95°C. Após resfriar cada uma das incubações, o cromógeno foi extraído com n-butanol e lido espectrofotometricamente a 532 nm. Um coeficiente de extinção molar de 154.000 foi usado para calcular os níveis de TBARS.^{48,49}

Flavonóides da infusão de *Ilex paraguariensis*

O material vegetal, composto de folhas e talos de *Ilex paraguariensis* (MPI), foi fornecido pela ervateira Fino Mate® (Mato Leitão – RS), sendo

posteriormente identificado e uma exsicata depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN 133726). Após a coleta, o material foi seco em estufa de ar circulante em temperatura de $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até um teor de perda por dessecação entre 10 a 12%, sendo, posteriormente, submetido à moagem em moinho de facas (Retsch SK1®), cromatógrafo líquido Shimadzu® (LC-10 AD) equipado com controlador de gradiente (FCV-10 AL), injetor automático (SIL-10 A) e detector de UV/VIS (SPD-a0 A) controlado por software (CLASS LC-10). Como fase estacionária, empregou-se uma coluna Shim-pack® CLC-ODS (M) RP-18 (5 mm, 250 mm x 4 mm), protegida por pré-coluna, com fase estacionária Lichrosorb RP-18. Para avaliar a pureza e identidade dos picos, foi empregado, adicionalmente, um detector de arraste de diodo Waters Millenium (Milford®, MA, USA).

Metanol (grau CLAE, Merck®, Darmstadt, Alemanha), ácido acético glacial (P.A) e água ultrapura Milli-Q (Milipore®, Bedford, USA) foram empregados como fase móvel. Como padrões externos, ácido clorogênico (Sigma®) e rutina (Sigma®).

Preparo da solução extrativa de *Ilex paraguariensis* (SEI)

Para obtenção da SEI, 31,6g de MPI seca e moída foram colocadas em copo de Becker e entumecidas com 35,0 ml de água destilada aquecida a 65°C . Após o entumecimento, a MPI foi extraída por infusão, com onze porções de 15,0 ml, simulando o ensaio do grupo chimarrão. O infuso obtido foi, primeiramente, prensado e filtrado com auxílio de prensa hidráulica manual e, posteriormente,

submetido à nova filtração sobre papel de filtro, à pressão reduzida, sendo o volume reconstituído para 200,0 ml. Foi então realizada análise quantitativa do teor de polifenóis da solução extrativa de *Ilex paraguariensis* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para quantificação do teor de polifenóis na SEI, foi empregada a metodologia analítica descrita por Silva, empregando como substâncias de referência ácido clorogênico e rutina.⁵⁶

Curva padrão

Para obtenção das curvas padrão de ácido clorogênico (ACLO) e rutina (RUT), foram preparadas soluções metanólicas 50% (V/V) nas concentrações de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 mg/mL. As soluções foram filtradas em filtro de membrana de polivinilideno de 0,45 μm de diâmetro de poro. Os resultados foram expressos pela área média dos picos, obtidos em três injeções. Esse procedimento foi repetido por três dias consecutivos.

Preparo da amostra

Uma alíquota de 5,0 mL da SEI foi diluída a 50,0 mL com água, consistindo na solução-mãe (SM). Dessa SM, uma alíquota de 5,0 mL foi levada a 25,0 mL com metanol: água (50:50 v/v). A partir dessa solução, alíquotas de 2,0 mL foram diluídas em balões de 10,0 mL com metanol: água (50:50 v/v). Os resultados foram expressos pela área média dos picos obtidos em três injeções. Esse procedimento foi repetido por três dias consecutivos.

Condições cromatográficas

A metodologia analítica empregou um sistema gradiente linear de separação constituído de: (A) ácido acético 2% (V/V); (B) metanol: água 85 % (m/m). O regime de eluição utilizado foi de 31% de B durante 10 minutos, 31-56% de B por 10 minutos, 56% de B por 8 minutos, 56-77% de B por 12 minutos, 77-56% de B por 5 minutos e 56-31% de B por 5 minutos. O volume de injeção da amostra foi de 20 μ l/mL, o fluxo de 0,7 mL/min e a detecção 340 nm, com sensibilidade de 0,05 AUFS.

Substâncias	Solução extrativa	
	Concentração (mg/ml)	CV%
ácido clorogênico	1,39	0,39
rutina	0,44	0,37

CV % = Coeficiente de variação

Análise estatística

As características basais dos indivíduos estudados estão expressas como média, desvio padrão, frequência absoluta. Para a análise basal de idade, PAS, PAD e FC, utilizou-se o teste *t* Student; as demais variáveis foram analisadas utilizando-se o teste Exato de Fisher. Características basais para valores laboratoriais, antropométricos e de ingestão de energia foram comparadas por teste *t* Student, apresentadas como basal. Para comparação entre as variáveis laboratoriais, antropométricas, ingestão de energia e pressões arteriais ao longo

do tempo, foi utilizado ANOVA para medidas repetidas. Foram considerados significativos valores de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Características basais

As características basais dos participantes do estudo, listadas na tabela 1, não diferiram quanto a idade, sexo, hábito de fumar, índice de massa corporal, grau de instrução, história familiar para DAC, uso de medicações, prática de atividade física e etilismo. Também não houve diferenças na frequência cardíaca e nos níveis de pressão arterial sistólica e diastólica.

Tabela 1: Características basais dos participantes do estudo

Variáveis	Chimarrão n=10	Controle n=9	p
Idade (anos)	63,9±7,1	64,22±6,5	0,91
Homens (n)	5	4	0,35
<i>Pressão Arterial</i>			
PAS (mmHg)	119,3±17,6	135,6±21	0,08
PAD (mmHg)	71,2±14	75,9±12	0,45
FC (bat/min)	63±9	68±6	0,19
Tabagista	2	3	0,62
IMC (kg/m ²)	27±3	28±3	0,55
<i>Grau instrução</i>			
ensino fundamental	9	6	
ensino médio	1	3	
<i>História familiar para DAC</i>			
Angina	6	4	0,99
DM	1	4	0,10
IAM	5	6	0,99
Morte Súbita	1	2	0,99
HAS	4	6	0,63
<i>Medicações</i>			
IECA	8	6	0,62
Antagonista de Cálcio	1	2	0,58
Nitrato	2	3	0,62
Betabloqueador	9	7	0,58
Diurético	4	6	0,37
Anticoagulante	7	6	1
Hipolipimeante	7	7	1
Digitálico	1	2	0,58
Atividade física (n)	7	2	0,30

Idade, sexo, valores basais de PAS (pressão arterial sistólica), PAD (pressão arterial diastólica), FC (frequência cardíaca), IMC (índice de massa corporal), DAC (Doença Arterial Coronária), DM (Diabetes Mellitus), IAM (Infarto Agudo do Miocárdio), HAS (hipertensão arterial sistêmica), Medicação IECA (Inibidores da Enzima de Conversão). Valores expressos como média, desvio padrão e frequência absoluta. Para análise de idade, PAS, PAD e FC utilizou-se o teste *t* Student e as demais variáveis foram analisadas utilizando-se o teste Exato de Fisher.

Efeitos da retirada dos alimentos que contêm flavonóides *washout*

Na tabela 2, encontram-se os efeitos da dieta com a retirada dos alimentos que contêm flavonóides sob valores laboratoriais, antropométricos e energéticos.

O *washout* promoveu um aumento significativo do colesterol LDL (chimarrão: 26,7±30mg/dL e controle: 8,2±19mg/dL) e da relação CT/HDL (chimarrão: 0,4±0,8 e controle: 0,51±0,36) semelhante em ambos os grupos. No entanto, CT, HDL e Triglicerídeos (TG) não sofreram nenhuma alteração significativa no período.

Os níveis de TBARS não foram alterados em relação ao tempo, durante o período de *washout*, porém apresentaram diferenças entre os grupos P=0,001 (no grupo chimarrão de 0,11 nmol/mg proteína para 0,09 nmol/mg proteína e no grupo controle de 0,15 nmol/mg proteína para 0,13 nmol/mg proteína). O resultado para flavonóides (quercetina), no período de *washout*, apresentou um aumento significativo no tempo P=0,05 (chimarrão: 0,32±0,54 nmol/L e controle: 0,21±0,34 nmol/L). Já o IMC e ingestão energética não apresentaram nenhuma alteração significativa no período de acompanhamento.

Tabela 2: Resultados das variáveis laboratoriais, antropométrica e de ingestão energética antes e após o período do *washout*

Variáveis	Chimarrão (n = 10)		Controle (n = 9)		Tempo (P)	Grupo (P)	Interação (P)
	Pré	Pós	Pré	Pós			
<i>Lipoproteínas</i>							
Colesterol Total	205,6 ±60	214±72	202±70	205±64	0,23	0,83	0,32
HDL (mg/dL)	44±16,7	41±13	42±13	38±9	0,10	0,68	0,75
LDL (mg/dL)	112±52,7	139±59	125±57	133±53	0,008	0,87	0,12
Relação CT/HDL	4,8±1	5,2±1,2	4,96±1,5	5,5±1,6	0,006	0,79	0,82
TG (mg/dL)	218±111	173±57	173±87	166±51,6	0,12	0,45	0,25
TBARS (nmol/mg proteína)	0,11±0,04*	0,096±0,02	0,156±0,04	0,135±0,03	0,10	0,002	0,71
Flavonóides/quercetina (µmol/L)	0,28±0,22 [‡]	0,59±0,55	0,17±0,11 [‡]	0,41±0,34	0,05	0,34	0,82
IMC (Kg/m ²)	27,5±3,3	27,3±3,3	28,4±3,1	28,2±3,07	0,20	0,54	0,59
Ingestão alimentar (kcal)	1964±230*	1.882±376	1.778±182	1.848±254	0,92	0,32	0,23

CT (Colesterol Total), HDL (Lipoproteína de alta densidade), LDL (Lipoproteína de baixa densidade) Relação CT/HDL (Relação Colesterol Total/Lipoproteína de alta densidade), TG (Triglicerídeos), TBARS (Substâncias Reativas de Ácido Tiobarbitúrico), IMC (Índice de Massa Corporal).

Análises realizadas com n diferenciados[‡] Flavonóides: grupo chimarrão n=7 ; grupo controle n=6.

Valores expressos como média e desvio padrão. Características basais analisadas por teste *t Student* *P <0,05. Anova para medidas repetidas para determinar o efeito do *washout* sobre valores laboratoriais, antropométricos e de energia.

Efeitos do uso do chimarrão

As características basais dos participantes do estudo, listadas na tabela 3, não diferiram quanto ao colesterol total, HDL, LDL, relação colesterol total/HDL, TG, flavonóide quercetina, IMC e ingestão alimentar. Os efeitos das variáveis laboratoriais, antropométricas e de ingestão energética, após o uso do chimarrão, encontram-se na tabela 3. O uso do chimarrão promoveu uma diminuição significativa da relação CT/HDL (chimarrão: $0,2 \pm 0,2$ e controle: $0,3 \pm 0,5$, $P=0,016$) e para TG (chimarrão: 34 ± 36 mg/dL e controle: 29 ± 26 mg/dL, $P=0,001$), semelhante em ambos os grupos. Em relação ao CT, HDL e LDL, não ocorreu nenhuma alteração significativa durante a intervenção. A figura 1 apresenta o flavonóide quercetina (chimarrão: $0,17 \pm 0,78$ nmol/L, controle: $0,17 \pm 0,25$ nmol/L), onde não ocorreram diferenças significativas no período do estudo.

No grupo chimarrão, os valores de TBARS foram menores que no grupo controle. O grupo chimarrão passou de $0,0966$ nmol/mg proteína para $0,0954$ nmol/mg proteína e o grupo controle passou de $0,1351$ nmol/mg proteína para $0,1622$ nmol/mg proteína. Após o uso do chimarrão, os valores de TBARS apresentaram diferença significativa ($P=0,001$) para o grupo, mas para a interação entre os dois grupos não ocorreu significância, ou seja, o chimarrão não fez o TBARS alterar. Nas variáveis que analisaram peso corporal e ingestão de energia, os grupos apresentaram diferenças significativas em relação a uma diminuição de IMC para o tempo (chimarrão: $0,3 \pm 0,3$ kg/m² e controle: $0,1 \pm 0,2$ kg/m² ($P=0,001$)), ocorrendo também a alteração da ingestão energética em relação ao tempo do estudo (chimarrão: 259 ± 239 kcal e controle: 270 ± 227 kcal ($P<0,001$)).

Tabela 3: Variáveis laboratoriais, antropométrica e de ingestão energética antes e após 5 dias de intervenção utilizando chimarrão preparado com *Ilex*

Variáveis	Chimarrão (n = 10)		Controle (n = 9)		Tempo (P)	Grupo (P)	Interação (P)
	Basal	Pós	Basal	Pós			
<i>Lipoproteínas</i>							
CT (mg/dL)	214±72	202±73	205±64	194±54	0,07	0,77	0,90
HDL (mg/dL)	41±13	40±15	38±9	39±9	0,89	0,68	0,82
LDL (mg/dL)	139±59	133±59	133±53	128±42	0,29	0,82	0,98
Relação CT/HDL	5,2±1,2	5,06±1,3	5,5±1,6	5,2±1,3	0,02	0,79	0,70
TG (mg/dL)	173±57	139±48	166±51,6	166±51,6	<0,002	0,86	0,74
TBARS (nmol/mg proteína)	0,096±0,02 *	0,095±0,02	0,135±0,03	0,162±0,03	0,19	<0,002	0,16
Flavonóide/quercetina (µmol/L)	0,59±0,55 †	0,42±0,47	0,41±0,34 †	0,21±0,12	0,29	0,25	0,92
IMC (kg/m ²)	27,3±3,3	27±3,2	28,2±3,1	28,1±3,1	0,002	0,52	0,12
Ingestão alimentar (kcal)	1.882±376	1.630±311	1.848±254	1.578±218	<0,002	0,73	0,86

CT (Colesterol Total), HDL (Lipoproteína de alta densidade), LDL (Lipoproteína de baixa densidade) Relação CT/HDL (Relação Colesterol Total/Lipoproteína de alta densidade), TG (Triglicerídeos), TBARS (Substâncias Reativas de Ácido Tiobarbitúrico), IMC (Índice de Massa Corporal).

Análises realizadas com n diferenciados; † Flavonóides: chimarrão n=7; Flavonóides: controle n=6.

Valores expressos como média e desvio padrão. Características basais analisadas por teste *t Student* **P* <0,05. Anova para medidas repetidas para determinar o efeito do uso do chimarrão sobre valores laboratoriais, antropométricos e de energia.

