

**Alexandre Funck**

**EFEITOS ANTI-OBESIDADE DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) EM  
CAMUNDONGOS**

Bragança Paulista - SP  
2008

**Alexandre Funck**

EFEITOS ANTI-OBESIDADE DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)  
EM CAMUNDONGOS

ORIENTADOR

**Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco (USF) para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista - SP

2008

WD 210 Funck, Alexandre.  
F977e Efeitos anti-obesidade da Erva Mate (*Ilex paraguariensis*) em camundongos / Alexandre Funck -- Bragança Paulista, 2008.  
55 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Marcelo Lima Ribeiro.

1. Erva Mate. 2. *Ilex paraguariensis*. 3. Fitoterapia.  
4. Obesidade. 5. Atividade antioxidante. 6. Estresse oxidativo – efeito de drogas. I. Ribeiro, Marcelo Lima.  
II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

## **BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro

Membros:

1. Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro
2. Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
3. Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz

Suplentes:

1. Prof. Dr. Denise Gonçalves Priolli
2. Prof. Dr. Alessandra Gambero

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Data: 01/01/2008

*Aos meus pais, João e Elizeth  
pelo amor incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro, pela maneira gentil e competente com que norteou os meus estudos.

Ao amigo Demétrius pelo interesse na colaboração desta dissertação.

A todas as pessoas que direta e indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1 – INTRODUÇÃO.....	10
1.1 – A obesidade e a saúde pública.....	10
1.2 – Síndrome metabólica.....	10
1.3 – Adipocitocinas.....	12
1.4 – Balanço energético.....	13
1.5 – Modelos experimentais de obesidade.....	15
1.6 – Compostos fenólicos.....	15
1.7 – Erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ).....	18
1.8 – Principais produtos comerciais.....	19
1.9 – Propriedades funcionais da erva-mate.....	21
2- OBJETIVOS.....	22
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 – Material vegetal.....	23
3.2 – Preparo dos extratos aquosos.....	23
3.3 – Animais.....	23
3.4 – Modelo de obesidade induzido por dieta.....	23
3.5 – Desenho do experimento.....	24
3.6 – Testes bioquímicos.....	25
3.7 – Teste de tolerância a insulina.....	26
3.8 – Ganho de peso e crescimento.....	26
3.9 – Determinação da atividade antioxidante – Ensaio cometa.....	26

3.10 – Análise estatística.....	27
4 – RESULTADOS.....	28
4.1 – Modelo experimental de obesidade.....	28
4.2 – Intervenção com <i>Ilex paraguariensis</i> e parâmetros antropométricos e bioquímicos.....	28
4.3 – Determinação dos níveis de oxidação ao DNA – Ensaio cometa.....	31
5 – DISCUSSÃO.....	33
6- CONCLUSÃO.....	39
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40



## RESUMO

Nos dias atuais onde a obesidade tem atingido proporções epidêmicas, surgem cada vez mais evidências científicas, que a associam ao aumento do risco para o desenvolvimento de doenças, tais como as doenças cardíacas, diabetes, hipertensão e resistência à insulina. Trabalhos recentes sugerem que a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) seja um adjuvante no controle da obesidade, motivo pelo qual avaliou-se neste trabalho os efeitos anti-obesidade da erva-mate em camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica. Noventa animais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos de acordo com a dieta e a intervenção (erva-mate ou água) por 16 semanas. Após a intervenção, as análises bioquímicas foram realizadas com o sistema Cobas-Mira, o teste de tolerância à insulina foi determinado pela média do  $K_{ITT}$  e a atividade antioxidante foi testada utilizando-se o ensaio cometa. Para análise estatística foi utilizado análise de variância (ANOVA) para um critério, segundo do teste de Bonferroni. A intervenção com erva-mate reduziu os seguintes parâmetros avaliados: peso, glicemia, colesterol, triglicérides, LDL-colesterol e a enzima hepática AST. O nível de dano ao DNA foi significativamente menor nos animais obesos tratados com erva-mate em todas as doses utilizadas. Este estudo demonstra que a erva-mate tem efeitos protetores contra a obesidade induzida por dieta em camundongos.

Palavras chave: Erva-mate; *Ilex paraguariensis*; Fitoterapia; Obesidade; Atividade antioxidante; Estresse oxidativo/efeito de drogas

## ABSTRACT

Nowadays obesity has reached epidemic proportions, and there is a lot of evidence supporting an association between the obesity and major health risks such as cardiovascular disease, diabetes, hypertension, and insulin resistance. Since it has been suggested the potential of *Ilex paraguariensis* in the management of obesity, we evaluated the anti-obesity effects of *Ilex paraguariensis* in a high-fat diet in mice. Ninety animals were randomly assigned in different groups according to the diet and the intervention (*Ilex paraguariensis* 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<sub>ITT</sub> and antioxidant activity was tested using comet assay. Statistical analysis was done using one-way ANOVA followed by unpaired Bonferroni. *Ilex paraguariensis* intervention decreases weight and the following biochemical parameters: glucose blood level, cholesterol, triglycerides, LDL-cholesterol, and AST. The DNA damage levels were significantly lower in obesity animals treated with mate tea in all doses. In conclusion, this study reports that *Ilex paraguariensis* can have protective effects against high-fat diet induced obesity in mice.

Key words: *Ilex paraguariensis*; *Yerba maté*, Phytotherapy; Obesity; Antioxidant activity; Oxidativestress/Drugs

# 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 permitiram que ocorresse a denominada transição nos padrões nutricionais, com diminuição progressiva da desnutrição e 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 Estados 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. Entre 1976 e 1980, 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).

## 1.2. Síndrome Metabólica

Durante décadas estudos indicam uma forte associação da obesidade com diversas enfermidades (**Quadro 1**) (Jung, 1997). Porém foi somente em 1994 (Reaven, 1994) que 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). 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). A prevalência da síndrome metabólica é estimada entre 20 a 25% da população geral, 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 duas a três vezes maiores de morbidade cardiovascular que indivíduos sem a síndrome (Isomaa et al., 2001). Os dados de prevalência mundial da síndrome metabólica são muito preocupantes, já que esta síndrome é precursora de diabetes e doenças cardiovasculares (Isomaa et al., 2001). Considerando que existam cerca de 200 milhões de pacientes diabéticos em todo o mundo e que 80% vão falecer devido a doenças cardiovasculares, há um enorme apelo médico e sócio-econômico para se identificar marcadores da síndrome metabólica que possam auxiliar no combate à progressão da atual epidemia (Diabetes atlas, 2003).

