

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS
AQUOSAS OBTIDOS DE PREPARAÇÕES DE BEBIDA MATE (*Ilex paraguariensis* St.
Hil) EM AORTA DE RATOS**

RAFAEL SOUZA MARIS

**DOURADOS
2024**

RAFAEL SOUZA MARIS

**AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS
AQUOSAS OBTIDOS DE PREPARAÇÕES DE BEBIDA MATE (*Ilex paraguariensis* St.
Hil) EM AORTA DE RATOS**

Exame de Defesa apresentado ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal da Grande
Dourados – Faculdade de Ciências da
Saúde, para obtenção do Título de Mestre
em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Candida
Aparecida Leite Kassuya

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Fernando
Benitez Macorini

**DOURADOS
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M341a Maris, Rafael Souza

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS
AQUOSAS OBTIDOS DE PREPARAÇÕES DE BEBIDA MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) EM
AORTA DE RATOS [recurso eletrônico] / Rafael Souza Maris. -- 2024.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Candida Aparecida Leite Kassuya.

Coorientadora: Luis Fernando Benitez Macorini.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Etnofarmacologia. 2. Medicamentos fitoterápicos. 3. Anti-hipertensivo. 4. Mate. 5. Erva mate.
I. Kassuya, Candida Aparecida Leite. II. Macorini, Luis Fernando Benitez. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR RAFAEL SOUZA MARIS,
ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
"FARMACOLOGIA".

Aos dezoito dias do mês de junho do ano de dois mil e vinte e quatro, às quatorze horas, em sessão pública, realizou-se na Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada **"AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS AQUOSAS OBTIDOS DE PREPARAÇÕES DE BEBIDA MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) EM AORTA DE RATOS"**, apresentada pelo mestrando Rafael Souza Maris, do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof.^a Dr.^a Candida Aparecida Leite Kassuya/UFGD (presidente/orientadora), Prof. Dr. Fabio Juliano Negrão/UFGD (membro titular interno), Prof.^a Dr.^a Karimi Sater Gebara (membro titular externo). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o candidato ter apresentado a sua Dissertação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido o candidato considerado APROVADO. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dourados/MS, 18 de junho de 2024.

Documento assinado digitalmente
gov.br **CANDIDA APARECIDA LEITE KASSUYA**
Data: 20/06/2024 14:41:40-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Candida Aparecida Leite Kassuya
Presidente/orientadora

Documento assinado digitalmente
gov.br **FABIO JULIANO NEGRÃO**
Data: 20/06/2024 15:19:15-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Fabio Juliano Negrão
Membro Titular Interno

Documento assinado digitalmente
gov.br **KARIMI SATER GEBARA**
Data: 20/06/2024 15:36:49-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Karimi Sater Gebara
Membro Titular Externo

(PARA USO EXCLUSIVO DA PROPP)

ATA HOMOLOGADA PELO(A) PRÓ-REITOR(A) DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DA UFGD
PROPP/UFGD

Pg. 1 de 1

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho à todos que se fizeram presentes durante sua construção, em especial a Deus, minha família, amigos e mestres. Que mesmo apesar das dificuldades, sempre estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por todas as bênçãos que me foram concedidas até aqui, e por nunca ter me abandonado durante todo este período, principalmente nos momentos de lutas e dificuldades, sem ele, eu não seria nada.

Aos meus pais, Valdisa Souza da Rocha e Wilson Freres Maris por estarem juntos a mim durante os momentos de batalhas e dificuldades. Tudo isso que consegui até o momento foi graças a vocês dois, amo vocês.

Agradeço em especial a minha Orientadora Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya por ter me dado a oportunidade de trabalhar junto a ela e por todos os ensinamentos que me foram passados durante toda essa grande jornada.

Ao meu Coorientador Dr. Luis Fernando Benitez Macorini por ter me acompanhado ao longo de toda a jornada, ajudando e sempre mostrando o caminho e o processo de aprendizagem a se seguir.

Ao meu grande amigo e irmão Felipe Leoratto Parizoto e toda sua família, deixo os meus sinceros agradecimentos por cada risada, cada momento e por cada etapa conquistada ao longo do trabalho. O apoio de vocês foi de suma importância para a conclusão deste trabalho.

A minha grande amiga e parceira de trabalho, Cindy Liberato Rocha Castilhos, agradeço por toda ajuda, por cada risada e por cada conselho que me foi passado, saiba que foram muito valiosos ao longo da construção desse trabalho.

À todos os meus amigos, em especial Raphael Reche e Mariana Pazinato por sempre me aconselharem e por estar sempre presentes. Ao Rodolfo Ramos Brandão, por sempre me socorrer nas horas mais cruciais na realização do experimento. E a Sabrina Feijó, por ter estado presente em todas as fases do meu mestrado, me aconselhando e deixando todo o processo mais leve.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente estiveram presentes nesses 2 anos e que de alguma forma, contribuíram para que eu pudesse chegar ao final deste ciclo.

EPIGRAFE

There will be times in life when you need to stand up for yourself. Times when the right thing is to back down and apologize. Times when the right thing is to fight, times when the right thing is to turn and run. Times to hold on with all you have and times to let go with grace. Sometimes the right thing to do is to throw out the old schools of thought in the name of progress and reform. Sometimes the right thing to do is to listen to the wisdom of those who have come before us. How will you know what the right choice is in these crucial moments? You won't. How do I give advice to this many people about their life choices? I won't. Scary news is: You're on your own now. Cool news is: You're on your own now.

Taylor A. Swift

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 – Distribuição geológica da <i>I. paraguariensis</i> na América do Sul, sendo 1 – Argentina; 2 – Brasil; 3 – Paraguai; 4 - Uruguai. Fonte: Heck e De Mejia, 2007.....	16
Figura 2 – Folhas de <i>I. paraguariensis</i> . Fonte: Heck e De Mejia, 2007.....	16
Tabela 1 – Compostos identificados nas diferentes preparações de <i>I. paraguariensis</i> (chimarrão, tereré, chá mate) utilizando o método de UHPLC-ESI-MS/MS. Fonte: Mesquita <i>et al.</i> , 2021.....	18
Tabela 2 – Quantificação de ácido cafeico, ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico, 5-CQA), ácido gálico, cafeína e teobromina por HPLC-UV/DAD nos diferentes extratos de <i>Ilex paraguariensis</i> (chimarrão, tereré, chá-mate). Os valores são expressos em µg de composto/mL de extrato. T1 e T2 indicam diferentes lotes. As letras B, T e O indicam a empresa fornecedora do material: B = Barão de Cotegipe; T = Tomelero; O = Orgânico. Fonte: Mesquita <i>et al.</i> , 2021.....	19
Artigo 1.	
Table 1 – Average vasodilation per dose of the aqueous extracts tested on aorta with endothelium.....	41
Table 2 – Percentage of vasodilation per dose of the aqueous extracts tested on aorta with endothelium.....	42
Table 3 – Average vasodilation per dose of the aqueous extracts tested on aorta without endothelium.....	42
Table 4 - Percentage of vasodilation per dose of the aqueous extracts tested on aorta without endothelium.....	43
Table 5 - Average vasodilation per dose concentration of the compounds tested in the aorta.....	44
Table 6 – Percentage of vasodilation per substance concentration tested in aorta.....	44
Graph 1 – Graph showing vasodilation by hot and cold preparations in the tested doses in aorta with endothelium.....	45
Graph 2 – Graph showing vasodilation by compounds in the tested doses in aorta with endothelium.....	46

Graph 3 – Graph showing vasodilation by the preparations of the testes doses in aorta without endothelium.....	47
Table 7 - Percentage of vasodilation per dose of aqueous extracts tested with L-NAME.....	48
Table 8 - Percentage of vasodilation by doses of aqueous extracts testing with amiodarone.....	49
Table 9 - Percentage of vasodilation by dose of aqueous extracts tested with tetraethylammonium.....	50
Table 10 - Percentage of vasodilation per dose of aqueous extracts tested with 4-aminopyridine.....	51
Graph 4 – Graph showing vasodilation by the preparations in tested doses in aorta with endothelium in the mechanism of action test.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

4-AMP	– 4-Aminopiridina
Ach	– Acetilcolina
AMD	– Amiodarona
AVE	– Acidente vascular encefálico
Ca ²⁺	- Cálcio
CaCl ₂	- Cloreto de Cálcio
CCE	– Curva concentração efeito
CE50	– Concentração eficaz 50%
DRC	– Doença renal crônica
EDTA	- Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EPM	– Erro padrão da média
HAS	– Hipertensão arterial sistêmica
IC	– Insuficiência cardíaca
K ⁺	- Potássio
K _{ATP}	– Canais de potássio sensíveis a ATP
K _{Ca}	– Canais de potássio ativados por cálcio
KCl	- Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	- Fosfato de Potássio
K _{ir}	– Canais retificadores internos de potássio
K _v	– Canais de potássio voltagem dependentes
L-name	- <i>N</i> _ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
MgSO ₄	- Sulfato de Magnésio
NaCl	- Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	- Bicarbonato de Sódio
NO	– Óxido nítrico
Ntp	– Nitroprussiato
Phe	– Fenilefrina
TEA	– Tetraetilamônio
±	- Mais ou Menos
μM	– Micromol

$\leq$ - Menor ou igual a

g - Gramas

$\mu\text{g/mL}$ – Microgramas por mililitro

μl – Microlitro

mM – Milimol

% - Porcentagem

n° - Número

[] – Concentração

P – Probabilidade de significância

**AValiação da reatividade vascular de extratos e
substâncias aquosas obtidos de preparações de bebida mate
(*Ilex paraguariensis* St. Hil) em aorta de ratos**

RESUMO

Introdução: *Ilex paraguariensis* é uma planta pertencente à família Aquifoliaceae, comumente utilizada pela população da Argentina, Brasil e Paraguai, sendo conhecido popularmente como mate. Seu consumo se dá através de diversas preparações, se destacando o preparo a frio e a quente. Estudos já evidenciaram que a planta possui diversos compostos orgânicos com efeitos biológicos variados, como efeito anti-inflamatório, antioxidante e estudos que comprovaram sua eficácia na melhora da função endotelial e na proteção da função vascular de quem a consume, atuando ainda na prevenção do desenvolvimento da aterosclerose. Neste quesito, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) ganha relevância, visto que é um dos principais fatores de morbimortalidade em todo o mundo. O objetivo principal deste estudo foi o de avaliar a capacidade vaso relaxante das preparações e compostos de *Ilex paraguariensis* bem como o mecanismo de ação envolvido, através de estudos de reatividade vascular em aorta isolada de ratos *Wistar*. **Material e Métodos:** Como metodologia, os animais passaram por eutanásia, para realização de toracotomia para exposição de sua aorta. Essa foi removida e limpa, posteriormente sendo dividida em anéis de aorta com e sem endotélio. Os anéis, foram colocados em cubas com solução de Krebs-Henseleit modificado, e foram conectadas em transdutores. Os extratos foram obtidos através de preparações aquosas que simulam o consumo do mate pela população. **Resultados:** As preparações demonstraram atividade vasorrelaxante, com uma taxa de $54,93\% \pm 0,17$ em aorta com endotélio e $52,35\% \pm 0,02$ em aorta sem endotélio. A cafeína, composto majoritário, apresentou um efeito vasorrelaxante de 100%. O mecanismo de ação sugerido envolve a ativação dos canais de potássio (K^+) ativados por cálcio (Ca^{2+}). **Conclusão:** As preparações e os compostos isolados de *Ilex paraguariensis* apresentaram uma importante atividade anti-hipertensiva nos modelos de estudo por órgão isolado, demonstrando ser um promissor aliado no tratamento da hipertensão arterial sistêmica, possuindo como possível mecanismo de ação a ativação dos canais de potássio (K^+) ativados por cálcio (Ca^{2+}), podendo este efeito estar atribuído ao composto majoritário da planta, que é a cafeína.

Palavras-chave: Etnofarmacologia, Medicamentos fitoterápicos, Anti-hipertensivo, Mate, Erva Mate

EVALUATION OF THE VASCULAR REACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACTS AND SUBSTANCES OBTAINED FROM MATE DRINK PREPARATIONS (*Ilex paraguariensis* St. Hil) IN RAT AORTA

ABSTRACT

Introduction: *Ilex paraguariensis* is a plant belonging to the Aquifoliaceae family, commonly used by the population of Argentina, Brazil, and Paraguay, and popularly known as mate. It is consumed in various preparations, notably both cold and hot. Studies have shown that the plant contains various organic compounds with diverse biological effects, such as anti-inflammatory and antioxidant properties, and has proven effective in improving endothelial function and protecting vascular function in consumers, also preventing the development of atherosclerosis. In this context, systemic arterial hypertension (SAH) is significant, as it is one of the main factors of morbidity and mortality worldwide. The main objective of this study was to evaluate the vasorelaxant capacity of *Ilex paraguariensis* preparations and compounds, as well as the mechanism of action involved, through vascular reactivity studies in isolated aorta of *Wistar* rats.

