Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

EFEITOS BIOLÓGICOS DO CONSUMO DE CHÁ-MATE (*Ilex*
paraguariensis) FRENTE À OBESIDADE EM CAMUNDONGOS

DEMÉTRIUS PAIVA ARÇARI

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

Orientação: **Profa Dra Deborah Helena Markowicz Bastos**

São Paulo
2009

EFEITOS BIOLÓGICOS DO CONSUMO DE CHÁ-MATE (*Ilex
paraguariensis*) FRENTE À OBESIDADE EM CAMUNDONGOS

DEMÉTRIUS PAIVA ARÇARI

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

Orientação: **Profa Dra Deborah Helena Markowicz Bastos**

São Paulo

2009

*“A verdadeira viagem da descoberta não
consiste em procurar novas paisagens,
mas em possuir novos olhos”*

(Marcel Proust)

Aos meus queridos e amados pais
(C. Demétrio e Inês), que mesmo
diante das adversidades nunca me
desampararam e sempre acreditaram
no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto e de forma especial:

Aos meus pais que sempre lutaram em meu favor e por muitas vezes abriram mão das suas necessidades em função das minhas;

Às minhas queridas e estimadas Vó Xica e Tia Lola, que sempre me protegem e orientam meus passos;

À Profa. Deborah Helena pelo apoio, dedicação, compreensão e por toda orientação que me foi concedida;

Ao Prof. Marcelo Lima Ribeiro que sempre esteve presente durante toda a minha carreira científica, por me ajudar, por sua dedicação e por contribuir de maneira significativa para o meu desenvolvimento pessoal e profissional;

À Profa. Patrícia Carvalho que me orientou no desenvolvimento das análises bioquímicas;

À Profa. Alessandra Gambero que me orientou no desenvolvimento das análises relacionadas às respostas glicêmicas;

À Profa. Beth Torres pela alegria e por aceitar minha orientação temporária;

À Profa. Sandra Vívoló e ao Prof. Thomas Ong pelas preciosas sugestões oferecidas;

Aos amigos da UNIFAG que me ajudaram muito na parte experimental deste projeto em especial à Tanila e Karim que me ajudaram nas dietas empregadas e nas análises realizadas e ao Wlad pela ajuda com o PCR em tempo real;

À Marina F.F. Souza por ter realizado a análise dos compostos bioativos;

À minha querida Carol que sempre me ajudou nos momentos de dúvidas e nos momentos de fraqueza diante das dificuldades;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro para a realização do projeto e pela concessão da bolsa;

À Empresa Leão Jr. pela doação das amostras de chá-mate solúvel utilizadas;

Às secretárias da Faculdade de Saúde Pública, em especial a Sra. Alessandra Blaya, do Departamento de Nutrição, por sempre atender prontamente as minhas necessidades;

A todos vocês minha sincera admiração e muito obrigado!

RESUMO

Introdução: Atualmente a obesidade tem atingido proporções epidêmicas, evidências científicas mostram uma forte associação entre a obesidade e o maior risco para o desenvolvimento de diversas doenças tais como: doenças cardíacas, diabetes tipo II (mellitus), hipertensão e resistência à insulina. Bebidas à base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) têm importantes atividades biológicas, principalmente pelo alto teor de compostos polifenólicos existentes, que são reconhecidos por sua atividade antioxidante. Além dos compostos polifenólicos como flavonóides (quercetina e rutina) e ácidos fenólicos (ácido clorogênico e ácido cefeico), a erva-mate também é rica em cafeína e saponinas. Estudos recentes, com modelos animais e humanos demonstram inúmeros benefícios após o consumo de erva-mate, dentre estes, destaca-se sua atividade antioxidante, proteção ao DNA contra o dano induzido, atividade quimioprotetora celular, efeito na redução do LDL-colesterol, efeitos na motilidade intestinal, efeito vasodilatador, inibição da glicação e efeito termogênico. **Objetivo:** Avaliar os efeitos anti-obesidade do consumo de chá-mate em camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica. **Métodos:** Foram utilizados camundongos *Swiss* (n=62), eutróficos, machos, divididos aleatoriamente em diferentes grupos de acordo com a dieta utilizada (padrão ou hiperlipídica) e a intervenção escolhida (água ou chá-mate), por dezesseis semanas. Após a intervenção, as análises bioquímicas foram determinadas empregando-se o sistema Cobas-Mira e o quadro glicêmico foi determinado utilizando-se um glicosímetro seguido do ITT (teste de tolerância à insulina), a ação quimioprotetora ao DNA foi realizado pelo ensaio cometa; a expressão gênica das enzimas antioxidantes foi avaliada por PCR em tempo real. Para a significância dos dados foi utilizado análise de variância (ANOVA), seguido por Bonferroni's post hoc teste para comparações múltiplas. **Resultados:** A intervenção com chá-mate nos camundongos submetidos à dieta hiperlipídica foi capaz de melhorar os seguintes parâmetros avaliados: peso corpóreo, glicemia, resposta à insulina, colesterol, triacilglicerol e LDL-colesterol. O nível de danos ao DNA foi significativamente reduzido nos camundongos obesos tratados com chá-mate em todas as doses avaliadas, porém o consumo de chá-mate não modificou a expressão das enzimas antioxidantes avaliadas (SOD, GPx e Cat) independentemente da dose utilizada. **Conclusão:** O presente estudo

demonstra que o consumo do chá-mate pode influenciar de maneira positiva alguns biomarcadores relacionados com a obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.

Descritores: Chá-mate, *Ilex paraguariensis*, obesidade, estresse oxidativo, enzimas antioxidantes, perfil lipídico, resistência à insulina.

ABSTRACT

Introduction: Obesity has reached epidemic proportions, and there is a lot of evidence supporting the association of obesity with health conditions such as cardiovascular disease, diabetes, hypertension, and insulin resistance. Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) beverages have been reported to present biological activities attributed, mainly, to the it high polyphenol content, long known as antioxidants. In addition to the polyphenols such as flavonoids (quercetin and rutin) and phenolic acids (chlorogenic and caffeic acids), yerba maté is also rich in caffeine and saponins. Recently published evidences with animals and humans, has shown some beneficial effects related to the consumption of yerba maté, which include antioxidant activity, protecting effect on DNA against induced damage, chemopreventive activities, choleretic and intestinal effects, vasodilatation effects, inhibition of glycation and atherosclerosis and thermogenic effects.

Objective: We evaluated the anti-obesity effects of yerba maté in a high-fat diet in mice.

Methods: Sixty-two *Swiss* mice, were randomly assigned in different groups according to the diet and the intervention (mate-tea or water), for sixteen weeks. After intervention, the biochemical analysis was performed with Cobas-Mira system, the insulin test tolerance was determined by means of K_{ITT} , antioxidant activity were tested using Comet Assay and gene expression of antioxidant enzymes were evaluated by PCR *real time* . Statistical analysis was done using one-way ANOVA followed by unpaired Bonferroni. **Results:** Mate-tea intervention decreased in obese animals the following biochemical parameters: weight, glucose blood level, response to insulin, cholesterol, triglycerides and LDL-cholesterol. The DNA damage levels were significantly lower in obese animals treated with mate tea in all doses, but mate tea didn't affect the gene expression of antioxidant enzymes (SOD, GPx e Cat). **Conclusion:** In conclusion, this study reports that mate-tea may beneficial influence some biochemical markers related to high-fat diet induced obesity in mice.

Key words: Mate tea, *Ilex paraguariensis*, obesity, antioxidant activity.

ÍNDICE

1- Introdução	14
1.1- A obesidade e a saúde pública	14
1.2- Síndrome Metabólica	15
1.3- Resistência à Insulina	16
1.4- Adipocinas	17
1.5- Oxidação Biológica e formação de EROs	19
1.6- Estresse Oxidativo	21
1.7- Sistema antioxidante enzimático	22
1.8- Antioxidantes	23
1.9- Compostos fenólicos	24
1.10- Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	27
2- Justificativa	30
3- Objetivos	32
3.1- Objetivo Geral	32
3.2- Objetivos específicos	32
4- Material e Métodos	33
4.1- Material vegetal	33
4.2- Preparo dos extratos aquosos	33
4.3- Animais	33
4.4- Modelo de obesidade induzido por dieta	34
4.5- Desenho do experimento	34
4.6- Ganho de peso e crescimento	36
4.7- Consumo alimentar	36
4.8- Testes bioquímicos	36
4.9- Teste de Tolerância a Insulina (ITT)	37
4.10- Determinação da atividade antioxidante - <i>Ensaio Cometa</i>	37
4.11- Extração de RNA e síntese de cDNA	39
4.12- Quantificação da expressão por PCR em tempo real	39
4.13- Análise dos principais fitoquímicos	40
4.14- Análise estatística	41

4.15- Questões Éticas	41
5- Resultados	42
5.1- Modelo experimental de obesidade	42
5.2- Consumo Alimentar	43
5.3- Intervenção com <i>Ilex paraguariensis</i> em parâmetros antropométricos e bioquímicos	44
5.4- Determinação dos níveis de oxidação ao DNA – <i>Ensaio Cometa</i>	47
5.5- Análise da expressão gênica - PCR em tempo real	49
5.6- Avaliação dos fitoquímicos presentes no chá-mate utilizado	49
6- Discussão	51
7- Conclusão	61
8- Referências Bibliográficas	62
9- Anexos	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Doenças associadas à obesidade.	16
Tabela 2 – Dietas utilizadas no trabalho.	34
Tabela 3 – Grupos experimentais.	35
Tabela 4 – <i>Primers</i> utilizados para a PCR em tempo real.	40
Tabela 5 – Parâmetros clínicos e bioquímicos dos grupos submetidos à dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH) após 60 dias.	43
Tabela 6 – Controle do consumo alimentar após a intervenção com chá-mate.	43
Tabela 7 – Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos grupos submetidos à dieta padrão por 120 dias estudados após intervenção com chá-mate.	45
Tabela 8 – Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos grupos submetidos à dieta hiperlipídica por 120 dias estudados após intervenção com chá-mate.	46
Tabela 9 – Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos grupos submetidos à dieta padrão por 60 dias e dieta hiperlipídica por mais 60 dias estudados após intervenção.	47
Tabela 10 – Efeito da intervenção com chá-mate nos níveis de danos oxidativos ao DNA.	48
Tabela 11 – Efeito da intervenção com chá-mate na expressão das enzimas antioxidantes.	49
Tabela 12 – Concentração (mg/g) dos principais fitoquímicos presentes no chá-mate utilizado.	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de sinalização da insulina e captação da glicose.	17
Figura 2: Redução tetravalente do O ₂ a água e geração dos intermediários.	20
Figura 3: Esquema das defesas antioxidantes enzimáticas.	23
Figura 4: Estrutura química do ácido cafeico (I) e do ácido clorogênico (II).	26
Figura 5: Administração do chá-mate com cânula orogástrica.	35
Figura 6: Animais submetidos à dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH) após 60 dias.	42
Figura 7: Perfil dos compostos bioativos por HPLC do chá-mate utilizado a 272nm e 323nm.	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Obesidade e a Saúde Pública

A obesidade é um dos maiores problemas enfrentados pela saúde pública na atualidade (Guzik et al., 2006). No Brasil, as mudanças demográficas, sócio-econômicas e epidemiológicas ao longo do tempo culminaram na transição dos padrões nutricionais, que compreende a diminuição progressiva da desnutrição e o aumento da obesidade (Monteiro et al., 1995; Francisch et al., 2001). Isso se torna um problema de saúde pública, uma vez que as conseqüências da obesidade para a saúde são muitas, e variam do risco aumentado de morte prematura a graves doenças não letais, mas debilitantes que afetam diretamente a qualidade de vida dos indivíduos. De acordo com a classificação estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998), 54% dos adultos nos Estado Unidos estão com sobrepeso (índice de massa corporal - IMC $\geq 25\text{kg/m}^2$) e 22% estão obesos (IMC $\geq 30\text{kg/m}^2$). O primeiro, segundo e terceiro National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES-I a III), conduzidos nos Estados Unidos de 1971-74, 1976-80 e 1988-91, respectivamente, mostraram que, apesar dos 33 bilhões de dólares movidos pela indústria de “como perder peso”, o número de casos de obesidade vem aumentando significativamente sem diferenças raciais ou sociais. Em 1976- 80, a estimativa feita pelo NHANES mostrou que 25,4% dos adultos entre 20-74 anos apresentavam IMC $> 27,5\text{kg/m}^2$, enquanto a estimativa realizada em 1988-91 aumentou para 33,3% (Kuczmarski et al., 1994). Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) demonstram que no ano de 2003, 40,6% da população brasileira adulta encontrava-se com sobrepeso e 11,1% estava obesa (IBGE, 2003).