**Quadro 1** – Doenças associadas à obesidade (modificado de Jung, 1997)

Cardiovasculares	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Hipertensão</li> <li>✓ Doença coronariana</li> <li>✓ Acidente vascular cerebral</li> <li>✓ Veias varicosas</li> <li>✓ Trombose venosa profunda</li> </ul>	Região Torácica	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Câncer de mama</li> <li>✓ Ginecomastia</li> </ul>
Respiratórias	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Falta de ar</li> <li>✓ Apnéia durante o sono</li> <li>✓ Síndrome da hipoventilação</li> </ul>	Útero	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Câncer endometrial</li> <li>✓ Câncer cervical</li> </ul>
Gastrointestinais	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Hérnia de hiato</li> <li>✓ Cálculo na vesícula biliar</li> <li>✓ Cirrose e Esteatose hepática</li> <li>✓ Hemorróida</li> <li>✓ Câncer colorretal</li> </ul>	Urológico	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Câncer de próstata</li> <li>✓ Incontinência urinária</li> </ul>
Metabólicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Hiperlipidemia</li> <li>✓ Resistência à insulina</li> <li>✓ Diabetes Mellitus</li> </ul>	Pele	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Micoses</li> <li>✓ Linfedemas</li> <li>✓ Celulites</li> <li>✓ Acanthose</li> </ul>
Neurológica	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Bloqueio Nervoso</li> </ul>	Endócrinas	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Redução na resposta à prolactina</li> <li>✓ Aumento do cortisol livre na urina</li> <li>✓ Hiperandrogenismo</li> <li>✓ Síndrome do ovário policístico</li> </ul>
Ortopédicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Osteoartrite</li> <li>✓ Gota</li> </ul>	Gravidez	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Complicações obstétricas</li> <li>✓ Macrognatismo</li> <li>✓ Defeitos no tubo neural</li> </ul>
		Renal	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Proteinúria</li> </ul>

### 1.3. Adipocitocinas

Os adipócitos produzem uma variedade de moléculas biologicamente ativas conhecidas como: adipocitocinas ou adipocinas (Furukawa et al., 2004). Alguns estudos mostram que a produção desregulada das adipocitocinas “ofensivas” como o PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) (Shimomura et al., 1996), TNF- $\alpha$  (Fator Alfa da Necrose Tumoral) (Hotamisligil et al. 1993; Uysal et al., 1997), IL-6 (Interleucina 6) (Fried et al., 1998), MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) (Sartipy e Loskutoff, 2003) e angiotensina (Hainault et al., 2002), e as adipocitocinas “defensivas”, como a adiponectina (Berg et al., 2002; Tsao et al., 2002; Matsuzawa et al., 2004) e leptina (Friedman e Halaas, 1998; Farooqi et al. 2001; Unger, 2003), estão envolvidas na patogenicidade da síndrome metabólica. Algumas destas, além de exercer sua atividade pró-inflamatória também poderiam afetar a ação da insulina. O TNF- $\alpha$ , por exemplo, inibe a fosforilação da tirosina-quinase do receptor da insulina, resultando em defeitos na sinalização da insulina que conseqüentemente levará à resistência à insulina afetando o transporte de glicose (Feistein et al., 1993). Além disso, o TNF- $\alpha$  ativa a transcrição do fator nuclear  $\kappa$ B (nuclear factor), que orquestra uma série de alterações inflamatórias promovendo a transcrição de outros genes envolvidos com o processo inflamatório tais como a COX-2 (ciclooxigenase) e iNOS, (forma induzível de óxido nítrico) por exemplo (Bayon et al., 2003).

No entanto, Furukawa et al. (2004) mostra uma relação direta entre o acúmulo de gordura nos adipócitos e o aumento do estresse oxidativo, mostrando que o aumento de ácido graxo armazenado nos adipócitos estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela ativação da via NADPH oxidase, além de reduzir a produção de enzimas antioxidantes.

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

#### 1.4. Balanço energético

A obesidade não é uma doença singular, e sim um grupo heterogêneo de condições com múltiplas causas que, em última análise, refletem no fenótipo obeso (Jebb, 1999). O balanço energético positivo, que ocorre quando o valor calórico ingerido é superior ao gasto, é um fator importante para o desenvolvimento da obesidade, promovendo aumento nos estoques de energia e peso corporal. O início da manutenção de um balanço calórico positivo relativo às necessidades do organismo pode ser consequência tanto de aumento na ingestão calórica, como redução do total calórico gasto, ou os dois fatores combinados (Pereira et al., 1999a). Estudos realizados por Freitas et al., (1998) indicam a alta incidência de sedentarismo na população obesa. Além disto, o processo de modernização e transição econômica observado na maioria dos países tem promovido alterações na industrialização da produção alimentícia, que colabora para o consumo de dietas ricas em proteína e gordura e baixa em carboidratos complexos (Mahan e Escott-Stump, 1998).

Atualmente, existe maior quantidade de alimentos disponíveis, enquanto a demanda energética da vida moderna tem caído drasticamente. Estudo realizado com crianças nos EUA (Wildey et al., 2000) demonstrou que, aproximadamente, um terço do consumo calórico diário das crianças é realizado na escola, onde 88,5% do estoque das lanchonetes é rico em gordura e/ou açúcar. Em estudo relatado por Mahan e Escott-Stump (1998), realizado com 264 trabalhadores (203 homens e 61 mulheres), foi observado que 81,9% dos indivíduos consumiam lipídios acima de 30% do total calórico ingerido, dado semelhante ao encontrado na população norte-americana. Metade das mulheres ingeria acima de 40% de lipídios na dieta e a frequência de sobrepeso era de 43,9%, enquanto a de indivíduos obesos era de 23,1%. Outro dado interessante observado pelos pesquisadores foi que a maioria dos trabalhadores realizava apenas três refeições diárias e 43% dos indivíduos obesos tinham o jantar como a maior refeição. Há indícios de que o padrão de alimentação hiperlipídica, hiperprotéica e hipoglicídica esteja se repetindo também no Brasil. Estudos realizados com mulheres obesas brasileiras demonstraram que mais de 30% do total calórico ingerido por esta população era proveniente de lipídios (Pereira et al., 1998; Klopfer et al., 1999), o que demonstra ingestão semelhante à encontrada nos países desenvolvidos, caracterizando esta dieta como ocidentalizada.

A tendência secular no aumento da obesidade parece ocorrer paralelamente à redução na prática de atividade física e aumento do sedentarismo (Martinez, 2000). O hábito da prática de atividade física é influenciado na criança pelos pais, e quando desenvolvidos nesta fase, tendem a se manter do mesmo modo até a fase adulta (Strauss, 1999). Além disso, uma redução natural no gasto energético é observada com a modernização, ocasionando estilo de vida mais sedentário com transporte motorizado, equipamentos mecanizados que diminuem o esforço físico de homens e mulheres tanto no trabalho como em casa (WHO, 1998). Já foi demonstrada uma redução de aproximadamente 600 kcal com a diminuição do tempo despendido com brincadeiras de rua e o aumento do tempo assistindo televisão; do mesmo modo, cortar grama com as mãos gastava aproximadamente 500 kcal/h, enquanto que a utilização de cortadores elétricos de grama diminuiu para 180 kcal/h; lavar as roupas no tanque consumia aproximadamente 1500 kcal/dia enquanto usar a máquina de lavar requer apenas 270 kcal/2h para a mesma quantidade de roupas (Martinez, 2000). De fato, poucas atividades hoje em dia são classificadas como muito ativas, enquanto há algumas décadas atrás, várias atividades tinham esta característica (WHO, 1998). No entanto, é muito difícil estabelecer uma relação de causa e efeito entre o IMC e o grau de atividade física, mas sabe-se que a redução na atividade física diária afeta direta e indiretamente, através da taxa metabólica basal (TMB), o gasto energético diário do indivíduo. Os três principais componentes do gasto energético diário são: TMB, o efeito térmico dos alimentos (ETA) e a prática de atividade física (AT) (Schutz, 1995). Vários autores já demonstraram relação inversa entre TMB e IMC em animais (Yoshioka et al., 1992) e entre redução da TMB e aumento de peso corporal em humanos (Albu, 1997; Weinsier et al., 1998).