Materials and Methods: The animals were euthanized, followed by thoracotomy to expose their aorta. The aorta was removed, cleaned, and divided into aortic rings with and without endothelium. The rings were placed in baths with modified Krebs-Henseleit solution and connected to transducers. The extracts were obtained through aqueous preparations simulating the consumption of mate by the population. **Results:** The preparations demonstrated vasorelaxant activity, with a rate of $54.93\% \pm 0.17$ in aorta with endothelium and $52.35\% \pm 0.02$ in aorta without endothelium. Caffeine, the major compound, exhibited a vasorelaxant effect of 100%. The suggested mechanism of action involves the activation of potassium (K^+) channels activated by calcium (Ca^{2+}).

Conclusion: Preparations and isolated compounds of *Ilex paraguariensis* showed significant antihypertensive activity in isolated organ study models, demonstrating promise as an ally in the treatment of systemic arterial hypertension. The possible mechanism of action involves the activation of potassium (K^+) channels activated by calcium (Ca^{2+}), likely attributed to caffeine, the major compound of the plant.

Keywords: Ethnopharmacology, Phytotherapeutic Drugs, Antihypertensive, Mate, Yerba Mate

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Plantas medicinais.....	15
2.2 <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.....	15
2.2.1 Composição química.....	18
2.3 Pressão arterial.....	19
2.3.1 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....	20
2.3.2 Óxido nítrico.....	21
2.3.3 Prostaglandinas.....	22
2.3.4 Canais de K ⁺ ativados por Ca ⁺	22
2.4 Hipertensão Arterial Sistêmica.....	23
3 OBJETIVOS.....	25
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
5 APÊNDICES.....	30
5.1 Artigo 1: Evaluation of the vascular reactivity of aqueous extracts and substances obtained from mate drink preparations (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil) in rat aorta.....	32
6 CONCLUSÃO.....	57
7 ANEXOS.....	58
7.1 Carta de aprovação do comitê de ética em uso de animais.....	58

INTRODUÇÃO

A bioprospecção pode ser definida como a procura de novos compostos orgânicos, capazes de trazerem benefícios farmacológicos, podendo-se destacar a busca por novas substâncias bioativas em plantas medicinais, que podem estar associadas diretamente ao conhecimento etnofarmacológico, ou seja, conhecimento popular/tradicional que as comunidades possuem sobre determinada espécie de planta medicinal, que é utilizada comumente para o tratamento das mais variadas patologias (ASTOLFI FILHO *et al.*, 2015).

Segundo Ataliba *et al.* (2017), as plantas medicinais de uso popular vêm sendo empregadas pela sociedade como complemento ao tratamento medicamentoso em determinadas patologias, sendo que essa prática recebe o nome de fitoterapia, sendo encontrada cada vez mais presente nos serviços de atenção primária à saúde. Dentre essas plantas, podemos destacar a *Ilex paraguariensis*, pertencente a família Aquifoliaceae e conhecida popularmente como erva mate.

I. paraguariensis é uma planta nativa da América do Sul, ocorrendo na Argentina, Brasil e Paraguai, sendo seu consumo feito através do ‘Tereré’ ou ‘Chimarrão’ ou então através do ‘Chá mate’. Estudos recentes já comprovaram que o consumo de *I. paraguariensis* promove um efeito hepatoprotetor (TAMURA *et al.*, 2013), ação hipocolesterolêmica (STEIN *et al.*, 2005) e ação que promove melhoras relacionadas à saúde cardiovascular (JUNIOR e MORANDB, 2016).

Dentre as principais patologias que acometem a população, podemos destacar a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), que é o principal fator de risco para as Doenças cardiovasculares (DCV) conforme descrito por Silverthorn (2017). De acordo com o estudo publicado por Malachias (2016), a HAS é considerada um dos maiores fatores de morbidade e mortalidade em todo o mundo, podendo estar associada com o desenvolvimento de outras patologias, tais como a doença renal crônica (DRC), o acidente vascular encefálico (AVE) e a insuficiência cardíaca (IC).

Um dos riscos inerentes a HAS, é o fato de que ela acelera o processo de aterogênese (lipoproteína de baixa densidade oxidada presente na parede arterial) e também causa alterações degenerativas nas paredes das artérias, quadro este que pode

acarretar uma dissecação aórtica, até a hemorragia cerebrovascular, além da remodelação cardíaca (KUMAR *et al.*, 2016).

Embora a *I. paraguariensis* seja uma planta rica em compostos bioativos, poucos são os estudos científicos que apontem sua indicação para o tratamento da HAS. Neste aspecto, este estudo teve como objetivo principal, o de avaliar a atividade vaso relaxante do extrato aquoso de preparações e compostos de *I. paraguariensis* em testes de reatividade vascular *Ex vivo*, bem como o mecanismo de ação envolvido neste efeito.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

Desde os primórdios da humanidade, o ser humano vem buscando na natureza formas de se adaptar as circunstâncias do meio em que vive. Deste modo, ele encontrou na natureza as plantas medicinais, e desde então vem desenvolvendo o conhecimento a respeito de algumas espécies e de seus modos de utilização. Tais descobertas são utilizadas até os dias atuais para produção de novos fármacos, auxiliando no tratamento de diversas patologias, pois servem como subsídio de interesse farmacêutico (RANGEL; BRAGANÇA, 2009; LEITÃO *et al.*, 2014; MADEIRO; DE LIMA, 2015).

Segundo, Soares *et al.* (2015), a investigação das plantas medicinais utilizadas pela população no tratamento de patologias proporciona uma vasta quantidade de dados farmacológicos e fitoquímicos sobre determinadas espécies. Essa prática, conhecida como etnofarmacologia, integra o conhecimento empírico dos usuários com as descobertas obtidas por meio de estudos científicos.

No Brasil, é possível encontrar aproximadamente 40.989 espécies de plantas medicinais usadas pela população, sendo que a flora brasileira é uma potente usina de substâncias biologicamente ativas, sendo uma potencial fonte para produção de novos fármacos (BRANQUINHO, 2016). Neste quesito, a população brasileira se destaca no uso de plantas medicinais, fazendo com que ocorra uma grande procura pelas indústrias farmacêuticas para realizar pesquisas com essas plantas, isso permite o alinhamento do conhecimento popular e do conhecimento científico em pesquisas clínicas e experimentais, para realizar a comprovação da atividade biológica da planta (LEITÃO, 2018).

2.2 *Ilex paraguariensis* St. Hil

I. paraguariensis é uma planta arbórea, pertencente à família Aquifoliaceae, nativa da América do Sul e de ocorrência natural em países como a Argentina, Paraguai e Brasil (VIEIRA *et al.*, 2010). Popularmente, o consumo da *I. paraguariensis* acontece através de três preparações diferentes: chimarrão, tereré e chá mate.



Figura 1. Distribuição geológica da *I. paraguariensis* na América do Sul, sendo 1 – Argentina; 2 – Brasil; 3 – Paraguai; 4 - Uruguai. Fonte: Heck e De Mejia, 2007.

Um fator importante a ser considerado quanto às diferentes formas de consumo, é que a composição final é influenciada pelo processo de produção da planta e preparo da bebida. Aqui, destaca-se o poder das infusões quentes (chimarrão) permitirem a extração quase que completa dos componentes solúveis, enquanto no preparo a frio (tereré), ocorre de maneira razoavelmente menor (DARTORA, 2010). Em relação às preparações destinadas ao chá mate, além de sujeitas as variantes ocasionadas pelo processo de secagem, passam também pela torrefação (GEBARA, 2019).



Figura 2. Folhas de *I. paraguariensis*. Fonte: Heck e De Mejia, 2007.

A *I. paraguariensis* possui uma rica composição química com 196 constituintes voláteis identificados e documentados na literatura (KAWAKAMI et al., 1991), além de vitaminas A, B1, B2, C, E, potássio, magnésio, cálcio, manganês, ferro, selênio, fósforo e zinco (BASTOS et al., 2007). Substâncias fenólicas são os constituintes majoritários, aproximadamente 5g/l, seguidos das saponinas e metilxantinas. Dos fenólicos destacam-se a epicatequina (EC) e a epicatequina galato (EGC), ácidos fenólicos como o ácido clorogênico (ACG), ácido gálico (AG) e o ácido 4,5 dicafeol quínico, além de flavonoides como a rutina, quercetina, luteolina, kaempferol e taninos (FILIP et al., 2001). Substâncias fenólicas são conhecidas por sua ampla capacidade antioxidante. Além disso, possuem ação direta na regulação do metabolismo energético e propriedades anti-inflamatórias (STEVENSON et al., 2007). Além disso, as saponinas presentes possuem propriedades anti-inflamatórias e hipocolesterolêmicas (HAN et al., 2005), além de responsáveis pelo sabor amargo característico das bebidas.

Apesar de ser utilizada a bastante tempo na medicina popular, estudos do uso da espécie são datados a partir do final da década de 90, sendo as primeiras pesquisas demonstrando a atividade antioxidante *In vitro* de extratos de *I. paraguariensis* da década de 90 (GUGLIUCCI et al., 1995). A partir disso, muitos outros estudos foram realizados visando efeitos farmacológicos para as mais diversas finalidades. Atividade na inibição da glicação em experimentos *In vitro* (LUNCEFORD et al., 2005), ação hipocolesterolêmica em testes *In vivo* (STEIN et al., 2005), atividades relacionadas a saúde cardiovascular (JUNIOR e MORANDB, 2016), e efeito hepatoprotetor em protocolos experimentais *In vivo* (TAMURA et al., 2013) são alguns dos efeitos promissores relacionados as atividades desta planta.

Em relação a atividade anti-inflamatória e seu sistema de ação, embora propriedades promissoras da espécie sejam bem relatadas em literatura e que recentes trabalhos como de Luz et al., (2016) e Silva Lima et al., (2014) investiguem a atividade anti-inflamatória da planta, muitas questões relacionadas aos diferentes extratos permanecem uma vez os estudos realizados não são com extratos aquosos como utilizados pela população. Além disso, trabalhos não considerarem características da droga vegetal (forma de preparo do material vegetal, sua secagem e particularidades do farmacógeno). Em estudos recentes publicados pelo grupo, foi possível constatar que as preparações e compostos de *I. paraguariensis* apresentaram efeito anti-inflamatório em baixas doses, efeito ansiolítico e antioxidante (MESQUITA et al., 2021).

2.2.1 Composição química

A composição química, ou seja, a disponibilidade de compostos em um extrato, varia de acordo com os métodos de extração empregados. Deste modo, o preparo a frio e a quente realiza a extração dos mais variados compostos (MESQUITA *et al.*, 2021).

Conforme o estudo publicado por Mesquita *et al* (2021) foi possível identificar uma gama de compostos (Tabela 1) com atividades biológicas já elucidadas em outros trabalhos. Os compostos com maiores concentrações presentes nas folhas de *I. paraguariensis* são os polifenóis (ácido clorogênico) e as xantinas (caféina e teobromina) (CARDOZO *et al.*, 2021).

Compound	Retention time (min.)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	Fragmentations (m/z)	Extract samples		
					Chimarrão T1-T	Terere T1-T	Mate-tea T1-O
3-Caffeoylquinic acid (3-CQA)	0.63	353		191, 179	+	+	+
Teobromine	1.30		181		+	+	+
Caffeic acid	2.14	179			+	+	+
4-Caffeoylquinic acid (4-CQA)	2.28	353		191, 179	+	-	-
5-Caffeoylquinic acid (5-CQA)	3.02	353		191, 179	+	+	+
Caffeine	3.09		195		+	+	+
Dicaffeoylquinicacid	4.30	515		353	+	+	+
Dicaffeoylquinicacid	4.55	515		353	+	+	+
Quercetin-3-O-glucoside	4.74	463		301	+	-	-
Quercetin-3-O-rutinoside	4.76	609		301	+	+	-
Dicaffeoylquinicacid	4.78	515		353	+	+	+
Kaempferol-3-O-glucoside	6.10	447		285	+	-	-

+: detected compound; -: no detected compound.

Tabela 1. Compostos identificados nas diferentes preparações de *I. paraguariensis* (chimarrão, tereré, chá mate) utilizando o método de UHPLC-ESI-MS/MS. Fonte: Mesquita *et al.*, 2021.