1.2. Síndrome Metabólica

Há forte associação da obesidade com diversas doenças (tabela 1) (Jung, 1997). Em 1988 foi introduzido o conceito de síndrome X – atualmente denominada “Síndrome Metabólica (SM)” para descrever um conjunto de anormalidades metabólicas e hemodinâmicas, freqüentemente presentes no indivíduo obeso (Reaven, 1994). A prevalência da síndrome metabólica é estimada entre 20 a 25% da população mundial, com comportamento crescente nas últimas décadas (Dunstan et al., 2002). Esta prevalência é ainda maior entre homens e mulheres mais velhos, chegando a 42% entre indivíduos com idade superior a 60 anos (Isomaa et al., 2001). Indivíduos com síndrome metabólica apresentam risco 2 a 3 vezes maior de morbidade cardiovascular que indivíduos saudáveis (Isomaa et al., 2001). Os dados de prevalência mundial da síndrome metabólica são muito preocupantes, já que este quadro é preditor de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Isomaa et al., 2001). Considerando que existam cerca de 200 milhões de pacientes diabéticos em todo o mundo e que 80% irão falecer devido a doenças cardiovasculares, deste modo as pesquisas médicas estão voltadas na identificação de possíveis marcadores da síndrome metabólica que possam auxiliar no combate à progressão da atual epidemia (Diabetes atlas, 2003). Hoje é amplamente conhecido o papel da resistência à insulina (RI) como elo entre a obesidade de distribuição central, intolerância à glicose, hipertensão arterial, dislipidemia, distúrbios da coagulação, hiperuricemia e microalbuminúria, integrantes da síndrome metabólica “ampliada” (DeFronzo et al., 1991; Reaven, 1994; Timar et al., 2000).

Tabela 1 – Doenças associadas à obesidade.

Cardiovasculares	✓ Hipertensão	Região Torácica	✓ Câncer de mama
	✓ Doença Coronariana		✓ Ginecomastia
	✓ Acidente Vascular Cerebral		
	✓ Veias varicosas	Útero	✓ Câncer endometrial
	✓ Trombose venosa profunda		✓ Câncer cervical
		Urológico	✓ Câncer de próstata
Respiratória	✓ Apnéia durante o sono	Pele	✓ Incontinência Urinária
			✓ Micose
			✓ Linfodemas
Gastrointestinais	✓ Hérnia de hiato	Endócrinas	✓ Celulites
	✓ Cálculo na vesícula biliar		✓ Acanitose
	✓ Cirrose e Esteatose hepática		
Metabólicas	✓ Hemorróida	Gravidez	✓ Redução na resposta à prolactina
	✓ Câncer colorrectal		✓ Aumento do cortisol livre na urina
			✓ Hiperandrogenismo
Neurológica	✓ Hiperlipidemia	Renal	✓ Síndrome do ovário policístico
	✓ Resistência à Insulina		
	✓ Diabetes Mellitus		
Ortopédicas	✓ Bloqueio Nervoso		✓ Complicações Obstétricas
	✓ Osteoartrite		✓ Macrognitossomia
	✓ Gota		✓ Defeitos no tubo neural
			✓ Proteinúria

(modificado de Jung, 1997)

1.3. Resistência à insulina (RI)

A insulina desencadeia uma série de respostas biológicas e os principais tecidos alvos para a regulação homeostática da glicose incluem o fígado, o tecido muscular e o tecido adiposo. Os efeitos biológicos da insulina iniciam-se após a ativação do seu receptor, o que resulta na fosforilação em tirosina de vários substratos protéicos intracelulares incluindo os substratos receptores de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) (Kahn et al., 1993; Van Obberghen 1994). Estes substratos quando fosforilados em tirosina se associam e interagem com a subunidade p85 da enzima fosfatidilinositol 3 quinase (PI-3q), que por sua vez ativa a proteína AKT. Esta proteína é capaz de estimular a captação da glicose via transportador de glicose (GLUT-4), síntese de glicogênio no fígado e no músculo e a lipogênese no tecido adiposo (Figura 1) (Tozzo et al., 1995; Kuo et al., 2004; Huang et al., 2007). Diversos trabalhos mostram que um aumento na produção de adipocinas como o fator de necrose

tumoral alpha (TNF- α) inibe a fosforilação da tirosina-quinase do IRS, resultando em defeitos na sinalização da insulina que conseqüentemente leva à resistência à insulina (RI) afetando desta forma o transporte de glicose (Rotter et al., 2003; Csehi et al., 2005; Zhang et al., 2008).

Figura 1: Mecanismo de sinalização da insulina e captação da glicose. (modificado de Araújo, 2005)

1.4. Adipocinas

Embora os mecanismos moleculares de desenvolvimento da obesidade não estejam bem estabelecidos, sabe-se que esta condição está associada com uma inflamação crônica na qual o tecido adiposo desempenha um importante papel (Yudkin et al., 1999; Bulló et al., 2003). Estudos recentes mostram que o tecido adiposo não é somente um reservatório de energia, mas que exerce importantes funções no sistema endócrino, metabolismo e na regulação homeostásica (Guzik et al., 2006).

As células do tecido adiposo, denominadas adipócitos, estocam energia na forma de triacilglicerol e podem mobilizar essas reservas para ser utilizada durante períodos de

privação energética (Large et al., 2004). Além disso, os adipócitos produzem uma variedade de moléculas biologicamente ativas conhecidas como adipocinas (Furukawa et al., 2004). Alguns estudos mostram que a produção desregulada das adipocinas como o inibidor da ativação do plasminogênio-1 (PAI-1) (Shimomura et al., 1996), fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) (Hotamisligil et al., 1993; Uysal et al., 1997), interleucina – 6 (IL-6) (Fried et al., 1998), MCP-1 (Sartipy et al., 2003) e angiotensinogênio (Hainault et al., 2002), adiponectina (Berg et al., 2002; Tsao et al., 2002, Matsuzawa et al., 2004) e leptina (Friedman & Halaas, 1998; Unger, 2003) estão envolvidas na patogenicidade da síndrome metabólica (SM). Algumas destas, além de exercer sua atividade pró-inflamatória também poderiam afetar os mecanismos ligados à sinalização da insulina.

Porém os mecanismos que elucidam como o acúmulo de gordura leva à expressão desregulada das adipocinas ainda não estão totalmente esclarecidos. Diversos autores reportaram elevados níveis séricos de adipocinas em animais e humanos com excesso de adiposidade (Zhang et al., 1994; Samad e Loskutoff, 1996; Ahima e Flier, 2000). De modo complementar, a redução da massa de gordura está relacionada a uma redução nos níveis destas citocinas (Dandona et al., 1998; Ziccardi et al., 2002).

Alguns trabalhos mostram uma relação direta entre o acúmulo de gordura nos adipócitos e o aumento do estresse oxidativo, mostrando que o aumento de ácido graxos armazenados nos adipócitos estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela ativação da via NADPH oxidase além de mostrarem uma redução na produção das enzimas antioxidantes (Furukawa et al., 2004).

1.5. Oxidação Biológica e formação de EROs

Para obtenção de energia a maioria dos organismos vivos dispõe de um processo aeróbico, a respiração. Este processo possibilita o aproveitamento máximo das moléculas alimentares energéticas, porque utiliza uma sequência crescente em eletronegatividade ou poder oxidante, sendo o oxigênio o aceptor final de elétrons. A respiração ocorre por meio de sistemas enzimáticos que se encontram aderidos às membranas internas da mitocôndria, organela citoplasmática que apresenta como uma de suas principais características morfológicas dobramentos internos denominados de cristas. Estas cristas têm por objetivo ampliar a superfície das membranas internas, aumentando assim, a área de adesão do sistema enzimático, denominado cadeia respiratória ou cadeia de transporte de elétrons (Signorini et al., 1995).

A Figura 2 ilustra a sequência oxidativa da respiração, como pode ser observado a cadeia respiratória produz como intermediários o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroperoxila ($HOO^{\cdot}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), compostos que podem ser tornar subprodutos (Ferreira & Matsubara, 1997).

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroperoxila ($HOO^{\cdot}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), além de compostos que não fazem parte da cadeia respiratória como o oxigênio singlete (1O_2) e o radical peroxila ($ROO^{\cdot}$), recebem de forma mais adequada, a denominação espécies reativa de oxigênio (EROs) (Abdalla, 2006).

O termo radical livre, geralmente utilizado, designa um átomo ou grupo de átomos com um elétron desemparelhado, ou seja, com um elétron ímpar em sua órbita mais externa (Halliwell & Gutteridge, 2000). Portanto, entre as espécies derivadas do oxigênio molecular, somente o ânion superóxido, o radical hidroperoxila e o radical hidroxila podem ser realmente considerados radicais livres, e são representados pela adição de um ponto

como índice de reatividade. O ânion superóxido recebe ainda um traço, representando o seu número de oxidação negativo. As EROs são, portanto, compostos altamente reativos que buscando adquirir estabilidade, durante sua breve existência, reagem com a matéria circundante, causando danos às estruturas celulares como membrana celular, DNA e proteínas (Cross et al, 1987; Ames et al., 1993; Wiseman & Halliwell, 1996).

Figura 2: Redução tetravalente do O_2 a água, com a entrada de quatro elétrons e quatro H^+ para cada molécula de oxigênio, e geração dos intermediários (1) ânion superóxido, (2) radical hidroperoxila, (3) peróxido de hidrogênio e (4) radical hidroxila. (modificado de Wiseman & Halliwell, 1996).

Os metais podem ter impacto na formação de espécies reativas de oxigênio. O ferro (Fe) por sua abundância nos organismos vivos destaca-se como o principal agente, embora o cobre (Cu) também possa ser um agente na formação. A ação dos metais é demonstrada em dois tipos de reações: reação de Fenton e reação de Haber-Weiss.

Na reação de Fenton, o Fe^{+2} reage com oxigênio formando o Fe^{+3} e o ânion superóxido. O ânion superóxido reage com íons hidrogênio, resultando em peróxido de hidrogênio que reage novamente com o Fe^{+2} , formando o radical hidroxila.

Na reação de Haber-Weiss, o Fe^{+3} e ânion superóxido se regeneram, formando Fe^{+2} e o O_2 . O Fe^{+2} resultante reage com o peróxido de hidrogênio e forma o radical hidroxila (Ferreira & Matsubara, 1997).

1.6. Estresse Oxidativo

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

O estresse oxidativo tem sido relacionado com a fisiopatologia de várias doenças, incluindo doenças associadas à síndrome metabólica tais como as cardiopatias, aterosclerose e alguns tipos de câncer (Halliwell & Gutteridge, 2000).

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

1.7. Sistema antioxidante enzimático

O sistema antioxidante enzimático (Figura 3) constitui a primeira defesa endógena a agir aos ataques das espécies reativas de oxigênio, impedindo sua formação ou sequestrando-as de forma a impedir sua interação com alvos celulares (Rover Júnior et al. 2001).

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

A GPx, é uma enzima antioxidante dependente de selênio, catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de outros peróxidos orgânicos, às custas da conversão da glutathiona reduzida (GSH) a glutathiona oxidada (GSSG) e água (H_2O) e peróxidos orgânicos a álcool. Assim, a GPx desempenha um papel importante na inibição de processos degenerativos como a peroxidação lipídica e na prevenção de danos causados ao DNA pelas espécies reativas (Martins, 2007).

A Catalase é uma hemoproteína citoplasmática localizada nos peroxissomos do fígado e rins e em microperoxissomos de outras células, essa enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água (H_2O) e oxigênio (O_2) (Rojkind et al., 2002).

No entanto, estes mecanismos de defesa contra as EROs no organismo humano podem ser insuficientes e os danos causados podem se tornar cumulativos e resultar em estresse oxidativo debilitante. Por isso, torna-se essencial acrescentar à dieta alimentos

antioxidantes que ampliem a sua capacidade de inativar estas espécies instáveis (Ames, 1993).

Figura 3: Esquema das defesas antioxidantes enzimáticas, mostrando a geração de espécies reativas. Mitocôndria, NADPH oxidase ou xantina oxidase e outros sistemas convertem (O_2) em ($O_2^{\cdot-}$), o qual é dismutado pela superóxido dismutase (SOD), H_2O_2 pode ser convertido em H_2O pela catalase (CAT) e/ou glutatona peroxidase (GPx), ou o H_2O_2 pode formar radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) após reação com Fe^{+2} . A GPx reduz todos os hidroperóxidos além do H_2O_2 utilizando glutatona reduzida (GSH), um doador de hidrogênio. Outra enzima, a glutatona redutase (GR), mantém o equilíbrio entre (GSH) (99%) e glutatona oxidada (GSSG 1%). (modificado de Griending & Fitzgerald, 2003).

1.8. Antioxidantes

Antioxidante é qualquer substância que, presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, reduz significativamente ou previne a oxidação destas substâncias (Becker et al., 2004).

Os alimentos de origem vegetal das mais variadas espécies são fontes de diversos compostos que apresentam atividade antioxidante natural (Moller & Loft, 2006). Diversos estudos demonstram a importância do consumo de alimentos que contenham substâncias

com atividade antioxidante para a prevenção de doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares, câncer e desordens cerebrais degenerativas relacionadas ao envelhecimento (Chu et al., 2000; Luximon-ramma et al., 2003; Liyana-pathirana & shahida, 2006).

Um dos principais grupos de antioxidantes encontrados nas plantas são os compostos fenólicos, estes por sua vez além da atividade antioxidante, também demonstram outras atividades biológicas importantes, tais como: atividades antiinflamatória, antialérgica, antimicrobiana e anticarcinogênica (Schinella et al., 2000; Filip et al., 2000; Gorzalczany et al., 2001; Bastos & Torres, 2003; Bracesco et al., 2003, Chandra & Mejia, 2004; Lunceford & Gugliucci, 2005; Mosimann et al., 2006).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é devida principalmente às suas propriedades de oxido-redução, que permite eles atuarem como agentes redutores ou doadores de hidrogênio. Além disso, eles também apresentam um potencial quelante de metais, favorecendo desta forma sua ação antioxidante (Willams et al., 2004).