Deste modo, o sedentarismo e os hábitos nutricionais parecem representar o principal fator de risco no desenvolvimento da obesidade mundial (Pereira et al., 1999). O Brasil parece estar seguindo esta mesma linha, visto que em 2003 a prevalência de obesidade no país foi estimada em 11% da população, enquanto em 1989 era de 9,6% e em 1974 era de 5,7% (IBGE, 2003). Levantamento do Ministério da Saúde referente ao ano de 2003 demonstra que cerca de 40,6% da população adulta já se encontra com sobrepeso.

## **1.5. Modelos experimentais de obesidade**

O estudo da obesidade em humanos provavelmente responderia muitas dúvidas correntes neste tópico. No entanto, pesquisas com humanos têm óbvias limitações éticas e financeiras, além de estudo em animais permitir grande quantidade de pesquisas e resultados. Além disto, animais de laboratório podem ser mantidos em condições rigidamente controladas consumindo dieta controlada e mantidos livres de patógenos e germes. O fato de animais de laboratório também se tornarem obesos espontaneamente, alimentando-se de ração comercial, ou através de outras manipulações, abriu novas áreas para a pesquisa na área da obesidade. Mesmo que estes modelos animais não possam ser considerados exatamente os modelos de obesidade em humanos, eles ainda são de grande valor no estudo das condições bioquímicas, fisiológicas e patológicas necessárias para o acúmulo excessivo de adiposidade. Nos últimos 20 anos, aumentou muito o conhecimento sobre diversos fatores que contribuem para o desenvolvimento da obesidade, e as conseqüências endócrinas e metabólicas desta doença. Muito deste conhecimento foi derivado de estudos em modelos de obesidade animal. Estudos sobre as causas e tratamentos da obesidade têm sido desenvolvidos em animais que apresentam esta característica através de lesão neural, alterações endócrinas, anormalidades genéticas e alterações alimentares (Sclafani e Springer, 1976).

## **1.6. Compostos Fenólicos**

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo conhecida atualmente mais de 8.000 estruturas. São metabólitos secundários de plantas, que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Tais substâncias ocorrem naturalmente em frutas frescas, vegetais, nos chás e nos vinhos tintos e fazem parte integral da dieta humana (Manach et al., 2004).

Pesquisas sobre a absorção e biodisponibilidade de polifenóis ainda são escassas, principalmente devido a limitações de métodos analíticos devidamente validados. A maioria desses compostos está presente nos alimentos na forma de ésteres, glicosídios ou de polímeros que não são possíveis de ser absorvidos na sua forma nativa. Sabe-se que a estrutura química dos polifenóis e a composição da microflora intestinal determinam a taxa



e a extensão da absorção e a natureza dos metabólitos circulantes no plasma (Scalbert & Williamson, 2000). A medida direta da concentração destes compostos na circulação e urina e o aumento da capacidade antioxidante do plasma após sua ingestão, podem fornecer evidências de sua absorção no trato gastrointestinal (Manach et al., 2004).

Após a ingestão, os fenólicos são conjugados no intestino delgado e mais tarde no fígado. Aparecem no plasma de uma a sete horas após sua ingestão, geralmente conjugados com ácido glucurônico ou como compostos sulfatados e metilados (Manach et al., 2004; Nardini et al., 2002; Scalbert et al., 2005).

Acredita-se que a biodisponibilidade e atividade biológica dos polifenóis estejam 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 polifenóis têm sido objeto de estudo de muitas pesquisas por estarem associados à prevenção de doenças crônico-degenerativas, como aterosclerose e câncer. A bioatividade dos fenólicos pode estar relacionada com potencial antioxidante, que é associada à própria natureza química deste grupo de compostos: devido à sua estrutura, polifenóis são em geral bons agentes redutores e, juntamente com outros agentes redutores encontrados na dieta tais como vitamina C, vitamina E e carotenóides, podem proteger tecidos e estruturas celulares contra danos oxidativos (Vinson e Dabbag, 1998). Tais substâncias são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos através da captação de radicais livres, bloqueando reações em cadeia e algumas vezes agindo como quelantes de metais (Shahidi & Wanasundara, 1992), atuando tanto na etapa de iniciação como na de propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (Soares, 2002). Além do potencial antioxidante, os fenólicos possuem outras propriedades, dentre elas, atividade antiinflamatória, anti-agregação plaquetária, diurética, antiviral e anticarcinogênica, sendo também benéficos ao sistema cardiovascular por sua participação na vasodilatação (Rice-Evans et al., 1996; Neiva et al., 1999).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grandes grupos: os flavonóides e seus derivados e os ácidos fenólicos. Os flavonóides são os que

apresentam a estrutura química descrita como C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, sendo estes os compostos mais diversificados no reino vegetal. Podem ser representados pelas antocianinas, flavonas, flavonóis, catequinas, taninos e isoflavonas. 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 flavonóides atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres, em ambos os compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico. Esses compostos têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (Bianchi e Antunes, 1999). 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 do câncer, de doenças cardiovasculares e de outras 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 (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). 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 caféico, o qual, associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico (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 caféico, 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 Olthof et al., 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 e doenças cardiovasculares, entre outras (Waterman e Mole, 1994; Bravo, 1998; Karakayas, 2001; Soares, 2002; Mancine-Filho e Moreira, 2003; Giada e Mancine-Filho, 2004). Alguns autores verificaram seu efeito antioxidante na diminuição da oxidação *in vitro* de L.D.L., sendo comparado ao poder encontrado para a Vitamina E, C e  $\beta$ -Caroteno (Laranjinha et al., 1994; Vinson e Dabbagh, 1998). Essa ação antioxidante é devida à presença de um grupamento orto-di-hidroxila no anel aromático do ácido caféico, que atuaria como um acceptor de radicais livres, participando na fase de iniciação e de propagação do processo oxidativo (Monteiro e Trugo, 2005). Em outro trabalho, foi relatado que o 5-CQA apresentou propriedades anti-inflamatórias devido a sua capacidade de inibição do processo inflamatório mediado por citocinas (Tatefuji et al., 1996). No estudo conduzido por Parker et al. (1998) e Herling et al., (1999) observou-se uma diminuição dos níveis sanguíneos de glicose, por meio da inibição da enzima glicose-6-fosfatase após uso de injeções de ACG. Essa variedade de efeitos benéficos atribuídos ao ACG, preponderantemente ao 5-CQA, tem encorajado muitos pesquisadores a trabalhar com essa família de compostos fenólicos (Clifford e Ramirez-Martinez, 1990; Gugliucci e Menini, 2002; Nardine et al., 2002; Olthoff et al., 2003; Bastos et al., 2005).