A análise por HPLC demonstrou que os maiores constituintes são os ácidos fenólicos, flavonoides e alcaloides (Tabela 2) (MESQUITA *et al.*, 2021). Devido a essa gama de compostos, os estudos farmacológicos envolvendo a *I. paraguariensis* possuem como foco, a utilização dos compostos fenólicos, especificamente dos ácidos cafeoilquínicos. Trata-se de um composto de baixo peso molecular e considerado um metabólito secundário (GEBARA, 2019).

Compound	Concentration (µg/mL of extract)			
	Chimarrão			
	T1-T*	T2-T	T1-B	T2-B
Caffeic acid	26.00±0.92	28.66±1.62	19.48±1.48a	23.98±0.04
Chlorogenicacid (5-CQA)	38.63±1.06	42.34±1.86	39.48±1.17	55.12±0.80a
Gallic acid	Nd	Nd	Nd	nd
Caffeine	21.61±0.55	23.74±0.93	22.68±2.59	27.95±0.89a
Theobromine	6.03±0.17	6.45±0.18	2.24±0.12a	4.85±0.11a
Terere				
	T1-T	T2-T	T1-B	T2-B
Caffeic acid	23.20±1.41	21.89±2.06*	16.38±0.79a	19.43±0.87a*
Chlorogenicacid (5-CQA)	42.63±2.51	40.77±4.73	30.34±0.43a*	35.34±1.23a*
Gallic acid	Nd	Nd	2.91±0.03*	3.24±0.13*
Caffeine	13.06±0.79*	12.77±0.96*	21.08±1.87a	22.92±0.75a*
Theobromine	4.88±0.26*	4.83±0.30*	2.84±0.11a	4.26±0.45
Mate-tea				
	T1-O	T2-O		
Caffeic acid	13.23±0.25*#	15.74±0.17b*#		
Chlorogenicacid (5-CQA)	27.87±1.69*#	33.01±0.07b*		
Gallic acid	Nd	Nd		
Caffeine	19.51±2.41*#	20.23±0.06*		
Theobromine	2.40±0.15*#	3.42±0.17b*		

Tabela 2. Quantificação de ácido cafeico, ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico, 5-CQA), ácido gálico, cafeína e teobromina por HPLC-UV/DAD nos diferentes extratos de *Ilex paraguariensis* (chimarrão, tereré, chá-mate). Os valores são expressos em µg de composto/mL de extrato. ♦T1 e T2 indicam diferentes lotes. As letras B, T e O indicam a empresa fornecedora do material: B = Barão de Cotegipe; T = Tomelero; O =

Orgânico. Fonte: Mesquita *et al.*, 2021.

2.3 Pressão Arterial

Segundo Silverthorn (2017), a pressão arterial (PA) em um indivíduo saudável é de 120 mmHg para pressão sistólica e 80 mmHg para pressão diastólica. Porém este valor pode variar de pessoa para pessoa, pois a PA resulta do produto entre o débito cardíaco e a resistência vascular periférica. Para que essa regulação se torne possível, alguns sistemas do corpo humano entram em ação para manter a pressão em valores aceitáveis, dependendo de cada situação em que o indivíduo se encontra (TIRLONI, 2018).

A PA é um estado de perfeito equilíbrio entre o volume sanguíneo, o débito cardíaco, o fluxo sanguíneo e a sua distribuição pelos vasos sanguíneos arteriais e venosos. Esses fatores podem influenciar na PA, pois o volume sanguíneo é determinado através da ingestão ou perda de líquidos, que por sua vez pode ocorrer de forma passiva ou regulada pelos rins. Já em relação ao débito cardíaco, ele será determinado pelo volume sistólico bombeado pelo coração. O fluxo sanguíneo tem como principal mediador o diâmetro das arteríolas, pois é nelas que ocorrem as variações de resistência ao fluxo. Já a distribuição é determinada pelo diâmetro das veias (SILVERTHORN, 2017).

No processo do controle da PA, o ser humano possui dois mecanismos distintos de resposta, os de curto e longo prazo. Os mecanismos envolvidos no controle da PA a curto prazo são mediados pelos quimiorreflexos, barorreflexos e pelo sistema nervoso central, já os de longo prazo tem como mecanismo o rim, que é responsável pelo Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (HALL, 2016).

2.3.1 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

Um dos mecanismos utilizados pelo corpo humano para manter a PA é o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), que é intermediado pelo rim. Este sistema tem por principal objetivo, o de regular o tônus vascular, a secreção hormonal, o balanço hidroeletrolítico e as atividades neuronais (TIRLONI, 2018). Este sistema é ativado quando há uma queda na PA, que conseqüentemente irá levar a uma diminuição da perfusão renal (PALOZI, 2017).

Com a ativação do SRAA, o rim irá produzir e secretar a renina, através das células justaglomerulares que estão presentes entorno da arteríola aferente do glomérulo renal. Uma vez livre na circulação, a renina presente no plasma irá se ligar ao angiotensinogênio, que foi produzido e liberado pelo fígado na circulação. Quando ocorre essa ligação, a renina atua sobre o angiotensinogênio, produzindo a angiotensina I (ANG

I), que irá se ligar a enzima conversora de angiotensina (ECA), que está presente no endotélio dos vasos sanguíneos, se transformando em angiotensina II (ANG II), que ficará livre no plasma. A ANG II detém o poder de vasoconstrição, pois ela irá causar uma série de reações no organismo (SILVERTHORN, 2017).

A ANG II irá agir nos receptores presentes nas arteríolas causando vasoconstrição, além de atuar no centro de controle cardiovascular presente no bulbo, que provoca o aumento da resposta cardiovascular, culminando na elevação da PA. Outro foco de ação da ANG II é no hipotálamo, onde atua aumentando os níveis de secreção da vasopressina e aumenta o estímulo de sede, culminando no aumento do volume sanguíneo, elevando a PA. E por fim, a ANG II também irá agir sobre o córtex da glândula supra renal, estimulando a mesma a aumentar os níveis de aldosterona, estimulará a reabsorção de sódio (Na^+), culminando também no aumento de volume, elevando a PA, atuando também no túbulo proximal, causando o mesmo efeito (SILVERTHORN, 2017).

2.3.2 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é produzido por três isoformas do óxido nítrico sintase (NOS): NOS induzida (iNOS ou NOS II) e duas NOS constitutivas, a neuronal (nNOS ou NOS I) e a endotelial (eNOS ou NOS III) (PALOZI, 2017). Dentre as principais funções de cada isoforma, pode-se citar o relaxamento da musculatura lisa e vasodilatação através de nervos ou neurônios nitrérgicos causados pela nNOS (NOS I); o efeito citostático da iNOS (NOS II) e por fim, o efeito de manter os vasos sanguíneos dilatados, controlando a PA e possuindo efeitos vasoprotetores e antiateroscleróticos causados pela eNOS (NOS III) (VII DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2016).

Em condições fisiológicas normais, a eNOS irá produzir o NO no endotélio vascular, sendo que o NO liberado na luz vascular irá atuar como um potente inibidor da adesão e da agregação plaquetária na parede vascular, além de inibir a adesão de leucócitos pela parede do endotélio, atuando na regulação da PA e na contração do músculo cardíaco. Sua produção é dada exclusivamente pelo endotélio vascular (PALOZI, 2017).

A eNOS irá sintetizar o NO nas células endoteliais a partir da L-arginina, sendo que após sua produção, migra para as células musculares lisas dos vasos, ativando a guanilato ciclase (GCs), que irá converter a guanosina trifosfato (GTP) a guanosina

monofosfato cíclica (GMPc), que atua diminuindo os níveis de cálcio intracelular, promovendo a vasodilatação, controlando a PA (TIRLONI, 2018).

2.3.3 Prostaglandinas

As prostaglandinas (PGs) podem ser localizadas em quase todos os tecidos do corpo humano, sendo parte de uma grande família de vários compostos endógenos, sendo que as PGs possuem várias diferenças estruturais, que estão intimamente ligadas às suas atividades biológicas. Ela pode promover efeitos diferentes e até mesmo opostos em diversos tecidos, sendo que essa capacidade de reação em um tecido ou até mesmo de inibir a reação irá depender do tipo de receptor ao qual as PGs irão se ligar (PALOZI, 2017).

Segundo Vasquez *et al.* (2018), as PGs podem atuar como fatores autócrinos e parácrinos com suas células alvo, pois estão presentes nas imediações no local de sua secreção, sendo sua meia vida é curta. Porém as PGs se diferem dos hormônios endócrinos, uma vez que não são produzidas em um local específico, mas sim por toda extensão do corpo. Sua síntese se dá através da fosfolipase A2 (PLA2), que irá hidrolisar fosfolípidios da membrana, o que irá gerar como produto, o ácido araquidônico, principal substrato para duas vias enzimáticas, a via da cicloxigenase (COXs) e a via das lipoxigenases (LOXs) (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

A via da COXs irá desencadear a síntese de prostaglandinas e tromboxanos, já a via da LOXs irá sintetizar os leucotrienos. Podemos destacar as 4 principais prostaglandinas que são geradas neste processo: prostaglandina E2 (PGE2), prostaciclina (PGI2), prostaglandina D2 (PGD2) e por fim a prostaglandina F2a (PGF2a) (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). As PGE2 irão atuar nos vasos sanguíneos como potentes vasodilatadores, efeito este que é observado principalmente nas arteríolas, esfíncteres pré-capilares e vênulas pós-capilares, além de atuar também nos rins, vasos mesentéricos e nas coronárias (PALOZI, 2017).

2.3.4 Canais de K⁺ ativados por Ca⁺

Os canais de potássio ativados por cálcio (KCa) são componentes cruciais na regulação da excitabilidade celular, desempenhando papéis essenciais em uma variedade de processos fisiológicos, como a regulação do potencial de membrana, o controle do

tônus vascular e a modulação da atividade neuronal. Esses canais são ativados pelo aumento da concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}), o que geralmente ocorre em resposta a estímulos fisiológicos que provocam a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático ou a entrada de Ca^{2+} através de canais voltagem-dependentes (FÉLÉTOU, 2009).

A ativação dos canais KCa resulta na hiperpolarização da membrana plasmática, o que diminui a excitabilidade celular ao reduzir a abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes e limita a entrada adicional de Ca^{2+} . Este mecanismo é vital para a homeostase celular e a prevenção de condições patológicas associadas à hiperexcitabilidade celular (HALL, 2016). Recentemente, tem-se destacado o interesse terapêutico nos canais KCa devido à sua ampla distribuição e papel em diversas patologias. Por exemplo, a ativação dos canais tem sido explorada no tratamento da hipertensão arterial, visto que promove o relaxamento do músculo liso vascular. Estudos também sugerem que a modulação dos canais pode oferecer benefícios terapêuticos em condições como ansiedade e epilepsia, dado seu papel na estabilização da atividade neuronal (FÉLÉTOU, 2009).

2.4 Hipertensão Arterial Sistêmica

Apesar do corpo humano ser dotado de sistemas fisiológicos capazes de controlar a PA, as vezes podem ocorrer de esses sistemas entrarem em falha, muitas das vezes multifatoriais. Quando isso ocorre, a PA se mantém elevada, ou seja, acima de seu valor de referência (120 mmHg para PAS e 80 mmHg para PAD), quando isso ocorre de forma crônica (valor superior a 140 mmHg para PAS e 90 mmHg para PAD), o indivíduo desenvolve o quadro de hipertensão arterial sistêmica (HAS), sendo considerada um dos maiores fatores de morbidade e mortalidade em todo o mundo, além de ser um dos principais fatores para as doenças cardiovasculares (DCVs) (WHO, 2017; TIRLONI, 2018).

É possível encontrar dois tipos de classificação para a HAS, sendo ela primária (essencial) e/ou secundária. A HAS primária poderá se instalar através de fatores genéticos que possam influenciar na regulação da PA; através da redução da excreção de sódio, o que resulta no aumento de líquido, que gera o aumento do débito cardíaco e à vasoconstrição periférica, elevando a PA; pode ocorrer por influências vasoconstritoras, através de estímulos ou fatores que possam causar constrição (alteração estrutural na

parede do vaso), causando aumento da resistência periférica e elevando a PA; e por fim fatores ambientais, tais como o tabagismo, obesidade, consumo elevado de sal, estresse, dentre outros fatores. Já na HAS secundária, esta pode ser causada pela hipertensão renovascular, onde a estenose da artéria renal gera uma diminuição do fluxo glomerular e na pressão da artéria aferente, o que acaba por induzir a secreção da renina, que aumenta o tônus vascular e o volume sanguíneo através do SRAA; pode ocorrer também através de distúrbios monogênicos, que afetam as enzimas envolvidas no metabolismo da aldosterona (aumento de secreção de aldosterona, que gera o aumento de reabsorção de sal e água) ou pode ocorrer por mutações de proteínas que agem na reabsorção de sódio (KUMAR, 2016).