1.9. Compostos Fenólicos

A classe de compostos fenólicos engloba desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (Bravo, 1998). Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (Croft, 1998). São conhecidos mais de 8.000 compostos e têm sido associados a várias funções, dentre elas à atividade antioxidante (Dreosti, 2000). Esses compostos ocorrem naturalmente em frutas frescas, vegetais, nos chás e nos vinhos tintos e fazem parte integral da dieta humana (Manach et al., 2004).

Acredita-se que a biodisponibilidade e atividade biológica dos polifenóis está diretamente relacionada com sua estrutura química e, além disso, exista uma variabilidade

individual sobre o metabolismo e biodistribuição desses compostos em humanos (Monteiro et al., 2007).

Os compostos fenólicos de fontes vegetais podem ser divididos em dois grupos:

- os flavonóides e seus derivados;
- os ácidos fenólicos e seus derivados.

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

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção de diversas doenças (Manach et al., 2004).

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal. O terceiro grupo é representado pelos ácidos fenólicos que, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também se ligar entre si ou com

outros compostos. A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido cafeico, o qual, associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico (Figura 4) (Soares, 2002).

Os ácidos clorogênicos são um conjunto de 5 grupos principais de compostos fenólicos e seus isômeros formados, principalmente, pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos derivados do ácido cinâmico: o ácido cafeico, o ferúlico, ou o p-cumárico. O ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) é o mais relatado dentro desta classe de substâncias, sendo absorvido no intestino antes e após a metabolização por bactérias (Olthof et al., 2001 e 2003). Durante as últimas décadas, os efeitos protetores do ácido clorogênico (ACG) sobre os sistemas biológicos foram abordados em diferentes estudos *in vitro* e *in vivo*. Há diversos estudos que avaliaram produtos ricos em ACG na prevenção do câncer, doenças cardiovasculares entre outras (Waterman & Mole, 1994; Bravo, 1998; Karakayas, 2001; Mancine-Filho & Moreira, 2003; Giada & Mancine-Filho, 2004).

Figura 4: Estrutura química do ácido cafeico (I) e do ácido clorogênico (II).

1.10. Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta nativa da América do Sul crescendo naturalmente em países como a Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil (Heck & Mejla, 2007). O consumo de bebidas a base de erva-mate remonta centenas de anos. Os indígenas das nações Guaraní e Quíchua tinham o hábito de beber infusões com suas folhas.

A maior parte da erva-mate produzida na América do Sul destina-se ao consumo na forma de chimarrão, no entanto, o mercado para bebidas a base de chá-mate tem crescido a cada ano, seja pelos benefícios à saúde que começam a ser veiculados pela mídia seja pelo lançamento de novos produtos com maior aceitação pelo público, como as bebidas prontas para beber aromatizadas com aroma natural de frutas (maçã, pêssego) (Esmelindro et al., 2002 e Bastos & Torres, 2003). A erva-mate também pode ser consumida sob outras formas, como o tererê que constitui a bebida obtida pela maceração da erva em água fria ou gelada, forma como é ingerida, principalmente na região centro-oeste do Brasil ou ainda sob a forma de chá-mate, sendo essa bebida produzida a partir da infusão da erva-mate que sofreu processo de torrefação (Bastos & Torres, 2003).

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

A *Ilex paraguariensis* é utilizada na medicina popular e recomendada por herboristas para artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade,

fadiga, retenção de líquido, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas. Devido a estas propriedades, a erva-mate encontra-se incluída em importantes farmacopéias como a Martindale e a British Herbal Pharmacopeia. (Anesini et al., 2006).

Os principais compostos bioativos presentes na erva-mate são os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas. Nesta última classe de compostos podemos citar a cafeína, a teobromina e a teofilina (Alikaridis, 1987), componentes de reconhecida ação sobre o sistema nervoso central, aos quais é atribuída a ação estimulante do mate. Dentre a classe de saponinas encontram-se tripenóides como as gliconas, os ácidos ursólico e oleanólico (Gnoatto et al., 2007), tais substâncias são responsáveis pelo amargor e espuma do mate, além de outras propriedades biológicas (Gnoatto et al., 2007). Entre os compostos fenólicos destaca-se o elevado conteúdo de derivados cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico (ACGs) e seus isômeros, aos quais se atribui a ação adstringente e antioxidante do produto (Clifford, 1990 e Cardozo-Junior et al., 2007). Além do ácido clorogênico, os flavonóides rutina, quercetina, diglicosídeo de luteolina, taninos e a cafeoilglicose também estão presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (Ricco et al., 1991; Carini et al., 1998; Filip et al., 2001).

O interesse no potencial uso da erva-mate para a promoção de saúde é relativamente recente. Em meados da década de 90 foram publicados os primeiros trabalhos que demonstraram a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de infusões de erva-mate verde e seca (chimarrão) (Gugliucci, 1996; Gugliucci e Stahl, 1995 e Campos et al., 1996). No estudo realizado por Bastos e colaboradores (2007), os extratos de erva-mate verde e tostada apresentaram atividade antioxidante *in vitro* superior à do chá verde (*Camelia sinensis*). Outras pesquisas demonstraram que a erva-mate apresentava atividade antioxidante equivalente ou superior à vitamina C e a vitamina E, substâncias consideradas

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

A grande maioria das pesquisas aqui relatadas foi conduzida com a erva-mate beneficiada para chimarrão, isto é, a erva-mate verde seca e cancheada. A torrefação promove mudanças na composição química da erva-mate, como a degradação de cafeína e ácidos fenólicos e a formação de melanoidinas, pirazinas e pirinas, assim como altera a cinética de extração dos compostos bioativos (Bastos et al., 2006), o que pode levar a modificações na biodisponibilidade e em atividades biológicas, como a atividade antioxidante.

2. JUSTIFICATIVA

O estado de saúde ou de doença de um indivíduo não está apenas relacionado à sua herança genética ou exclusivamente à sua interação com o ambiente, é preciso considerar o fenótipo, que integra o genoma humano e os fatores ambientais. A ingestão de alimentos e a exposição aos nutrientes e a outros componentes dos alimentos são identificados como elementos-chave na patogenia e progressão de doenças poligênicas relacionadas à dieta. É de conhecimento geral que muitas doenças crônicas e aquelas derivadas do envelhecimento estão relacionadas com a Nutrição.

Apesar da complexidade da pesquisa em doenças crônicas, as ferramentas de biologia molecular oferecem a melhor expectativa para a compreensão os processos moleculares que mantêm a saúde e previnem o desenvolvimento destas doenças. Substâncias bioativas, nutrientes ou não, presentes nos alimentos, que fazem parte da dieta, podem interferir na expressão gênica prevenindo a instalação de doenças crônicas não transmissíveis como a diabetes tipo 2, a obesidade, as doenças cardíacas e o câncer.

As bebidas a base de erva-mate apresentam diversos compostos bioativos e a sua atividade antioxidante e quimioprotetora já foram demonstradas em modelos biológicos. Além do mecanismo de captação de radicais livres já demonstrado, é provável que o consumo prolongado deste produto exerça influência em mecanismos gênicos, mais especificamente através da expressão de enzimas antioxidantes. Esta hipótese deriva da sua composição em compostos fenólicos que comprovadamente já demonstraram esta habilidade.

Este projeto visa avaliar a atividade biológica (ação quimioprotetora do DNA) da erva-mate tostada através da técnica do ensaio cometa, avaliar a expressão gênica das

enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) através da PCR em tempo real e avaliar parâmetros bioquímicos relacionados com a obesidade em camundongos tornados obesos através de uma dieta hiperlipídica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade biológica da infusão de erva-mate tostada na obesidade induzida por dieta em camundongos.

3.2. Objetivos específicos

Após conduzir ensaio em que camundongos (obesos e não obesos) consomem chá-mate em duas diferentes concentrações, pretendeu-se:

- Avaliar a capacidade quimioprotetora do DNA das duas concentrações de erva-mate através do ensaio cometa em tecido hepático e linfócitos;
- Avaliar a capacidade de proteção celular nos tecidos supracitados após o desafio com peróxido de hidrogênio (H_2O_2);
- Verificar modificações na expressão gênica das enzimas antioxidantes (SOD, Cat e GPx) no tecido adiposo, hepático e no sangue por meio da técnica de PCR *real time*;
- Avaliar o perfil lipídico por meio dos níveis de colesterol e frações (HDL, LDL) e níveis de triacilglicerol;
- Avaliar a possível reversão da resistência a insulina induzida pela obesidade através do Teste de Tolerância a Insulina (ITT);
- Quantificar os principais fitoquímicos presentes no chá-mate utilizado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

O chá-mate solúvel foi doada pela empresa Leão Jr. Curitiba, Paraná. Um único lote foi utilizado para todo o experimento.

4.2. Preparo dos extratos aquosos

Alguns trabalhos recentes do nosso grupo (Miranda et al., 2008; Martins et al., 2008; Oliveira et al., 2008) demonstraram resultados mais expressivos utilizando-se intervenções com chá-mate na concentração de 1,0g e 2,0g por quilo corpóreo, deste modo os experimentos do presente projeto foram realizados com erva-mate tostada solubilizada em água nas concentrações de 1,0 g.kg⁻¹ e 2,0 g.kg⁻¹, administrando-se o mesmo volume de chá nas duas concentrações.

4.3. Animais

Foram utilizados 62 camundongos *Swiss*, machos, com peso variando entre 20 e 25 g e idade média de três meses provenientes do CEMIB (Centro de Bioterismo da UNICAMP). Todos os animais ficaram alojados no Biotério do Laboratório de Biologia Molecular e Imunofarmacologia da UNIFAG/USF e passaram por um período de adaptação às condições ambientais durante uma semana. Os animais foram mantidos em um período claro/escuro de 12h, temperatura 22°C ±3 e de umidade 55% ± 3, com livre acesso a água e ração. Estes foram distribuídos em grupos experimentais de acordo com o tratamento e dose utilizada.

4.4. Modelo de obesidade induzida por dieta

O modelo experimental que mais se assemelha a grande parte da obesidade humana é o modelo de obesidade exógena, onde é oferecido ao animal um maior aporte calórico através de uma sobrecarga de carboidratos ou gordura, isoladamente ou em associações. A Tabela 2 ilustra as dietas usadas no presente trabalho.

Tabela 2 – Dietas utilizadas no trabalho.

	Dieta Padrão		Dieta Hiperlipídica	
	g.kg ⁻¹	kcal.kg ⁻¹	g.kg ⁻¹	kcal.kg ⁻¹
Amido de milho	397,5	1590	115,5	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Amido dextrinado	132	528	132	528
Banha de porco	-	-	312	2808
Óleo de Soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Minerais	35	-	35	-
Vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Colina	2,5	-	2,5	-
Total	1000	3948	1000	5358

4.5. Desenho do experimento

Inicialmente os animais foram divididos em dois grupos: um deles alimentados com a dieta padrão (DP), e o outro com dieta hiperlipídica (DH) por sessenta dias. Depois destes sessenta dias os animais foram subdivididos aleatoriamente de acordo com a dieta e a

intervenção escolhida. A intervenção consistiu na administração de uma dose diária durante 60 dias (Tabela 3). A administração das substâncias foi realizada com auxílio de uma cânula orogástrica que garantiu a ingestão. (Figura 5)

Figura 5: Administração do chá-mate com cânula orogástrica.

Tabela 3 – Grupos experimentais.

Grupos	Dieta		Intervenção	Nº. animais
	60 dias	60 dias		
Grupo I	DP	DP	Água	10
Grupo II	DP	DP	Mate 1,0 g.kg ⁻¹	06
Grupo III	DP	DP	Mate 2,0 g.kg ⁻¹	06
Grupo IV	DH	DH	Água	10
Grupo V	DH	DH	Mate 1,0 g.kg ⁻¹	06
Grupo VI	DH	DH	Mate 2,0 g.kg ⁻¹	06
Grupo VII	DH	DP	Água	06
Grupo VIII	DH	DP	Mate 1,0 g.kg ⁻¹	06
Grupo IX	DH	DP	Mate 2,0 g.kg ⁻¹	06

DP = Dieta padrão, DH = dieta hiperlipídica utilizada.

4.6. Ganho de peso e crescimento

Os animais foram pesados semanalmente com auxílio de uma balança digital (plenna) durante todo o experimento, para avaliar o ganho de peso e crescimento.

4.7. Consumo alimentar

A ingestão alimentar dos animais foi avaliada a cada dois dias durante toda a etapa de intervenção com o chá-mate, através do peso da dieta utilizada. Para se obter a quantidade ingerida por animal era ofertado ao mesmo 50g de dieta (padrão ou hiperlipídica) e após dois dias pesava-se novamente a quantidade de ração existente no comedouro. Para o cálculo de quantidade ingerida utilizava-se da seguinte fórmula:

$$50 \text{ g} - \text{Quant. de dieta existente no comedouro (g)} = \text{Quant. ingerida (g)}$$

4.8. Testes bioquímicos

Após 60 dias e ao final da intervenção os animais foram anestesiados (ketamina/xilazina (1:1 v/v) e amostras do sangue foram coletadas através de punção cardíaca. O soro foi obtido pela centrifugação (800 x G) do sangue por 10 min e imediatamente a concentração do colesterol total (CHOL), triacilglicerol (TG) e lipoproteína de alta densidade (HDL) foram determinadas usando o sistema Cobas-Mira (Roche Diagnostics, USA). A lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi calculada utilizando a Fórmula de Friedwald em que:

$$\text{LDL colesterol (mg/dL)} = \text{total CHOL} - \text{TG}/5 - \text{HDL colesterol.}$$

4.9. Teste de Tolerância a Insulina (ITT)

Após 12 horas de jejum, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (I.P) de ketamina/xilazina (1:1 v/v) e as amostras sanguíneas foram obtidas da artéria caudal. Após a coleta da glicemia basal com auxílio de um glicosímetro, foi administrado insulina (1,5 U/kg) por injeção I.P, e coletadas as amostras após 0, 10, 15, 20 e 30 minutos para determinação dos níveis séricos de glicose. A constante da curva glicêmica (K_{ITT}) foi obtida após as coletas realizadas, utilizando-se a formula $^{0,693}/_{t_{1/2}}$. (Bonora et al., 1987).