### **1.7. Erva-mate - *Ilex paraguariensis***

A *Ilex paraguariensis* é uma árvore da família das aquifoliáceas, originária da região subtropical da América do Sul, presente no sul do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai. Entretanto, cerca de 80% da área de ocorrência pertence ao Brasil, distribuindo-se entre os Estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A região Sul é a maior produtora, onde é explorada por pequenos produtores que se reúnem em cooperativas para processá-la ou comercializá-la (Heck e Mejla, 2007). O consumo de bebidas a base de erva-mate remonta a centenas de anos. Os indígenas das nações Guarani e Quíchua tinham o hábito de beber infusões com suas folhas. Atualmente os produtos da erva-mate são consumidos

como chá quente ou gelado, como chimarrão (Brasil) ou tererê (Mato Grosso do Sul e Paraguai) (Esmelindro et al., 2002; Bastos e Torres, 2003).

A *Ilex paraguariensis* é utilizada na medicina popular e por herboristas, sendo recomendada 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 inclusive em importantes farmacopéias como a Martingdale e a British Herbal Pharmacopoeia (Anesini et al., 2006).

Os principais fitoquímicos 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 as agliconas, os ácidos ursólico e oleanólico (Gnoatto et al., 2007). Tais substâncias são responsáveis pelo amargor e espuma do mate e pela atividade antiinflamatória além de outras inúmeras propriedades biológicas (Gnoatto et al., 2007). Entre os compostos fenólicos destaca-se o elevado conteúdo de derivados cafeoilquímicos, como o ACG e seus isômeros, aos quais se atribui a ação adstringente e antioxidante do produto (Clifford, 1990; Cardozo-Junior et al., 2007). Além do ACG, 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).

## **1.8. Principais produtos comerciais**

### **Chimarrão e Tererê**

O chimarrão e o tererê são as denominações dadas tradicionalmente à erva-mate seca, triturada e socada com grande porcentagem de paus, folhas, pó e goma. Chimarrão é destinado à degustação em cuia, com água quente conservando o paladar amargo. O tererê consiste em infusão de erva-mate degustada com água gelada (Bastos e Torres et al., 2003; Embrapa, 2006). O processamento da erva-mate para chimarrão e tererê consiste basicamente de três etapas: sapeco, secagem e cancheamento. O sapeco é

realizado junto ao fogo direto e consiste na passagem rápida dos ramos com folhas sobre as chamas do sapecador. O equipamento consiste de um cilindro metálico, perfurado e inclinado através do qual a erva colhida passa recebendo as chamas. Esta etapa tem por função a retirada da umidade superficial e inativação de enzimas (peroxidase e polifenoloxidase) que causam a oxidação do produto. A temperatura média da erva na entrada do sapecador é de 400°C e na saída é de 65°C. O tempo de residência oscila em torno de 8 minutos. O tempo de residência e a temperatura média da erva nos secadores dependem das características operacionais de cada sistema. No secador de esteira, o tempo médio é de 3 horas e a temperatura varia entre 90 e 110°C. No secador rotativo, o produto permanece em contato direto com a fumaça por aproximadamente 30 minutos. No entanto, a temperatura não apresenta a mesma uniformidade da utilizada no secador de esteira, sendo que na entrada do secador a temperatura média é de 350°C e na saída 110°C. O cancheamento consiste na trituração da erva após o processo de secagem. Em seguida, a erva é peneirada e o material coletado passa a denominar-se erva cancheada. Esta pode ser usada diretamente como matéria-prima para a produção de chás ou, após passar por um processo de soque, de chimarrão (Esmelindro et al., 2002; Bastos e Torres, 2003; Embrapa, 2006).

### **Chá mate tostado**

A erva-mate padronizada para preparação do chá mate tostado é um produto beneficiado constituído somente de folhas ou de folhas e de galhos, triturados e tostados em equipamentos apropriados. A erva-mate passa por um sistema de forno com fogo indireto semelhante ao que se usa para torrefação de café, para então dar origem ao chá mate tostado. Depois de tostado, o mate passa por um processo de extração, por água quente e vapor sob pressão, em colunas extratoras, onde são retirados os sólidos solúveis. O líquido extraído (extrato) é adoçado transformando-se em xarope. O extrato é desidratado em contato com ar quente transformando-se em mate solúvel (Bastos e Torres, 2003; Embrapa, 2006).

## 1.9. Propriedades funcionais da Erva-mate

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) (Glugliucci, 1996; Glugliucci e Stahl, 1995; Campos et al., 1996). Filip et al. (2000) e Filip et al. (2001) observaram um maior potencial antioxidante da erva-mate quando comparada a diferentes espécies de *Ilex* consumidas na América do sul. No estudo realizado por Bastos et al. (2007), os extratos de erva-mate tanto verde quanto tostada apresentaram atividade antioxidante *in vitro* superior à do chá verde (*Camellia sinensis*). Em outra pesquisa verificou-se que a erva-mate apresentava atividade antioxidante equivalente ou superior à vitamina C, Vitamina E e ou Trolox, substâncias consideradas como padrão para essa propriedade (Laranjinha et al., 1994; Vinson e Dabbagh, 1998; Schinella et al., 2000; Gugliucci e Menini, 2002; Chandra e Mejia, 2004). Na seqüência, outros resultados publicados a partir de ensaios com infusões da erva-mate verde demonstraram alguns dos efeitos farmacológicos popularmente atribuídos a esta planta: efeito colerético e de propulsão 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 e Gugliucci, 2005), ação hipocolesterolêmica (Stein et al., 2005), efeito vasodilatador e vasorelaxante (Baisch et al., 1998; Stein et al., 2005), e atuação no impedimento da progressão da aterosclerose (Mosimann et al., 2006). Outros trabalhos demonstraram a atividade antioxidante relacionada ou não com a inibição do processo de oxidação da L.D.L. e alterações na estrutura e no sistema de reparo do D.N.A., o que poderia contribuir para prevenção da aterosclerose e câncer (Filip et al., 2000; Gugliucci e Menini, 2002; Bracesco et al., 2003; Ramirez-Mares et al., 2004; Bastos et al., 2006; Menine et al., 2007; Miranda et al., 2008).

## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é avaliar a atividade biológica da infusão de erva mate tostada.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

- Avaliar a possível reversão da resistência a insulina induzida pela obesidade através do Teste de Tolerância a Insulina (TTI);
- Avaliar o perfil lipídico por meio dos níveis de colesterol e frações (HDL, LDL) e níveis de triacilgliceróis;
- Determinar as concentrações das enzimas hepáticas aspartato (AST) e alanina (ALT) amino transferases;
- Avaliar a capacidade quimioprotetora do D.N.A. das duas concentrações através do ensaio cometa em linfócitos;
- Avaliar a capacidade quimioprotetora do D.N.A. das duas concentrações através do ensaio cometa em linfócitos após o desafio com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

A erva-mate tostada solúvel foi doada pela empresa Leão Jr. Curitiba, Paraná. Um único lote foi utilizado para todo o experimento. O teor de fenólicos do chá utilizado foi determinado pelo método de folin, sendo 350mg/g.

#### 3.2. Preparo dos extratos aquosos

Os experimentos foram realizados com erva-mate solubilizada em solução fisiológica nas concentrações de 1,0 g.kg<sup>-1</sup> e 2,0 g.kg<sup>-1</sup>, administrando-se o mesmo volume de extrato nas duas concentrações.

#### 3.3. Animais

Foram utilizados 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 12 horas, 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.

#### 3.4. 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. O **Quadro 2** ilustra as dietas usadas no presente trabalho.



**Quadro 2** – Dietas utilizadas no trabalho.

	Dieta Padrão		Dieta Hiperlipídica	
	g.kg <sup>-1</sup>	kcal.kg <sup>-1</sup>	g.kg <sup>-1</sup>	kcal.kg <sup>-1</sup>
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	-
<b>Total</b>	1000	<b>3948</b>	1000	<b>5358</b>

### 3.5. 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 oito semanas. Depois destas oito semanas os animais foram subdivididos aleatoriamente de acordo com a dieta e a intervenção escolhida. A intervenção consistiu na administração de uma dose diária de água ou de mate (1,0 g.kg<sup>-1</sup> e 2,0 g.kg<sup>-1</sup>) durante mais 8 semanas (**Quadro 3**). A administração das substâncias foi realizada com auxílio de uma cânula orogástrica que garantiu a ingestão.

**Quadro 3** – Grupos experimentais.

<b>Grupos</b>	<b>Dieta 8 Sem.</b>	<b>Dieta</b>	<b>Intervenção 8 Semanas</b>	<b>Nº. animais</b>
<b>Grupo I</b>	DP	DP	Água	10
<b>Grupo II</b>	DP	DP	Mate 1g.kg <sup>-1</sup>	10
<b>Grupo III</b>	DP	DP	Mate 2g.kg <sup>-1</sup>	10
<b>Grupo IV</b>	DH	DH	Água	10
<b>Grupo V</b>	DH	DH	Mate 1g.kg <sup>-1</sup>	10
<b>Grupo VI</b>	DH	DH	Mate 2g.kg <sup>-1</sup>	10
<b>Grupo VII</b>	DH	DP	Água	10
<b>Grupo VIII</b>	DH	DP	Mate 1g.kg <sup>-1</sup>	10
<b>Grupo IX</b>	DH	DP	Mate 2g.kg <sup>-1</sup>	10

### **3.6. Testes bioquímicos**

Após sessenta dias do início da intervenção, os animais foram anestesiados (ketamina/xilazina (1:1 v/v) e amostras do sangue foram coletadas através de punção cardíaca. O plasma foi obtido pela centrifugação (800 x g) do sangue por 10 minutos e imediatamente as concentrações do colesterol total (CHOL), triacilglicerol (TG) e lipoproteína de alta densidade (HDL) foram determinadas usando o sistema Cobas-Mira System (Roche Diagnostics). A lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi calculada utilizando a Fórmula de Friedwald em que: LDL colesterol (mg/dl) = Colesterol total – (TG/5 + HDL-colesterol). A concentração das enzimas hepáticas aspartato (AST) e alanina (ALT) amino transferases no plasma foram determinadas pelo mesmo sistema Cobas-Mira System (Roche Diagnostics).

### **3.7. Teste de Tolerância a Insulina (T.T.I)**

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).

### **3.8. Ganho de peso e crescimento**

A ingestão e o peso dos animais foram monitorados durante todo o experimento, para avaliar a curva de ganho de peso e crescimento.

### **3.9. Determinação da atividade antioxidante – Ensaio cometa**

Após o sacrifício dos animais, o sangue foi isolado e congelado apropriadamente em freezer -80°C para a determinação dos danos oxidativos ao D.N.A..

A avaliação dos danos oxidativos ao D.N.A. de linfócitos foi feita por meio do ensaio cometa (*comet assay*). Através desta técnica foi possível detectar danos no D.N.A. em linfócitos. 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 400 g 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 100 g a 20°C por 15 min. Descartado o sobrenadante, as amostras foram ressuspendidas em 500 µl de Hank's.

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

A fim de avaliar o possível efeito protetor contra danos oxidativos ao D.N.A., 200 µl da suspensão celular foi tratada com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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 (baixo ponto de fusão)* 0.5 % (Promega), postos sobre uma lâmina e cobertos com uma lamínula. Estas foram imersas em uma solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% SDS, pH 10 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) e permaneceram a 4°C durante a noite. Este procedimento removeu o citoplasma e a maior parte das proteínas nucleares, deixando o D.N.A. super-helicoidizado em um formato nucleóide. A presença de quebras no D.N.A. relaxa a espiralização do D.N.A. e a subsequente eletroforese alcalina relaxa ainda mais as alças do D.N.A., 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 D.N.A., 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 programa de computador Komet 5.5 (Kinetic Imaging, USA).

### **3.10. Análise estatística**

Para a significância dos dados de análise foi utilizado análise de variância (ANOVA), seguido por Bonferroni's post hoc 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. RESULTADOS

### 4.1. Modelo experimental de obesidade

Após 8 semanas consumindo a DH os animais apresentaram uma alteração significativa no peso corpóreo, glicemia basal e resistência à insulina quando comparados aos animais do grupo controle. Além disso, observou-se também que os níveis de colesterol, triglicérides, LDL colesterol, bem como as concentrações das enzimas ASL e ALT foram significativamente mais elevadas nos animais tratados por oito semanas com DH (**Tabela 1**). Nesta etapa do projeto fomos capazes de implementar, com sucesso, o modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Os nossos resultados indicam que a dieta aumentou significativamente o peso dos animais e, além disso, os animais obesos apresentavam resistência a insulina e alterações nos diversos parâmetros bioquímicos avaliados. Tais alterações são compatíveis com resultados descritos anteriormente e mimetizam as alterações que a obesidade gera em seres humanos (Araújo et al., 2007).