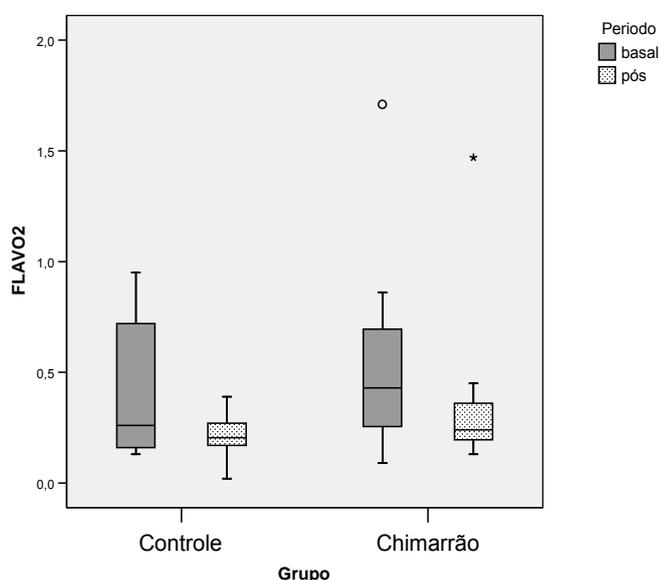


Figura 1: Resultado da análise do Flavonóide quercetina no plasma, antes e após a intervenção com chimarrão (*Ilex paraguariensis* St. Hil)

Os efeitos do uso do chimarrão na pressão arterial sistêmica e na frequência cardíaca encontram-se na figura 2. As pressões arteriais sistólica e diastólica elevaram-se, após 30 minutos do término da ingestão, de

123±12/69±13 mmHg para 125±19/75±10 mmHg no grupo chimarrão e de 137±22/76±12 mmHg para 142±20/82±15 mmHg no grupo controle. Aos 60 minutos do término da ingestão, a pressão arterial sistólica manteve-se elevada em relação ao basal, porém sem significância (ANOVA: Grupo = 0,09, Tempo = 0,08, Interação = 0,67) e a pressão arterial diastólica demonstrou aumento significativo (ANOVA: Tempo < 0,001, Grupo = 0,25, Interação = 0,90).

A pressão arterial basal nos indivíduos do grupo chimarrão foi de 135,6±21/75,9±12 mmHg e no grupo controle de 119,3±17,6/71,2±14 mmHg. Os efeitos pressóricos máximos da ingestão de chimarrão foram significativos e semelhantes entre os grupos (chimarrão e controle), ocorrendo aos 30 minutos após a ingestão. A pressão arterial sistólica apresentou aumento máximo de 3,9±2,7 mmHg (de 123±12 mmHg para 126±15 mmHg) no grupo chimarrão e de 9±4 mmHg (de 137±22 mmHg para 146±19) no grupo controle. A pressão arterial diastólica aumentou 6±2 mmHg (de 69±13 mmHg para 75±10 mmHg) no grupo chimarrão e 5±3 mmHg (de 76±12 mmHg para 81±13 mmHg) no grupo controle. Aos 60 minutos após o término da ingestão, a pressão arterial sistólica manteve-se elevada em relação ao basal, porém sem significância (ANOVA: Grupo = 0,09, Tempo = 0,08, Interação = 0,67) e a diastólica demonstrou aumento significativo (ANOVA: Grupo = 0,001, Tempo = 0,25, Interação = 0,97), analisada nos dois grupos (figura 2). Os valores basais das pressões sistólica e diastólica são expressos como médias no período do estudo.

As pressões arteriais sistólica e diastólica elevaram-se, após 30 minutos do término da ingestão, de 123±12/69±13 mmHg para 125±19 mmHg no grupo chimarrão e 137±22/76±12 mmHg para 142±20/82±15 mmHg no grupo controle.

A frequência cardíaca basal no grupo chimarrão foi de 63 ± 10 bpm e no grupo controle, de 68 ± 6 bpm. A figura 2 mostra que não houve interação entre os grupos no comportamento da frequência cardíaca após 60 minutos da ingestão aguda do chimarrão (grupo chimarrão = 61 ± 8 bpm; grupo controle = 64 ± 8 bpm, ANOVA: Tempo = 0,30, Interação = 0,34). Porém, ocorreu uma redução significativa na frequência cardíaca analisada após 60 minutos da intervenção, tanto no grupo chimarrão (61 ± 8 bpm) como no grupo controle (64 ± 8 bpm, ANOVA: Grupo = 0,03) (figura 2).

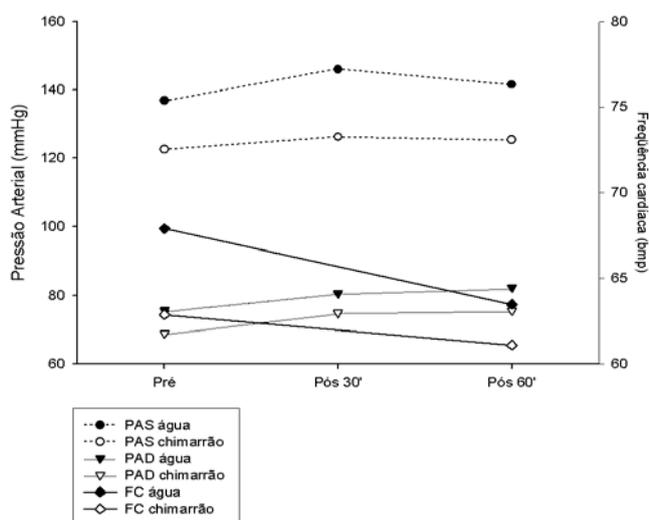


Figura 2: Efeitos do uso de chimarrão na pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca. PAS = pressão arterial sistólica, PAD = pressão arterial diastólica, FC = frequência cardíaca

DISCUSSÃO

O chimarrão é uma bebida de uso milenar, hábito cultural da América do Sul. No Brasil, seu uso é mais freqüente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. A matéria-prima de preparo é a erva-mate *Ilex paraguariensis* St. Hil (IP), que possui, em sua composição química, polifenóis e flavonóides. Em nossa investigação, avaliamos os níveis de flavonóides ingeridos através do chimarrão e como foi a absorção desses na corrente sangüínea. Diversos estudos informam que os flavonóides contidos nas frutas e vegetais são eliminados na urina, conforme demonstraram Krogholm et al⁴⁰ e Young et al⁴¹. Young⁴¹ investigou a presença dos flavonóides no plasma após a ingestão de frutas e vegetais, em voluntários saudáveis, mas não encontrou a referida substância. Krogholm⁴⁰ investigou, em estudantes voluntários, a presença de flavonóides na excreção urinária após ingestão de frutas e verduras, procedendo, para tanto, um modelo de retirada de alimentos que continham flavonóides. O estudo foi realizado em dois momentos diferentes, com *run-in-days* de 3 dias para cada intervenção, seguidos, respectivamente, da ingestão de 300 g, no primeiro período, e 600 g de frutas e verduras, no segundo período; o pesquisador encontrou uma forte correlação linear entre a média de excreção de flavonóides e as doses de frutas e vegetais, com a presença de flavonóides na urina de 24 horas e maior concentração no grupo que ingeriu 600 g de frutas e vegetais. Estudos anteriores usaram doses maiores de flavonóides em relação ao estudo de Krogholm.⁴⁰ Young⁴¹ também investigou a presença de flavonóides na excreção urinária e no plasma, obtida após o uso de suco de maçã e groselha negra por 7 dias, com a concentração de 4,8, 6,4 e 9,6 mg de quercetina/dia, mas não detectou mudanças nas dosagens de quercetina do plasma. O'Reilly, em sua

investigação, comparando a concentração de flavonóides no plasma, após ingestão de dieta enriquecida com flavonóides do chá preto e de cebolas de uma dieta com baixo teor de flavonóides, também não encontrou concentrações significativas ao final de duas intervenções de 14 dias.⁵⁷

Em relação à presença de flavonóides na corrente sangüínea ou urinária providos da erva mate, após sessões de chimarrão, não encontramos estudos na literatura médica feitos por trabalhos específicos. Para identificarmos se os flavonóides existentes na erva-mate IP e ingeridos sob forma de chimarrão seriam absorvidos para a corrente sangüínea, como ocorre nas frutas e vegetais, tomamos o cuidado, depois de selecionados os pacientes, propor dieta igual para todos e a suspensão prévia, por 4 dias (*washout*) e mais 5 dias durante a intervenção, do uso de frutas, verduras, sucos, chás e chimarrão. A participação fiel ao estudo por parte dos pacientes foi comprovada pela análise das concentrações dos flavonóides, lipídios, oxidação e IMC antes e após as intervenções. Quanto à absorção de flavonóides para a corrente sangüínea, constatamos que não ocorreram alterações significativas antes e após a intervenção nos dois grupos (controle e chimarrão). A quantidade de erva mate no líquido utilizado foi a que habitualmente as pessoas usam durante uma manhã ou uma tarde nas sessões de chimarrão. Nosso estudo não permite respostas se as concentrações sangüíneas de flavonóides dos indivíduos que fazem uso prolongado de chimarrão têm comportamento distinto do que encontramos, visto que nossa intervenção foi em um período de tempo limitado. Ao comparamos as concentrações de quercetina em situação basal e após 5 dias de intervenção, houve uma tendência de queda e não de aumento da concentração de flavonóide na corrente sangüínea, como supomos nos objetivos do estudo. Em situação

basal e após a intervenção, notamos que houve essa tendência à queda, que pode ser interpretada pelo efeito da dieta com a retirada dos alimentos ricos em flavonóides e do próprio chimarrão, durante os 4 dias de *washout*. Os resultados obtidos nos permitem afirmar que o uso agudo de chimarrão na quantidade proposta não aumenta a concentração de quercetina na corrente sanguínea.

Para identificar se o uso do chimarrão interfere nas concentrações dos lipídios e na oxidação, dosamos a concentração sanguínea dos mesmos no basal e após 12 horas do término da última tomada de chimarrão mantivemos o mesmo padrão dietético utilizado durante toda intervenção. Como se observa dos resultados, os dois grupos (controle e chimarrão) diminuíram as concentrações dos lipídios. O colesterol total apresentou uma tendência à significância e os TG apresentam um resultado significativo com $P < 0,001$ para o tempo, nos dois grupos investigados. Gugliucci e Stahl⁵⁸ avaliaram o efeito de extratos aquosos e alcoólicos na iniciação e propagação da oxidação de LDL induzida por Cu^{+2} e peróxido *in vitro*, demonstrando que o extrato alcoólico e o aquoso inibem a etapa inicial da oxidação de LDL, sendo que o extrato aquoso mostrou-se mais eficiente como antioxidante. Gugliucci¹⁰ estudou o efeito da ingestão da infusão de IP em LDL *in vivo*, coletou amostra de sangue, em jejum, de 3 voluntários saudáveis, ofereceu 500 mL de extrato aquoso de IP, não especificou concentração da substância e após 1 hora fez outra coleta de sangue, obtendo diferenças significativas ($P < 0.001$) tanto em TBARS como inibição da oxidação de LDL. Schinella⁶, utilizando extrato aquoso de IP com a proporção folha/água (5g/100 mg), identificou a inibição da peroxidação lipídica enzimática e não-enzimática em sistemas biológicos, possivelmente no início do processo em seqüestrar radicais livres, e demonstrou propriedades de redução de radicais

livres. Filip⁴ avaliou, por meio do método de TBARS, a atividade antioxidante do extrato aquoso da IP e de outras plantas do gênero *Ilex*, utilizando lipossomas obtidos da gema de ovo e submetidos à oxidação. Comparado com outras variedades de *Ilex*, a IP apresentou alta atividade antioxidante. Sugeriu, após equivalência com o vinho tinto e com chá preto ou verde, uma quantidade de 70g de erva preparada como chimarrão, com 400mL de água/dia/pessoa. Em nosso trabalho, oferecemos chimarrão aos selecionados, perfazendo uma quantidade erva IP de 285g/dia/pessoa + 1.500 mL/água fracionada em porções, e não obtivemos diferenças significativas na atividade antioxidante em relação ao grupo controle, que foram avaliadas por substância reativa de ácido tiobarbitúrico (TBARS). Mosimann et al⁷ acompanhou, por 8 semanas, 32 ratos, divididos em 4 grupos; administrou extrato aquoso de IP na proporção de 50mg/mL (folhas secas moídas/água) para 2 grupos (controle mate e Hipercolesterolêmico mate), que recebiam 400 mL/dia (água ou extrato aquoso IP) e 100g de dieta. Após 2 meses, avaliou TBARS, aterosclerose na aorta, colesterol sérico, TG, HDL-c. Os resultados mostraram que o extrato aquoso de IP poderia inibir a progressão da aterosclerose em ratos que utilizam dieta com colesterol; entretanto, não apresentaram diferença no colesterol sérico, TBARS e enzimas antioxidantes.

Ao avaliarmos nossos resultados em relação ao perfil lipídico e oxidação, constatamos que a dosagem sangüínea realizada 12 h após o término do chimarrão reduz a ingestão calórica ($P < 0,001$), identificada nos dois grupos, que possivelmente influenciou também na diferença do IMC $P = 0,001$. Outra possibilidade seria a presença de volume maior de líquidos durante o período do estudo ou mesmo a monotonia alimentar em relação a cores e diminuição de variedades de nutrientes. Se essas tendências forem devido aos mecanismos que

atuam sobre a redução da ingestão alimentar, novos estudos deverão ser realizados para comprovar sua veracidade.

Em relação aos efeitos cardiocirculatórios induzidos pela quantidade de líquido utilizado nas sessões de chimarrão com IP por pacientes portadores de cardiopatia isquêmica, não encontramos referências na literatura. Sabe-se, pelos estudos de Callegaro²⁸, que a ingestão aguda de água (500mL), em pacientes jovens com hipertensão leve em posição supina, aumenta significativamente a pressão arterial sistêmica (PAS) e diminui a frequência cardíaca (FC). Em nosso estudo, demonstramos que após a ingestão de chimarrão com IP foi verificada a PAS e a pressão arterial diastólica (PAD) aos 30 e 60 minutos do término da sessão, ocorrendo uma elevação significativa da PAS e da PAD, tanto no grupo chimarrão como no grupo controle, sendo que a PAD demonstrou uma tendência a elevar-se e a PAS a manter-se no mesmo nível. O aumento da pressão arterial sistêmica deve ser atribuído pela ingestão de líquidos por uma resposta de ação arterial, vasoconstritora, como foi demonstrado em estudos anteriores^{28,29,30,31,32,33}, tanto em pessoas normais como em portadoras de alteração autonômica do simpático por idade ou doença. Hodgson investigou se o chá verde ou preto poderia atenuar os efeitos pressóricos ou mesmo diminuir durante o consumo regular; esse estudo também verificou a PAS e PAD em 30 e 60 minutos após ingestão; os resultados mostraram alterações significativas somente para a verificação aos 30min, confirmando as alterações pressóricas após 30 min da ingestão aguda de líquido.³² Quanto ao comportamento da frequência cardíaca, nosso estudo demonstrou uma redução da mesma, como já fora observado em estudos anteriores, que também utilizaram a ingestão de líquidos.^{28,29,30,31}

Os eletrocardiogramas realizados durante o estudo, em situação basal e após 60 minutos do término de cada intervenção, perfazendo um período de 5 dias, com análise da FC, mostraram presença de arritmias, alterações da condução do átrio ventricular e intraventricular, sobrecargas de cavidades atriais e reventriculares, presença de infarto do miocárdio e alterações da repolarização ventricular. As análises dos traçados eletrocardiográficos, obtidas nas condições basal e pós-intervenção, não mostraram alterações significativas para o uso do chimarrão ou água no período de acompanhamento, a não ser a redução da frequência cardíaca.