O controle da pressão arterial envolve mecanismos de curto e longo prazo para manter a homeostase. No curto prazo, o sistema nervoso autônomo, particularmente o sistema nervoso simpático, responde rapidamente a mudanças na pressão arterial através de receptores de pressão chamados barorreceptores, localizados nas artérias carótidas e no arco aórtico. Esses receptores enviam sinais ao cérebro, que ajusta a frequência cardíaca, a força de contração do coração e o diâmetro dos vasos sanguíneos para estabilizar a pressão arterial. No longo prazo, os rins desempenham um papel crucial através da regulação do volume sanguíneo e da liberação de hormônios, como a renina, que ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Esse sistema aumenta a retenção de sódio e água, elevando o volume sanguíneo e a pressão arterial. Além disso, o hormônio antidiurético (ADH) e o peptídeo natriurético atrial (ANP) também influenciam a retenção de líquidos e a resistência vascular, contribuindo para o controle prolongado da pressão arterial (SILVERTHORN, 2017).

As principais terapias farmacológicas disponíveis para o controle da HAS são os agentes que irão atuar reduzindo a resistência arterial e até mesmo diminuindo o débito cardíaco. As classes farmacológicas envolvidas nessa ação são os diuréticos, inibidores da ECA, bloqueadores de canais de cálcio, beta bloqueadores e antagonistas da angiotensina II. Geralmente, é realizada a associação de mais de um desses fármacos para se ter um controle da PA (VASCONCELOS, 2018).

3 OBJETIVOS

GERAL

Avaliar o efeito vaso relaxante dos preparos e compostos de *I. paraguariensis* em aorta isolada de ratos *Wistar*.

ESPECÍFICOS

Verificar a reatividade vascular das soluções preparadas a quente e a frio de *I. paraguariensis*;

Verificar a reatividade vascular dos compostos isolados de *I. paraguariensis*;

Elucidar o mecanismo de ação envolvido no efeito vaso relaxante das preparações de *I. paraguariensis*.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTOLFI FILHO, S.; SILVA, C. G. N.; BIGI, M. F. M. A. Bioprospecção e biotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v. 19, n. 38, p. 45-80, 2015.

ATALIBA, F. J. B., *et al.* Interações planta medicinal x medicamento convencional no tratamento da hipertensão arterial. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 29, n. 2, p. 90-99, 2017.

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

BRANQUINHO, L. S. Avaliação da toxicidade e da atividade anti-inflamatória do óleo essencial das folhas de *Piper glabratum* em camundongos. 2016. 57 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados**, Dourados, MS, 2016.

CARDOZO, A. G. L., *et al.* Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-hil.): uma revisão abrangente sobre composição química, benefícios à saúde e recentes avanços. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, e590101120036, 2021.

DA SILVA LIMA, N., *et al.* Effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) treatment on leptin resistance and inflammatory parameters in obese rats primed by early weaning. **Life Sciences**, v. 115, n. 1-2, p. 29-35, 2014.

DARTORA, N. Avaliação dos polissacarídeos e metabolitos secundários das folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em diferentes estados fisiológicos e de processamento. 2010. 109 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímicas) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

FÉLÉTOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options?. **British journal of pharmacology**, v. 156, n. 4, p. 545-562, 2009.

FILIP, R., *et al.* Phenolic compound in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 774-778, 2001.

GEBARA, K. S. Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): consumo, composição química e influência sobre o metabolismo. 2017. 109 f. **Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)**

- **Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados**, Dourados, MS, 2017.

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

HALL, J. E. Guyton & Hall tratado de fisiologia médica. 9. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2016.

HAN, L. K., *et al.* Saponins from platycodi radix ameliorate high fat diet-induced obesity in mice. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 2241-2245, 2002.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-51, 2007.

JUNIOR, E. L. C.; MORAND, B. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440-454, 2016.

KAWAKAMI, M.; KOBAYASHI, A. Volatile constituents of green mate and roasted mate. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 39, p. 1275-1279, 1991.

KUMAR, V. Robbins & Cotran-patologia bases patológicas das doenças. 9. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier Brasil**, 2016.

LEITÃO, F., *et al.* Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: an overview on their botanical diversity and toxicological potential. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, 2014.

LEITÃO, M. M. Análise toxicológica, anti-inflamatória e anti-nociceptiva do extrato etanólico e frações obtidas das folhas de *Piper glabratum* Kunth. 2018. 105 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde**, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2018.

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, p. 419-427, 2005.

LUZ, A. B. G., *et al.* The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. **International Immunopharmacology**, v. 36, p. 165-172, 2016.

MADEIRO, A. A. S.; DE LIMA, C. R. Estudos etnofarmacológicos de plantas medicinais utilizadas no Brasil – Uma revisão sistemática. Caderno de Graduação – **Ciências Biológicas e da Saúde** – UNIT – Alagoas, v. 3, n. 1, p. 69-76, 2015.

MESQUITA, M., *et al.* Chimarrão, terere and mate-tea in legitimate technology modes of preparation and consume: A comparative study of chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-anxiety properties of the mostly consumed beverages of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 279, p. 114401, 2021.

PALOZI, R. A. C. Papéis das vias do óxido nítrico e das prostaglandinas nos efeitos anti-hipertensivos sustentados em ratas ovariectomizadas com hipertensão renovascular tratadas com extrato aquoso de *Acanthospermum hispidum* DC. 2017. 47 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados**, Dourados, MS, 2017.

RANGEL, M.; BRAGANÇA, F. C. R. Representações de gestantes sobre o uso de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 1, p. 100-109, 2009.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. Arteriosclerosis, **Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

SILVERTHORN, D. U. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. Porto Alegre: **Artmed**, 2017.

SOARES, F. P., *et al.* Estudo etnofarmacológico e etnobotânico de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (janaguba). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 900-908, 2015.

STEIN, F. L. P., *et al.* Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biological Research for Nursing**, v. 7, p. 146-156, 2005.

STEVENSON, D. E.; HURST, R. D. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 2900-2916, 2007.

TAMURA, A., *et al.* Yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) extract prevents ethanol-induced liver injury in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1714-1723, 2013.

TIRLONI, C. A. S. Investigação etnofarmacológica dos efeitos cardiovasculares e renais de três espécies medicinais utilizadas no Pantanal sul-mato-grossense. 2018. 201 f. **Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados**, Dourados, MS, 2018.

VASQUEZ, A.; MOUCHLIS, V. D.; DENNIS, E. A. Review of four major distinct types of human phospholipase A2. **Advances in biological regulation**, v. 67, p. 212-218, 2018.

VASCONCELOS, P. C. P. Avaliação do potencial diurético, anti-hipertensivo e cardioprotetor da planta medicinal *Gomphrena celosioides* Mart. (Amaranthaceae) em ratos. 2018. 64 f. **Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados**, Dourados, MS, 2018.

VIEIRA, M. A., *et al.* Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) residue. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 283-285, 2010.

VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v. 107, n. 3, 2016.

WHO. Cardiovascular diseases (CVDs): Fact sheet Updated May 2017. 2017.

5 APÊNDICES

Artigo 1. Evaluation of the vascular reactivity of aqueous extracts and substances obtained from mate drink preparations (*Ilex paraguariensis* St. Hil) in rat aorta

Artigo 1 Não publicado: Journal of Ethnopharmacology
(Qualis A1)

ScienceDirect Journals & Books [Register](#) [Sign in](#)

 **Journal of Ethnopharmacology**
Supports open access

8.6 CiteScore | 5.4 Impact Factor

[Articles & Issues](#) [About](#) [Publish](#) [Order journal](#) [Search in this journal](#) [Submit your article](#) [Guide for authors](#)

**EVALUATION OF THE VASCULAR REACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACTS
AND SUBSTANCES OBTAINED FROM MATE DRINK PREPARATIONS (*Ilex
paraguariensis* St. Hil) IN RAT AORTA**

Rafael Souza Maris^a, Felipe Leorato Parizoto^a, Katiana Simões Lopes^a, Luis Fernando Benitez Macorini^{a,b}, Marcos José Salvador^c, Arielle Cristina Arena^d, Cândida Aparecida Leite Kassuya^b,

^aSchool of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS, Brazil.

^bSchool of Health Sciences, University Center of Grande Dourados (UNIGRAN), Dourados, MS, Brazil

^cInstitute of Biology, Department of Plant Biology, PPGBCE, and PPGCF, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

*Author for correspondence: Candida Aparecida Leite Kassuya (candida2005@gmail.com) - Address: School of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Rodovia Dourados-Itahum, km 12, 79825-070, MS, Brazil, Phone: +55 67 3410-2326 Fax: +55 67 3410-2326.

Abstract

Ilex paraguariensis is a plant belonging to the Aquifoliaceae family, commonly used by the population of Argentina, Brazil, and Paraguay, and popularly known as mate. It is consumed in various preparations, notably both cold and hot. Studies have shown that the plant contains various organic compounds with diverse biological effects, such as anti-inflammatory and antioxidant properties, and has proven effective in improving endothelial function and protecting vascular function in consumers, also preventing the development of atherosclerosis. In this context, systemic arterial hypertension (SAH) is significant, as it is one of the main factors of morbidity and mortality worldwide. The main objective of this study was to evaluate the vasorelaxant capacity of *Ilex paraguariensis* preparations and compounds, as well as the mechanism of action involved, through vascular reactivity studies in isolated aorta of *Wistar* rats. In order to evaluate these preparations, 48 adults male *Wistar* rats were euthanized, followed by thoracotomy to expose their aorta. The aorta was removed, cleaned, and divided into aortic rings with and without endothelium. The rings were placed in baths with modified Krebs-Henseleit solution and connected to transducers. The extracts were obtained through aqueous preparations simulating the consumption of mate by the population. The preparations and compounds exhibited vasodilator activity, with a rate of $54.93\% \pm 0.17$ in aorta with endothelium and $52.35\% \pm 0.02$ in aorta without endothelium. Caffeine, the major compound, exhibited a vasorelaxant effect of 100%. The suggested mechanism of action involves the activation of potassium (K^+) channels activated by calcium (Ca^{2+}). The preparations and isolated compounds of *Ilex paraguariensis* showed significant antihypertensive activity in isolated organ study models, demonstrating promise as an ally in the treatment of systemic arterial hypertension. The possible mechanism of action involves the activation of potassium (K^+) channels activated by calcium (Ca^{2+}), likely attributed to caffeine, the major compound of the plant.

Keywords: Ethnopharmacology, Phytotherapeutic Drugs, Antihypertensive, Mate, Yerba Mate

LIST OF ABBREVIATIONS

4-AMP - 4-Aminopyridine

Ach - Acetylcholine

AMD - Amiodarone

CVA - Cerebrovascular accident

Ca²⁺ - Calcium

CaCl₂ - Calcium chloride

CCE - Concentration-effect curve

CE₅₀ - Effective concentration 50%

CKD - Chronic kidney disease

EDTA - Ethylenediamine Tetraacetic Acid

EPM - Standard error of the mean

SAH - Systemic arterial hypertension

HF - Heart failure

K⁺ - Potassium

KATP - ATP-sensitive potassium channels

KCa - Calcium-activated potassium channels

KCl - Potassium chloride

KH₂PO₄ - Potassium phosphate

Kir - Inward rectifier potassium channels

Kv - Voltage-dependent potassium channels

L-name - N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride

MgSO₄ - Magnesium sulphate

NaCl - Sodium chloride

NaHCO₃ - Sodium bicarbonate

NO - Nitric oxide

Ntp - Nitroprusside

Phe - Phenylephrine

TEA - Tetraethylammonium

1 INTRODUCTION

Ilex paraguariensis (Aquifoliaceae) is a plant native to South America, popularly known as *yerba mate*. It is commonly found in Argentina, Brazil, Uruguay and Paraguay and is consumed as 'tereré' or 'chimarrão' (VIEIRA *et al.*, 2010). It is consumed through hot or cold aqueous preparations, which influence the extraction of compounds present in the drink (MESQUITA *et al.*, 2021).

Recent studies have shown the presence of phenolic compounds in *mate* such as saponins, methylxanthines, vitamins A, B1, B2, C and E, potassium, magnesium and calcium (MESQUITA *et al.*, 2021). Despite being used for a long time in folk medicine as a diuretic (CARDOZO *et al.*, 2021), pharmacological studies have showed that the consumption of *I. paraguariensis* promotes a hepatoprotective effect (TAMURA *et al.*, 2013), hypocholesterolemic action (STEIN *et al.*, 2005) and can improve cardiovascular health (JUNIOR and MORANDB, 2016).