### 4.2. Intervenção com *Ilex paraguariensis* e peso e parâmetros bioquímicos

O peso dos animais bem como os resultados dos testes bioquímicos obtidos após a intervenção com erva-mate acham-se descritos na **Tabela 2**. Em relação aos animais que receberam a DH durante todo o experimento (GIV, GV e GVI), os resultados do presente trabalho indicam que a intervenção, em ambas as concentrações testadas, alterou algumas variáveis estudadas. Os dados obtidos mostram que o consumo de erva mate a 1,0 g.Kg<sup>-1</sup> e 2,0 g.Kg<sup>-1</sup> levaram a uma redução significativa no peso corpóreo total dos camundongos, na glicemia basal e resistência à insulina. Além disso, os resultados obtidos indicam uma diminuição significativa nos níveis de colesterol, triglicérides e LDL colesterol. Ao dosarmos as concentrações das enzimas hepáticas os dados deste trabalho indicam que após a intervenção houve uma redução significativa nos níveis de AST. (**Tabela 2**).

Nos animais que receberam a DH nas primeiras oito semanas do estudo e, subsequentemente, tiveram a substituição desta pela DP (GVII, GVIII e GIX), os dados referentes ao presente estudo mostram que a intervenção com erva mate, em ambas as doses, juntamente com a restrição calórica, foi responsável por uma alteração significativa

em algumas variáveis estudadas (peso corpóreo, glicemia basal, colesterol, triglicérides e LDL colesterol) em todos os grupos (**Tabela 2**).

**Tabela 1** – Obesidade induzida por dieta após 8 semanas: parâmetros clínicos e bioquímicos.

	<i>Dieta Padrão</i>	<i>Dieta Hiperlipídica</i>
<b>Peso Corpóreo (g)</b>	38,00 ± 1,39	51,81 ± 4,37*
<b>Glicemia Basal (mg/dL)</b>	144,37 ± 36,78	264,00 ± 24,48*
<b>KITT</b>	2,64 ± 0,20	1,33 ± 0,18*
<b>CHOL (mg/dL)</b>	86,37 ± 6,43	188,37 ± 9,54**
<b>TG (mg/dL)</b>	130,40 ± 3,61	178,73 ± 5,69*
<b>HDL (mg/dL)</b>	38,31 ± 3,06	48,54 ± 4,58
<b>LDL (mg/dL)</b>	21,98 ± 1,35	104,08 ± 3,78**
<b>AST (mg/dL)</b>	79,38 ± 3,51	128,74 ± 6,11*
<b>ALT (mg/dL)</b>	49,61 ± 5,51	78,44 ± 9,29*

\* p < 0,05 e \*\* p < 0,01.

**Tabela 2** – Parâmetros antropométricos e bioquímicos nos grupos estudados após 16 semanas.

	Dieta Padrão			Dieta Hiperlipídica			Dieta Hiperlipídica/Padrão		
	GI Água	GII Mate 1g.Kg <sup>-1</sup>	GIII Mate 2g.Kg <sup>-1</sup>	GIV Água	GV Mate 1g.Kg <sup>-1</sup>	GVI Mate 2g.Kg <sup>-1</sup>	GVII Água	GVIII Mate 1g.Kg <sup>-1</sup>	GIX Mate 2g.Kg <sup>-1</sup>
<b>Peso Corpóreo (g)</b>	43 ± 1,41	41,5 ± 2,82	40,3 ± 2,82	<b>54 ± 10,09*</b>	50,08 ± 9,85 <sup>#</sup>	51,91 ± 8,26 <sup>#</sup>	47,60 ± 2,88*	42,80 ± 4,82 <sup>@</sup>	42,50 ± 3,70 <sup>@</sup>
<b>Glicemia Basal (mg/dL)</b>	154,67 ± 17,93	162 ± 13,45	149 ± 8,72	<b>284,60 ± 24,48*</b>	201,33 ± 30,24 <sup>#</sup>	200,33 ± 25,79 <sup>#</sup>	268,67 ± 41,05*	177,33 ± 13,01 <sup>@</sup>	197,00 ± 11,14 <sup>@</sup>
<b>K<sub>ITT</sub></b>	2,75 ± 0,20	ND	ND	<b>1,35 ± 0,40*</b>	2,42 ± 0,93 <sup>#</sup>	2,07 ± 0,60 <sup>#</sup>	ND	ND	ND
<b>CHOL (mg/dL)</b>	88,67 ± 6,43	83 ± 7,81	88,33 ± 8,5	<b>203,00 ± 9,54*</b>	160,33 ± 7,02 <sup>#</sup>	155,67 ± 14,29 <sup>#</sup>	129,67 ± 4,04*	112,67 ± 7,57 <sup>@</sup>	115,33 ± 6,11 <sup>@</sup>
<b>TG (mg/dL)</b>	132,00 ± 3,61	134,67 ± 6,51	138,67 ± 14,19	<b>190,33 ± 5,69*</b>	126,67 ± 8,96 <sup>#</sup>	135,00 ± 8,89 <sup>#</sup>	168,00 ± 4,58*	142,67 ± 5,86 <sup>@</sup>	139,67 ± 7,51 <sup>@</sup>
<b>HDL (mg/dL)</b>	40,67 ± 3,06	38,67 ± 7,02	39 ± 3,61	52,00 ± 4,58	47,67 ± 6,03	53,33 ± 4,51	47,00 ± 2,00	40,33 ± 7,64	41,33 ± 2,89
<b>LDL (mg/dL)</b>	21,60 ± 8,23	17,39 ± 2,66	21,59 ± 8,63	<b>112,93 ± 7,38*</b>	87,32 ± 12,86 <sup>#</sup>	75,34 ± 17,60 <sup>#</sup>	49,07 ± 4,02*	43,80 ± 13,33	46,06 ± 3,01
<b>AST (mg/dL)</b>	82,33 ± 3,51	81,00 ± 4,36	81,33 ± 4,93	<b>137,33 ± 6,11*</b>	127,00 ± 7,00 <sup>#</sup>	122,00 ± 9,85 <sup>#</sup>	123,33 ± 8,33*	119,00 ± 8,89	119,00 ± 5,59
<b>ALT (mg/dL)</b>	53,67 ± 5,51	54,00 ± 10,82	57,67 ± 13,43	81,33 ± 9,29*	74,67 ± 6,03	69,67 ± 5,86	77,00 ± 6,24*	62,67 ± 3,51	53,67 ± 3,79

\*p < 0,05 \*\*p < 0,01, quando comparado ao grupo GI; #p < 0,05, quando comparado ao grupo GIV; @p < 0,05 @@ p < 0,01, quando comparado ao grupo GVII.

#### 4.3. Determinação dos níveis de oxidação ao D.N.A. – Ensaio cometa

Os níveis de danos oxidativos ao D.N.A. de amostras oriundas dos linfócitos foram avaliados por meio do ensaio cometa. Além disso, a resistência do D.N.A. ao ataque induzido *ex vivo* por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliado como um indicador da capacidade antioxidante.