CONCLUSÃO

Com base na metodologia adotada e pelos resultados obtidos, podemos concluir que:

- os flavonóides existentes na folha da erva-mate não são encontrados em níveis detectados por CLAE na corrente sanguínea 12 h após ingestão de chimarrão;
- após a ingestão aguda de 1,5 L/dia de chimarrão ou de 1,5 L/dia de água, há redução significativa no perfil dos lipídios da corrente sanguínea, determinados provavelmente pela redução de ingestão de alimentos;

- o uso de chimarrão em pequenos grupos ou quantidades equivalentes de água sem folhas de erva-mate determina um aumento significativo da pressão arterial sistêmica.

- em relação ao comportamento da circulação, constatamos que nos dois grupos, depois da ingestão de 1,5 l/dia de líquidos, com ou sem a presença da infusão de *Ilex paraguariensis* St. Hil, houve um aumento significativo da pressão arterial sistólica e diastólica e reduziu a frequência cardíaca.

- constatamos, ainda, que ocorreu uma significativa redução nas concentrações de lipoproteínas de baixa densidade e lipoproteínas de alta densidade e triglicerídeos. Como o comportamento foi semelhante nos dois grupos, não pode ser atribuída a alteração pelo chimarrão.

REFERÊNCIAS

1. Gorzalcany S, Filip R, et al. Choloretic effect and intestinal propulsion of “mate” (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *J Ethnopharmacology* 2001; 75: 291-4.
2. Lessa LCB. *História do chimarrão*. 3.ed. Porto Alegre: Sulina, 1986; 7-41.
3. Fagundes GCP. Cevando o mate. 6.ed. Porto Alegre: Querência, 1983; 26-32.
4. Filip R, Lotito SB et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutr Res* 2000; 20(10):1437-46.
5. Filip R, Lopez P, et al. Phenolic compounds em seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 2001; 72:774-8.

6. Schinella GR., Troiani G. et al. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Bioph Res Comm* 2000; 269:357-60
7. Mosimann ALP, Wilhelm Filho D, Silva EL. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *BioFactors* 2006; 26:59-70.
8. Kraemer KH, Takeda ATC, Schenkel EP et al. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. *Phytochemistry* 1996; 42:1119-22.
9. Reginatto FH, Athayde ML, Gosmann G. Methyxanthines accumulation in *Ilex* species – caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. *J Braz Chem Soc* 1999; 10:443-6.
10. Gugliucci A. Antioxidant Effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of Decreased Oxidability of Human LDL *in vivo*. *Biochem Bioph Res Comm* 1996; 224:338-44.
11. Hollman PCH, Katan MB. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food Chem Toxicol* 1999; 37:337-42.
12. Hein KE et al. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* , 2002; 13:572-84.
13. Hollman PCH, et al. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radical Biol Med* 1996; 21(5):703-7.
14. Erlund I et al. Pharmacokinetics of quercetina from quercetina aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56:545-53.
15. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol* 2001; 77(supl 3):1-48.
16. Kinsella JE., Frankel E., German B., Kanner J. Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. *Food Technology* 1993; April 85-9.
17. Lorigeril M, Salen P et al. Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications After Myocardial Infarction – Final Report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99:779-85.
18. Leaf A. Dietary Prevention of Coronary Heart Disease, The Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99:733-35.
19. Lorigeril M, Salen P, et al. Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications After Myocardial Infarction – Final Report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99:779-85.
20. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342:1007-11.

21. Hertog MGL, Kromhout D, et al. Flavonoid Intake and Long-term Risk of Coronary Heart Disease and Cancer in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med* 1995; 155:381-6.
22. Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Relation between Intake of Flavonoids and Risk for Coronary Heart Disease in Male Health Professionals. *Ann Int Med* 1996; 125(5):384-9.
23. Knekt P, Järvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoide intake and Coronary Mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 1996; 312:478-81.
24. Geleijnse JM, Launer LJ et al. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 2002; 75:880-6.
25. Sesso HD, Gazian, JM et al. Coffee and Tea Intake and Risk of Myocardial Infarction. *Am J Epidemiol* 1999; 149(2):162-7
26. Ishikawa T, Suzukawa M et al. Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification^{1,2}. *Am J Clin Nutr* 1997; 66:261-6.
27. Schinella G, Fantinelli JC, Mosca SM. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. *Clin Nut* 2005; 24:360-6.
28. Callegaro C et al. Efeitos Hemodinâmicos e Autonômicos da Ingestão aguda de água em indivíduos hipertensos. Resumo do 6° Congresso da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Card* 2005; 52(supl 4):147.
29. Endo Y, Yamauchi K, et al. Changes in Blood Pressure and Muscle Sympathetic Nerve Activity during Water Drinking in Humans. *Japanese J Phys* 2002; 52:421-7.
30. Jordan J. Acute effect of water on blood pressure. What do we know? *Clin Auton Res* 2002; 12:250-5.
31. Scott EM, Greenwood JP, et al. Water ingestion increases sympathetic vasoconstrictor discharge in normal human subjects. *Clinical Sci* 2001; 100: 335-2.
32. Hodgson JM, Puddey IB, et al. Effects on blood of drinking green and black tea. *J Hypertens* 1999; Apr 17(4):457-63.
33. Jordan J, Shannon JR, et al. A potent pressor response elicited by drinking water. *Lancet* 1999; 27:723.
34. Altman DG, Schulz KF, Moher D. The Revised CONSORT Statement for Reporting Randomized Trials: Explanation and Elaboration. *Ann Intern Med* 2001;134:663-694.

35. Franco V, Polanczyk CA, Clausell N, Rohde LE. Role of Dietary Vitamin K Intake in Chronic Oral Anticoagulation: Prospective Evidence from Observational and Randomized Protocols. *Am J Med* 2004; 116:651-56.
36. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in The Netherlands. *J Agric Food Chem* 1992; 40:279-83.
37. Hertog MGL, Hollman PCH, Putte BV. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices. *J Agric Food Chem* 1993; 41:1242-46.
38. Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS, Black C. Quantitative Analysis of Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce and Celery. *J Agric Food Chem* 1997; 45:590-95.
39. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. US Department of Agriculture, March 2003. <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>>.
40. Krogholm KS, Haraldsdóttir J et al. Urinary Total Flavonoid Excretion but Not 4-Pyridoxic Acid or Potassium Can Be Used as a Biomarker for the Intake of Fruits and Vegetables. *Nutri* 2004; 134:445-51.
41. Young JF, Nielsen SE, et al. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status¹⁻³. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:87-4.
42. Hollman PCH, Trijp JMPV, et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS* 1997; 418:152-56.
43. Programa de Apoio à Nutrição NUTWIN, do Departamento de Informática em Saúde da Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, São Paulo-Brasil.
44. Dee R, Ziegenhorm J. Kinetic enzymatic method for automatic determination of cholesterol total in serum. *Clin Chem* 1983; 29:1978-80.
45. Nauck M, Maerz W, Wiland H. New immuno separation-based homogenous assay for HDL-cholesterol compared with three homogenous methods for HDL-cholesterol. *Clin Chem* 1998; 44:1443-51.
46. Friedwald NT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of concentration cholesterol in plasma without use of ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:449-02.
47. Klotzch SG, Mcnamara JR. Triglyceride measurements: a review of methods and interferences. *Clin Chem* 1990; 36:1605-13.
48. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD et al: Reaction Conditions Affecting the Relationship Between Thiobarbituric Acid Reactivity and Lipid Peroxides in Human Plasma. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 31:331-335.
49. Polydoro M, et al. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sciences* 2004; 74:2819.

50. Manach C, Morand C, et al. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS* 1997; 409:12-6.
51. Willett WC, Dietz WH, Colditz GA. Guidelines for healthy weight. *N Engl J Med* 1999; 341:427-34.
52. International Obesity Task Force. About Obesity. Available from: URL: <<http://www.obesite.chaire.ulavl.ca/iotf.htm>>.
53. Calle EE, Thun MJ et al. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 1999; 341:1097-105.
54. Denke MA, Sempos CT, Grundy SM. Excess body weight. An under-recognized contributor to dyslipidemia in white American women. *Arch Intern Med* 1994; 154:401.
55. Mion D, Machado CA, Gomes MAM. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol* 2004; 82(IV):1-14.
56. Silva FA. Avaliação tecnológica e biológica de extrato seco por Spray-drying de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate). Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, 2004. [Tese de Doutorado em andamento].
57. O'Reilly JD, et al. Consumption of flavonoids in onions and black tea: lack of effect on F₂-isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:1040-4.
58. Gugliucci A, Stahl AJC. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Bioch Mol Bio Int* 1995; 35(1):47-56.

**EFFECTS OF CHIMARRÃO (*Ilex paraguariensis* St. Hil) ON THE
FLAVONOID ABSORPTION, LIPID CONCENTRATION AND
CIRCULATION**

**Zaíra Tronco Salerno
Waldomiro Carlos Manfroi
Valquiria Linck Bassani
José Cláudio Moreira
Carmen Pilla**

**Post-Graduation Program in Health Sciences: Cardiology and
Cardiovascular Sciences, Medicine School of Universidade Federal do Rio
Grande do Sul (UFRGS), Brazil. Partly sponsored by concessions from the
Fund of Incentive to Research and Events (FIPE) and Mate Labor Union of
Rio Grande do Sul (SINDIMATE)**

**Contact:
Waldomiro Carlos Manfroi
Serviço de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350, sala 2060
Porto Alegre, RS, Brasil – 90035-003
Fone/Fax 55 51 2101 8621
e-mail: wmanfroi@hcpa.ufrgs.br**

ABSTRACT

Introduction: Chimarrão (*mate*) is a tea prepared from dry greens of *Ilex paraguariensis* St. Hil (*IP*); drinking chimarrão is an old habit in southern Brazil, Bolivia, Paraguay, Uruguay and Argentina. The IP extracts contain polyphenol compounds, flavonoids, saponins and methylxanthines. Studies suggest that the flavonoids present in the diet may be related to the atherosclerosis prevention, by inhibiting the LDL oxidation.

Objective: Evaluate the chimarrão intake effects on the plasmatic concentration of flavonoids, lipids and the circulation.

Material and Methods: A non-randomized experimental clinical essay, performed with 19 patients between 50 and 80 years old, male and female, supervised at the Ischemic Cardiopathy Clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The washout period lasted 4 days, followed by 5 days with chimarrão intervention. The offered diet included only foods containing flavonoids. The data collection was performed between 2003 and 2004, and the following aspects were evaluated: flavonoid concentration in blood, lipid profile, thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), food intake, Body Mass Index (BMI), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), heart rate (HR) and family history of heart disease. The variables were analyzed using the Student's t-test, Fisher's Exact Test and the analysis of variance (ANOVA).

Results: After a 4-day washout procedure, a significant increase in both LDL-c cholesterol (chimarrão: 26.7 ± 30 mg/dL and control: 8.2 ± 19 mg/dL) and TC/HDL ratio (chimarrão: 0.4 ± 0.8 and control: 0.51 ± 0.36) was detected, similar in both groups. The effects of using chimarrão presented a significant reduction in both TC/HDL ratio (chimarrão: 0.2 ± 0.2 and control: 0.3 ± 0.5 , $P=0.016$) and TG (chimarrão: 34 ± 36 mg/dL and control: 29 ± 26 mg/dL, $P=0.001$), similar in both groups. After using chimarrão, the TBARS values presented a significant difference ($P=0.001$), considering the application period. Both groups showed significant differences concerning a reduction in BMI ($P=0.001$) and Energy Intake ($P=0.001$).

Conclusion: After the utilization of chimarrão for 12 hours, no significant data were detected regarding the flavonoid concentration in blood. Alterations were observed in the systemic blood pressure and heart rate.

INTRODUCTION

Chimarrão (*mate*) is a deep-rooted habit, not only in southern Brazil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul States), but also in part of Bolivia and Paraguay, as well as in all Uruguay and Argentina¹. It is a tea prepared from *erva mate* (*Ilex paraguariensis* St. Hil), usually drunk while hot. It is made of thin, dry and ground leaves and twigs, screened through a thick sieve, and has green color². In South America, around 30% of the population drink over 1 liter/day of this beverage⁴.

This history says that the Guarani native people living in Guairá (Paraná) were stronger, more cheerful, sweet-tempered and welcoming than the other Guarani people from any other region. Their habits included a beverage made of ground leaves, drunk from a small gourd using a bamboo straw, named *caá-í* (water from tasty herb)³. In 1823, Auguste de Saint-Hilaire botanically classified the *erva mate* as one *Ilex* type, with the *paraguariensis*, designation belonging to the Aquifoliaceae family². The species of the *Ilex* (Aquifoliaceae) type are medium- to large-sized trees that grow in tropical and subtropical regions^{4,5,6}.

These species are known for its bitter taste, and for probably being hepatoprotective, choleric, hypercholesterolemic, antioxidant, antirheumatic, diuretic, glycogenolytic and with lipolytic properties^{1,4,5,6}. The IP extracts contain polyphenol compounds (chlorogenic acid)^{4,5,6,7}, flavonoids⁵, saponins⁸ and methylxanthines⁹. Studies conducted with the IP phytochemicals show an antioxidant action on the LDL oxidation^{7,10}. The flavonoids: rutin, luteolin, quercetin and kaempferol were detected in the IP⁵.

Over 4,000 flavonoid types have been identified in the nature¹¹. Innumerable studies involve the flavonols (rutin, quercetin, kaempferol, myricetin and apigenin), characterized by the flavan nucleus, that represent one of the phenolic groups with antioxidant and chelating properties¹¹. In human diet, they are more frequently found in fruits, vegetables, wines, teas and cocoa, in the form of β -glycosides or aglycones^{11,12}. Their protective effects start with the ability to inhibit the lipid peroxidation, chelant and the redox activity of metals, and attenuate other processes that involve reactive oxygen species¹². The local absorption and bioavailability mechanisms have advanced in the investigations for new biochemical markers, but further studies are still required^{13,14,15}. Studies suggest that the flavonoids present in the diet may be related to the atherosclerosis prevention, by inhibiting the LDL oxidation, thus reducing its atherogenicity and consequently, the risk of Coronary Artery Disease (CAD)^{15,16,17,18,19}. The Zutphen Elderly Study showed that the mortality caused by CAD would be inversely associated with the flavonol and flavone intake²⁰. The Seven Countries Study, among others, investigated the influence of flavonoid intake through fruits, greens, teas and wines as a protective factor for CAD^{6,21,22,23,24,25,26}.

However, there is insufficient information on the antioxidant properties (free radical scavenger) of the *Ilex paraguariensis* *St Hil* extracts. Among the substances used through the centuries, researches have tried to characterize the IP as a health protector. We have not found any pertinent study related to the IP benefits involving CAD.