4.10. Determinação da atividade antioxidante – Ensaio cometa

Após o sacrifício dos animais, o sangue e o tecido hepático foram isolados, e congelados apropriadamente em freezer -80°C para a determinação dos danos oxidativos ao DNA.

A avaliação dos danos oxidativos ao DNA de linfócitos e do tecido hepático foi feita por meio do ensaio cometa (*comet assay*). Através desta técnica foi possível detectar danos no DNA em linfócitos e nas células hepáticas. A análise de danos foi feita de acordo com o Pool-Zobel et al (1994). Resumidamente, 1,5 ml de sangue foram postos cuidadosamente sobre 1,5 ml de HISTOPAQUE -1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e centrifugados a 400G a 20°C por 30 min. Após descartar o plasma os linfócitos foram transferidos para um novo tubo, lavados com 4 ml de solução de Hank's (HBSS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e centrifugados 100G a 20°C por 15 min. Descartado o sobrenadante, as amostras foram ressuspensas em 500 µl de Hank's.

Alíquotas foram retiradas para avaliar a viabilidade celular, foram descartadas aquelas com viabilidade inferior a 75%.

A fim de avaliar o possível efeito protetor contra danos oxidativos ao DNA, 200 µl da suspensão celular foi tratada com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 100 µM a 4°C por 30 min.

A versão alcalina do ensaio do cometa foi realizada de acordo com Singh *et al.* (1988). Em suma, 10 µl da suspensão celular previamente obtida foram misturados à agarose *low melting point* 0,5 % (Promega), postos sobre uma lâmina e cobertos com uma lamínula. Estas foram imersas em uma solução de lise gelada (NaCl 2,5 M, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% SDS, pH 10 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) e permaneceram a 4°C *overnight*. Este procedimento removeu o citoplasma e a maior parte das proteínas nucleares, deixando o DNA *supercoiled* em um formato nucleóide. A presença de quebras no DNA relaxa a espiralização do DNA e a subsequente eletroforese alcalina relaxa ainda mais as alças do DNA, que ficaram, após a eletroforese, com o aspecto de um cometa. O tamanho da cauda de cometa reflete a extensão das rupturas das hélices de DNA, e pode ser quantificado por métodos de intensificação de imagem e análise computacional.

Após a lise, as lâminas foram expostas a um tampão alcalino (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH~13,4) por 40 min a 4°C. A eletroforese foi realizada neste tampão a 4°C por 30 min a 25V e 300 mA. Após a corrida as lâminas foram neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5), coradas com *SYBR Safe™* (Invitrogen) e analisadas com um microscópio de fluorescência. Cem células foram aleatoriamente selecionadas (50 de cada réplica) e analisadas usando o *software* Komet 5.5 (Kinetic Imaging, USA).

4.11. Extração de RNA e síntese de cDNA

Uma biópsia de cada um dos tecidos selecionados foi destinada à extração de RNA. Para a estabilização e proteção do RNA, após o sacrifício, todas as amostras destinadas a este fim foram armazenadas em *RNAlater* (QIAGEN, Valencia, CA, USA) a -80°C até o momento da extração do RNA. Esta foi feita usando-se o *RNeasy*[®] *tissue kit* (QIAGEN) seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração, ~25 µg de RNA foram usados para a síntese do cDNA usando o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com Xin et al. (2004).

4.12. Quantificação da expressão por PCR em tempo real

A análise de expressão dos genes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, e do gene constitutivo β-actina foram feitas por meio da PCR em tempo real. Os primers utilizados neste estudo foram desenhados com o auxílio do site <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm> e acham-se descritos na Tabela 4. A reação de PCR em tempo real foi feita usando o Platinum[®] SYBR GREEN[®] qPCR Supermix UDG (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. As amostras foram cicladas no equipamento 7300 Real-Time PCR System e analisadas com o auxílio do RQ Study Software (Applied Biosystems). Todas as reações foram feitas em triplicata e a média do C_t usada para avaliação da expressão gênica. As amostras foram normalizadas usando-se o controle constitutivo. A expressão relativa foi calculada de acordo com a fórmula $2^{(Rt-Et)}/2^{(Rn-En)}$ (Buckhaults et al., 2001).

Tabela 4 – *Primers* utilizados para a PCR em tempo real.

Gene	<i>Primer</i>	Seqüência (5'→3')
β-actina	Sense	GCTACAGCTTCACCACCACA
	Antisense	TCTCCAGGGAGGAAGAGGAT
SOD	Sense	TCAATGGTGGGGGACATATT
	Antisense	GCTTGATAGCCTCCAGCAAC
Catalase	Sense	CCTCGTTCAGGATGTGGTTT
	Antisense	TCTGGTGATATCGTGGGTGA
GPx	Sense	GGTTCGAGCCCAATTTTACA
	Antisense	CATTCCGCAGGAAGGTAAAG

SOD= Superóxido dismutase, GPx= Glutathione peroxidase.

4.13. Análise dos principais fitoquímicos

Concentração total de polifenóis

A concentração total de polifenóis foi determinada de acordo com o método de Folin Ciocalteau (Arabbi et al., 2004). O ácido clorogênico (Sigma, St. Louis-USA) foi utilizado como padrão.

Análise cromatográfica por *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em Fase Reversa*

O chá-mate solúvel foi avaliado sem outras modificações que a diluição em fase móvel, sempre que necessário para adequar as concentrações das substâncias de interesse à curva de calibração e com diluições apropriadas na fase móvel para a construção das curvas padrões.

Utilizou-se um cromatógrafo TSP (*Thermo Separation Products*) composto por uma bomba automática e um sistema automático de análise (*automatic Spectra Series Autosampler*) e um sistema de análise UV/VIS. Todos os módulos foram controlados por computador equipado com o programa System Manager SN4000 (SpectraSystem).

Empregou-se coluna de 4.6 x 250 mm, 5 μ m C18 foi para a separação. O volume injetado foi de 20 μ L. A Fase Móvel era composta de dois solventes: A) Água/ ácido acético (99,5:0,5 v/v) e B) metanol. A composição da fase móvel era 75% do solvente A e 25% do solvente B e a eluição foi isocrática com fluxo de 0.8 ml/min.. A identificação dos compostos fenólicos e metilxantinas foi baseada na comparação do tempo de retenção de substâncias desconhecidas em relação aos de padrões puros. A análise quantitativa foi realizada a 272 nm para cafeína e teobromina e 323 nm para ácido fenólico A quantificação foi realizada por uma calibração externa usando cinco distintos pontos da curva padrão. O coeficiente de correlação de Pearson (r) das curvas foram sempre superiores a 0,99. As determinações foram feitas em triplicatas.

4.14. Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado análise de variância (ANOVA), seguido por Bonferroni's post hoc teste para comparações múltiplas.

Todos os dados obtidos foram analisados usando o programa estatístico SPSS 12.0 (SPSS Inc., USA). Os resultados são apresentados como razões de chance com um intervalo de confiança de 95%. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

4.15. Questões éticas

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa da Universidade São Francisco- USF, campus Bragança Paulista onde foi desenvolvida a parte experimental (Anexo 1).

5. RESULTADOS

5.1. Modelo experimental de obesidade

No início do experimento os animais pertencentes aos grupos submetidos à dieta padrão apresentavam um peso corpóreo médio de 31,02g ($\pm 0,90$) e os animais pertencentes aos grupos submetidos à dieta hiperlipídica apresentavam um peso corpóreo médio de 30,54g ($\pm 0,67$), não demonstrando diferença significativa entre os grupos avaliados. Após 60 dias consumindo a dieta hiperlipídica (DH) os animais apresentaram uma alteração significativa no peso corpóreo, glicemia basal e resistência à insulina (K_{ITT}) quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 6). Além disso, observou-se também que os níveis de colesterol total (CHOL), triacilglicerol (TG) e LDL-colesterol foram significativamente mais elevados nos animais tratados por 60 dias com DH (tabela 5).

Figura 6: Animais submetidos a dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH) respectivamente após 60 dias.

Tabela 5 – Parâmetros clínicos e bioquímicos dos grupos submetidos a dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH) após 60 dias.

	Dieta Padrão	Dieta Hiperlipídica
Peso Corpóreo (g)	38,00 ± 1,39	51,81 ± 4,37*
Glicemia (mg/dL)	154,67 ± 36,78	284,60 ± 24,48*
ITT	2,75 ± 0,20	1,33 ± 0,18*
Colesterol total (mg/dL)	88,67 ± 6,43	203,00 ± 9,54**
TG (mg/dL)	132,00 ± 3,61	190,33 ± 5,69*
HDL (mg/dL)	40,67 ± 3,06	52,00 ± 4,58
LDL (mg/dL)	21,60 ± 1,35	113,33 ± 3,78**

* p < 0,05 e ** p < 0,01. ITT= Teste de tolerância à insulina, CHOL= Colesterol total, TG= Triacilglicerol, HDL= Lipoproteína de alta densidade, LDL= Lipoproteína de baixa densidade, ND = Não Determinado.

5.2. Consumo alimentar

Os dados do consumo alimentar após a intervenção com chá-mate acham-se descritos na Tabela 6. Em todos os grupos avaliados, independentemente da dieta recebida, não ocorreu modificação da quantidade ingerida ao longo dos 60 dias de intervenção.

Tabela 6 – Controle da ingestão alimentar após a intervenção com chá-mate.

	Dieta Padrão			Dieta Hiperlipídica			Dieta Hiperlipídica/Padrão		
	Controle	Mt 1g	Mt 2g	Controle	Mt 1g	Mt 2g	Controle	Mt 1g	Mt 2g
Quantidade ingerida (g)	39,71 (±6,23)	38,83 (±6,35)	41,36 (±6,26)	40,03 (±5,79)	39,80 (±6,36)	40,71 (±8,01)	36,51 (±6,24)	37,36 (±8,82)	36,75 (±5,88)

Os valores representam a média e o desvio padrão dos grupos avaliados. Mt 1g = Chá-mate na concentração de 1,0 g.kg⁻¹, Mt 2g = Chá-mate na concentração de 2,0 g.kg⁻¹.

5.3. Intervenção com *Ilex paraguariensis* em parâmetros antropométricos e bioquímicos

Os dados antropométricos bem como os resultados dos testes bioquímicos obtidos após a intervenção acham-se descritos nas tabelas 7-9. Em relação aos animais que receberam a dieta hiperlipídica durante todo o experimento (**GIV**, **GV** e **GVI**), os resultados do presente trabalho indicam que a intervenção, em ambas as concentrações testadas, alterou significativamente alguns dos parâmetros avaliados. O consumo de chá-mate a 1,0 g.Kg⁻¹ e 2,0 g.Kg⁻¹ levaram a uma redução significativa no peso corpóreo total dos camundongos, na glicemia basal e resistência à insulina (K_{ITT}). Além disso, ocorreu diminuição significativa nos níveis de colesterol, triacilglicerol e LDL (Tabela 8).

Para os animais que receberam a DH nos primeiros sessenta dias do estudo e, subseqüentemente, foram submetidos à dieta padrão (**GVII**, **GVIII** e **GIX**), os dados mostram que a intervenção com chá-mate, em ambas as doses, juntamente com a restrição calórica, resultou em alteração significativa em alguns dos parâmetros avaliados (peso corpóreo, glicemia basal, colesterol, triacilglicerol e LDL). Entretanto, os resultados são mais expressivos para os animais dos grupos em que houve administração de chá-mate, independentemente da dose (Tabela 9).

Tabela 7 – Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos grupos submetidos à dieta padrão por 120 dias estudados após intervenção com chá-mate.

	Dieta Padrão		
	GI (Água)	GII (Mt 1,0 g.Kg⁻¹)	GIII (Mt 2,0 g.Kg⁻¹)
Peso Corpóreo (g)	43,00 ± 1,41	41,50 ± 2,82	40,30 ± 2,82
Glicemia (mg/dL)	157,18 ± 17,93	162,00 ± 13,45	149,00 ± 8,72
ITT	2,89 ± 0,27	ND	ND
Colesterol total (mg/dL)	89,17 ± 5,73	83,00 ± 7,81	88,33 ± 8,5
TG (mg/dL)	129,00 ± 2,41	134,67 ± 6,51	138,67 ± 14,19
HDL (mg/dL)	39,67 ± 2,46	38,67 ± 7,02	39,00 ± 3,61
LDL (mg/dL)	21,60 ± 7,83	17,40 ± 5,00	21,60 ± 10,21

ITT= Teste de tolerância à insulina, CHOL= Colesterol total, TG= Triacilglicerol, HDL= Lipoproteína de alta densidade, LDL= Lipoproteína de baixa densidade, ND = Não Determinado.