Os dados referentes às análises do ensaio cometa (**Tabela 3**) mostram que somente os grupos submetidos à dieta hiperlipídica durante 16 semanas e que receberam a intervenção com erva-mate (GV e GVI) apresentaram uma redução significativa nos níveis de danos ao D.N.A. quando comparados ao grupo controle (GIV), independentemente da dose administrada. Além disso, nossos dados indicam que a erva mate não é genotóxica, pois os níveis de danos oxidativos ao D.N.A. (dos grupos submetidos a dieta padrão) após o período de intervenção apresentaram uma redução, não sendo porém estatisticamente significativa.

Em relação ao efeito protetor contra danos oxidativos ao D.N.A. induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Tabela 4**) os resultados deste trabalho mostram que a intervenção foi capaz de inibir os danos gerados somente nas amostras oriundas dos grupos DH, apesar dos demais grupos também apresentarem uma redução nos níveis de danos ao D.N.A., porém esta não foi significativa do ponto de vista estatístico.



**Tabela 3** – Efeito da intervenção com erva mate nos níveis de danos oxidativos ao D.N.A..

	Danos ao D.N.A.		
	DP (T.M ± D.P)	DH (T.M ± D.P)	DH/DP (T.M ± D.P)
Controle	2.00 ± 0.54 G I	5.91 ± 0.58 G IV	4.21 ± 0.32 G VII
Mate 1g.kg <sup>-1</sup>	1.66 ± 0.24 G II	4.71 ± 0.86* G V	3.88 ± 0.61 G VIII
Mate 2g.kg <sup>-1</sup>	1.45 ± 0.27 G III	4.48 ± 0.78* G VI	3.73 ± 0.57 G IX

Os valores representam a media do *tail moment* (TM) de 100 células em unidades arbitrárias, \* p < 0,05 quando comparados ao grupo controle.

**Tabela 4** – Efeito da intervenção com erva mate nos níveis de danos oxidativos ao D.N.A. induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

	Danos ao D.N.A. induzidos por 100 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
	DP (T.M ± D.P)	DH (T.M ± D.P)	DH/DP (T.M ± D.P)
Controle	3.82 ± 1.37 G I	7.97 ± 0.64 G IV	5.31 ± 0.63 G VII
Mate 1g.kg <sup>-1</sup>	3.67 ± 1.28 G II	5.98 ± 0.97* G V	4.81 ± 0.78 G VIII
Mate 2g.kg <sup>-1</sup>	3.53 ± 0.90 G III	5.92 ± 0.81* G VI	4.73 ± 0.89 G IX

Os valores representam a media do *tail moment* (TM) de 100 células em unidades arbitrárias, \* p < 0,05 quando comparados ao grupo controle.

## 5. DISCUSSÃO

A obesidade é considerada um dos maiores problemas de saúde pública na atualidade, principalmente devido a sua associação com o desenvolvimento de algumas doenças tais como: a hipertensão, dislipidemia, aterosclerose, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (Guzik et al., 2006). A combinação de alguns desses fatores caracterizam a Síndrome Metabólica, que é caracterizada pela hiperinsulinemia e por diferentes intensidades de resistência à insulina, que explicam a relação entre várias anormalidades e a obesidade (Weisberg et al., 2006). Além disso, sugere-se que a metabólica estaria associada ao desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Mulhall et al., 2002). Esta engloba um amplo espectro de doenças que abrange desde a esteatose hepática simples sem sinais inflamatórios até manifestações mais severas como a esteatohepatite não alcoólica (EHNA) e a cirrose hepática (Angulo e Lindor, 2002). Normalmente pacientes com DHGNA apresentam um processo inflamatório, levando ao aumento das concentrações plasmáticas das enzimas hepáticas como a ALT e a AST. Desta forma, as enzimas AST e ALT são utilizadas como biomarcadores para identificação de possíveis doenças hepáticas, sendo que o aumento destas pode ser associada à obesidade e à síndrome metabólica (Clark e Diehl, 2003; Clarck et al., 2003).

O presente estudo demonstra que a intervenção por 8 semanas com extrato aquoso de erva mate em camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica proporciona uma redução significativa no peso corpóreo, glicemia basal, resistência à insulina, níveis de colesterol e triglicérides. Ao avaliarmos as enzimas hepáticas após intervenção, os dados deste trabalho indicam que houve uma redução significativa nos níveis de AST.

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 caféico 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). Os ácidos clorogênicos são um grupo importante de polifenóis dietéticos biologicamente ativos de uma família de ésteres formados pelos ácidos quínico e caféico, sendo o mais comum e conhecido o ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) (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 a voluntários humanos, estes demonstraram um retardo no esvaziamento gástrico. Tais dados sugerem que a presença de saponinas em alguns dos compostos 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 erva 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 5**).

**Tabela 5** - 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
<b>Quantidade ingerida (g)</b>	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.

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). Esses dados poderiam justificar, em parte, as reduções observadas nos parâmetros lipídicos avaliados após intervenção com erva-mate. Outros autores relataram que os ácidos clorogênicos poderiam ter uma importante ação anti-obesidade devido a redução da glicemia pós prandial, do colesterol e triglicérides 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).

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).

A obesidade leva a uma inflamação generalizada caracterizada pelo aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias. A presença de algumas citocinas pró-inflamatórias é importante para o estabelecimento do quadro de resistência à insulina, dentre 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 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 (Espósito et al., 1999; Fasshauer et al., 2003).

Outra citocina importante é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) 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- $\alpha$  e o metabolismo da glicose (Winkler et al., 2003; Hsueh e Law, 2003). Este efeito ocorre em razão da supressão pelo TNF- $\alpha$  da sinalização da insulina, reduzindo a fosforilação do IRS-1. Tal fato resulta na redução da síntese e translocação do 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 ao diabetes tipo 2 (Arner, 1995; Araújo et al., 2007).

Diversos estudos mostram que os níveis de RNAm de TNF- $\alpha$  são elevados 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- $\alpha$  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<sup>2</sup>) e obesos (IMC >

30 kg/m<sup>2</sup>), houve correlação positiva entre níveis de TNF- $\alpha$  e IMC, sugerindo a correlação entre níveis altos de TNF- $\alpha$  e o acúmulo de tecido adiposo, principalmente em indivíduos obesos (Montague et al., 1998). Além disso, o TNF- $\alpha$  ativa a transcrição do fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), que orquestra 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).

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. Esta enzima induz a degradação intracelular do AMP cíclico (cAMP), e sua inibição leva a um 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. Já foi relatada uma relação direta entre o aumento da obesidade, a redução na produção das enzimas antioxidantes e o aumento do estresse oxidativo, mostrando que o aumento de ácido graxo armazenados nos adipócitos estimula a produção de EROs pela ativação da via NADPH oxidase (Furukawa et al., 2004).

De maneira similar a produtos naturais ricos em compostos fenólicos e vitaminas antioxidantes, a atividade antioxidante de infusões de erva-mate tem sido objeto de estudos (Gugliucci, 1996; 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 seqüestrar 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 e Menini, 2002; Bastos et al., 2005; Ramirez-Mares et al., 2004).