Concerning the lipids, studies that used the *Ilex paraguariensis* *St. Hil* (IP) extract in both animals and humans show its efficiency in inhibiting the copper-induced LDL oxidation *in vivo* in human plasma^{4,6,7,10}. This action has been

associated with the possible influence of polyphenols and flavonoids present in the extract^{10,27}.

Thus, there are no studies about the chimarrão intake effects on the cardiocirculatory system and plasma lipid concentration in patients with ischemic cardiopathy. The literature shows that the excessive intake of liquids provokes higher systemic blood pressure and reduced heart rate^{28,29,30,31,32,33}.

This study was performed considering the unavailability of sufficient data on the chimarrão effects on people suffering from CAD and because we had not found in the literature studies that evaluated the flavonoid concentration in the human blood after chimarrão sessions, the effects on the circulatory system and lipid concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Sample selection

This is a non-randomized experimental clinical essay, performed with 19 patients (9 in the chimarrão group and 10 in the control group) with Ischemic Cardiopathy, supervised at the Ischemic Cardiopathy Clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The study involved patients between 50 and 80 years old, male and female, with symptomatic coronary artery disease. Patients in the following situations were excluded from the study: with valvular disease, primary myocardopathy, recent myocardial infarction (<3 months), patients that have had

a surgery of any nature (recent), cerebral vascular accident (recent), angioplasty (recent), patients that use statins and vitamins A, E, C.

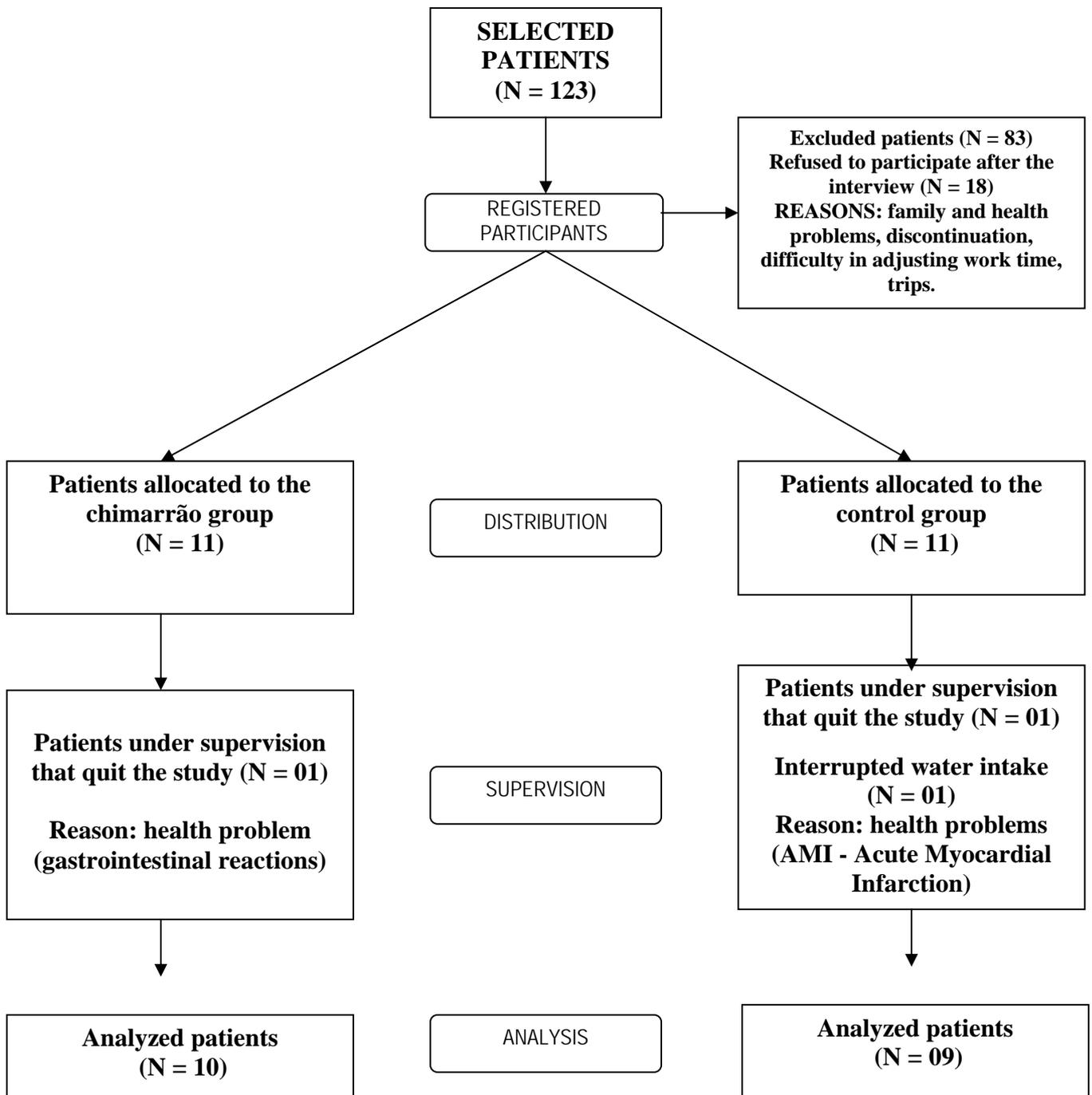
All individuals participated in the study of their own free will and signed the Informed Consent Term. The study was approved by the Research Ethics Committee (CEP – *Comitê de Ética em Pesquisa*) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, in February 2003.

The 123 patients were selected from 365 patient records that were supervised at the clinic between 2003 and 2004, as illustrated in Flow Diagram 1, according to The Consort³⁴. They were invited to participate in the study by phone or personally, when the patient came to work for a routine visit. The patient was interviewed by the researcher and answered the protocols related to the psychosocial aspects, lifestyle, disease history, medications, chimarrão and food intake habits³⁵. After that, the interviewee received instructions on the date, time, place, maintenance of the prescribed medicament treatment and information about foods that would not be part of his/her diet during the study period. The list of foods that informed about the food intake restrictions and permissions was elaborated according an analysis performed to detect the content of flavonoids in foods identified by Crozier et al., Hergot et al. and USDA Database for Flavonoid^{36,37,38,39}.

In total, 38 patients were interviewed. From this group, 20 patients were selected for the control group, but only 9 of them remained until the end of the study. Considering the 11 patients that were excluded along the study period, 2 of them were not included in the analysis due to health problems – one with gout crisis and one with ischemic alterations on the ECG – and were taken to the HCPA

first-aid clinic. The other 9 patients gave up the study due to family problems, difficulties in adjusting the work time to the study, trips and health problems. In the chimarrão group, 18 patients were interviewed, and 10 of them were selected for analysis. One of the patients was excluded from the study due to gastrointestinal reactions on the second day of the study, and was taken to the HCPA first-aid clinic. The other 7 remaining patients gave up the study because of traveling difficulties, health and family problems (Flowchart 1).

Flowchart 1: Patients of the study



Intervention outline

Diet

In order to homogenize the groups, for biochemical measures and flavonoid intake in foods, we applied a washout period, which was elaborated according to studies of Franco et al., Young et al., Krogholm and Hollman^{35,40,41,42}. The washout period in our study lasted 4 days and the patients' diet restricted foods rich in flavonoids. On the fifth day, the intervention period started at 7:30 am, and ended on the tenth day, at 8 am, as illustrated in Flowchart 2.

The meals offered during the study period (breakfast, lunch and dinner) were elaborated at the Serviço de Nutrição e Dietética (SND) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Based on these preparations, the research nutritionist selected those that could be offered during the study, basically composed of white bread, bovine meat or chicken, white rice, pasta without sauce, vegetal halvarine, sugar and cassava; the foods listed in the initial instructions were excluded^{36,37,38,39}. During the meals, the patients were supervised by the researcher, who gave directions on the food quantities and filled out the meal records. On the 2nd, 3rd, 4th, 6th, 7th, 8th and 9th days, the SND provided breakfast for the participants to eat at home. On the 1st, 5th and 10th days, they received breakfast at the SND of the HCPA, after the blood sample collection and anthropometric data recording. During the study, the diet-related instructions to avoid foods with antioxidants and flavonoids were systematically emphasized. The diet food intake was calculated using the Programa de Apoio à Nutrição®, Version

1,5 – Departamento de Informática em Saúde (SPDM) – Unifesp/EPM, 2002, CD, Universidade Federal de São Paulo⁴³.

Chimarrão and control

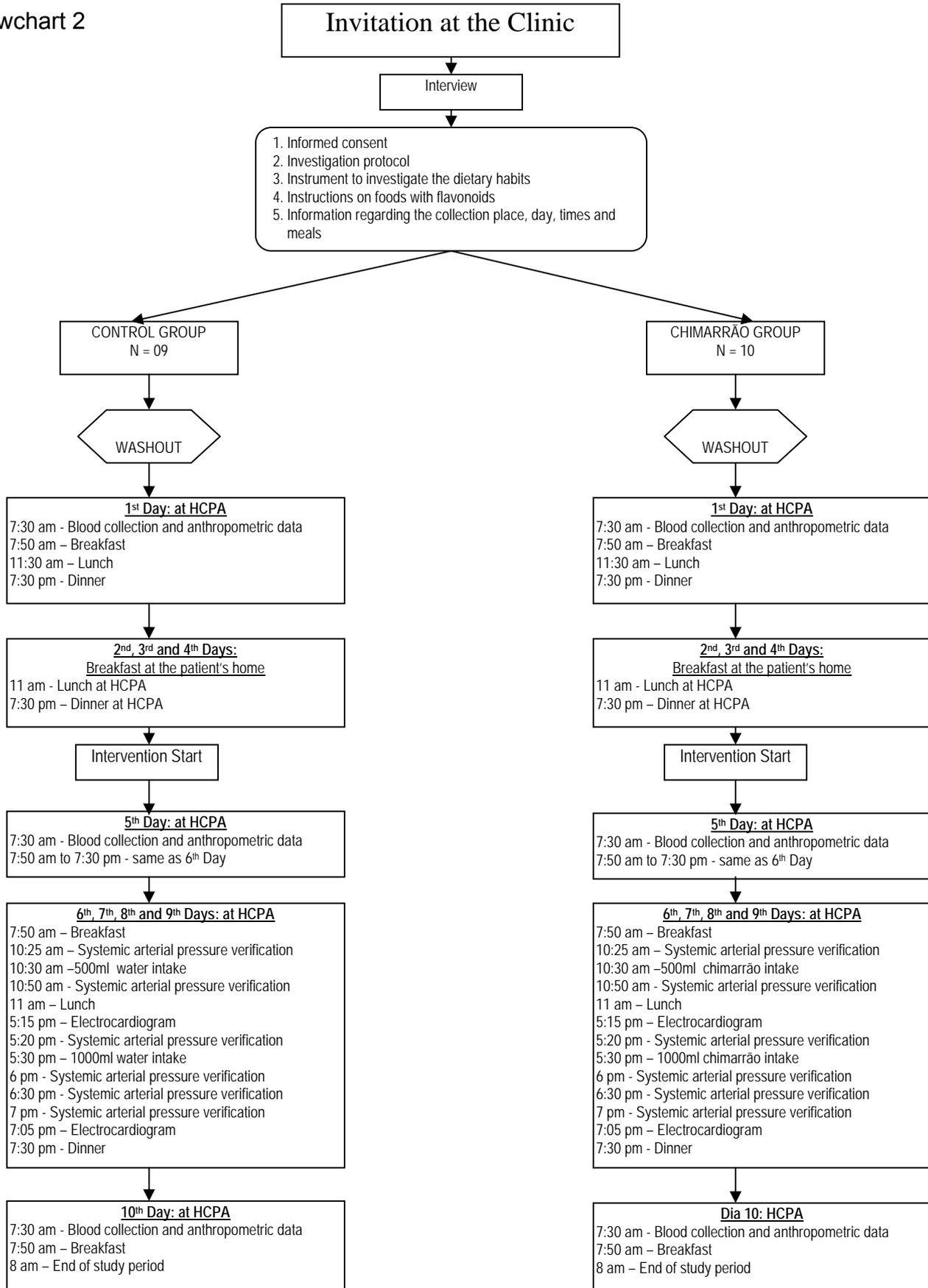
The chimarrão or water intake happened on the fifth day of the study, in a room of the Cardiology Clinic of the HCPA, which was properly acclimatized. The 21 participants were divided into 8 small groups, keeping the average of 3 participants/group, regardless of the chimarrão/water intervention. The beverages were prepared by the researcher. The chimarrão was prepared with 95g of dry and ground leaves of *I. paraguariensis St. Hil*, 100mL of water at 35°C/5minutes (to treat the chimarrão) and for the infusion: 500mL of water/65°C/portion, being offered 3 portions/day. The beverage used in the control group was water, collected at the same site as the chimarrão group. The control group patients drank water at 35°C and followed the same schedule protocol and data monitoring used in the chimarrão group. An L.C.D Digital Multi-Stem® thermometer was used to check the water temperature of both chimarrão and control groups. Each chimarrão portion was divided into 11, served at an average time of 20 minutes. The selection and quantification of dry and ground leaves of *I. paraguariensis St. Hil* was performed by the research laboratory of the Pharmacy School of the UFRGS. The researcher received individual bags from the laboratory containing 95g of dry and ground leaves. Each chimarrão group participant used 15 bags during the study, totaling an amount of 1,450g dry and ground leaves of *I. paraguariensis St. Hil*, for the period of 5 days. The laboratory also provided instructions on the preparation method and water temperature. The equipment

used in the chimarrão intervention procedure consisted of the gourd made of non-toxic material, stainless steel straw, with the utilization of a filter at its submerged end, and a thermal bottle. The chimarrão material was used individually and properly identified. The control group participants received the same treatment as that for the chimarrão group, with the utilization of 1,500mL/water/day (Flowchart 2).

Data collections

The blood sample for biochemical data was collected before breakfast and at three moments: on the first, fifth and tenth days of the study, and the collection was performed at the Unidade de Coleta do Serviço de Patologia Clínica (SPC) of the HCPA and followed the blind sample method. The measurements were performed at the Biochemical Laboratory of the SPC, as follows: Total Cholesterol (Sera-Pak Bayer® Cholesterol Kit)⁴⁴, HDL Cholesterol fractions (HDL-c Immuno FS*Diasys® fluid stable® Kit)⁴⁵, LDL Cholesterol (Friedwald formula)⁴⁶, Triglycerides (Sera-Pak Bayer® triglyceride Kit)⁴⁷. For the other measurements: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and flavonoid, the plasma was frozen at -80°C and then taken to proper laboratories that performed the measurements. The TBARS analysis^{48,49} was performed at the Biochemical Department of the Basic Health Sciences of the UFRGS and the flavonoid measurement^{42,50} was performed at the Research Center Laboratory at the Biomedical Research Unit in the Clinical Pathology Service of the HCPA.