Tabela 8 – Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos grupos submetidos à dieta hiperlipídica por 120 dias estudados após intervenção com chá-mate.

	Dieta Hiperlipídica		
	GIV (Água)	GV (Mt 1,0 g.Kg⁻¹)	GVI (Mt 2,0 g.Kg⁻¹)
Peso Corpóreo (g)	54,00 ± 10,09*	50,08 ± 9,85 [#]	51,91 ± 8,26 [#]
Glicemia (mg/dL)	289,32 ± 21,48*	201,33 ± 30,24 [#]	200,33 ± 25,79 [#]
K_{ITT}	1,35 ± 0,40*	2,42 ± 0,93 [#]	2,07 ± 0,60 [#]
Colesterol total (mg/dL)	189,00 ± 4,71*	160,33 ± 7,02 [#]	155,67 ± 14,29 [#]
TG (mg/dL)	199,13 ± 5,89*	126,67 ± 8,96 [#]	135,00 ± 8,89 [#]
HDL (mg/dL)	54,00 ± 4,78	47,67 ± 6,03	53,33 ± 4,51
LDL (mg/dL)	112,93 ± 5,12*	87,33 ± 11,04 [#]	75,33 ± 18,15 [#]

*p < 0,05, quando comparado ao grupo GI; [#]p < 0,05, quando comparado ao grupo GIV. ITT= Teste de tolerância à insulina, CHOL= Colesterol total, TG= Triacilglicerol, HDL= Lipoproteína de alta densidade, LDL= Lipoproteína de baixa densidade, ND = Não Determinado.

Tabela 9 – Parâmetros antropométricos e bioquímicos dos grupos submetidos à dieta padrão por 60 dias e dieta hiperlipídica por mais 60 dias estudados após intervenção.

	Dieta Hiperlipídica/Padrão		
	GVII (Água)	GVIII (Mt 1,0 g.Kg ⁻¹)	GIX (Mt 2,0 g.Kg ⁻¹)
Peso Corpóreo (g)	47,60 ± 2,88*	42,80 ± 4,82 [@]	42,50 ± 3,70 [@]
Glicemia (mg/dL)	246,00 ± 16,97*	177,33 ± 13,01 [@]	197,00 ± 11,14 [@]
K_{ITT}	ND	ND	ND
Colesterol total (mg/dL)	139,67 ± 4,04*	112,67 ± 7,57 [@]	115,33 ± 6,11 [@]
TG (mg/dL)	168,00 ± 4,58*	142,67 ± 5,86 [@]	139,67 ± 7,51 [@]
HDL (mg/dL)	47,00 ± 2,00	40,33 ± 7,64	41,33 ± 2,89
LDL (mg/dL)	59,07 ± 5,12*	53,80 ± 11,39	56,07 ± 5,78

*p < 0,05, quando comparado ao grupo GI;; [@]p < 0,05, quando comparado ao grupo GVII. ITT= Teste de tolerância à insulina, CHOL= Colesterol total, TG= Triacilglicerol, HDL= Lipoproteína de alta densidade, LDL= Lipoproteína de baixa densidade, ND = Não Determinado.

5.4. Determinação dos níveis de oxidação ao DNA – Ensaio Cometa

Os níveis de danos oxidativos ao DNA dos linfócitos e do tecido hepático foram avaliados por meio do ensaio cometa. Além disso, a resistência do DNA ao ataque induzido *ex vivo* por H₂O₂ foi avaliado como um indicador da capacidade antioxidante. Os resultados provenientes destas análises acham-se descritos na Tabela 10. Os animais dos grupos submetidos à dieta hiperlipídica durante 120 dias e que receberam a intervenção com chá-mate apresentaram uma redução significativa nos níveis de danos ao DNA quando comparados ao grupo controle hiperlipídico, independentemente da dose administrada e do tecido analisado. Além disso, o chá-mate não é genotóxico, pois os níveis de danos oxidativos ao DNA dos grupos que foram submetidos a uma dieta padrão durante todo o

experimento se mantiveram após o período de intervenção com chá-mate. Com relação ao efeito protetor contra danos oxidativos ao DNA induzidos por H_2O_2 , os resultados provenientes das análises dos linfócitos mostram que a intervenção com chá-mate foi capaz de reduzir de forma significativa os danos gerados nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica. No tecido hepático nossos resultados mostram que todos os grupos que sofreram a intervenção com chá-mate apresentou uma redução significativa nos níveis de danos ao DNA induzidos por H_2O_2 independentemente da dieta recebida.

Tabela 10 – Efeito da intervenção com chá-mate nos níveis de danos oxidativos ao DNA avaliada pelo *Ensaio cometa*.

Linfócitos		Danos ao DNA		Danos ao DNA induzidos por 100 μM de H_2O_2		
Dieta	DP	DH	DH / DP	DP	DH	DH / DP
(período)	(120 dias)	(120 dias)	(60 dias) / (60dias)	(120 dias)	(120 dias)	(60 dias) / (60dias)
Água	$2,00 \pm 0,54$	$5,91 \pm 0,58$	$4,21 \pm 0,32$	$3,82 \pm 1,37$	$7,97 \pm 0,64$	$5,31 \pm 0,63$
Mate 1,0 g.kg⁻¹	$1,66 \pm 0,24$	$4,71 \pm 0,86^*$	$3,88 \pm 0,61$	$3,67 \pm 1,28$	$5,98 \pm 0,97^*$	$4,81 \pm 0,78$
Mate 2,0 g.kg⁻¹	$1,45 \pm 0,27$	$4,48 \pm 0,78^*$	$3,73 \pm 0,57$	$3,53 \pm 0,90$	$5,92 \pm 0,81^*$	$4,73 \pm 0,89$
Fígado		Danos ao DNA		Danos ao DNA induzidos por 100 μM de H_2O_2		
Dieta	DP	DH	DH / DP	DP	DH	DH / DP
(período)	(120 dias)	(120 dias)	(60 dias) / (60dias)	(120 dias)	(120 dias)	(60 dias) / (60dias)
Água	$1,40 \pm 0,37$	$4,22 \pm 0,45$	$3,17 \pm 0,21$	$2,93 \pm 0,46$	$5,91 \pm 0,37$	$4,51 \pm 0,78$
Mate 1,0 g.kg⁻¹	$1,34 \pm 0,33$	$2,98 \pm 0,38^*$	$2,78 \pm 0,38$	$1,88 \pm 0,22^*$	$4,69 \pm 0,43^*$	$3,27 \pm 0,67^*$
Mate 2,0 g.kg⁻¹	$1,33 \pm 0,20$	$2,91 \pm 0,23^*$	$2,65 \pm 0,36$	$1,80 \pm 0,24^*$	$4,58 \pm 0,64^*$	$3,21 \pm 0,41^*$

Os valores representam a média do *tail moment* (TM) em U.A (unidades arbitrárias) e o desvio padrão de 100 células, * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que recebeu água. DP = dieta padrão, DH = dieta hiperlipídica.

5.5. Análise da expressão gênica - PCR em tempo real

No presente trabalho avaliamos a expressão relativa dos genes superóxido dismutase (SOD), catalase (Cat) e glutathione peroxidase (GPx), em RNA extraído de sangue, tecido hepático e tecido adiposo.

Não houve diferença significativa no padrão de expressão entre os tecidos analisados e os grupos estudados. Os resultados da análise de expressão relativa dos genes supracitados acham-se descritos na tabela 11.

Tabela 11 – Efeito da intervenção com chá-mate na expressão das enzimas antioxidantes.

Tecidos	Genes	Dieta Padrão			Dieta Hiperlipídica			Dieta Hiperlipídica/Padrão		
		Controle	Mt 1g	Mt 2g	Controle	Mt 1g	Mt 2g	Controle	Mt 1g	Mt 2g
HEPÁTICO	SOD	0,50 (± 0,04)	0,36 (± 0,08)	0,32 (± 0,02)	0,64 (± 0,1)	0,40 (± 0,03)	0,39 (± 0,07)	0,48 (± 0,05)	0,41 (± 0,01)	0,42 (± 0,1)
	Catalase	1,18 (± 0,04)	1,40 (± 0,07)	1,62 (± 0,1)	1,67 (± 0,07)	1,48 (± 0,03)	1,27 (± 0,06)	1,62 (± 0,02)	1,58 (± 0,1)	1,54 (± 0,1)
	GPx	0,54 (± 0,05)	0,66 (± 0,02)	0,58 (± 0,09)	0,76 (± 0,01)	0,58 (± 0,07)	0,45 (± 0,02)	0,46 (± 0,03)	0,42 (± 0,02)	0,40 (± 0,01)
ADIPOSO	SOD	0,17 (± 0,01)	0,15 (± 0,02)	0,16 (± 0,03)	0,25 (± 0,04)	0,23 (± 0,02)	0,24 (± 0,01)	0,19 (± 0,04)	0,16 (± 0,01)	0,15 (± 0,03)
	Catalase	2,04 (± 0,4)	1,83 (± 0,5)	1,60 (± 0,1)	2,21 (± 0,1)	2,09 (± 0,3)	1,95 (± 0,09)	1,85 (± 0,1)	1,21 (± 0,5)	1,94 (± 0,3)
	GPx	0,34 (± 0,02)	0,40 (± 0,05)	0,21 (± 0,06)	0,36 (± 0,03)	0,27 (± 0,01)	0,24 (± 0,02)	0,30 (± 0,01)	0,26 (± 0,04)	0,32 (± 0,03)
SANGUE	SOD	0,96 (± 0,02)	0,99 (± 0,01)	0,85 (± 0,02)	1,03 (± 0,05)	0,98 (± 0,04)	0,87 (± 0,06)	0,81 (± 0,01)	0,80 (± 0,03)	0,88 (± 0,01)
	Catalase	0,99 (± 0,02)	0,76 (± 0,03)	0,88 (± 0,02)	1,18 (± 0,4)	1,26 (± 0,2)	1,12 (± 0,1)	0,82 (± 0,08)	0,69 (± 0,07)	0,73 (± 0,02)
	GPx	0,98 (± 0,05)	0,97 (± 0,04)	0,79 (± 0,03)	1,24 (± 0,09)	1,02 (± 0,08)	0,98 (± 0,04)	0,91 (± 0,02)	0,88 (± 0,07)	0,98 (± 0,04)

Os valores representam a média da expressão relativa em U.A (unidades arbitrárias) e o desvio padrão dos grupos avaliados. Mt 1g = Chá-mate na concentração de 1,0 g.kg⁻¹, Mt 2g = Chá-mate na concentração de 2,0 g.kg⁻¹, SOD= Superóxido dismutase e GPx= Glutathione peroxidase.

5.6. Avaliação dos fitoquímicos presentes no chá-mate utilizado

O teor de fitoquímicos presentes no chá-mate utilizado encontra-se descrito na tabela 12 e na Figura 7. O chá utilizado neste estudo apresentou 5,82 mg/g de cafeína, 3,30

mg/g de teobromina, 32,25 de ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA), 0,58 mg/g de ácido cafeico e o teor de polifenóis de 348,80 mg/g de chá-mate.

Tabela 12 – Concentração (mg/g) dos principais fitoquímicos presentes no chá-mate utilizado.

Cafeína	Teobromina	ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA)	Ácido cefeico	Total de polifenóis*
5,82±0,17	3,30± 0,35	32,25±0,50	0,58±0,01	348,80±16,35

* Determinado por cada pico cromatográfico identificado como ácido clorogênico, baseado na comparação por UV com o 5-CQA puro. Os valores representam a média e o desvio padrão dos fitoquímicos avaliados.

Figura 7: Perfil dos compostos bioativos por HPLC do chá-mate utilizado a 272 nm e 323 nm, sendo: 1=Teobromina, 2= 5-CQA, 3= Cafeína, 4= Ácido cafeico.

6. DISCUSSÃO

A intervenção por 60 dias com chá-mate em camundongos obesos resultou em redução significativa no peso corpóreo, glicemia, resistência à insulina, níveis de colesterol e triacilglicerol (tabela 8). Os efeitos benéficos observados neste estudo após a intervenção devem-se provavelmente à presença de diversos compostos no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, dentre eles destacam-se: as xantinas, a cafeína, a teobromina, a teofilina, as saponinas e os compostos fenólicos como ácido cafeico e seus derivados, principalmente os ácidos clorogênicos (Gugliucci e Stahl, 1995; Gugliucci, 1996; Schinella et al., 2000; Filip et al., 2000; Bastos et al., 2007).

Em um trabalho realizado por Andersen e Fogh (2001) utilizando cápsulas contendo uma mistura de erva-mate, guaraná (*Paullinia cupana*) e damiana (*turnera diffusa*) ministrada à voluntários humanos, demonstrou um retardo no esvaziamento gástrico dos voluntários. Tais dados sugerem que a presença de saponinas presente em alguns dos compostos utilizados poderia causar uma sensação de saciedade por um tempo maior, o que poderia ocasionar uma redução no consumo alimentar e conseqüentemente uma possível redução de peso corpóreo. Entretanto, no presente trabalho as alterações no peso corpóreo dos animais tratados com chá-mate, não podem ser atribuídas a uma possível inibição do apetite, pois, em nenhum dos grupos estudados, houve alteração na quantidade de ração ingerida (tabela 6) após a intervenção com chá-mate. Além disso, alguns autores descrevem que as saponinas possuem ação sobre o metabolismo do colesterol e também na redução da absorção intestinal da gordura proveniente da dieta atuando principalmente na redução da ação da lipase pancreática (Kim et al., 1996). Dados estes que poderiam justificar, em parte,

as reduções observadas nos parâmetros lipídicos avaliados após intervenção com chá-mate. Outros autores relataram que os ácidos clorogênicos poderiam ter uma importante ação anti-obesidade devido a redução da glicemia pós prandial, colesterol e triacilglicerol plasmáticos em ratos, redução na resistência à insulina e melhora no *pool* de minerais também em ratos (Herling et al.,1999; Rodriguez de Sotillo e Hadley, 2002). No trabalho realizado por Pang et al (2008) onde avaliou os efeitos da suplementação com erva-mate verde na obesidade, os resultados demonstram que após a intervenção houve uma redução de 12% na glicemia, além de ocorrer uma redução no peso corpóreo e no LDL colesterol dos animais.