In this context, the use of *I. paraguariensis* could help in the treatment of systemic arterial hypertension (SAH). SAH is the major risk factor for cardiovascular disease (CVD) as described by Silverthorn (2017). According to the study published by Malachias (2016), SAH is considered to be one of the largest contributors to morbidity and mortality worldwide and may be associated with the development of other pathologies such as chronic kidney disease (CKD), stroke, and heart failure (HF). One of the inherent risks of SAH is that it accelerates the process of atherogenesis (oxidized low-density lipoprotein present in the arterial wall) and also causes degenerative changes in the arterial walls, which may lead to aortic dissection, cerebrovascular hemorrhage, and cardiac remodeling (KUMAR *et al.*, 2016). Medical treatment includes the use of vasoactive drugs, or drugs that act directly on the central nervous system and renal system to modulate the renin-angiotensin-aldosterone system (DA SILVA *et al.*, 2012).

Although studies have shown that *I. paraguariensis* is a plant rich in bioactive compounds, few scientific studies validate its use for the treatment of hypertension. Thus, the main objective of this study was to evaluate the vasorelaxant activity of the aqueous extract of *I. paraguariensis* preparations (Chimarrão Barão[®], Chimarrão Tomeleiro[®]; Tereré Barão[®] and Tereré Tomeleiro[®]) and its compounds in *ex vivo* vascular reactivity tests, as well as the action mechanism modulating the effect.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Vegetal Material

The plant material was obtained from different commercial companies, Tomeleiro[®] and Barão de cotegipe[®] in different periods of 2017. The aqueous extracts and isolated substances of *Ilex paraguariensis* St. Hil were prepared according to the methodology described by Mesquita *et al.* (2021).

Aqueous solutions were prepared from formulations simulating the consumption of mate by the population, with the following names: Chimarrão Barão[®], Chimarrão Tomeleiro[®], hot drink preparations. Tereré Barão[®] and Tereré Tomeleiro[®], which were prepared cold.

The compounds identified by HPLC and subsequently isolated are: caffeine, caffeic acid, chlorogenic acid, theobromine and gallic acid.

2.2 Reagents

4-Aminopyridine, Acetylcholine (Ach), Amiodarone, Phenylephrine (Phe), Nitroprusside (Ntp), N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-name) and Tetraethylammonium were purchased from Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sodium bicarbonate (NaHCO₃), sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), calcium chloride (CaCl₂), potassium phosphate (KH₂PO₄), glucose, magnesium sulfate (MgSO₄) were purchased from Synth, Diadema, São Paulo, Brazil.

2.3 Animals

The current project was submitted to the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Grande Dourados (UFGD) and approved under protocol no. 08/2020.

For this study, a total of 42 male Wistar rats, aged between 10 and 12 weeks, from the Central Animal Facility of the Federal University of Grande Dourados - UFGD, were used. The animals were kept in the vivarium of the Faculty of Health Sciences of Federal University of Grande Dourados (FCS - UFGD) and were housed in cages with access to water and food *ad libitum*, in a light-controlled environment, with a light/dark cycle of 12 hours each, at a controlled temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

2.4 Preparation of Aortic Rings

After euthanasia (by ketamine and xylazine I.P), male *Wistar* rats underwent thoracotomy to isolate the thoracic aorta. Connective tissue and fat were removed from the artery and it was divided into 3 aortic rings. One the rings had its endothelium mechanically removed by rubbing the vessel on a rod with absorbent cotton at the end. The rings were suspended in isolated organ baths containing modified Krebs-Henseleit

solution (composition in mM: NaCl 115.0; KCl 4.6; CaCl₂ 2.5; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄ 2.4; NaHCO₃ 25.0; Glucose 11.0; EDTA 0.026). The culture medium was maintained at 37.0 ± 0.5°C and saturated with carbogen (95% O₂, 5% CO₂). Subsequently, the rings were connected to isometric force transducers (ADINSTRUMENTS Pty Ltd, model FE224, QuadBridge Amp) and the tension variation recordings were documented using the ADINSTRUMENTS MLS260/8 LabChart Pro program. The total stabilization time of the preparations was 1 hour, with an initial tension of 1.5 g, which was maintained throughout the experiment. During the *ex vivo* vascular reactivity tests, concentration-effect curves (CECs) were performed for 10 µM phenylephrine (Phe), 10 µM acetylcholine (Ach) and 10 µM nitroprusside (Ntp) in aorta with and without endothelium (Da Silva *et al.*, 2012).

2.5 Experimental protocols

2.5.1 Investigation of the vasorelaxant effect of *Ilex paraguariensis* preparations and compounds

After the period of stabilization, the aorta was contracted with 10 µM phenylephrine (Phe). Multiple different concentrations of the aqueous extract and isolated compounds of *I. paraguariensis* were added cumulatively (3-3000 µg/ml) to the solution present in the vats, with the aim of verifying the vessel response (Da Silva *et al.*, 2012). Subsequently, 100 µL of each solution containing extracts or compounds were added to each vat, with a stabilization time of 15 minutes between additions. Vascular reactivity was assessed using the tissue's response in the presence of vasoactive agents and *I. paraguariensis* extracts and compounds. Vascular reactivity was determined with the maximum tissue response to vasoactive agents and the 50% effective concentration (CE50) was correlated when the extract or compound induced vasorelaxant effect in 50%

of maximum tissue response. The CE50s were measured by graphical determination and the averages were presented as the antilogarithm of the arithmetic mean of the CE50 logs from each experiment, with the respective 95% confidence intervals (Da Silva *et al.*, 2012).

2.5.2 Investigation of the involvement of the nitric oxide pathway in the vasorelaxant effect of *Ilex paraguariensis* extracts and compounds

A solution containing 100 μ M of L-NAME (non-selective nitric oxide synthase inhibitor) was perfused individually in the modified Krebs-Henseleit preparation. After one hour, a solution containing Phe 10 μ M was added, and after 15 minutes, the extract concentrations were added cumulatively (3-3000 μ g/mL), as previously described. (TIRLONI *et al.*, 2019).

2.5.3 Investigation of the involvement of K⁺ channels in the vasorelaxant effect of *Ilex paraguariensis* extracts and compounds

Solutions containing tetraethylammonium 5 mM (Ca²⁺-activated K⁺ channel blocker - KCa), amiodarone 10 μ M (K⁺ channel blocker), 4-aminopyridine 1 mM (voltage-dependent K⁺ channel blocker - Kv) were perfused individually in the modified Krebs-Henseleit preparation. After one hour, a solution containing Phe 10 μ M was added. After 15 minutes, the extract concentrations were also added cumulatively (3-3000 μ g/mL), as previously described.

2.6 Statistical Analysis

The data obtained was analyzed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA),

followed by the Bonferroni post-test. Statistical differences were presented as *P < 0.01
 P < 0.001 and *P < 0.0001 using the GraphPad Prism 8 program.

3 RESULTS

3.1 *Ex vivo* vascular reactivity

After the stabilization period of the aortic rings with the addition of Phe 10 μ M and the doses of the aqueous and compound extracts of *I. paraguariensis*, it was possible to observe a vasodilator effect (Table 1 and 2).

In aorta with endothelium, a maximum vasorelaxant response was obtained at a dose of 3000 ug/mL for the cold preparation of tereré barão®, and at a dose of 1500 ug/mL for the cold preparation of tereré tomeleiro®. For the hot preparations in aorta with endothelium, the responses were 3000 ug/mL for the chimarrão barão® preparation and 3000 ug/mL for the chimarrão tomeleiro® preparation (Table 1).

Vasodilation in aorta with endothelium pre-contracted with Phe 10 μ M in the cold preparation of tereré barão® at a dose of 3000 ug/mL was 54.93% $\pm$ 0.17, while for the hot preparation of chimarrão tomeleiro® at a dose of 3000 ug/mL vasodilation reached 53.53 $\pm$ 0.08 (Table 2).

Table 1 - Average vasodilation per dose of the aqueous extracts tested on aorta with endothelium.

[] ug/mL	Tereré Barão®	Tereré Tomeleiro®	Chimarrão Barão®	Chimarrão Tomeleiro®
0	2.01 $\pm$ 0.16	1.92 $\pm$ 0.24	2.13 $\pm$ 0.28	2.02 $\pm$ 0.08
23.43	2.02 $\pm$ 0.16	1.85 $\pm$ 0.20	2.10 $\pm$ 0.26	1.98 $\pm$ 0.07
46.87	2.03 $\pm$ 0.15	1.85 $\pm$ 0.22	2.11 $\pm$ 0.26	1.96 $\pm$ 0.09
93.75	2.01 $\pm$ 0.15	1.84 $\pm$ 0.21	2.10 $\pm$ 0.26	1.94 $\pm$ 0.09
187.5	2.01 $\pm$ 0.14	1.83 $\pm$ 0.21	2.09 $\pm$ 0.23	1.92 $\pm$ 0.10
375	1.99 $\pm$ 0.14	1.82 $\pm$ 0.21*	2.10 $\pm$ 0.25	1.91 $\pm$ 0.09
750	1.96 $\pm$ 0.15	1.80 $\pm$ 0.20*	2.13 $\pm$ 0.29	1.90 $\pm$ 0.10
1,500	1.89 $\pm$ 0.14	1.76 $\pm$ 0.18**	2.09 $\pm$ 0.25	1.79 $\pm$ 0.10*
3,000	1.73 $\pm$ 0.17**	1.77 $\pm$ 0.18**	1.85 $\pm$ 0.32	1.74 $\pm$ 0.08**

The data obtained is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA), followed by the Bonferroni Post-tests test. Statistical differences are represented by *P<0.01 **P<0.001 ***P<0.0001.

In view of this data, we proceeded to study the majority of compounds which were isolated and perfused in the MicroMol vat, obtaining the following results: for theobromine, the maximum vasorelaxant effect was observed at a dose of 1024 μ M, followed by caffeine which also showed an effect at a dose of 1024 μ M. Caffeic acid had the maximum vasorelaxant effect at a dose of 256 μ M, chlorogenic acid at a dose of 1024 μ M and gallic acid had the maximum effect at a dose of 1024 μ M (Table 5 and 6).

Table 2 - Percentage of vasodilation per dose of the aqueous extracts tested on aorta with endothelium.

[] ug/mL	% of Vasodilation Tereré Barão®	% of Vasodilation Tereré Tomeleiro®	% of Vasodilation Chimarrão Barão®	% of Vasodilation Chimarrão Tomeleiro®
23.43	0 $\pm$ 0	17.20 $\pm$ 0.20	4.79 $\pm$ 0.26	7.64 $\pm$ 0.07
46.87	0 $\pm$ 0	16.40 $\pm$ 0.22	2.66 $\pm$ 0.26	12.10 $\pm$ 0.09
93.75	0 $\pm$ 0	18.40 $\pm$ 0.21	4.52 $\pm$ 0.26	16.56 $\pm$ 0.09
187.5	0,33 $\pm$ 0,14	20.80 $\pm$ 0.21	6.12 $\pm$ 0.23	19.75 $\pm$ 0.10
375	2,63 $\pm$ 0,14	23,60 $\pm$ 0,21*	4.52 $\pm$ 0.25	22.29 $\pm$ 0.09
750	8,88 $\pm$ 0,15	28 $\pm$ 0,20*	0 $\pm$ 0	24.20 $\pm$ 0.10
1500	23,03 $\pm$ 0,14	38 $\pm$ 0,18**	5.59 $\pm$ 0.25	44.27 $\pm$ 0.10*
3000	54,93 $\pm$ 0,17**	36 $\pm$ 0,18**	43.88 $\pm$ 0.32	53.50 $\pm$ 0.08**

The data obtained is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA), followed by the Bonferroni Post-tests test. Statistical differences were represented by *P<0.01 **P<0.001 ***P<0.0001.

Table 3 - Average vasodilation per dose of the aqueous extracts tested on aorta without endothelium.

[] ug/mL	Tereré Barão®	Tereré Tomeleiro®	Chimarrão Barão®	Chimarrão Tomeleiro®
0	1,88 $\pm$ 0,08	2,09 $\pm$ 0,16	2,02 $\pm$ 0,28	1,78 $\pm$ 0,06
23,43	1,89 $\pm$ 0,06	2,12 $\pm$ 0,17	1,99 $\pm$ 0,06	1,72 $\pm$ 0,02***

46,87	1,86±0,07*	2,11±0,18	1,99±0,06	1,73±0,00***
93,75	1,87±0,06	2,09±0,18	1,97±0,06	1,74±0,04***
187,5	1,85±0,06*	2,09±0,19	1,97±0,06	1,70±0,05***
375	1,85±0,06*	2,09±0,19	1,97±0,06	1,72±0,00***
750	1,85±0,06*	2,08±0,19	1,98±0,06	1,71±0,05***
1500	1,81±0,06**	2,08±0,19	1,97±0,06	1,67±0,02***
3000	1,76±0,04***	2,05±0,19	1,95±0,06	1,64±0,04***

The data obtained is presented as mean ± SEM. Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA), followed by the Bonferroni Post-tests test. Statistical differences were represented by *P<0.01 **P<0.001 ***P<0.0001.