Flowchart 2



The BMI (weight/height²)^{51,52,53,54} was verified at the Collection Unit of the SPC at the HCPA on the first, fifty and tenth days of the study, using a Filizola® scale, with 150 kg capacity and 100g increments. For this data collection, the participants were required to take off their shoes and to keep as fewer clothing items as possible.

The arterial pressure verification followed the protocol of the Sociedade Brasileira de Hipertensão Arterial; the first measurement was performed on the fifth day, before the chimarrão and/or water intervention, and then 30 and 60 minutes after the end of the interventions⁵⁵.

The electrocardiogram (ECG) tracing was performed by the Laboratory of Non-Invasive Methods of the HCPA, by the Cardiology Clinic, before the intervention, and 60 minutes after the end of each intervention, for the period of 5 days. The following variables were measured: heart rhythmic, heart frequency, overload of the cavities, presence of heart arrhythmia, presence of AMI (old or recent), myocardial ischemia (presence, aggravation, improvement and maintenance) and branch block. One participant that presented branch block was taken to the cardiologist, at the Cardiology Clinic of the HCPA, and excluded from the study.

Flavonoids in plasma

Quercitin, β -glucuronidase and sulfatase were obtained through Sigma (STO Lois), MO, USA®, acetic acid of Merck®, phosphoric acid 98% PA of Quimex, CLAE grade Acetonitrile of OmniSol (affiliate of Merck, Da, Germany).

Type-II water was used, which was obtained through reverse osmosis with Mili-Q system. The measurements were performed according to Manach⁵⁰ and an analytical system was used for Shimadzu® high performance liquid chromatography (CLAE), with an SCL-10 A controller, LC-10 AD injection pump, UV-VIS SPD 10 A detector and a Chromatopac C-R6A. The analytical reversed phase column employed was of Supelco BDS Hypersil® C8, 15 X 4.6 mm X 5u, and UBondak® C18 guard column. The mobile phase consisted in the mixture of 73% of 0.5% phosphoric acid and 27% of pumped acetonitrile, in a flow of 1.2 mL/min; the flavonoid peak reading was performed in an UV detector at 370 nm; the column remained at ambient temperature and the laboratory was acclimatized at 20°C^{42,50}.

A quercetin solution for storage was prepared (5mg/mL) in methanol. The standard operation solution was obtained by diluting the solution for storage to the final concentration of 0.100, 0.625, 1.25 and 5.0 nmol/L, in order to perform a calibration curve. The operation solutions were added to a serum sample, with no flavonoids, which had its CLAE previously verified.

The blood samples were collected through heparinized tubes through brachial puncture, before breakfast. The plasmas were separated through centrifugation and stored at -80°C until the measurement date. On the measurement day, 0.5mL of plasma was treated with 0.1 ml of 0.58 mol/L acetic acid, in order to avoid the instability of flavonoids in pH higher than 7.4 and incubated with β -glucuronidase (5×10^6 units/L) and sulfatase ($2,5 \times 10^5$ units/L) at 37°C, for 60 minutes. After that, 4.0 mL of acetone were added to the samples, for the precipitation of enzymes and flavonoid extraction. The mixture was

homogenized with vortex for 30 seconds and then centrifuged. The superficial part containing the flavonoid was separated and evaporated in a vacuum centrifuge (Labcomco®) for 30 minutes or until drying, and the residue was dissolved in 0.5 mL of the motile phase. The resulting solution was injected directly into the CLAE equipment, with a 20 µl loop. Under these conditions, a quercetin peak was identified, with mean retention time of 4.5 minutes.

TBARS in plasma

In the first group of experiments, the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the sample (0.5 mL of plasma or 0.5 ml of saline and 30% de red blood cells) were determined. In short, 0.5 ml of the sample was added to a reaction mixture containing 2.0 mL of 1% phosphoric acid (pH 2.0) and 1.0 mL aqueous solution of 0.6% TBA, followed by 30-minute heating period at 95°C. After cooling each incubation, the chromogen was extracted with n-butyl alcohol and analyzed spectrophotometrically at 532 nm. A molar extinction coefficient of 154,000 was used to calculate the levels of TBARS^{48,49}.

Flavonoids of the *Ilex paraguariensis* infusion

The vegetal material, composed of dry and ground leaves of *Ilex paraguariensis* (MPI), was supplied by Fino Mate® (Mato Leitão – RS) *erva mate* company, and subsequently identified through a dry herb specimen analyzed by the Herb Center at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN 133726).

After the collection, the material, which was dried in a circulating air oven at $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ to a loss level through dissection between 10 and 12%, being subsequently submitted to the grinding process using a knife grinder (Retsch SK1®), Shimadzu® (LC-10 AD) liquid chromatograph equipped with a gradient controller (FCV-10 AL), automatic injector (SIL-10 A) and detector of UV/VIS (SPD-a0 A) and software controlled (CLASS LC-10). During the stationary phase, a Shim-pack® CLC-ODS (M) RP-18 (5 mm, 250 mm x 4 mm) column was applied, protected by a pre-column, with Lichrosorb RP-18 stationary phase. A Waters Millennium diode array detector was also used to evaluate the peak purity and identity (Milford®, MA, USA).

Methanol (CLAE grade, Merck®, Darmstadt, Germany), glacial acetic acid (P.A) and Milli-Q ultrapure water (Milipore®, Bedford, USA) were used as mobile phase. Chlorogenic acid (Sigma®) and rutin (Sigma®) were used as external standards.

Preparation of the *Ilex paraguariensis* extraction solution (SEI)

In order to obtain the SEI, 31.6g of dry and ground MPI were placed in a Becker container and diluted with 35.0 ml of distilled water heated at 65°C . After that, the MPI was extracted through infusion, with eleven 15.0 ml portions. The resulting infused liquid was first pressed and filtered with a manual hydraulic press, and then submitted to another filtration on a filtering paper, at reduced pressure, with the volume being reconstituted to 200.0 ml. The quantitative analysis of the polyphenol content in the *Ilex paraguariensis* extraction solution

was performed through high performance liquid chromatography (CLAE). The analytical method described by Silva was used to quantify the polyphenol content in the SEI, using the chlorogenic acid and rutin as reference substances⁵⁶.

Standard curve

Methanolic solutions were prepared in order to obtain the standard curves of chlorogenic acid (ACLO) and rutin (RUT), which were 50% (V/V) in concentrations of 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 and 10.0 mg/mL. The solutions were filtered using a polyvinylidene membrane filter of 0.45 μm pore diameter. The results were based on the mean area of the peaks obtained in three injections. This procedure was repeated on three consecutive days.

Sample preparation

A 5.0 mL fraction of the SEI was diluted to 50.0 mL with water, which was considered the mother solution (SM), from which a 5.0 mL fraction was diluted to 25.0 mL with methanol:water (50:50 v/v). From such solution, 2.0 mL portions were diluted in 10.0 mL bags with methanol:water (50:50 v/v). The results were based on the mean area of the peaks obtained in three injections. This procedure was repeated on three consecutive days.

Chromatographic conditions

The analytical methodology used a linear gradient separation system. The system will use a linear gradient composed of: (A) acetic acid 2% (V/V); (B) methanol:water 85 % (m/m). The elution system was as follows: 31% of B for 10 minutes, 31-56% of B for 10 minutes, 56% of B for 8 minutes, 56-77% of B for 12 minutes, 77-56% of B for 5 minutes and 56-31% of B for 5 minutes. The sample injection volume was 20 μ l/mL, with 0,7 mL/min flow and 340 nm detection, as well as with 0.05 AUFS sensitivity.

Substances	Extraction Solutionrativa	
	Concentration (mg/ml)	CV%
chlorogenic acid	1.39	0.39
rutin	0.44	0.37

CV % = Variance coefficient

Statistical analysis

The basic characteristics of the studied individuals are expressed as mean, standard deviation, absolute frequency. The Student's t-test was used in the basic analysis of age, PAS, PAD and FC; and the other variables were analyzed through Fisher's Exact Test. The basic characteristics of laboratorial, anthropometric and energy intake values were compared using the Student's t-test, considered as basic variables. The comparison of laboratorial, anthropometric, energy intake and artery pressure variables along the time used

ANOVA method, for repeated measurements. Values of $P < 0.05$ were considered as significant.

RESULTS

Basic characteristics

The basic characteristics of the patients that participated in the study, listed in Table 1, did not differ in the aspects of age, sex, smoking habit, body mass index, instruction level, family history of CAD, medication use, physical activity practice and alcoholism. There was also no differences in the heart rate and levels of systolic and diastolic blood pressure.

Table 1: Basic characteristics of the participants in the study

Variables	Chimarrão n=10	Control n=9	p
Age (years)	63.9±7.1	64.22±6.5	0.91
Men (n)	5	4	0.35
<i>Blood Pressure</i>			
SBP (mmHg)	119.3±17.6	135.6±21	0.08
DBP (mmHg)	71.2±14	75.9±12	0.45
HR (beat/min)	63±9	68±6	0.19
Smoker	2	3	0.62
BMI (kg/m ²)	27±3	28±3	0.55
<i>Instruction level</i>			
fundamental level	9	6	
intermediate level	1	3	
<i>CAD family history</i>			
Angina	6	4	0.99
DM	1	4	0.10
AMI	5	6	0.99
Sudden Death	1	2	0.99
SAH	4	6	0.63
<i>Medications</i>			
ACE	8	6	0.62
Calcium Antagonist	1	2	0.58
Nitrate	2	3	0.62
Beta Blocker	9	7	0.58
Diuretic	4	6	0.37
Anticoagulant	7	6	1
Hypolipidemic	7	7	1
Digitalis	1	2	0.58
Physical activity (n)	7	2	0.30

Age, sex, basic values of SBP (systolic blood pressure), DBP (diastolic blood pressure), HF (heart frequency), BMI (body mass index), CAD (Coronary Artery Disease), DM (Diabetes Mellitus), AMI (Acute Myocardial Infarction), SAH (systemic arterial hypertension), Medication: ACEI (Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors). Values expressed as mean, standard deviation and absolute frequency. For age analysis, PAS, PAD and FC, the Student's t-test was used. The remaining variables were analyzed using Fisher's Exact Test.

Washout effects

Table 2 shows the effects of the diet without foods containing flavonoids, in laboratorial, anthropometrical and energy values.

The washout period promoted a significant increase in the LDL cholesterol (chimarrão: 26.7±30mg/dL and control: 8.2±19mg/dL) and in TC/HDL (chimarrão:

0.4±0.8 and control: 0.51±0.36), which was similar in both groups. However, CT, HDL and TG did not present any significant alteration during the washout period.

The TBARS levels did not present alterations in time, during the washout period, but showed differences between the groups P=0.001 (in the chimarrão group: from 0.11 nmol/mg protein to 0.09 nmol/mg protein and in the control group: from 0.15 nmol/mg protein to 0.13 nmol/mg protein). Concerning the flavonoids (quercetin) during the washout period, there was a significant increase in time P=0.05 (chimarrão: 0.32±0.54 nmol/L and control: 0.21±0.34 nmol/L). On the other hand, the BMI and the energy intake did not show any significant alteration during the period the patients were supervised.

Table 2: Results of laboratorial, anthropometric and energy intake variables before and after the washout period

Variáveis	Chimarrão (n = 10)		Controle (n = 9)		Tempo (P)	Grupo (P)	Interação (P)
	Pré	Pós	Pré	Pós			
<i>Lipoproteínas</i>							
Colesterol Total	205,6 ±60	214±72	202±70	205±64	0,23	0,83	0,32
HDL (mg/dL)	44±16,7	41±13	42±13	38±9	0,10	0,68	0,75
LDL (mg/dL)	112±52,7	139±59	125±57	133±53	0,008	0,87	0,12
Relação CT/HDL	4,8±1	5,2±1,2	4,96±1,5	5,5±1,6	0,006	0,79	0,82
TG (mg/dL)	218±111	173±57	173±87	166±51,6	0,12	0,45	0,25
TBARS (nmol/mg proteína)	0,11±0,04*	0,096±0,02	0,156±0,04	0,135±0,03	0,10	0,001	0,71
Flavonóides/quercitina (µm ol/L)	0,28±0,22 [‡]	0,59±0,55	0,17±0,11 [‡]	0,41±0,34	0,05	0,34	0,82
IMC (Kg/m ²)	27,5±3,3	27,3±3,3	28,4±3,1	28,2±3,07	0,20	0,34	0,39
Ingestão alimentar (kcal)	1964±230*	1.882±376	1.778±182	1.848±254	0,92	0,32	0,23

TC (Total Cholesterol), HDL (High Density Lipoprotein), LDL (Low Density Lipoprotein) TT/HDL Ratio (Total Cholesterol/High Density Lipoprotein Ratio), TG (Triglycerides), TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substance), BMI (Body Mass Index).

Analyses performed with differentiated n[‡] Flavonoids: chimarrão group n=7; control group n=6.

Values expressed as mean and standard deviation. Basic characteristics analyzed through the Student's t-test *P <0.05. ANOVA method used for repeated measurements to determine the washout effect on the laboratorial, anthropometric and energy intake values.

Effects of the chimarrão intervention

The basic characteristics of the studied participants, listed in Table 3, did not differ regarding the total cholesterol, HDL, LDL, total cholesterol/HDL ratio, TG, flavonoid quercetin, BMI and food intake. Table 3 also shows the effects of laboratorial, anthropometric and energy intake variables after the chimarrão intervention. The chimarrão intervention promoted a significant reduction in the TC/HDL ratio (chimarrão: 0.2 ± 0.2 and control: 0.3 ± 0.5 , $P=0.016$) and in TG (chimarrão: 34 ± 36 mg/dL and control: 29 ± 26 mg/dL, $P=0.001$), which was similar in both groups. The values of CT, HDL and LDL did not present any significant alteration during the intervention. Figure 1 shows flavonoid quercetin (chimarrão: 0.17 ± 0.78 nmol/L, control: 0.17 ± 0.25 nmol/L), which did not show significant differences during the study period.

The chimarrão group presented lower TBARS values than those presented by the control group. The chimarrão group altered from 0.0966 nmol/mg protein to 0.0954 nmol/mg protein and the control group altered from 0.1351 nmol/mg protein to 0.1622 nmol/mg protein. After the chimarrão intervention, the TBARS values presented a significant difference ($P=0.001$) in the whole group, but insignificant if comparing both groups, i.e., the chimarrão intervention did not provoke alterations to the TBARS. The variables that analyzed the body weight and the energy intake of the two groups presented significant differences concerning a BMI reduction to the time (chimarrão: 0.3 ± 0.3 kg/m² and control: 0.1 ± 0.2 kg/m² ($P=0.001$)), as well as energy intake alterations in relation to the study time (chimarrão: 259 ± 239 kcal and control: 270 ± 227 kcal ($P<0.001$)).