Uma das vias propostas pela qual o ácido clorogênico parece influenciar na glicemia é através da inibição da ação da glicose-6-fosfatase hepática. Esse sistema enzimático é responsável pela regulação homeostática da glicose sanguínea, atuando no passo final da gliconeogênese e da glicogenólise, originando a glicose livre que é exportada para a corrente sanguínea (Arion et al.,1998). Esse sistema enzimático é um fator significativo nas elevadas taxas de produção hepática de glicose no diabetes (Arion et al.,1998). Estudos *in vivo* em modelos animais demonstraram que o ácido clorogênico é capaz de reduzir a glicemia através dessa via (Herling et al.,1999; Bassoli et al.,2008). Porém no estudo realizado por Oliveira et al. (2008) com ratos *Wistar* para avaliar a influência da erva-mate verde nos parâmetros bioquímicos relacionados ao diabetes mellitus e ao metabolismo de glicose não foi observado modificação na atividade enzimática da glicose-6-fosfatase hepática. No entanto, este estudo demonstra um aumento significativo na expressão gênica do cotransportador intestinal de glicose SGLT1, responsável pela absorção intestinal da glicose. Além disso, alguns autores verificaram o efeito antioxidante do ácido clorogênico na diminuição da oxidação *in vitro* de LDL, sendo comparado ao poder encontrado para a

Vitamina E, C e β -Caroteno (Laranjinha et al., 1994; Vinson & Dabbagh, 1998). Essa ação antioxidante é devida à presença de um grupamento orto-di-hidroxila no anel aromático do ácido cafeico, que atuaria como um aceptor de radicais livres, participando na fase de iniciação e de propagação do processo oxidativo (Monteiro e Trugo, 2005). No estudo realizado por Tatefuji et al. (1996), foi relatado que o 5-CQA apresentou propriedades antiinflamatórias devido a sua capacidade de inibição do processo inflamatório mediado por citocinas.

A obesidade leva a uma inflamação generalizada caracterizada pelo aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias. A presença de algumas citocinas pró-inflamatórias são importantes para o estabelecimento do quadro de resistência à insulina, entre elas destaca-se a interleucina-6 (IL-6). Sabe-se que aproximadamente um terço da IL-6 circulante provém do tecido adiposo em seres humanos (Mohamed-Ali et al., 1997) e que esta desempenha papel na redução da expressão do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) (Papanicolaou et al., 1998; Pradhan et al., 2001) e do transportador de glicose-4 (GLUT-4) (Espósito et al., 1999; Fasshauer et al., 2003) no tecido muscular e hepático, sendo um fator preditivo para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Zhang et al., 1994; Moore et al., 2004). Adicionalmente, alguns autores mostraram que o aumento nos níveis desta citocina estaria relacionado a uma redução na secreção da adiponectina, que é uma citocina diretamente relacionada à sensibilização a insulina (Esposito et al., 2003; Fasshauer et al., 2003).

Outra citocina importante é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que desempenha um papel regulador no acúmulo de gordura corporal e no transportador de glicose (GLUT-4) (Arner, 1995; Montague et al., 1998). Em indivíduos obesos, há uma

forte correlação inversa entre os níveis de TNF- α e o metabolismo da glicose (Winkler et al., 2003; Hsueh & Law, 2003). Este efeito ocorre em razão da supressão pelo TNF- α da sinalização da insulina, reduzindo a fosforilação do IRS-1, tal fato resulta na redução da síntese e translocação do transportador de glicose (GLUT-4) para a membrana com conseqüente diminuição na captação de glicose pelas células mediada pela ação da insulina, levando a um quadro de hiperinsulinemia e em último estágio a diabetes tipo 2 (Arner, 1995; Araújo et al., 2007). Dessa forma, alguns autores consideram que a expressão de TNF- α no tecido adiposo possa ser o fator causal na patogênese da obesidade ligada a resistência a insulina (Araújo et al., 2007). Diversos estudos mostram que os níveis de RNAm de TNF- α são elevadas em indivíduos e animais obesos, estando estes positivamente correlacionados com o aumento do volume dos adipócitos, tanto no depósito visceral quanto subcutâneo (Montague et al., 1998; Winkler et al., 2003; Araújo et al., 2007). Dessa forma, alguns autores consideram que a expressão de TNF- α no tecido adiposo possa ser o fator causal na patogênese da obesidade ligada a resistência a insulina (Araújo et al., 2007). Em um estudo comparando indivíduos de peso normal ($IMC = 19$ a 24 kg/m^2) e obesos ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$), houve correlação positiva entre níveis de TNF- α e IMC, sugerindo a correlação entre níveis altos de TNF- α e o acúmulo de tecido adiposo, principalmente em indivíduos obesos (Montague et al., 1998). Além disso, o TNF- α ativa a transcrição do fator nuclear κB (NF- κB), que orchestra uma série de alterações inflamatórias promovendo a transcrição de outros genes envolvidos com o processo inflamatório tais como a COX-2 e iNOS, por exemplo (Bayon et al., 2003).

Os resultados positivos obtidos por esse trabalho sugerem, que a redução da resistência à insulina observada após intervenção, poderia estar associada à uma redução na

produção de IL-6 e TNF- α , ocasionada possivelmente por uma redução no peso corpóreo dos animais tratados com chá-mate. Trabalhos recentes do nosso grupo mostram que a intervenção com erva-mate tostada foi capaz de reduzir a expressão gênica de IL-6 e TNF- α em camundongos obesos (dados não publicados), porém os mecanismos pelo qual ocorre essa redução ainda não são totalmente esclarecidos.

Outro mecanismo importante que corrobora os dados aqui apresentados refere-se à presença de cafeína na *Ilex paraguariensis*. Estudos em animais e estudos epidemiológicos prospectivos sugerem que o consumo de cafeína pode reduzir o peso corpóreo e adiposidade, provavelmente pelo aumento da termogênese, oxidação lipídica e lipólise (Acheson, 2005; Westerterp-Plantenga et al., 2006). A cafeína aumenta a concentração circulante de epinefrina em humanos, acelerando desta forma o metabolismo e caracterizando seu efeito termogênico e na lipólise. Outro mecanismo proposto para a ação da cafeína na lipólise sugere que a cafeína pode inibir a fosfodiesterase – reduzindo a degradação intracelular do AMP cíclico (cAMP), levando ao aumento na concentração de cAMP e subsequentemente aumento da lipólise (Acheson, 2005).

As recentes descobertas sobre radicais livres estimularam o aparecimento de grande número de pesquisas sobre a ação de substâncias antioxidantes, presentes naturalmente em alguns alimentos, as quais seriam capazes de agir como protetoras dos organismos vivos frente a esse processo de oxidação. Alguns trabalhos mostram uma relação direta entre o aumento da obesidade e o aumento do estresse oxidativo, mostrando que o aumento de ácido graxos armazenados nos adipócitos estimulam a produção de EROs pela ativação da via NADPH oxidase além de mostrarem uma redução na produção das enzimas antioxidantes (Furukawa et al., 2004).

De maneira similar a estudos com outros produtos naturais, ricos em compostos fenólicos e vitaminas antioxidantes, o estudo da atividade antioxidante de infusões de erva-mate foi objeto de vários estudos (Gugliucci, 1997; Filip et al., 2000; Schinella et al., 2000; Bracesco et al., 2003). Em todos os trabalhos, verificou-se a potente atividade antioxidante de infusões aquosas de erva-mate, tanto *in vitro* como *in vivo*. O mecanismo proposto relaciona-se com a presença nas infusões de substâncias capazes de seqüestrarem radicais livres formados no início do processo de oxidação. A erva-mate apresenta altas concentrações de ácidos clorogênicos e concentrações baixas de flavonóides, que passam para a bebida durante o processo de infusão (Gugliucci & Menini, 2002; Bastos et al., 2005; Ramirez-Mares et al., 2004). Alguns autores consideram a erva-mate uma fonte de baixo custo de compostos com atividade antioxidante na dieta. No entanto a maioria destas pesquisas foi realizada com a erva-mate verde e cancheada (*Ilex paraguariensis*) sendo escassos os trabalhos que evidenciem se o processo de torrefação desta planta influencia na atividade antioxidante desta matéria prima.

Postula-se que agentes antioxidantes poderiam proteger o organismo contra o desenvolvimento de diversas doenças através da remoção dos EROs antes que estes tenham a chance de induzir danos ao DNA (Ames, 1983).

A fim de avaliar a ação protetora/antioxidante de compostos naturais e sintéticos, diversos trabalhos mostram que o *comet assay* (*single-cell gel electrophoresis*) é um método simples, sensível e reprodutível para a avaliação de efeitos antioxidantes *in vivo* e *in vitro*. Através deste é possível detectar quebras em fitas simples e duplas e oxidação em bases do DNA (Festa et al., 2001; Oldham et al., 2002; Porrini et al., 2005). De modo complementar, vários estudos têm avaliado os efeitos da indução de danos em DNA, por

peróxido de hidrogênio (H_2O_2), para verificar a capacidade que as células teriam em se proteger após o desafio com H_2O_2 (Festa et al., 2001; Shi et al., 2002).

Os dados referentes às análises do ensaio cometa mostram que nos dois tecidos avaliados os grupos submetidos à dieta hiperlipídica durante 120 dias e que receberam a intervenção com chá-mate (GV e GVI) apresentaram uma redução significativa nos níveis de danos ao DNA quando comparados ao grupo controle hiperlipídico, independentemente da dose administrada (tabela 10).

O mecanismo antioxidante proposto relaciona-se possivelmente com os altos teores de ácido clorogênico e cafeico (Clifford et al., 1990; Bastos et al., 2006) presentes na erva-mate que seriam capazes de quelar metais e seqüestrarem radicais livres formados durante o processo oxidativo (Gugliucci & Stahl, 1995; Gugliucci, 1996; Gugliucci & Menine, 2002). Segundo Cintra (1999) os compostos fenólicos podem reagir com o EROs, como o anion superóxido e o radical hidroxila, atuando como agentes redutores, doadores de hidrogênio e seqüestradores de radicais livres. Pesquisas atuais sugerem que esses metabólitos são absorvidos no trato gastrointestinal e estão biodisponíveis no plasma dentro de 0,5 a 4 horas depois de sua ingestão, cujo pico de absorção ocorre após 1h de consumo (Nardine et al., 2002; Monteiro et al., 2005).

Embora muitos trabalhos tenham sido publicados a respeito dos efeitos benéficos da erva-mate, alguns autores relatam uma associação positiva entre o seu consumo e um risco aumentado de câncer de bexiga e renal (Vassallo et al., 1985; de Stefani et al., 1990; de Stefani et al., 1998; de Stefani et al., 2007). Tal associação poderia ser atribuída a presença de alguns compostos carcinogênicos na constituição da erva-mate. Adicionalmente estudos experimentais mostraram que o ácido cafeico teria um efeito carcinogênico na bexiga de camundongos (Hagiwara et al., 1991). Além disso, Fonseca et al. (2000) sugerem que a

erva-mate possua atividade mutagênica e clastogênica em cultura de células. Nossos dados, por outro lado, indicam que a erva-mate não é genotóxica, pois os níveis de danos oxidativos ao DNA dos animais submetidos à dieta padrão se mantiveram após o período de intervenção. Com relação ao efeito protetor contra danos oxidativos ao DNA induzidos por H_2O_2 , os resultados provenientes das análises dos linfócitos mostram que a intervenção com chá-mate foi capaz de reduzir de forma significativa os danos gerados nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica. No tecido hepático nossos resultados mostram que todos os grupos que sofreram a intervenção com chá-mate apresentou uma redução significativa nos níveis de danos ao DNA induzidos por H_2O_2 independentemente da dieta recebida (tabela 10). Esses achados corroboram dados encontrados em outro trabalho do nosso grupo (Miranda et al., 2008) onde foi observado a atividade antioxidante da erva-mate tostada em camundongos submetidos a uma dieta normolipídica, além disso o mesmo estudo foi capaz de mostrar uma melhora no sistema de reparo ao DNA após a intervenção com erva-mate. Acredita-se que a proteção observada deva-se a presença dos compostos polifenólicos, que possivelmente neutralizariam os radicais livres formados pelo peróxido de hidrogênio antes que esses pudessem causar danos ao DNA celular.

O acúmulo de radicais livres também pode ser evitado por meio do sistema de defesa antioxidante, que consiste nas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (Cat) e a glutathione peroxidase (GPx) (Meneghini, 1988). O balanço entre as velocidades de produção e de atividade dessas enzimas determina as concentrações de radicais livres (Boveris et al., 1999). As SODs trabalham em conjunto com a catalase e a GPX, e tem como função desativar H_2O_2 gerado pelas SODs durante a reação de dismutação do ânion superóxido (Meneghini, 1988).