Table 4 - Percentage of vasodilation per dose of the aqueous extracts tested on aorta without endothelium.

[] ug/mL	% of Vasodilation Tereré Barão®	% of Vasodilation Tereré Tomeleiro®	% of Vasodilation Chimarrão Barão®	% of Vasodilation Chimarrão Tomeleiro®
23,43	0±0	0±0	5,77±0,28	22,94±0,06***
46,87	5,29±0,06*	0±0	5,77±0,06	18,82±0,02***
93,75	2,20±0,07	0,56±0,18	5,77±0,06	14,71±0,00***
187,5	7,49±0,06*	0±0	9,62±0,06	29,41±0,04***
375	7,49±0,06*	0,56±0,19	9,62±0,06	22,35±0,05***
750	7,49±0,06*	1,13±0,19	7,69±0,06	26,47±0,00***
1500	18,06±0,06**	2,26±0,19	9,62±0,06	38,82±0,05***
3000	26,87±0,06***	6,78±0,19	13,46±0,06	52,35±0,02***

The data obtained is presented as mean ± SEM. Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA), followed by the Bonferroni Post-tests test. Statistical differences were represented by *P<0.01 **P<0.001 ***P<0.0001.

For the study carried out on aorta without endothelium, the following results were obtained: for the cold preparation of tereré barão®, a maximum vasorelaxant response was obtained at a dose of 3000 ug/mL and for the preparation of tereré tomeleiro®, the maximum response was at a dose of 3000 ug/mL. Whereas, for the hot preparations on aorta without endothelium, a vasorelaxant effect was demonstrated at a maximum dose of 3000 ug/mL for the preparations of chimarrão barão® and tomeleiro® (Table 3 and 4).

For the compounds, caffeine showed the highest rate of a vasodilator effect, with 100% vasodilation at a dose of 1024 μ M (Table 6). For the aorta that had its endothelium mechanically removed, the cold preparation of tereré barão® at a dose of 3000 μ g/mL was $26.87\% \pm 0.06$, while for the hot preparation of chimarrão tomeleiro® at a dose of 3000 μ g/mL the vasodilation reached 52.35 ± 0.02 . The other doses that vasorelaxant effect was observed and the doses with statistically significant values are shown in tables 2, 4 and 6.

Table 5 – Average vasodilation per dose concentration of the compounds tested in the aorta.

[] μ M	Theobromine	Caffeic Acid	Caffeine	Chlorogenic Acid	Gallic Acid
0	1.96 $\pm$ 0.06	2.03 $\pm$ 0.08	1.85 $\pm$ 0.10	1.72 $\pm$ 0.05	1.96 $\pm$ 0.06
8	1.94 $\pm$ 0.06	2.05 $\pm$ 0.08	1.79 $\pm$ 0.11**	1.75 $\pm$ 0.06***	2.01 $\pm$ 0.05
16	1.89 $\pm$ 0.06	2.05 $\pm$ 0.08	1.75 $\pm$ 0.11***	1.74 $\pm$ 0.06***	2.02 $\pm$ 0.06
32	1.86 $\pm$ 0.06*	2.04 $\pm$ 0.08	1.71 $\pm$ 0.10***	1.77 $\pm$ 0.06***	2.10 $\pm$ 0.06
64	1.84 $\pm$ 0.06**	2.05 $\pm$ 0.08	1.67 $\pm$ 0.11***	1.78 $\pm$ 0.06***	2.11 $\pm$ 0.06
128	1.83 $\pm$ 0.06***	2.00 $\pm$ 0.08	1.62 $\pm$ 0.11***	1.77 $\pm$ 0.06***	2.09 $\pm$ 0.06
256	1.81 $\pm$ 0.06***	1.99 $\pm$ 0.08***	1.61 $\pm$ 0.11***	1.79 $\pm$ 0.06***	1.98 $\pm$ 0.06
512	1.77 $\pm$ 0.04***	2.03 $\pm$ 0.08	1.58 $\pm$ 0.11	1.76 $\pm$ 0.06***	1.88 $\pm$ 0.10**
1024	1.68 $\pm$ 0.06***	2.02 $\pm$ 0.08	1.50 $\pm$ 0.11***	1.72 $\pm$ 0.10***	1.75 $\pm$ 0.06***

The data obtained is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA), followed by the Bonferroni Post-tests test. Statistical differences were represented by *P<0.01 **P<0.001 ***P<0.0001.

Table 6 – Percentage of vasodilation per substance concentration tested in aorta.

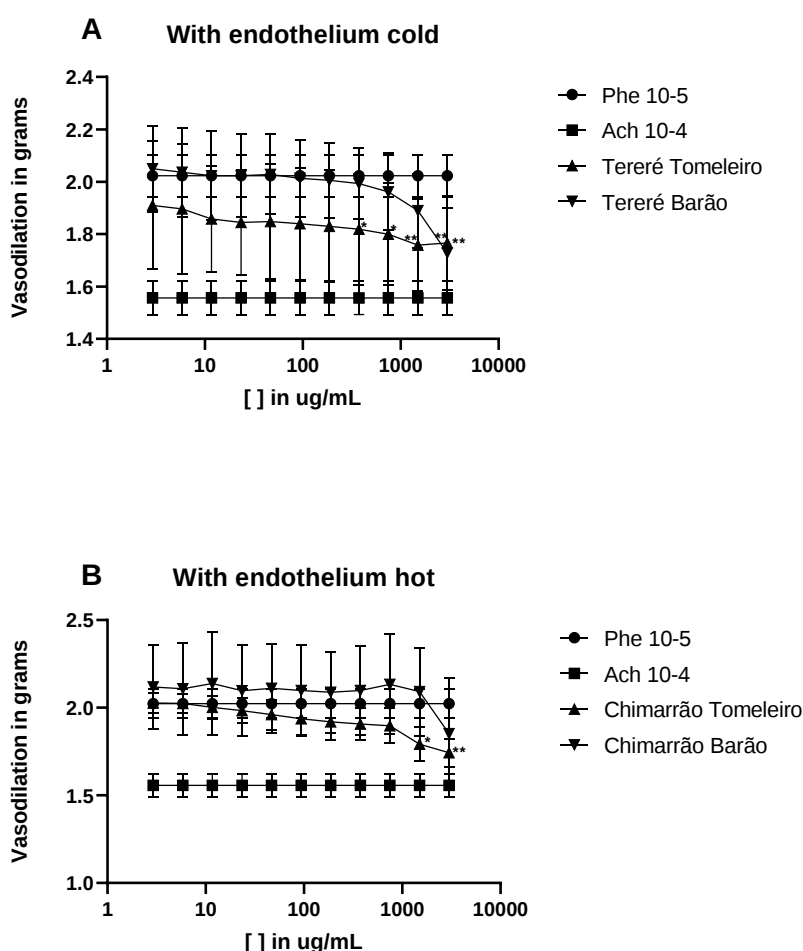
[] μ M	% Vasodilation Theobromine	% Vasodilation Caffeic Acid	% Vasodilation Caffeine	% Vasodilation Chlorogenic Acid	% Vasodilation Gallic Acid
8	4,35 $\pm$ 0,06	0 $\pm$ 0	17,92 $\pm$ 0,11	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
16	15,22 $\pm$ 0,06	0 $\pm$ 0	29,25 $\pm$ 0,11**	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
32	21,74 $\pm$ 0,06*	0 $\pm$ 0	41,51 $\pm$ 0,10***	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
64	26,09 $\pm$ 0,06**	0 $\pm$ 0	51,89 $\pm$ 0,11***	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
128	28,26 $\pm$ 0,06***	1,95 $\pm$ 0,08	66,04 $\pm$ 0,11***	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

256	32,61±0,06***	3,90±0,08*	68,87±0,11***	0±0	0±0
512	42,03±0,04***	0±0	77,36±0,11***	0±0	18,12±0,10**
1024	60,87±0,06***	0±0	100±0,11***	2,99±0,10	45,65±0,06***

The data obtained is presented as mean ± SEM. Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA), followed by the Bonferroni Post-tests test. Statistical differences were represented by *P<0.01 **P<0.001 ***P<0.0001.

The vasodilator effect in aorta with endothelium could be observed in the majority of preparations after the 7th dose (187.5 ug/mL) and extending into the maximum dose (3000 ug/mL) (Graphs 1 e 2).

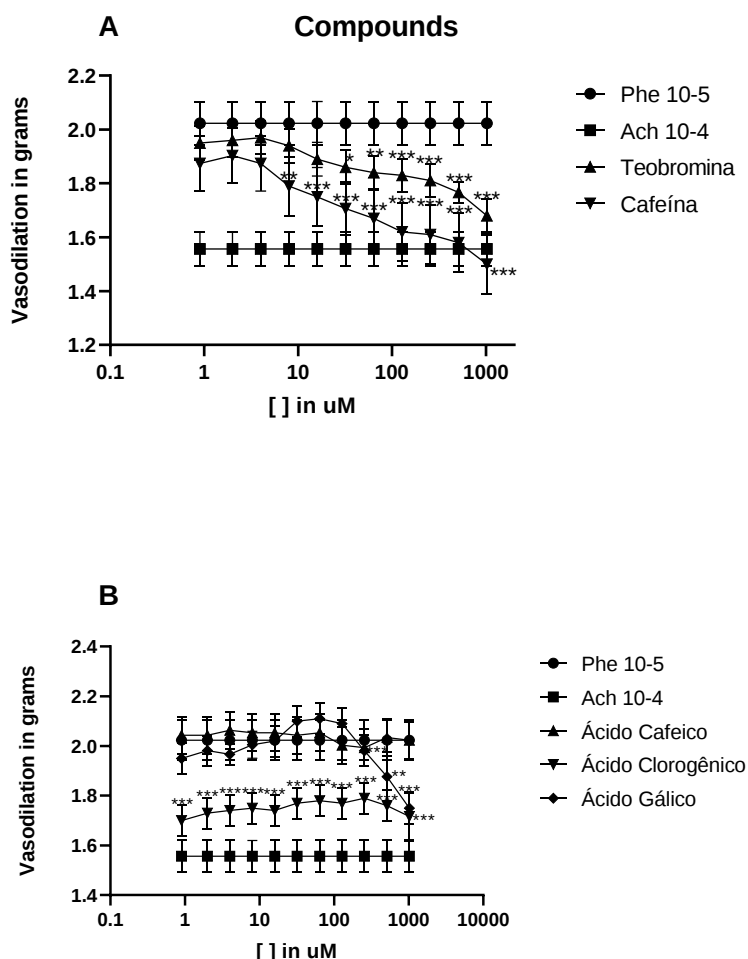
Graph 1 – Graph showing vasodilation by hot and cold preparations in the tested doses in aorta with endothelium.



The data obtained is presented as mean ± SEM. Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA), followed by the Bonferroni Post-tests test.

Statistical differences were represented by * $P < 0.01$ ** $P < 0.001$ *** $P < 0.0001$. A: Aorta with endothelium cold; B: Aorta with endothelium hot.