Table 3: Results of laboratorial, anthropometric and energy intake variables before and 5 days after the intervention with chimarrão prepared from *Ilex paraguariensis* St. Hil

Variables	Chimarrão (n = 10)		Control (n = 9)		Time (P)	Group (P)	Interaction (P)
	Before	After	Before	After			
<i>Lipoproteins</i>							
TC (mg/dL)	214±72	202±73	205±64	194±54	0.07	0.77	0.90
HDL (mg/dL)	41±13	40±15	38±9	39±9	0.89	0.63	0.81
LDL (mg/dL)	139±59	133±59	133±53	128±42	0.29	0.82	0.98
TC/HDL ratio	5,2±1,2	5,06±1,3	5,5±1,6	5,2±1,3	0.01	0.79	0.70
TG (mg/dL)	173±57	139±48	166±51,6	166±51,6	<0.001	0.86	0.74
TBARS (nmol/mg protein)	0,096±0,02 *	0,095±0,02	0,135±0,03	0,162±0,03	0.19	<0.001	0.16
Flavonoids/quercitin (µmol/L)	0,59±0,55 †	0,42±0,47	0,41±0,34 †	0,21±0,12	0.29	0.25	0.92
BMI (kg/m ²)	27,3±3,3	27±3,2	28,2±3,1	28,1±3,1	0.001	0.51	0.12
Food intake (kcal)	1.882±376	1.630±311	1.848±254	1.578±218	<0.001	0.73	0.86

TC (Total Cholesterol), HDL (High Density Lipoprotein), LDL (Low Density Lipoprotein) TT/HDL Ratio (Total Cholesterol/High Density Lipoprotein Ratio), TG (Triglycerides), TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substance), BMI (Body Mass Index).

Analyses performed with differentiated n[†] Flavonoids: chimarrão group n=7; control group n=6.

Values expressed as mean and standard deviation. Basic characteristics analyzed through the Student's t-test *P <0.05. ANOVA method used for repeated measurements to determine the washout effect on the laboratorial, anthropometric and energy intake values.

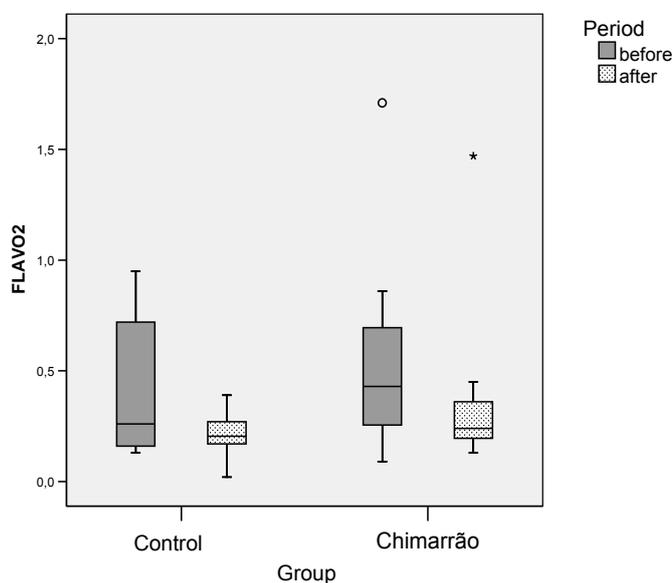


Figure 1: Result of Flavonoid quercitin analysis in the plasma, before and after the chimarrão (*Ilex paraguariensis* St. Hil) intervention

The chimarrão intervention effects on the systemic blood pressure and the heart frequency are shown in Figure 2. The systolic and diastolic blood pressures

were higher, 30 minutes after the intake, from $123\pm 12/69\pm 13$ mmHg to $125\pm 19/75\pm 10$ mmHg in the chimarrão group and from $137\pm 22/76\pm 12$ mmHg to $142\pm 20/82\pm 15$ mmHg in the control group. The systolic blood pressure, 60 minutes after the intake, remained higher than the basic value, but insignificant (ANOVA: Group = 0.09, Time = 0.08, Interaction = 0.67) and the diastolic blood pressure showed a significant increase (ANOVA: Time < 0.001, Group = 0.25, Interaction = 0.90).

The basic blood pressure of the patients in the chimarrão group was $135.6\pm 21/75.9\pm 12$ mmHg and in the control group $119.3\pm 17.6/71.2\pm 14$ mmHg. The maximum pressure effects of the chimarrão intake were significant and similar in both groups (chimarrão and control), which occurred 30 minutes after the intake. The systolic blood pressure presented 3.9 ± 2.7 mmHg maximum increase (from 123 ± 12 mmHg to 126 ± 15 mmHg) in the chimarrão group and 9 ± 4 mmHg (from 137 ± 22 mmHg to 146 ± 19) in the control group. The diastolic blood pressure increased 6 ± 2 mmHg (from 69 ± 13 mmHg to 75 ± 10 mmHg) in the chimarrão group and 5 ± 3 mmHg (from 76 ± 12 mmHg to 81 ± 13 mmHg) in the control group. The systolic blood pressure, 60 minutes after the intake, remained higher in relation to the basic value, but insignificant (ANOVA: Group = 0.09, Time = 0.08, Interaction = 0.67) and the diastolic blood pressure presented a significant increase (ANOVA: Group = 0.001, Time = 0.25, Interaction = 0.97), which were analyzed in both groups (Figure 2). The basic values for the systolic and diastolic blood pressures are considered as mean in the study period.

The systolic and diastolic blood pressures presented higher values 30 minutes after the intake, from $123\pm 12/69\pm 13$ mmHg to 125 ± 19 mmHg in the

chimarrão group and $137\pm 22/76\pm 12$ mmHg to $142\pm 20/82\pm 15$ mmHg in the control group.

The basic heart rate in the chimarrão group was 63 ± 10 bpm and in the control group 68 ± 6 bpm. Figure 2 shows that there was no interaction between the groups regarding the heart rate behavior 60 minutes after the acute chimarrão intake (chimarrão group = 61 ± 8 bpm; control group = 64 ± 8 bpm, ANOVA: Time = 0.30, Interaction = 0.34). However, the heart frequency showed a significant reduction, which was analyzed 60 minutes after the intervention, both in the chimarrão group (61 ± 8 bpm) and in the control group (64 ± 8 bpm, ANOVA: Group = 0.03) (Figure 2).

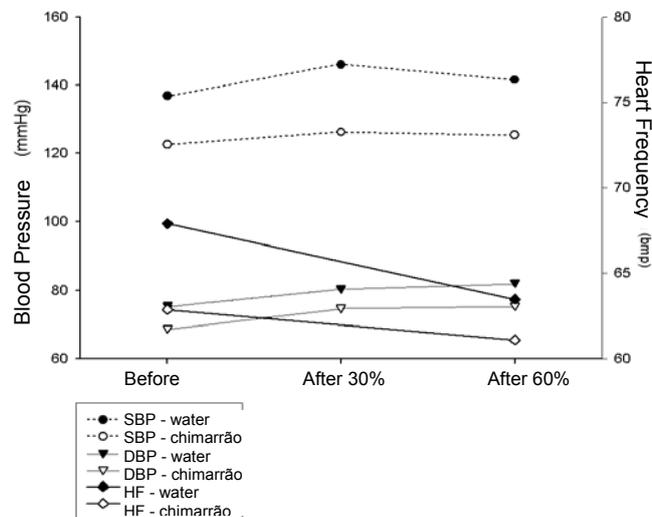


Figure 2: Effects of the chimarrão intervention on the systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and heart frequency (HF)

DISCUSSION

The chimarrão is a very old beverage, a cultural habit in the South America. In Brazil, it is more frequent in Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná states. The material for its preparation is *erva-mate Ilex paraguariensis St. Hil* (IP), which contains polyphenols and flavonoids. In our study, we evaluated the levels of flavonoid intake through the chimarrão and how such flavonoids were absorbed by the blood circulation. Several studies inform that the flavonoids in fruits and vegetables are eliminated with the urine, as already demonstrated by Krogholm⁴⁰ and Young⁴¹. Young⁴¹ investigated the presence of flavonoids in the plasma of healthy volunteers after the fruit and vegetable intake, but did not find the referred substance. Krogholm⁴⁰ investigated, in voluntary students, the presence of flavonoids in the urinary excretion after the intake of fruits and greens, by removing foods containing flavonoids from the diet. The study was performed at two different moments, with 3 consecutive days to each intervention, respectively followed by the 300g intake in the first period and the 600g intake of fruits and greens in the second period; the researcher found a strong linear correlation between the mean flavonoid excretion and the doses of fruits and vegetables, with the presence of flavonoids in the 24-hour period urine and higher concentration in the group that ingested 600g of fruits and vegetables. Previous studies used higher dosing of flavonoids if compared to the study conducted by Krogholm.⁴⁰ Young⁴¹ also investigated the presence of flavonoids in the urinary excretion and in the plasma after the intake of apple and black currant juice for 7 days, with the concentration of 4,8, 6,4 and 9,6 mg of quercetin/day, but did not detect alterations to the quercetin dosing in the plasma. O'Reilly, in his study that compared the flavonoid concentration in the plasma after the intake of a diet rich in black tea and

onion flavonoids and a diet of low content of flavonoids, did not find any significant concentrations either, at the end of two interventions for 14 days⁵⁷.

Regarding the presence of flavonoids from IP *erva mate* in the blood circulation or urinary excretion, after the chimarrão sessions, we did not find any study in the medical literature performed by specific researches. In order to identify whether the flavonoids in the IP *erva-mate* and ingested in the chimarrão would be absorbed by the blood circulation, as it happens with the fruits and vegetables, we were careful in proposing an equal diet to every previously selected participant, and the previous interruption, for 4 days (washout) plus 5 days during the intervention of fruit, greens, juices, teas and chimarrão intake. The loyal participation in the study by the patients was attested in the analysis of the flavonoid and lipids concentrations, oxidation and BMI before and after the interventions. Regarding the flavonoid absorption in the blood circulation, we found that there are no significant alterations before and after the intake (for both the control and chimarrão groups). The IP *erva* quantity in the utilized liquid is the same as that the people habitually drink in the morning or at the end at chimarrão session. Our study does not allow answers as the concentrations of flavonoids in the blood of individuals that use chimarrão present a different behavior from what we have described, since our intervention was performed within a very short time. When comparing the flavonoids concentrations on basic situations to a 5-day intervention, it is possible to note a tendency of reduction, and not increase in the blood concentration in blood circulation, as we have supposed in the objective of the study. Under basic situations and then after the intervention, we can see that there was a trend to reduction, which can be associated with the diet effect, the removal of foods rich in flavonoids and the chimarrão itself, during the 4-day

washout. The results obtained allow us to state that the acute use of chimarrão in the proposed quantity does not increase the flavonoid concentration in the blood circulation.

In order to identify whether the use of chimarrão interferes or not in the lipid concentrations and oxidation, we have measured the blood concentration of lipids in the beginning of the study and then 12 hours after the end of the last chimarrão intake, keeping the same diet standard during all the intervention. As the results show, both groups (control and chimarrão) reduced the lipid concentrations. The total cholesterol presented a tendency to the relevance and the TG presented a significant result, with $P < 0.001$ to the time, in both investigated groups. Gugliucci and Stahl⁵⁸ evaluated the effect of aqueous extracts and alcoholism in the start and propagation of LDL oxidation induced by Cu^{+2} and in-vitro peroxide. This evaluation showed that the alcoholic and aqueous extracts inhibit the initial phase of the LDL oxidation, being the aqueous extract more efficient as an antioxidant. Gugliucci¹⁰ studied the effect of the IP infusion intake in in-vivo LDL, collected blood samples of 3 healthy volunteers before breakfast, offered 500 mL of IP aqueous extract, did not specify the substance concentration and performed a new blood collection one hour later, obtaining significant differences ($P < 0.001$) both in TBARS and the LDL oxidation inhibition. Schinella⁶, using IP aqueous extract with the leaf/water proportion (5g/100mg), identified the enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation inhibition in biological systems, possibly at the beginning of the process that eliminates the free radicals, and showed free radical scavenger properties. Filip⁴ evaluated, through the TBARS method, the antioxidant activity of the aqueous extract from the IP and other Ilex-type plants, using liposomes obtained from the yolk of an egg and submitted to

oxidation. Compared to other Ilex species, the IP presented high antioxidant activity. It suggested, after the equivalence to the red wine and black or green tea, the amount of 70g of the IP prepared as chimarrão, with 400mL of water/day/person. In our study, we offered chimarrão to the selected participants, providing an IP amount of 285g/day/person + 1,500 mL/water divided into portions, and did not obtain significant differences in the antioxidant activity in relation to the control group, which were evaluated through the TBARS method. Mosimann⁷ supervised, for 8 weeks, 32 rats, divided into 4 groups; he gave IP aqueous extract in the proportion of 50mg/mL (dry and ground leaves/water) to 2 groups (mate control group and mate Hypercholesterolemic group) that received 400 mL/day (water or IP aqueous extract) and 100g of diet. Two months later, he evaluated the TBARS, aorta atherosclerosis, serum cholesterol, TG and HDL-c. The results showed that the IP aqueous extract could inhibit the evolution of atherosclerosis in rats that ingested diet with cholesterol; however, they did not present any difference in the serum cholesterol, TBARS and antioxidant enzymes.

When evaluating our results in relation to the lipid profile and oxidation, we confirm that the blood measurement performed 12h after the chimarrão intervention end reduces the caloric intake ($P < 0.001$), identified in the two groups, which possibly influenced the BMI difference of IMC ($P = 0.001$). Another possibility would be the presence of a greater volume of liquids during the study period or the dietary monotony regarding colors and the reduction of nutrient varieties. If these tendencies result from the mechanisms that act on the food intake reduction, new studies should be performed to attest its veracity.

Concerning the cardiocirculatory effects induced by the quantity of liquid used in the IP chimarrão sessions on patients with ischemic cardiopathy, we have

not found references in the literature. We know that, according to the studies performed by Callegaro²⁸, the acute water intake (500mL) in young patients with light supine hypertension, increases the systemic blood pressure (SBP) significantly and reduces the heart rate (HR). In our study, we attested that, after the IP chimarrão intake, the SBP and the DBP were verified 30 and 60 minutes after the session end, and showed a significant increase of the SBP and DBP, both in the chimarrão and control groups, with DBP presenting a higher tendency to increase and the SBP presenting a tendency to remain at the same level. The increased SBP might be associated with the liquid intake through an artery action response, vasoconstrictor, as already demonstrated in previous studies^{28,29,30,31,32,33}, both in normal persons and individuals with autonomic alteration to the sympathetic nerve, due to age or disease problems. Hodgson investigated whether the green or black tea could attenuate the pressure effects or even reduce them during the regular intake. This study also verified the SBP and the DBP 30 and 60 minutes after the intake; the results showed significant alterations only in the 30min verification, which confirmed the pressure alterations 30 minutes after the acute liquid intake³². Concerning the heart frequency behavior, our study demonstrated a reduction in the heart frequency, as already observed in previous studies, which also used the liquid intake.^{28,29,30,31}

The electrocardiograms performed during the study, originally and then 60 minutes after the end of each intervention, totaling a 5-day period, with heart frequency analysis, showed the presence of arrhythmias, alterations to the ventricular and intraventricular atrium conduction, overloads of atrium and re-ventricular cavities, presence of myocardial infarction and alterations to the ventricular repolarization. The analyses of the electrocardiogram tracing,

performed before and after the intervention, did not show significant alterations regarding the use of chimarrão or water during the supervision period, except for the reduction in the heart frequency.