Avaliamos se a obesidade e/ou intervenção com chá-mate poderiam modular a

expressão de genes envolvidos com a produção de enzimas antioxidantes de fase II tais como: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase. Os dados obtidos não revelaram qualquer alteração nos diferentes grupos avaliados após a intervenção com chá-mate (Tabela 11). São escassos na literatura trabalhos que tenham avaliado o consumo de chá-mate e a modulação gênica das enzimas antioxidantes endógenas (SOD, Cat e GPx). Estudo realizado por Matsumoto et al. (2008) com indivíduos humanos mostra que após a intervenção por sete dias com chá-mate, ocorre um aumento significativo na expressão gênica das enzimas supracitadas. Os polifenóis podem exercer habilidade antioxidante por neutralizarem radicais livres, mas também através da proteção dos antioxidantes endógenos, por aumentar sua expressão, como foi observado num estudo conduzido por Ross e Kasum (2002), em que houve aumento na concentração das enzimas GPx e SOD em eritrócitos humanos após o consumo de apigenina, um flavonóide encontrado em frutas e ervas. Do mesmo modo, foi demonstrado por Toyokuni e colaboradores (2003) que ácidos fenólicos presentes em extratos de plantas de Maurîtânia foram capazes de aumentar a expressão de enzimas antioxidantes em células COS 7. Um dos possíveis mecanismos de ação desses fitoquímicos envolve a modulação da expressão genética de enzimas antioxidantes, as quais auxiliam na eliminação de carcinógenos e toxinas prejudiciais ao organismo, como os lipoperóxidos, prevenindo assim a interação com macromoléculas (proteínas, lipídios e DNA), o que poderia provocar mutações e culminar no aparecimento de cânceres (Yeh & Yen 2006). Os trabalhos acima citados representam intervenções com humanos que é diferente do modelo experimental utilizado no presente trabalho, nossos resultados demonstram que a dieta hiperlipídica aumenta a expressão das enzimas antioxidantes, mas esse aumento não é significativo do ponto de vista estatístico, acreditamos que o consumo prolongado do chá-mate possivelmente reduza o processo

inflamatório ocasionado pela obesidade, devido a uma redução de peso observado no nosso estudo, que por sua vez reduziria o processo inflamatório generalizado, desta maneira a expressão do sistema formado pelas enzimas antioxidantes voltaria à normalidade devido a uma redução na formação das espécies reativas de oxigênio.

Em geral, ácidos fenólicos que são capazes de induzir atividade de enzimas antioxidantes apresentam grande habilidade antioxidante plasmática (Yeh e Yen 2006). De forma geral o presente estudo demonstrou que a ingestão de chá-mate tostado modificou alguns parâmetros relacionados com a obesidade como: peso corpóreo, glicemia basal, colesterol, triacilglicerol e LDL, além de possuir uma excelente atividade antioxidante demonstrada pelos resultados obtidos pelo ensaio cometa. Acredita-se que os resultados positivos encontrados no presente trabalho após a intervenção com chá-mate, deve-se provavelmente à presença de diversos compostos no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, dentre os quais destaca-se: as xantinas, a cafeína, a teobromina, as saponinas e os compostos fenólicos como ácido cafeico e seus derivados, principalmente os ácidos clorogênicos, que poderiam atuar de diferentes maneiras sobre o metabolismo, além de serem potentes antioxidantes, favorecendo desta maneira uma modificação em alguns dos parâmetros avaliados.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o presente trabalho demonstram que a ingestão de chá-mate influencia de maneira positiva alguns parâmetros bioquímicos associados à obesidade.

Os fitoquímicos presentes na erva-mate podem interferir em processos biológicos relacionados à obesidade por diferentes mecanismos. Por meio de mecanismos diretos como a neutralização de espécies reativas e também por meio de mecanismos indiretos, como, por exemplo, a redução de peso que por sua vez leva a uma melhora no contexto geral do indivíduo obeso.

Deste modo, o presente trabalho sugere que a ingestão de chá-mate poderia contribuir para diminuir o risco de desenvolvimento de doenças crônicas relacionadas a processos oxidativo, tais como a aterosclerose e câncer, assim como de doenças associadas à síndrome metabólica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla DSP. Estresse oxidativo e alimentação. In: Tirapegui J. Nutrição – Fundamentos e aspectos atuais. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2006, p. 181-197.

Acheson KJ. Caffeine and insulin sensitivity. *Metab Syndr Relat Disord*. 2005;3(1):19-25.

Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000; 11,327-32.

Alikaridis F. Natural constituents of *Ilex* species. *J. Ethnopharmacol*. 1987; 20:121-144.

Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, Sep 23;221(4617):1256-64, 1993.

Andersen T, Fogh J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. *J Hum Nutr Diet*. 2001; 14,243-50.

Anesini C, Ferraro G, Filip R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. *Food Chem*. 2006; 97 (3): 459-464.

Arabbi PR, Genovese MI, Lajolo FM. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(5):1124-1131.

Araújo EP, De Souza CT, Ueno M, Cintra DE, Bertolo MB, Carnevali JB, Saad MJ, Velloso LA. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology*. 2007;148:5991-7.

Araújo MSC, Obesidade e resistência à insulina induzida pela restrição crônica no consumo de sal em ratos wistar. [Dissertação de mestrado] Universidade de São Paulo, 2005.

Arion WJ, Canfield WK, Ramos FC, Su ML, Burger HJ, Hemmerle H, Schubert G, Below P, Herling AW. Chlorogenic acid analogue S 3483: a potent competitive inhibitor of the hepatic and renal glucose-6-phosphatase systems. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Mar 15;351(2):279-85.

Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med*. 1995; 27:435-8.

Atlas de Diabetes ano base 2003. disponível em: <<http://www.eatlas.idf.org>>. Acesso em: 22 de setembro 2007.

Baisch ALM, Johnston KB, Stein FLP Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats *J Ethnopharmacol* 1998; 60 (2): 133-139.

Bassoli BK, Cassolla P, Borba-Murad GR, Constantin J, Salgueiro-Pagadigorria CL, Bazotte RB, da Silva RS, de Souza HM. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. *Cell Biochem Funct.* 2008 May-Jun;26(3):320-8.

Bastos DHM, Oliveira DM, Matsumoto RLT, Carvalho PO, Ribeiro ML. Yerba maté: Pharmacological properties, research and biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 2007;1(1):37-46.

Bastos DHM, Isshimoto E, Marques MOM, Fernando FA, Torres EAFS. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex Paraguariensis*) infusions. *Journal of food and Analysis* 2006; 19(6-7): 538-543.

Bastos DHM, Torres EAFS. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex Paraguariensis*) e saúde pública. *Nutrire* 2003; (26):77-89.

Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS et al. The chlorogenic acid and caffeine content of yerba mate (*Ilex Paraguariensis*) beverages. *Acta Farm. Bonaerense* 2005; 24(1): 91-5.

Bayon Y, Ortiz MA, Lopez-Hernandez FJ, Gao F, Karin M, Pfahl M, Piedrafito FJ. Inhibition of IkappaB kinase by a new class of retinoid-related anticancer agents that induce apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(3):1061-74.

Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: An adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.*, 13:84–89, 2002.

Becker MA, Kisicki J, Khosravan R, Wu J, Mulford D, Hunt B, MacDonald P, Joseph-Ridge N. Febuxostat (TMX-67), a novel, non-purine, selective inhibitor of xanthine oxidase, is safe and decreases serum urate in healthy volunteers. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2004; 23(89):1111-6.

Bonora E, Manicardi V, Zavaroni I, Coscelli C, Butturini U. Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabete Metab.* 1987; 13:116-21.

Bracesco N, Dell MRA, Behtash S, Glugliucci A et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *J Altern Complement Méd* 2003; 9(3):379-387.

Bravo L. Polyphenols, chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutrition.* 56(11):317-333, 1998

Bulló M, García-Lorda P, Megias I, Salas-Salvadó J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res.* 2003; 11(4):525-31

Buckhaults P, Rago C, St Croix B, Romans KE, Saha S, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors. *Cancer Res.* 2001; 61:6996-7001.

Campos AM, Escobar J, Lissi EA. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguariensis* extracts and red wine. *J. Braz. Chem. Soc.* 1996; 7:43-49

Cardozo-junior EL, Ferrarese-Filho O, Cardozo-Filho L, Ferrarese MLL, Donaduzzi CM, Sturion JA. Methylxanthines and phenolic compounds contents in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. *J Food Compost Anal.* 2007;20:1-10.

Carini M, Facino RM, Aldini G, Calloni M, Colombo L. Characterization of phenolic antioxidants from maté (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/Tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998; 12: 1813-1819.

Chandra S, Mejia EG. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinine reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camelia sinensis*) teas. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52:3583-3589.

Clifford MN, Ramirez-Martinez JR. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents on maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. *Food Chem* 1990; (35):13-21.

Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 1999; 79: 362-372

Csehi SB, Mathieu S, Seifert U, Lange A, Zweyer M, Wernig A, Adam D. Tumor necrosis factor (TNF) interferes with insulin signaling through the p55 TNF receptor death domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 329(1):397-405.

Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman, D. Oxygen radicals and human disease., *Ann. Intern. Med.* 1987; 107:526-545.

Chu CK, Ma L, Olgen S, Pierra C, Du J, Gumina G, Gullen E, Cheng YC, Schinazi RF. Synthesis and antiviral activity of oxaselenolane nucleosides. *J Med Chem.* 2000; 43(21):3906-12.

Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York academic of Science* 1998; 854:435-442.

Dreosti JE. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa and wine. *Nutrition* 2000; 16(7):692-694.

Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:2907-10

De Stefani E, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Correa P, Ronco AL, Brennan P, Ferro G, Acosta G, Mendilaharsu M. Non-alcoholic beverages and risk of bladder cancer in Uruguay. *BMC Cancer*. 2007; 29;7:57.

De Stefani E, Fierro L, Mendilaharsu M, Ronco A, Larrinaga MT, Balbi JC, Alonso S, Deneo-Pellegrini H. Meat intake, 'mate' drinking and renal cell cancer in Uruguay: a case-control study. *Br J Cancer*. 1998; 78:1239-43.

De Stefani E, Muñoz N, Estève J, Vasallo A, Victora CG, Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res*. 1990; 15;50:426-31.

Defronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991;14:173-94.

Degáspari CH e Waszczynskyj N. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. *Visão Acadêmica*. 2004; (5): 33-40.

Dunstan DW, Daly RM, Owen N, Jolley D, De Courten M, Shaw J, Zimmet P. High-intensity resistance training improves glycemic control in older patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2002 Oct;25(10):1729-36.

Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keany JF. Antioxidants and Atherosclerotic Heart Disease. *N England J med*. 1997; 337(6):1158-1166.

Esmelindro MC, Toniazzo G, Waczuk A, et al. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2002; 22 (2): 199-204.

Espósito PG, D'Alessio MA, Barbieri M. Primary and secondary prevention of atherosclerosis: is there a role for antioxidants? *Diabetes Metab*. 1999; 25,298-306.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rer ass Med Brasil* 1997; 43(1):61-8.

Fasshauer M, Klein J, Lossner U, Paschke R. Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res*. 2003; 35:147-52.

Festa F, Aglitti T, Duranti G, Ricordy R, Perticone P, Cozzi R. Strong antioxidant activity of ellagic acid in mammalian cells in vitro revealed by the comet assay. *Anticancer Res*, Nov-Dec; 21(6A):3903-8, 2001.

Filip RS, Lotito SB, Ferraco G, Raga CG. Antioxidant activity of *Ilex Paraguariensis* and related species. *Nutrition Res* 2000; 20(10):1437-1446.

Filip R, López P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven south american *Ilex* species. *Fitoterapia*. 2001; 72,774-778

Fonseca CA, Otto SS, Paumgarten FJ, Leitão AC. Nontoxic, mutagenic, and clastogenic activities of Mate-Chimarrão (*Ilex paraguariensis*). J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2000;19:333-46

Francischi RP, Pereira LO, Lancha Jr AH. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. Rev Paul Educ Fís 2001;15:117-40.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg, AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. J. Clin. Endocrinol. Metab., 83:847–850, 1998.

Friedman JM and Halaas, JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature., 395:763–770, 1998.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Shimomura, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J. Clin. Invest., 114:1752–1761, 2004.

Giada MLR e Mancine-Filho J. Avaliação da atividade antioxidante in vitro de compostos fenólicos de alimentos. Nutrire 2004; (28):91-107.

Glugliucci A, Menini T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *achyrocline satureoides*. Life Sci 2002; (71): 693-705.

Gnoatto SC, Dassonville-Klimpt A, Da Nascimento S, Galéra P, Boumediene K, Gosmann G, Sonnet P, Moslemi S. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. Eur J Med Chem. 2007; [Epub ahead of print]

Gorzalczany S, Filip R, Alonso MR, Mino J, Ferraro GE, Acevedo C. Choleric effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. J Ethnopharmacol 2001; 75(2-3):291-4.