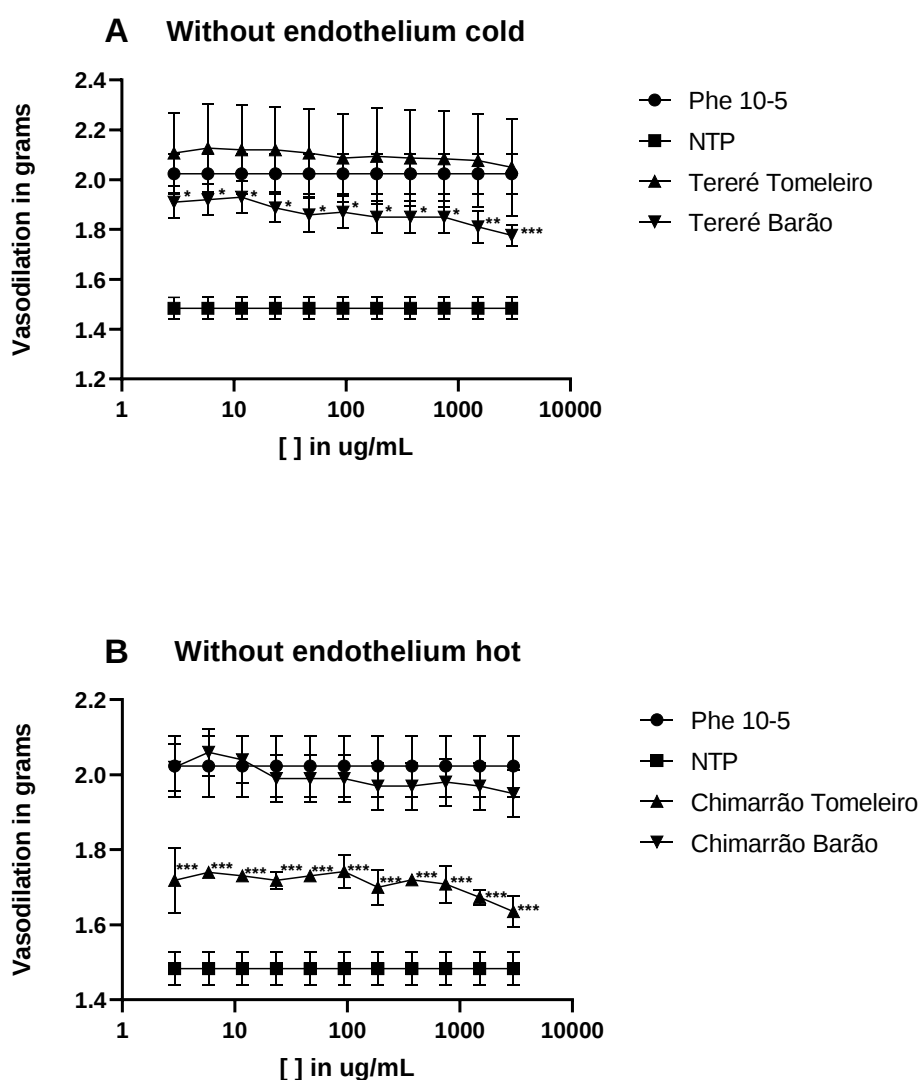
Graph 2 – Graph showing vasodilation by compounds in the tested doses in aorta with endothelium



The data obtained is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA), followed by the Bonferroni Post-tests test. Statistical differences were represented by * $P < 0.01$ ** $P < 0.001$ *** $P < 0.0001$. A: Methylxanthine compounds; B: Phenolic compounds.

The vasodilator effect in aorta without endothelium can also be observed in the majority of preparations after the 6th dose (93,75 ug/mL) extending until the maximum dose (3000 ug/mL), where the preparation of chimarrão tomeleiro® reached an approximately vasodilation of $52,35 \pm 0,02$ (Graph 3).

Graph 3 – Graph showing vasodilation by the preparations of the tested doses in aorta without endothelium



The data obtained is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA), followed by the Bonferroni Post-tests test. Statistical differences were represented by * $P < 0.01$ ** $P < 0.001$ *** $P < 0.0001$. A: Aorta without endothelium cold; B: Aorta with endothelium hot.

These findings suggest that the action mechanism involving the vasodilator effect of *I. paraguariensis* preparations are independent of vascular endothelium. Thereafter, specific tests to each action mechanism were assessed, in order to identify which one is involved in the effect.

3.2 Mechanism of action

3.2.1 Nitric oxide pathway

With results obtained in vasodilation tests, assessments were carried out, in relation to the mechanism of action in the effect. As a starting point, the first assessed test was the blockage of nitric oxide pathway, which ended up being confirmatory since the extract has shown effect in the aorta that had its endothelium mechanically removed.

After blocking the nitric oxide pathway using L-NAME 100 μ M, the administration of extract preparations in all its concentrations (30-3000 μ g/mL) was performed. It was possible to assess that the vasodilator effect from 23,43 μ g/mL up to the last extract concentration, presenting a maximum percentage of vasodilation of approximately $27,14\% \pm 0,05$ in the preparation of tereré barão® (Table 7), indicating that this extract does not use the NO pathway for its activity, seen that NO synthesis happens through the endothelium present in the intact vascular smooth muscle.

In summary, data obtained during this protocol have not shown any significant alterations in the vasodilator effect, since the same pattern was maintained between the vasodilator test in the aorta with complete endothelium and the aorta with mechanically removed endothelium (Table 7).

Table 7 – Percentage of vasodilation per dose of aqueous extracts tested with L-NAME

[] Ug/m L	% Vasodilation Tereré Barão®	% Vasodilation Tereré Tomeleiro®	% Vasodilation Chimarrão Barão®	% Vasodilation Chimarrão Tomeleiro®
23,43	4,29 $\pm$ 0,05	22,38 $\pm$ 0,05*	20,48 $\pm$ 0,05***	6,19 $\pm$ 0,05***
46,87	3,33 $\pm$ 0,05	22,86 $\pm$ 0,05***	20,48 $\pm$ 0,05***	9,52 $\pm$ 0,05***
93,75	4,76 $\pm$ 0,05	23,33 $\pm$ 0,05***	20,48 $\pm$ 0,05***	9,05 $\pm$ 0,05***
187,5	5,71 $\pm$ 0,05*	23,81 $\pm$ 0,05***	20,48 $\pm$ 0,05***	11,90 $\pm$ 0,05***
375	5,71 $\pm$ 0,05*	24,29 $\pm$ 0,05***	20,00 $\pm$ 0,05***	12,38 $\pm$ 0,05***
750	7,14 $\pm$ 0,05**	24,76 $\pm$ 0,05***	20,00 $\pm$ 0,05***	12,86 $\pm$ 0,05***
1500	9,52 $\pm$ 0,05***	26,67 $\pm$ 0,05***	20,48 $\pm$ 0,05***	15,71 $\pm$ 0,05***
3000	16,67 $\pm$ 0,05***	27,14 $\pm$ 0,05***	19,05 $\pm$ 0,05***	19,05 $\pm$ 0,05***

The data obtained is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA), followed by the Bonferroni Post-tests test. Statistical differences were represented by *P<0.01 **P<0.001 ***P<0.0001.

3.2.2 Potassium channels (K⁺)

In addition to the blockage of NO pathway test and assessing that it is not involved in the biological activity of *I. paraguariensis* preparations, the other mechanism assessed was the blockage of potassium channels, aiming to verify the vasodilator activity.

To evaluate the participation of potassium channels (K^+) in the vasodilator effects of the extract, three other methodologies were adopted (vasoactive agents): tetraethylammonium (potassium channel activated by calcium blocker), Amiodarone (potassium channel blocker), 4-Aminopyridine (potassium channels voltage-dependent blocker agent).

In the test using amiodarone as a blocking agent of potassium channels, vasodilation was shown in all in the tested doses, revealing that with this specific agent, it was not possible to elucidate that the vasodilator effect of *I. paraguariensis* preparations happens through K^+ channels (Table 8).

Table 8 – Percentage of vasodilation by doses of aqueous extracts testing with amiodarone.

[] Ug/mL	% Vasodilation Tereré Barão®	% Vasodilation Tereré Tomeleiro®	% Vasodilation Chimarrão Barão®	% Vasodilation Chimarrão Tomeleiro®
23.43	4.17±0.05	5.26±0.10	0±0.05	0±0.05
46.87	12.50±0.05	10.50±0.10	0±0.05	0±0.05
93.75	16.67±0.05	15.79±0.10	2.78±0.05	5.45±0.05
187.5	16.67±0.05	13.16±0.10	5.56±0.05	9.09±0.05
375	25.0±0.05	21.05±0.10	2.78±0.05	10.91±0.05
750	25.0±0.05	18.42±0.10	8.33±0.05	18.18±0.05
1500	70.83±0.05***	52.63±0.10	16.67±0.05	23.64±0.05
3000	87.50±0.05***	60.53±0.10*	30.50±0.05	18.18±0.05

The data obtained is presented as mean ± SEM. Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA), followed by the Bonferroni Post-tests test. Statistical differences were represented by *P<0.01 **P<0.001 ***P<0.0001.

Considering previous findings, tests for K^+ blockage were conducted. Therefore, the protocol that utilizes tetraethylammonium 5 mM to block K^+ channels activated by Ca^{2+} (K_{Ca}). was adopted.

After stabilization period in vat, with the addition of different preparation concentrations, it was possible to observe that they do not present vasodilator effect in

Phe 10 μ M pre-contracted aorta (Table 9). This data suggests that *I. paraguariensis* extract induces a vasodilator effect through the activation of K_{Ca} channels.

Table 9 – Percentage of vasodilation by dose of aqueous extracts tested with tetraethylammonium.

[] Ug/mL	% Vasodilation Tereré Barão®	% Vasodilation Tereré Tomeleiro®	% Vasodilation Chimarrão Barão®	% Vasodilation Chimarrão Tomeleiro®
23,43	0 $\pm$ 0	23,68 $\pm$ 0,05	0 $\pm$ 0	13,16 $\pm$ 0,05
46,87	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	2,63 $\pm$ 0,05
93,75	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	2,63 $\pm$ 0,05
187,5	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
375	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
750	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
1500	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
3000	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

The data obtained is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA), followed by the Bonferroni Post-tests test. Statistical differences were represented by *P<0.01 **P<0.001 ***P<0.0001.

To confirm the mechanism of action using K^+ channels, the protocol was assessed using 4-aminopyridine (K^+ channels voltage-dependent blocker agent), where it was possible to observe that *I. paraguariensis* preparations have shown reduced vasodilator activity (Table 10). In Phe 10 μ M pre-contracted aorta and complete endothelium, there was a percentage of 54,93% $\pm$ 0,17 vasodilation (Table 4), which means, the blockage with 4-aminopyridine reduced that percentage to a minimum relaxation of 30,00 $\pm$ 0,05 in dose of 1500 ug/mL (Table 10), indicating that the mechanism used in the extract effect could be related to the K^+ channels activated by Ca^+ pathway (Graph 4).

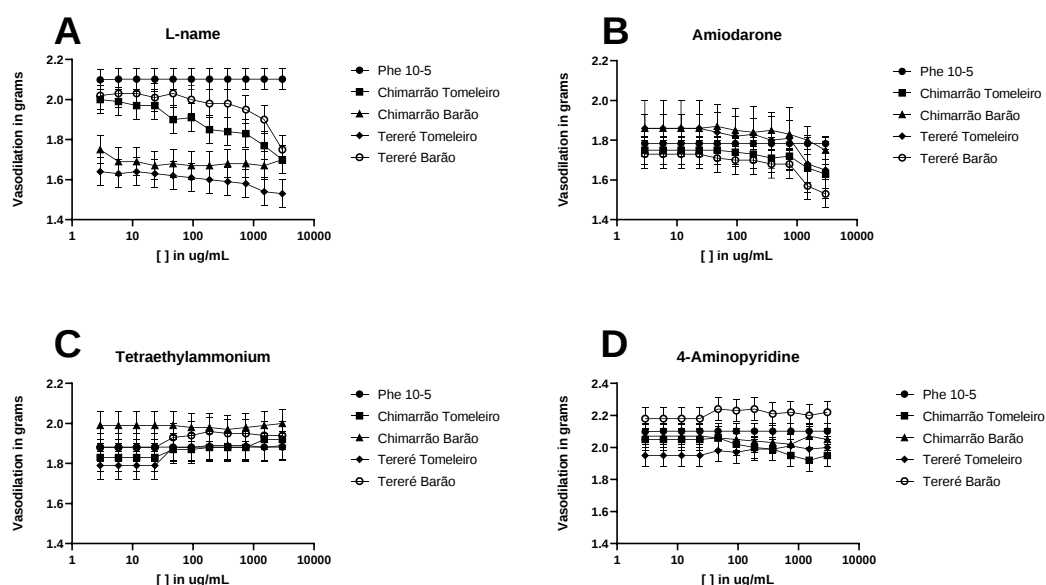
Table 10 - Percentage of vasodilation per dose of aqueous extracts tested with 4-aminopyridine.

[] Ug/mL	% Vasodilation Tereré Barão®	% Vasodilation Tereré Tomeleiro®	% Vasodilation Chimarrão Barão®	% Vasodilation Chimarrão Tomeleiro®
23,43	13.33 $\pm$ 0.05	25.00 $\pm$ 0.05*	5.00 $\pm$ 0.05	8.33 $\pm$ 0.05

46,87	23,33±0,05	20,00±0,05*	6,67±0,05	6,67±0,05
93,75	21,67±0,05*	21,67±0,05	8,33±0,05	13,33±0,05
187,5	23,33±0,05	18,33±0,05*	10,00±0,05	16,67±0,05
375	18,33±0,05*	18,33±0,05	11,67±0,05	18,33±0,05
750	20,00±0,05	15,00±0,05*	13,33±0,05	25,00±0,05
1500	16,67±0,05	18,33±0,05**	5,00±0,05	30,00±0,05
3000	20,00±0,05	16,67±0,05*	8,33±0,05	25,00±0,05

The data obtained is presented as mean ± SEM. Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA), followed by the Bonferroni Post-tests test. Statistical differences were represented by *P<0.01 **P<0.001 ***P<0.0001.