CONCLUSION

Based on the adopted methodology and the obtained results, we can conclude that:

- the flavonoids in the *erva-mate* leaf are not found in the blood circulation 12 hours after the chimarrão intake;
- after the acute intake of 1.5 L/day of liquids, there is a significant reduction in the lipid profile in the blood circulation, probably determined by the reduced food intake;
- the use of chimarrão in small groups or equivalent quantities of water without *erva-mate* leaves determines a significant increase in the systemic blood pressure.

Concerning the circulation behavior, we verified that the two groups, after the 1.5l/day liquid intake, with or without the *Ilex paraguariensis* St. Hil infusion, presented a significant increase in the systolic and diastolic blood pressures and reduced the heart rate.

We also verified that a significant reduction occurred in the concentrations of glucose, low-density lipoprotein and triglycerides. As the behavior was similar in both groups, the alteration through chimarrão cannot be evidenced.

REFERENCES

1. Gorzalcany S, Filip R, et al. Choleric effect and intestinal propulsion of "mate" (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *J Ethnopharmacology* 2001; 75: 291-4.
2. Lessa LCB. *História do chimarrão (The History of Chimarrão)*. 3.ed. Porto Alegre: Sulina, 1986; 7-41.
3. Fagundes GCP. *Cevando o mate (Treating the Mate)*. 6.ed. Porto Alegre: Quêrência, 1983; 26-32.
4. Filip R, Lotito SB et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutr Res* 2000; 20(10):1437-46.
5. Filip R, Lopez P, Gilberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 2001; 72:774-8.
6. Schinella GR., Troiani G. et al. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Bioph Res Comm* 2000; 269:357-60
7. Mosimann ALP, Wilhelm Filho D, Silva EL. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *BioFactors* 2006; 26:59-70.
8. Kraemer KH, Takeda ATC, Schenkel EP et al. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. *Phytochemistry* 1996; 42:1119-22.
9. Reginatto FH, Athayde ML, Gosmann G. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species – caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. *J Braz Chem Soc* 1999; 10:443-6.
10. Gugliucci A. Antioxidant Effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of Decreased Oxidability of Human LDL *in vivo*. *Biochem Bioph Res Comm* 1996; 224:338-44.
11. Hollman PCH, Katan MB. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food Chem Toxicol* 1999; 37:337-42.

12. Hein KE et al. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* , 2002; 13:527-84.
13. Hollman PCH, et al. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radical Biol Med* 1996; 21(5):703-7.
14. Erlund I et al. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56:545-53.
15. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (III Brazilian Guidelines on Dyslipidemia and Atherosclerosis Prevention Guideline). *Arq Bras Cardiol* 2001; 77(supl 3):1-48.
16. Kinsella JE., Frankel E., German B., Kanner J. Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. *Food Technology* 1993; April 85-9.
17. Lorgèril M, Salen P et al. Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications After Myocardial Infarction – Final Report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99:779-85.
18. Leaf A. Dietary Prevention of Coronary Heart Disease, The Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99:733-35.
19. Lorgèril M, Salen P et al. Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications After Myocardial Infarction – Final Report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99:779-85.
20. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342:1007-11.
21. Hertog MGL, Kromhout D et al. Flavonoid Intake and Long-term Risk of Coronary Heart Disease and Cancer in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med* 1995; 155:381-6.
22. Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Relation between Intake of Flavonoids and Risk for Coronary Heart Disease in Male Health Professionals. *Ann Int Med* 1996; 125(5):384-9.
23. Knekt P, Järvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and Coronary Mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 1996; 312:478-81.
24. Geleijnse JM, Launer LJ et al. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 2002; 75:880-6.
25. Sesso HD, Gazian, JM et al. Coffee and Tea Intake and Risk of Myocardial Infarction. *Am J Epidemiol* 1999; 149(2):162-7

26. Ishikawa T, Suzukawa M et al. Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification^{1,2}. *Am J Clin Nutr* 1997; 66:261-6.
27. Schinella G, Fantinelli JC, Mosca SM. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. *Clin Nut* 2005; 24:360-6.
28. Callegaro C et al. Efeitos Hemodinâmicos e Autonômicos da Ingestão aguda de água em indivíduos hipertensos (Hemodynamic and Autonomic Effects of Acute Water Intake in Individuals with Hypertension). Resumo do 6º Congresso da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Card* 2005; 52(supl 4):147.
29. Endo Y, Yamauchi K et al. Changes in Blood Pressure and Muscle Sympathetic Nerve Activity during Water Drinking in Humans. *Japanese J Phys* 2002; 52:421-7.
30. Jordan J. Acute effect of water on blood pressure. What do we know? *Clin Auton Res* 2002; 12:250-5.
31. Scott EM, Greenwood JP et al. Water ingestion increases sympathetic vasoconstrictor discharge in normal human subjects. *Clinical Sci* 2001; 100: 335-2.
32. Hodgson JM, Puddey IB et al. Effects on blood of drinking green and black tea. *J Hypertens* 1999; Apr 17(4):456-63.
33. Jordan J, Shannon JR et al. A potent pressor response elicited by drinking water. *Lancet* 1999; 27:723.
34. Altman DG, Schulz KF, Moher D. The Revised CONSORT Statement for Reporting Randomized Trials: Explanation and Elaboration. *Ann Intern Med* 2001;134:663-694.
35. Franco V, Polanczyk CA, Clausell N, Rohde LE. Role of Dietary Vitamin K Intake in Chronic Oral Anticoagulation: Prospective Evidence from Observational and Randomized Protocols. *Am J Med* 2004; 116:651-56.
36. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in The Netherlands. *J Agric Food Chem* 1992; 40:279-83.
37. Hertog MGL, Hollman PCH, Putte BV. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices. *J Agric Food Chem* 1993; 41:1242-46.
38. Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS, Black C. Quantitative Analysis of Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce and Celery. *J Agric Food Chem* 1997; 45:590-95.

39. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. US Department of Agriculture, March 2003. <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>>.
40. Krogholm KS, Haraldsdóttir J et al. Urinary Total Flavonoid Excretion but Not 4-Pyridoxic Acid or Potassium Can Be Used as a Biomarker for the Intake of Fruits and Vegetables. *Nutri* 2004; 134:445-51.
41. Young JF, Nielsen SE et al. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status¹⁻³. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:87-4.
42. Hollman PCH, Trijp JMPV et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS* 1997; 418:152-56.
43. Programa de Apoio à Nutrição NUTWIN, do Departamento de Informática em Saúde da Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, São Paulo-Brasil (Nutrition Support Program of the Health Computer Science Dept.).
44. Dee R, Ziegenhorm J. Kinetic enzymatic method for automatic determination of cholesterol total in serum. *Clin Chem* 1983; 29:1978-80.
45. Nauck M, Maerz W, Wiland H. New immuno separation-based homogenous assay for HDL-cholesterol compared with three homogenous methods for HDL-cholesterol. *Clin Chem* 1998; 44:1443-51.
46. Friedwald NT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of concentration cholesterol in plasma without use of ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:449-02.
47. Klotzch SG, Mcnamara JR. Triglyceride measurements: a review of methods and interferences. *Clin Chem* 1990; 36:1605-13.
48. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD et al: Reaction Conditions Affecting the Relationship Between Thiobarbituric Acid Reactivity and Lipid Peroxides in Human Plasma. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 31:331-335.
49. Polydoro M, et al. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sciences* 2004; 74:2819.
50. Manach C, Morand C et al. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS* 1997; 409:12-6.
51. Willett WC, Dietz WH, Colditz GA. Guidelines for healthy weight. *N Engl J Med* 1999; 341:427-34.
52. International Obesity Task Force. About Obesity. Available from: URL: <<http://www.obesite.chaire.ulavf.ca/iotf.htm>>.
53. Calle EE, Thun MJ et al. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 1999; 341:1097-105.

54. Denke MA, Sempos CT, Grundy SM. Excess body weight. An under-recognized contributor to dyslipidemia in white American women. *Arch Intern Med* 1994; 154:401.
55. Mion D, Machado CA, Gomes MAM. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (IV Brazilian Guidelines on Arterial Hypertension). *Arq Bras Cardiol* 2004; 82(IV):1-14.
56. Silva FA. Avaliação tecnológica e biológica de extrato seco por Spray-drying de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate) (Technological and biological evaluation of dry extract through spray-drying of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate)). Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, 2004. [Doctor's Degree Dissertation in progress].
57. O'Reilly JD et al. Consumption of flavonoids in onions and black tea: lack of effect on F₂-isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:1040-4.
58. Gugliucci A, Stahl AJC. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Bioch Mol Bio Int* 1995; 35(1):47-56.

7. ANEXOS

7.1 Termo de consentimento informado

Aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Estamos realizando um estudo com pessoas que participam do ambulatório de Cardiopatia Isquêmica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Este estudo, tem como objetivo, avaliar a concentração de flavonóides e oxidação do sangue através da ingestão da infusão de *Ilex paraguariensis* (**chimarrão**) em pacientes com presença de Doença Isquêmica do Coração.

Para análise de estudo serão realizados os seguintes procedimentos com o participante:

- Coleta de 14 ml de sangue venoso, para verificação da presença de: colesterol total e frações, glicemia de jejum, triglicerídios, flavonóides e radicais livres, no primeiro, no quinto e no último dia da pesquisa;
- Anotar, em formulário padronizado, os alimentos que ingeriu por 3 dias antes do início da pesquisa;
- Fazer 3 refeições (café da manhã, almoço e janta) por um período de 10 dias consecutivos, no refeitório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
- Anotar, em um formulário padronizado, todos os alimentos que ingerir fora do refeitório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
- Não comer os alimentos que possuem componentes que podem alterar os resultados dos exames. Conforme lista de orientação;
- Participar de uma entrevista inicial para o pesquisador conhecer os hábitos alimentares;
- Participar de entrevista, feita pelo(a) pesquisador(a), para analisar o consumo diário de alimentos;
- Preenchimento de questionário para dados de identificação do participante;
- Tomar chimarrão ou água, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com a quantidade definida pelo pesquisador, por 5 dias consecutivos; com materiais de uso individual, fornecido pelo pesquisador;
- Verificar a pressão arterial sistêmica antes do início, após 30 min e ao término da ingestão do chimarrão
- Realizar 1 (um) eletrocardiograma antes e 1 (um) após 60 min após o término da ingestão do chimarrão;
- Caso o senhor apresente constipação será administrado um laxante sob orientação do médico do ambulatório.

Salientamos, que o procedimento não causará nenhum dano à saúde e o tratamento efetuado não será diferente se o(a) senhor(a) não concordar em participar do estudo, e que mesmo após ter assinado o termo poderá desistir do estudo à qualquer momento.

O pesquisador responsável por este estudo é o Dr. Waldomiro Carlos Manfroi (fones: 3328-8328 e 99820786) e a Nutr. Zaíra Tronco Salerno (fones: 33337263 e 99632936) é a executora deste projeto.

Se o(a) senhor(a) tiver alguma dúvida antes de decidir quanto a sua participação no estudo, sinta-se à vontade em perguntar.

Declaro, diante das informações acima expostas, que estou de pleno acordo em participar da pesquisa.

Paciente:

Porto Alegre ____/____/____.

Pesquisador responsável:

Pesquisador:

Dr. Waldomiro Carlos Manfroi
(fones: 3328-8328 e 99820786)

Nut^a Zaíra Tronco Salerno
(fones: 33337263 e 99632936)

7.2 Protocolo de Investigação

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
SERVIÇO DE CARDIOLOGIA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

EFEITOS DO HÁBITO DO CHIMARRÃO (*Ilex paraguariensis* St. Hil) NA ABSORÇÃO DE FLAVONÓIDES, NA CONCENTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS E SOBRE A CIRCULAÇÃO

PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO

Pesquisador:

Záira Tronco Salerno

Orientador:

Prof. Dr. Waldomiro Carlos Manfroi

Colaboradores:

Prof. Dr. José Cláudio da Fonseca Morena

Prof^a Dr^a Valquiria Linck Bassani

Local de realização:

Ambulatório de Cardiopatia Isquêmica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO

ITENS INVESTIGADOS	
N° do prontuário: _____ Data da investigação: ___/___/___ N° _____ NOME: _____ Médico responsável: _____ Endereço: _____ CEP: _____ Telefone: _____ Celular: _____ e-mail: _____ Cidade: _____	N°: _____ D.INV: _____/___/___
1) DN: _____/_____/_____ 2) Sexo (1) F (2) M 3) Cidade: _____ (1) Capital (2) Interior 4) Localização: (1) zona rural (2) zona urbana 5) Estado civil: (1) solteiro (2) casado (3) outros (9) 6) Altura (cm) () 7) Peso (Kg) ()	1) DNASC _____/___/___ 2) Sexo: () 3) Cidade: () 4) Localização () 5) Estado civil () 6) altura () 7) peso ()
9) Grau de instrução: (1) analfabeto (2) primário incompleto (5) primário completo (3) secundário incompleto (6) secundário completo (4) superior incompleto (7) superior completo	9) GRINSTRU ()
10) História familiar (1) angina (1) sim (2) não (9) não sabe informar (2) Diabetes (1) sim (2) não (9) não sabe informar (3) Infarto do Miocárdio (1) sim (2) não (9) não sabe informar (4) Morte Súbita (1) sim (2) não (9) não sabe informar (5) HAS (1) sim (2) não (9) não sabe informar	10) HFAMILIAR ANGINA () DM () IAM () MS () HAS ()
11) TABAGISMO/FUMO: (1) sim Há quanto tempo? _____ N° cigarros ao dia? (2) não (3) às vezes Quando? _____ (4) ex-fumante Há quanto tempo? _____ (5) medicação antitabagismo (80) sim (81) não	11) TABAG TABFUMO () TEMPFUMO () CIGDIA () FQUANDO () EXFUMO () MEDTAB ()