Gugliucci A, Stahl A.J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. Biochem. Mol. Biol. Int. 1995; 35,47-56

Gugliucci A. Antioxidant effects of *Ilex Paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of Human LDL in vivo. Biochem. and Biophys. Res. 1996; 224,338-344

Guzik TJ, Mangalat D, Korb R. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? J Physiol Pharmacol. 2006; 57:505-28

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in biology and medicine. 3^a ed. Oxford – Ford university press, 2000.

Hagiwara A, Hirose M, Takahashi S, Ogawa K, Shirai T, Ito N. Forestomach and kidney carcinogenicity of caffeic acid in F344 rats and C57BL/6N x C3H/HeN F1 mice. *Cancer Res.* 1991; 51:5655-60

Hainault I, et al. Adipose tissue-specific increase in angiotensinogen expression and secretion in the obese (fa/fa) Zucker rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282:E59–E66, 2002.

Heck I and Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations *J Food Sci.* 2007; 72(9):R138-51.

Herling AW, Burger H, Schubert G, Hemmerle H, Schaefer H, Kramer W. Alterations of carbohydrate and lipid intermediary metabolism during inhibition of glucose-6-phosphatase in rats. *Eur J Pharmacol* 1999; 386(1): 75-82.

Hotamisligil GS, Shargill NS and Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259:87–91, 1993.

Hsueh WA, Law R. The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated and cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2003; 92:3-9

Huang S, Lifshitz LM, Jones C, Bellve KD, Standley C, Fonseca S, et al. Insulin stimulates membrane fusion and GLUT4 accumulation in clathrin coats on adipocyte plasma membranes. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(9):3456-69.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2002analise/tab02e.pdf> - 2004-12-16

Isomaa B, Henricsson M, Almgren P, Tuomi T, Taskinen MR, Groop L. The metabolic syndrome influences the risk of chronic complications in patients with type II diabetes. *Diabetologia.* 2001 Sep;44(9):1148-54.

Jung R. Obesity as a disease. *Br Med Bull* 1997;53:307-21.

Kahn RA, Yucel JK, Malhotra V. ARF signaling: a potential role for phospholipase D in membrane traffic. *Cell* 1993; 75(6):1045-8.

Karakayas EL. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. *Int J Food Sci. Nutr.* 2001; (52): 501-508.

Kim JK, Wi Jk, Youn JH. Metabolic impairment precedes insulin resistance in skeletal muscle during high-fat feeding in rats. *Diabetes* 1996; 45:651-8

Kuczmarski RJ, Flegal KM, Campbell SM, Johnson CL. Increasing prevalence of overweight among US adults: The national health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *JAMA* 1994; 272:205-211.

- Kuo CH, Hwang H, Lee MC, Castle AL, Ivy JL. Role of insulin on exercise-induced GLUT-4 protein expression and glycogen supercompensation in rat skeletal muscle. *Appl Physiol*. 2004; 96(2):621-7.
- Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab*. 2004; 30(4):294-309. Review.
- Laranjinha JA, Almeida LM, Madeira VM. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem. Pharmacol*. 1994; 48: 487-494.
- Lunceford N and Gugliucci A. *Ilex Paraguariensis* inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia* 2005; 76:419-427.
- Luximon-Ramma A, Baborun T, Soobrattee MA, Aruoma OI. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *J. Agric Food Chem*. 2002; 50(18):5042-7.
- Liyana-Pathirana CM, Shahidi F. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *J. Agric Food Chem*. 2006; 54(4):1256-64.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C and Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability *Am J Clin Nutr*. 2004;79:727– 47.
- Mancine-Filho J, Moreira AVB. Efeito dos compostos fenólicos de especiarias sobre lípidos polinsaturados. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2003;9:130-133.
- Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola D, Nicolo MC, Lerici CR. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science e Technol* 2001; 11:340-346.
- Martins MMR. Influência da atividade física e do ambiente sobre os níveis de glutathione peroxidase e perfil lipídico em grupo da terceira idade [Dissertação de mestrado] Novo Hamburgo: Centro Universitário Feevale. 2007.
- Matsumoto RLT. Atividade antioxidante de chá-mate (*Ilex paraguariensis*). [Dissertação de mestrado] Universidade de São Paulo. 2008
- Matsuzawa, Y, Funahashi, T, Kihara, S and Shimomura, I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb., Vasc. Biol.*, 24:29–33, 2004.
- Menini T, Heck C, Schulze J, de Mejia E, Gugliucci A. Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein. *Planta Med*. 2007; 73(11):1141-7.
- Miranda DD, Arçari DP, Pedrazzoli J Jr, Carvalho PD, Cerutti SM, Bastos DH, Ribeiro ML. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*. 2008; 24(4):375-81.

Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Panahloo A, Goodrick S, Coppack SW, Yudkin JS. Relationships between plasma leptin and insulin concentrations, but not insulin resistance, in non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1997;14:376-80.

Montague CT, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, et al. Depot -related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes*. 1998; 47:1384-90.

Monteiro MC e Trugo LC. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quim Nova*. 2005; 28(4): 637-641.

Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo L C and Donangelo C. Chlorogenic Acid Compounds from Coffee Are Differentially Absorbed and Metabolized in Humans. *Nutrition*. 2007;137 (10): 2196-2201.

Monteiro CA, Mondini L, Souza ALM, Popkin BM. Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional no Brasil. In: Monteiro CA, editor. *Velhos e novos males da saúde no Brasil – a evolução do país e de suas doenças*. São Paulo: Hcitech-NUPENS/USP 1995; 247-255.

Mooler P e Loft S. Dietary antioxidant and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. *Free Radic Biol Med*. 2006 ;41(3):388-415.

Moore MC, Cardin S, Edgerton DS, Farmer B, Neal DW, Lautz M, Cherrington AD. Unlike mice, dogs exhibit effective glucoregulation during low-dose portal and peripheral glucose infusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Feb;286(2):E226-33.

Mosimann ALP, Wilhelm-Filho D, da Silva EL Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol. *BioFactors* 2006; 26(1):59-70.

Meneghini, R. Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells., *Mut. Res*. 1988 ;195:215-230.

Nardini M, Cirillo E, Natella F and Scaccini C. Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption *J Agric Food Chem*. 2002; 50 (20): 5735 -5741.

Oldham KM, Wise SR, Chen L, Stacewicz-Sapuntzakis M, Burns J, Bowen PE. A longitudinal evaluation of oxidative stress in trauma patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.*, May-Jun;26(3):189-97, 2002.

Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Extensively Absorbed in Humans *J Nutr*. 2001;131:66-71.

Olthof MR, Hollman PCH, Buijsman MNCP, Katan MB. Human Nutrition and Metabolism Chlorogenic Acid, Quercetin-3-Rutinoside and black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans *J Nutr*.2003;133:1806-1814.

Oliveira DM, Freitas HS, Souza MFF, Arçari DP, Ribeiro ML, Carvalho PO, Bastos DHM. Yerba Mate' (*Ilex paraguariensis*) Aqueous Extract Decreases Intestinal SGLT1 Gene Expression but Does Not Affect Other Biochemical Parameters in Alloxan-Diabetic Wistar Rats. J. Agric. Food Chem. 2008 [in press]

Pang J, Choi Y, Park T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. Arch Biochem Biophys. 2008; 476(2):178-85.

Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. Ann Intern Med. 1998; 128:127-37.

Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, Kuchenmeister F, Lambertz R, Leucht U. et al. Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. Environ Mol Mutagen., 24:23-45,1994.

Porrini M, Riso P, Brusamolino A, Berti C, Guarnieri S, Visioli F. Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection. Br. J. Nutr., Jan;93(1):93-9, 2005.

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. JAMA. 2001; 286:327-34.

Ramirez-Mares MV, Chandra S, Mejia EG. In vitro chemopreventive activity of Camellia sinensis, Ilex Paraguariensis and Ardisia compressa tea ex tracts and selected polyphenols. Mutat Res. 2004; 554:53-65.

Reaven GM. Syndrome X: 6 years later. J Intern Med1994;736(suppl):13-22.

Ricco RA, Wagner ML, Gurni AA. Estudio comparativo de flavonoides en seis especies austrosudamericanas del género Ilex. Acta Farm Bonaer. 1991; 10:29-35.

Rojkind M, Dominguez-Rosales J, Nieto N, Greenwel P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. Cell Mol Life Sci. 2002; 59(11):1872-91.

Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. J biol Chem 2003; 278(46):45777-84.

Rover JL, Hoehr NF e Kubota APV. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. Quim Nova 2001; 24(1):112-119.

Rodriguez de Sotillo DVR, Hadley M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (*fa/fa*) Zucker rats. J. of Nutritional Biochemistry. 2002; 13:717-726

Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* 2002; 22:19-34.

Samad F, Loskutoff DJ. Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice. *Mol Med.* 1996; 2:568-82.

Sartipy P e Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100:7265–7270, 2003.

Signorini C, Ferrali M, Ciccoli L, Sugherini L, Magnani A, Comporti M. Iron release, membrane protein oxidation and erythrocyte ageing. *FEBS lett* 1995; 362(2):165-70.

Sies H. Strategies of antioxidant. Review. *Eur J. Biochem.* 1993; 215(2):213-219.

Schinella GR, Troiani G, Dávila V, Buschiazzi PM, Tournier HA. Antioxidant effects of na aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem. and Biophy. Res. Commun.* 2000; 269:357-360.

Shi YL, James AE, Benzie IF, Buswell JA. Mushroom-derived preparations in the prevention of H₂O₂-induced oxidative damage to cellular DNA. *Teratog Carcinog Mutagen.*, 22(2):103-11, 2002

Shimomura I, et al. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat. Med.*, 2:800–803 10, 1996.

Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr Campinas.* 2002; 15(1): 71-81.

Stein FLP, Schmidt B, Furlong EB, Souza-Soares LA, Soares MC, Vaz MR, Muccillo Baisch AL. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biol Res Nurs.* 2005; 7(2):146-56.

Tatefuji T, Izumi N, Ohta T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility *Biol Pharm Bull.* 1996; 19: 966 –970.

Timar O, Sestier F, Levy E. Metabolic syndrome X: A review. *Can J Cardiol* 2000; 16:779-89.

Toyokuni S, Tanaka T, Kawaguchi W, Fang NR, Ozeki M, Akatsuka S. Effects of the phenolic contents of Mauritian endemic plant extracts on promoter activities of antioxidant enzymes. *Free Radic Res.* 2003; 37(11):1215-24.

Tozzo E, Shepherd PR, Gnudi L, Kahn BB. Transgenic GLUT-4 overexpression in fat enhances glucose metabolism: preferential effect on fatty acid synthesis. *Am J Physiol.* 1995; 268:956-64.

Unger, RH. The physiology of cellular liporegulation. *Annu. Rev. Physiol.*, 65:333–347, 2003.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*. 389:610–614, 1997.

Van Obberghen E. Signalling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor. *Diabetologia* 1994; 37(Suppl 2):S125-34.

Vassallo A, Correa P, De Stéfani E, Cendán M, Zavala D, Chen V, Carzoglio J, Deneo-Pellegrini H. Esophageal cancer in Uruguay: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 1985; 75:1005-9

Vinson JA e Dabbag YA. Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutr Res* 1998; 18:1067-107.

Wiseman, H. e Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer., *Biochem. J.* 1996; 313:17-29.

Waterman PG, Mole S. Analysis of phenolic plant metabolites. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1994.

Westerterp-Plantenga M, Diepvens K, Joosen AM, Bérubé-Parent S, Tremblay A.b Metabolic effects of spices, teas, and caffeine. *Physiol Behav.* 2006 Aug 30;89(1):85 91.

WHO – World Health Organization. Obesity – preventing and managing the global epidemic. 1998.

Willams AM, Hodges NJ, North JS, Barton G. Perceiving patterns of play in dynamic sport tasks: investigating the essential information underlying skilled performance. *Perception* 2004; 35(3):317-32

Winkler G, Kiss S, Ketszhelyi L, Sapi Z, Ory I, Salamon F, et al. Expression of tumor necrosis factor (TNF- α) protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF- α , soluble serum TNFreceptor-2 concentrations and C-peptide level. *Eur J Endocrinol.* 2003;149:129-35.

Winterbourn CC, Kettle AJ. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305:729-736.

Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(4):972-978

Yeh CT, Yen GC. Induction of hepatic antioxidant Enzymes by phenolic acids in rats. *Nutrition* 2006; 136(1):11-15.

Yu BP. Cellular Defenses against damage from oxygen reactive species. *Physiol Rev.* 2004; 74:139-162.

Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser270 to promote insulin resistance in response to TNF-alpha signaling through IKK2. *J Biol Chem* 2008; [Epub ahead of print].

Zhang B, Szalkowski D, Diaz E, Hayes N, Smith R, Berger J. Potentiation of insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by thiazolidinedione-derived antidiabetic agents in Chinese hamster ovary cells expressing human insulin receptors and L6 myotubes. *J Biol Chem.* 1994; 14;269:25735-41

Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F, Molinari AM, Giugliano D. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation.* 2002; 105:804-9.

9. ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Bragança Paulista, 28 de agosto de 2007.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Avaliação da ação da erva mate (*Ilex Paraguariensis*) na modulação da expressão de enzimas antioxidantes e seu efeito quimioprotetor ao DNA de camundongos obesos.

Autor(es): Marcelo Lima Ribeiro, Deborah Bastos, Demetrius Paiva Arçari

Instituição: Universidade São Francisco

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, em reunião ordinária realizada no dia **28 de agosto de 2007**, analisou o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: Aprovado

Atenciosamente,

João Roberto Moro
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade São Francisco