Graph 4 – Graph showing vasodilation by the preparations in tested doses in aorta with endothelium in the mechanism of action test.



The data obtained is presented as mean ± SEM. Statistical differences were analyzed by Analysis of Variance (Two Way ANOVA), followed by the Bonferroni Post-tests test. Statistical differences were represented by *P<0.01 **P<0.001 ***P<0.0001. A: Aorta incubated with L-NAME; B: Aorta incubated with Amiodarone; C: Aorta incubated with Tetraethylammonium; D: Aorta incubated with 4-Aminopyridine

4 Discussion

The present study investigated the pharmacological vasodilator potential and action mechanism involved in the preparations and isolated compounds of *Ilex paraguariensis* in isolated aortic rings, where vasodilator activity dependent and

independent of endothelium were evident, possibly making use of the activation of K_{Ca} channels pathway.

The vascular endothelium (present in the blood vessels wall) plays a major role in the vascular tonus regulation, being responsible for the liberation (paracrine and/or autocrine) of vasoconstrictor and vasodilator substances, and the mediator for neuronal and hormonal mechanisms. The released substances act directly in the receptors present in smooth muscle cells that, in turn, are present in blood vessels (except venules and capillaries). These substances are known as circulating vasoactive factors, and their effect might be endothelium dependent or independent (acting directly or indirectly on smooth muscle cells) and stimulating or inhibiting contractile proteins (COELHO *et al.*, 2003).

In this aspect, several are the mechanisms that involve the endothelial activity and its vasodilator ability, such as endothelium-derivate factors, NO pathway, K^+ channels, among others (PANTHIYA *et al.*, 2019). The NO pathway plays a pivotal role in the vascular tonus regulation, where NO is synthetized through eNOS, using L-arginine and molecular oxygen as substrates, and once released by endothelial cells, it acts like as a vasodilator factor (PALOZI, 2018). The eNOS activation happens through the ACh connection (NO agonist) with their respective receptors (muscarinics) present in the vascular endothelium, that will result in NO synthesis (PANTHIYA *et al.*, 2019). In the present study, this pathway was blocked with L-NAME (NO synthesis suppressor), where a vasodilator effect was significantly shown. It was presented that the NO synthesis did not interfere in the effect caused by the extract, demonstrating that the latter does not make use of this pathway as a mediator.

K^+ channels also have a fundamental role in the vascular tonus regulation. Once they are opened, it results in hyperpolarization of the membrane, which will lead to the inhibition of calcium influx, culminating in a vasodilation. It is possible to differentiate the four types of K^+ channels which are voltage-dependent K^+ channels (K_v); Ca^{2+} -activated K^+ channels (K_{Ca}); ATP-sensitive K^+ channels; and inward-rectifier K^+ channels (K_{ir}) (GAN *et al.*, 2016). In this study, the protocol using several K^+ channels blockers, voltage-dependent K^+ channels (K_v); Ca^{2+} -activated K^+ channels (K_{Ca}); respectively AMD, 4-AMP and TEA was adopted.

The obtained data have shown that the vasodilation effect caused by *I. paraguariensis* preparations and compounds was inhibited by TEA (K_{Ca}) but the same was not observed in the AMD and 4-AMP protocols, indicating that the vasodilator effect of the extract can be directly attributed to the K_{Ca} channel activation. However, in the

voltage-dependent K^+ channels blockage test with 4-AMP, it was shown an attenuation of the vasodilator effect in tested doses, where maximum relaxation was up to $30,00 \pm 0,05$ in the 1500 ug/mL dose, against 54,93% of vasorelaxation in aorta with complete endothelium. In this sense, the study carried out by Gan *et al.* (2016) has shown similar results to the findings of this paper, when it comes to K_{Ca} channels. Even though it was a different compound, 20(S)-protopanaxadiol, where mechanisms of action directly involving Ca^{2+} channels were tested, and the extracellular influx of Ca^{2+} was inhibited.

Ca^{2+} -activated K^+ channels can be found throughout cells of the smooth vascular tissue, being activated by ‘sparks’ of Ca^{2+} (released of the stocked Ca^{2+} , that generates transient currents). The Ca^{2+} release will culminate in the generalized decrease of Ca^{2+} present in the intracellular medium, causing a hyperpolarization that will relax the arterial smooth muscle (FÉLÉTOU, 2009).

Corroborating with the current paper, the study published by Gebara (2019), highlighted that the consumption of *I. paraguariensis* improves the endothelial function, protecting and preserving the vascular function of those who consume it, as well as preventing the atherosclerosis development.

Moreover, one of the major compounds found in *I. paraguariensis* preparations is caffeine, a xanthine found in several food (MESQUITA *et al.*, 2021). During tests, caffeine has shown a vasodilator effect of 100% efficacy, which indicates that the substance may be involved in the effect presented by *I. paraguariensis* preparations. Studies have shown that caffeine is able to act as antagonist in adenosine receptors and as a sensitizer of calcium-liberating channels. Hence, in a cardiovascular process, caffeine is able to reduce cytoplasmic calcium in the endothelial cell, which favors the NO synthesis (ECHEVERRI *et al.*, 2010). A recent study was able to conclude that caffeine inhibits angiotensin-converting-enzyme (ACE) activity and arginases, demonstrating to be a potent anti-hypertensive, and helping the decrease of cardiovascular diseases (OBOH *et al.*, 2021).

The compounds present in the preparations are under direct influence by the extraction method, hot or cold, resulting in a range of compounds present in aqueous extracts. For this reason, aqueous preparations and the following compounds have shown vasodilator effect: theobromine, caffeine, chlorogenic acid, caffeic acid, and gallic acid. The same compounds have been previously studied by the same research group, where they have shown anti-inflammatory and anxiolytic effect (MESQUITA *et al.*, 2021).

Lastly, it is important to highlight that the difference in vasodilation presented throughout the experiments using *I. paraguariensis* preparations and compounds can be explained. The hot or cold consumption of the drink is a direct influence on the compounds that will get extracted from the plant, which can compete with themselves in the binding sites of the vessel smooth muscle. The same does not happen to ACh since it is a pure isolated substance, that will bind specifically with muscarinic receptors present in the vascular endothelium.

5 Conclusion

According to obtained data, we are able to conclude that *Ilex paraguariensis* preparations and compounds have shown vasodilator effect in isolated aorta of Wistar rats, with a vasodilation rate of $54,93\% \pm 0,17$ in aorta with endothelium and a rate of approximately $52,35\% \pm 0,02$ in aorta with mechanically removed endothelium. It also has shown caffeine as a majority compound, which presented a vasodilator effect of 100%. It is important to highlight that the mechanism of action related to the vasodilator activity of the preparations may be directly connected to the activation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels. Lastly, complementary studies must be carried out in order to assess and investigate new biological potentials referring to the use of *Ilex paraguariensis*.

6 References

- Cardozo, A. G. L., Da Rosa, R. L., Novak, R. S., Folquitto, D. G., Schebelski, D. J., Brusamarello, L. C. C., & Ribeiro, D. T. B. (2021). Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-hil.): uma revisão abrangente sobre composição química, benefícios à saúde e recentes avanços. *Research, Society and Development*, 10(11), e590101120036-e590101120036. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.20036>
- Coelho, T. H., Oliveira, S. M., & Moreira, A. L. (2003). Regulação do tono vascular. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
- Da Silva, R. C., Crestani, S., Souza, P., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Santos, A. R. S., Marques, M. C. A., Kassuya, C. A. L., & Silva-Santos, J. E. (2012). Endothelium-dependent and independent vasorelaxation induced by an n-butanolic fraction of bark of *Scutia buxifolia* Reiss (Rhamanaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 997-1004. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.045>
- Echeverri, D., Montes, F. R., Cabrera, M., Galán, A., & Prieto, A. (2010). Caffeine's vascular mechanisms of action. *International Journal of Vascular Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2010/834060>
- Félétou, M. (2009). Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options?. *British Journal of Pharmacology*, 156(4), 545-562. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00052.x>
- Gan, L., Wang, Z. H., Zhang, H., Zhou, X., Zhou, H., Sun, C., Si, J., Zhou, R., Jun, C., & Li, J. (2016). Endothelium-independent vasorelaxant effect of 20 (S)-protopanaxadiol on isolated rat thoracic aorta. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(12), 1555-1562. DOI: 10.1038/aps.2016.74
- Gebara, K. S. (2017). Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): consumo, composição química e influência sobre o metabolismo. (Tese de Doutorado em Ciências da Saúde). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS.
- Junior, E. L. C., & Morand, B. (n.d.). Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. *Journal of Functional Foods*, 21, 440-454. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.010>
- Kumar, V. (2016). Robbins & Cotran: Patologia Bases Patológicas das Doenças (9ª ed.). Rio de Janeiro: Elsevier Brasil.
- Malachias, M. V. B., et al. (2016). 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial: Capítulo 1-Conceituação, epidemiologia e prevenção primária. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 107(3), 14-17. <https://doi.org/10.5935/abc.20160151>
- Mesquita, M., Santos, E., Kassuya, C. A., & Salvador, M. J. (2021). Chimarrão, terere and mate-tea in legitimate technology modes of preparation and consume: A comparative study of chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-anxiety

properties of the mostly consumed beverages of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Journal of Ethnopharmacology, 279, 114401. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114401>

Oboh, G., Ojueroomi, O. O., Ademosun, A. O., Omayone, T. P., Oyagbemi, A. A., Ajibade, T. O., & Adedapo, A. A. (2021). Effects of caffeine and caffeic acid on selected biochemical parameters in L-NAME-induced hypertensive rats. Journal of Food Biochemistry, 45(3), e13384. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13384>

Palozi, R. A. C. (2017). Papéis das vias do óxido nítrico e das prostaglandinas nos efeitos anti-hipertensivos sustentados em ratas ovariectomizadas com hipertensão renovascular tratadas com extrato aquoso de *Acanthospermum hispidum* DC. (Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS.

Panthiya, L., Pantan, R., Tocharus, J., Nakaew, A., Suksamram, A., & Tocharus, C. (2019). Endothelium-dependent and endothelium-independent vasorelaxant effects of tiliacoronine 12'-O-acetate and mechanisms on isolated rat aorta. Biomedicine & Pharmacotherapy, 109, 2090-2099. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.062>

Silverthorn, D. U. (2017). Fisiologia humana: uma abordagem integrada. Artmed Editora.

Stein, F. L. P., Schmidt, B., Furlong, E. B., Soares, L. A. S., Soares, M. C. F., & Vaz, M. R. C. (2005). Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. Biological Research for Nursing, 7, 146-156. <https://doi.org/10.1177/1099800405280521>

Tamura, A., Sasaki, M., Yamashita, H., Matsui-Yuasa, I., Saku, B., Hikima, B., Tabuchi, M., Munakata, C., & Kojima-Yuasa, A. (2013). Yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) extract prevents ethanol-induced liver injury in rats. Journal of Functional Foods, 5, 1714-1723. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.017>

Tirloni, C. A. S. (2018). Investigação etnofarmacológica dos efeitos cardiovasculares e renais de três espécies medicinais utilizadas no Pantanal sul-mato-grossense. (Tese de Doutorado em Ciências da Saúde). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS.

Vieira, M. A., Maraschin, M., Pagliosa, C. M., Podestá, R., De Simas, K. N., Rockenbach, I. I., Amboni, R. D., & Amante, E. R. (2010). Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) residue. Journal of Food Science, 75, 283-285. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01548.x>

6 CONCLUSÃO

Em síntese, a presente dissertação apresenta a atividade anti-hipertensiva das preparações de *Ilex paraguariensis* e de seus compostos isolados, demonstrando o grande potencial da planta para a produção de um produto fitoterápico, aliado com a sua utilização popular.

7 ANEXOS

7.1 Carta de aprovação do comitê de ética em uso de animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Dourados-MS, 10/08/2021.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***"Potencial farmacológico e toxicológico do produtos de Ilex paraguariensis"***, registrada sob o protocolo de nº 08/2020, sob a responsabilidade de *Cândida Aparecida Leite Kassuya e Elisangela dos Santos* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal Da Grande Dourados, em reunião de 19/06/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	05/10/2021 a 10/03/2024
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus - Ratos Wistar Mus musculus – Camundongos Swiss e C57BL/6
Nº de animais	337 - 102 ratos e 235 camundongos
Peso/idade	Ratos – 6 semanas Camundongos – 6 semanas
Sexo	Ratos – 55 machos e 47 fêmeas Swiss – 100 machos e 95 fêmeas C57BL/6 – 40 machos
Origem	Biotério Central UFGD

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFGD – Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso.
Dourados/MS. E-mail: ceua@ufgd.edu.br