<p>12) COLESTEROL (coleta pelo prontuário)</p> <p>Data do exame: ____/____/____</p> <p>Colesterol total: _____ mg/dL</p> <p>HDL colesterol: _____ mg/dL</p> <p>LDL colesterol: _____ mg/dL</p>	<p>12) COLEST DATAEX ____/____/____ CTOTAL () HDL () LDL ()</p>
<p>13) ATIVIDADE</p> <p>() Vida sedentária</p> <p>() Vida não sedentária</p> <p>() Desportista</p>	<p>13) ATIV.()</p>
<p>14) ATIVIDADE FÍSICA:</p> <p>(1) sim</p> <p>(2) não</p> <p>(3) às vezes</p> <p>Tipo de atividade física</p> <p>(4) caminhada</p> <p>(5) corrida</p> <p>(6) natação</p> <p>(7) hidroginástica</p> <p>(8) futebol</p> <p>(9)</p> <p>(10)</p> <p>Nº vezes na semana? _____</p>	<p>14) ATIV. FÍSICA () TATFIS1() NXSEM1() TATFIS2 () NXSEM2 () TATFIS3 () NXSEM3 () TATFIS4 () NXSEM4 ()</p>
<p>15) DIABETES (coleta pelo proNtuário)</p> <p>(1) Tipo 1</p> <p>(2) Tipo 2</p> <p>(3) sem diabetes</p> <p>Data do exame: ____/____/____</p> <p>Glicemia de jejum: _____ mg/dL</p>	<p>15) DM () TDM () D. EXAME ____/____/____ GLICEMIA</p>
<p>16) MENOPAUSA</p> <p>(1) SIM</p> <p>(2) NÃO</p> <p>(3) NSABE</p> <p>mês _____ ano _____</p>	<p>16) MENOPAU () Mês () Ano ()</p>
<p>17) ETILISMO</p> <p>(1) social</p> <p>(2) intenso</p> <p>(3) NÃO</p>	<p>17) Etilismo ()</p>
<p>18) ATIVIDADE PROFISSIONAL</p> <p>(1) Executivo</p> <p>(2) Profissional Liberal</p> <p>(3) Professor</p> <p>(4) Comerciarío</p> <p>(5) operário</p> <p>(6) Funcionário Público</p> <p>(7) Motorista</p> <p>(8) Outras</p> <p>(9) Aposentado</p> <p>(10) dona-de-casa</p> <p>(11) estudante</p>	<p>18) ATIVPROF1 () ATIVPROF2 () ATIVPROF3 ()</p>

<p>19) HORÁRIO DO TRABALHO manhã (hora) 8h – 12h (88) não trabalha tarde (hora) 14h – 18h (88) não trabalha noite (hora) 19h - 22 h (88) não trabalha</p>	<p>19) HORTRAB MANHÃ _____ TARDE _____ NOITE _____</p>
<p>20) VITAMINAS (1) SIM (2) NÃO TIPO vitamina A – (1) sim (2) não (8) não se aplica vitamina C – (1) sim (2) não (8) não se aplica vitamina E – (1) sim (2) não (8) não se aplica</p>	<p>20)VITAM () TIPO VIT.A _____ VIT.E _____ VIT.C _____</p>
<p>21) MINERAIS (1) SIM (2) NÃO ferro – (1) sim (2) não (8) não se aplica zinco – (1) sim (2) não (8) não se aplica selênio – (1) sim (2) não (8) não se aplica magnésio – (1) sim (2) não (8) não se aplica</p>	<p>21) MINER () TIPO Fe Zn Mg Se</p>
<p>22) MEDICAMENTOS EM USO (1) digitálicos (2) procainamida (3) outros antanginosos (4) fenotiazinas (5) diuréticos (6) betabloqueadores (7) antihipertensivo (8) antilipêmicos (9) quinidina (10) nitratos (11) anovulatórios (12) anoréticos (13) antitabagismo (14) insulina</p>	<p>22) MEDIC. (1) digit (2) procain (3) outantang (4) fenoti (5) diuréticos (6) betabloq (7) antihiper (8) antilipêmi (9) quinidi (10) nitrat (11) anovula (12) anoréticos (13) antitabag (14) insulina</p>
<p>23) HÁBITO CHIMARRÃO (1) sim (2) não (3) às vezes (4) Há quanto tempo? _____ (5) N° de chimarrão ao dia e horário? _____ (6) usa erva com açúcar – (1) sim (2) não (8) não se aplica (7) usa erva sem açúcar – (1) sim (2) não (8) não se aplica (8) outra erva (1) sim (2) não (8) não se aplica</p>	<p>23) CHIMA TABCHIMA () TEMPCHIMA () NOCHIMA () FQUANDO () CAÇÚCAR () SAÇÚCAR () OUTRA ()</p>

OBSERVAÇÕES:

Dr. Waldomiro Carlos Manfroi
Orientador

Nut^a Zaíra Tronco Salerno
Pesquisadora

DATA: _____ / _____ / _____

7.3 Questionário de hábitos alimentares

Nome: _____ Pront.: _____

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____ Data: ____/____/____

O objetivo principal deste questionário é avaliar o seu hábito alimentar. Por isto contamos com a sua colaboração nos passando as informações mais precisas possível.

1. Quais refeições que o(a) sr(a) faz por dia e em que horários?

2. Tem hábito de comer fora de hora? _____ Qual(is) alimento(s)?

3. O(a) sr(a) come verduras e legumes? _____ Quais? Dê sua preferência e qual a frequência de uso.

4. Quais as verduras e legumes que o(a) sr(a) não tolera?

5. O(a) sr(a) come frutas? _____ Quais as frutas de sua preferência?

6. Com qual a frequência costuma comer frutas?

7. Quais as frutas que o(a) sr(a) não tolera?

8. O(a) sr(a) tem hábito de comer carne? _____ Quantas vezes na semana costuma comer? _____ Qual o tipo de carne mais usada?

9. Que tipo de carne o(a) sr(a) não tolera?

10. O(a) sr(a) tem hábito de comer massas? _____ Quantas vezes na semana costuma comer? _____ Qual o tipo de massa mais usada?

11. O(a) sr(a) tem hábito de comer pães/bolos/tortas? _____ Quantas vezes na semana costuma comer? _____ Quais os tipos de pães/bolos/tortas mais usados?

12. Que tipo de mistura o(a) sr(a) costuma passar no pão?

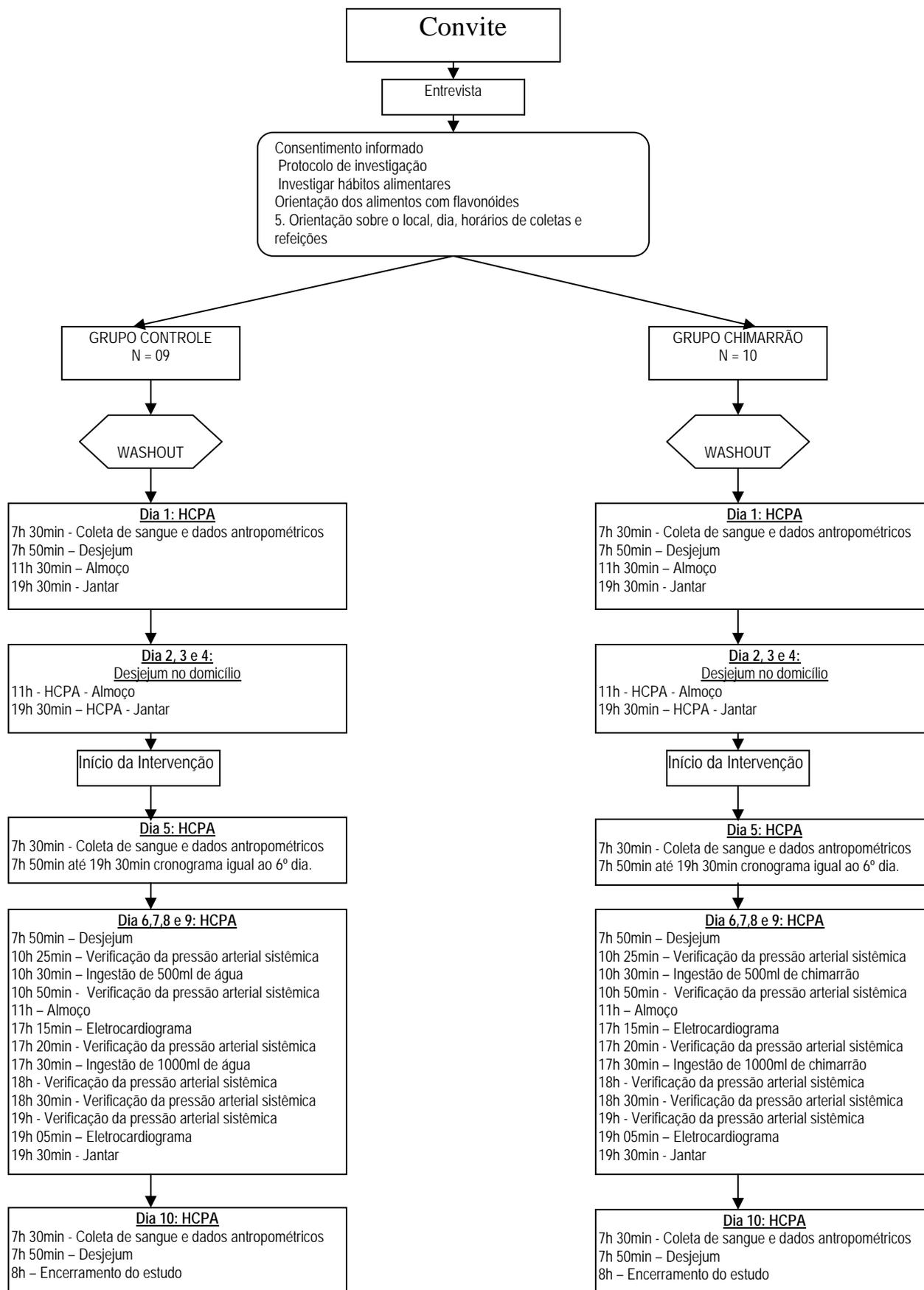
13. Qual o tipo de gordura que o(a) sr(a) tem hábito de usar para cozinhar?

14. O(a) sr(a) tem hábito de comer frituras? _____ Quantas vezes na semana costuma comer? _____ Qual o tipo de fritura mais usada?

15. O(a) sr(a) tem hábito de comer maionese? _____ Quantas vezes na semana costuma comer?

16. O(a) sr(a) tem hábito de tomar sucos de frutas? _____ Quantas vezes na semana costuma tomar? _____ Qual o tipo de suco mais usado?
17. O(a) sr(a) tem hábito de tomar chá/café? _____ Quantas vezes no dia costuma tomar? _____ Qual o tipo mais usado?
18. O(a) sr(a) tem hábito de ingerir alguma bebida durante a refeição? _____ Qual? _____ Em que quantidade?
19. O(a) sr(a) tem hábito de comer queijo/iogurte/leite? _____ Quantas vezes na semana costuma comer? _____ Qual o tipo mais usado?

7.4 Fluxograma 01



7.5 Lista de alimentos que não devem ser ingeridos durante a pesquisa

Grupo Vegetal A

Abobrinha d'água, acelga, agrião, aipo, alface, alho, beringela, brócolis, cebola, chicória, couve chinesa, aspargo, palmito, broto de bambu, cogumelo, couve-flor, espinafre, mostarda, pepino, rabanete, radite, rúcula, repolho, tomate.

Grupo Vegetal B

Abóbora menina, abóbora madura, moranga, beterraba, cenoura, chuchu, ervilha verde, quiabo, vagem, nabo.

Grupo dos Cereais (arroz, massa, batata ...)

Arroz integral
Sagü de uva e de laranja
Farinha aveia flocos
Farinha de trigo integral
Farinha Láctea
Neston

Grupo do pão

Pão integral, bolacha integral

Grupo da fruta e sucos das frutas

Abacaxi, ameixa fresca, ameixa seca, amora, banana, bergamota
caju, caqui, cereja
Figo
Goiaba
Laranja, limão, laranja
Maçã, mamão, manga, maracujá, melancia, melão, morango, nectarina
Pêra, pêssego
Uva, kiwi

Grupo das bebidas

Sucos de frutas e de vegetais
Vinhos
Chás em geral
Café
Achocolatados (Nescau ou similar)

Grupo de doces

Chocolates
Barra de cereais
Doces com frutas

7.6 Protocolo para o preparo do chimarrão com *Ilex paraguariensis* St. Hil

1. Aquecer 500ml de água a uma temperatura de 65°C, conferir a temperatura com auxílio do termômetro.
2. Armazenar a água em uma térmica com capacidade de 750 ml, conferir a temperatura e fechar hermeticamente.
3. Colocar na cuia 95g de folhas secas e moídas de *Ilex paraguariensis* St.Hil.
4. Montar o chimarrão com auxílio de uma placa de forma redonda de material plástico.
5. Adicionar 100ml de água com temperatura de 35°C para cevar a chimarrão.
6. Aguardar 5 minutos para cevar o mate.
7. Adicionar a bomba, com o filtro na borda inferior, a cuia.
8. Servir e tomar o chimarrão.

7.7 Protocolo para a verificação da pressão arterial

Procedimentos de medida da pressão arterial

1. Explicar o procedimento ao paciente, orientar que não fale e deixar que descanse por 5 a 10 minutos em ambiente calmo, com temperatura agradável. Promover relaxamento, para atenuar o efeito do avental branco;
2. Certificar-se de que o paciente não está com a bexiga cheia, não praticou exercícios físicos há 60-90 minutos; não ingeriu bebidas alcoólicas, café, alimentos, ou fumou até 30 minutos antes, e não está com as pernas cruzadas;
3. Utilizar manguito de tamanho adequado ao braço do paciente, cerca de 2 a 3 cm acima da fossa antecubital, centralizando a bolsa de borracha sobre a artéria braquial. A largura da bolsa de borracha deve corresponder a 40% da circunferência do braço e seu comprimento, envolver pelo menos 80%;
4. Manter o braço do paciente na altura do coração, livre de roupas, com a palma da mão voltada para cima e cotovelo ligeiramente fletido;
5. Posicionar os olhos no mesmo nível da coluna de mercúrio ou mostrador do manômetro aneróide;
6. Palpar o pulso radial e inflar o manguito até seu desaparecimento, para a estimativa do nível da pressão sistólica, desinflar rapidamente e aguardar um minuto antes de inflar novamente;

7. Posicionar a campânula do estetoscópio suavemente sobre a artéria braquial, na fossa antecubital, evitando compressão excessiva;
8. Inflar rapidamente, de 10 em 10 mmHg, até ultrapassar, de 20 a 30 mmHg, o nível estimado da pressão sistólica. Proceder à deflação, com velocidade constante inicial de 2 a 4 mmHg por segundo. Após identificação do som que determina a pressão sistólica, aumentar a velocidade para 5 a 6 mmHg para evitar congestão venosa e desconforto para o paciente;
9. Determinar a pressão sistólica no momento do aparecimento do primeiro som, seguido de batidas regulares que se intensificam com o aumento da velocidade de deflação. Determinar a pressão diastólica no desaparecimento do som. Auscultar cerca de 20 a 30 mmHg abaixo do último som para confirmar seu desaparecimento e depois proceder a deflação rápida e completa. Quando os batimentos persistirem até o nível zero, determinar a pressão diastólica no abafamento dos sons, anotar valores da sistólica/diastólica/zero;
10. Registrar os valores das pressões sistólicas e diastólicas, complementando com a posição do paciente, o tamanho do manguito e o braço em que foi feita a medida. Não arredondar os valores de pressão arterial para dígitos terminados em zero ou cinco;
11. Esperar 1 a 2 minutos antes de realizar novas medidas;
12. O paciente deve ser informado sobre os valores obtidos da pressão arterial e a possível necessidade de acompanhamento.