A erva-mate pode ser considerada uma fonte de baixo custo de compostos com atividade antioxidante na dieta. No entanto a maioria das pesquisas foi realizada com a erva-mate verde e cancheada (*Ilex paraguariensis*) sendo escassos os trabalhos que evidenciam 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 D.N.A. (Ames, 1983). Tendo em vista que os linfócitos são excelentes marcadores das condições de saúde do corpo, vários trabalhos indicam a aplicabilidade em se avaliar os danos oxidativos ao D.N.A. nestas células (Oldham et al., 2002).

A fim de avaliar a ação protetora/antioxidante de compostos naturais e sintéticos, diversos trabalhos mostram que o ensaio cometa (*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 desta metodologia é possível detectar quebras em fitas simples e duplas e oxidação em bases do D.N.A. (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 D.N.A., por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), para verificar a capacidade que as células teriam em se proteger após o desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Festa et al., 2001; Shi et al., 2002).

Os dados aqui apresentados referentes às análises dos linfócitos pelo ensaio cometa mostram que somente os grupos submetidos à dieta hiperlipídica durante todo o experimento e que receberam a intervenção com erva-mate (GV e GVI) apresentaram uma redução significativa nos níveis de danos ao D.N.A. quando comparados ao grupo controle (GIV), independentemente da dose administrada. O mecanismo antioxidante proposto relaciona-se possivelmente com os altos teores de ácido clorogênico e cafeíco (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 e Stahl, 1995; Gugliucci, 1996; Gugliucci e Menine, 2002). Segundo Cintra e Mancini Filho (1996) os compostos fenólicos podem reagir com as EROs, como o radical superóxido e 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 (Monteiro et al., 2007; Nardine et al., 2002).

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 caféico 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 D.N.A. dos animais submetidos à dieta padrão se mantiveram inalterados após o período de intervenção.

Em relação ao efeito protetor contra danos oxidativos ao D.N.A. induzidos por peróxido de hidrogênio os resultados deste trabalho mostram que a intervenção com erva-mate foi capaz de inibir os danos gerados de maneira significativa nas amostras oriundas dos grupos com dieta hiperlipídica. Apesar dos demais grupos submetidos à intervenção apresentarem uma redução nos níveis de danos ao D.N.A., esta não foi significativa do ponto de vista estatístico. Acredita-se que esta proteção observada deva-se principalmente a presença dos compostos polifenólicos existentes na erva mate, que possivelmente atua seqüestrando os radicais livres formados pelo peróxido de hidrogênio antes que esses possam causar danos ao D.N.A..

## 6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou os seguintes efeitos benéficos da ingestão de erva mate por camundongos diante de um modelo de obesidade induzido por dieta:

- Reversão do quadro de resistência a insulina;
- Diminuição dos níveis de colesterol total, LDL colesterol e triglicérides;
- Diminuição dos níveis da enzima aspartato amino transferases (AST);
- Melhora da capacidade quimioprotetora do D.N.A. em linfócitos;
- Melhora da capacidade de proteção celular após o desafio com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que a erva-mate pode atuar por diferentes mecanismos: além de ocorrer diretamente, por meio da neutralização de espécies reativas, pode-se processar através de mecanismos indiretos como, por exemplo, a redução de peso que por sua vez leva a uma melhora no contexto geral do indivíduo obeso.

Portanto, a ingestão de erva-mate pode contribuir para diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônicas relacionadas a processos oxidativos, assim como de enfermidades associadas à síndrome metabólica, podendo desta forma ser utilizada como uma ferramenta no combate a esta enfermidade que leva à morte milhões de pessoas no mundo todo e gera inúmeros gastos ao sistema de saúde.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Ahima, R.S.; Flier, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab**, 11:327-32, 2000.

Albu, J.; Shur, M.; Curi, M.; Murphy, L.; Heymsfield, S.B.; Pi-Sunyer, F.X. Resting metabolic rate in obese, premenopausal black women. **Am J Clin Nutr**, 66:531-38, 1997.

Alikaridis, F. Natural constituents of *Ilex* species. **J Ethnopharmac**, 20:121-44, 1987.

Ames, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. **Scienc**, 23;221(4617):1256-64, 1983.

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

Anesini, C.; Ferraro, G.; Filip, R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. **Food Chem**, 97 (3): 459-64, 2006.

Angulo, P.; Lindor, K.D. Non-alcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol Hepatol**, 17 S186 –S190, 2002.

Araújo, E.P.; De Souza, C.T.; Ueno, M.; Cintra, D.E.; Bertolo, M.B.; Carvalheira, J.B.; Saad, M.J.; Velloso, L.A. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. **Endocrinology**, 148:5991-97, 2007.

Arion, W.J.; Canfield, W.K.; Ramos, F.C.; Su, M.L.; Burger, H.J.; Hemmerle, H.; Schubert, G.; Below, P.; Herling, A.W. Chlorogenic acid analogue S 3483: a potent competitive inhibitor of the hepatic and renal glucose-6-phosphatase systems. **Arch Biochem Biophys**, 351(2):279-85, 1998.

Arner, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. **Ann Med**, 27:435-38, 1995.

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

Baisch, A.L.M.; Johnston, K.B.; Stein, F.L.P. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. **J Ethnopharmacol**, 60 (2): 133-39, 1998.

Bassoli, B.K.; Cassolla, P.; Borba-Murad, G.R.; Constantin, J.; Salgueiro-Pagadigorria, C.L.; Bazotte, R.B.; da Silva, R.S.; de Souza, H.M. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. **Cell Biochem Funct**, 26(3):320-28.

Bastos, D.H.M.; Torres, E.A.F.S. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Nutrire**, (26):77-89, 2003.

Bastos, D.H.M.; Fornari, A.C.; Queiroz, Y.S. et al. The chlorogenic acid and caffeine content of yerba mate (*Ilex p*) beverages. **Acta Farm Bonaerense**, 24(1): 91-95, 2005.

Bastos, D.H.M.; Isshimoto, E.; Marques, M.O.M.; Fernando, F.A.; Torres, E.A.F.S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food and Analysis**, 19(6-7): 538-43, 2006.

Bastos, D.H.M.; Oliveira, D.M.; Matsumoto, R.L.T.; Carvalho, P.O.; Ribeiro, M.L. Yerba maté: Pharmacological properties, research and biotechnology. **Med and Arom Plant Science and Biotec**,1(1):37-46, 2007.

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

Berg, A.H.; Combs, T.P; Scherer, P.E. ACRP30/adiponectin: An adipokine regulating glucose and lipid metabolism. **Trends Endocrinol. Metab**, 13:84–89, 2002.

Bianchi, M.L.P.; Antunes, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, 12 (2): 123-30, 1999.

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**, 13:116-21, 1987.

Bracesco, N.; Dell, M.R.A.; Behtash, S.; Glugliucci, A. et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of D.N.A. double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **J Altern Complement Med**, 9(3):379-87, 2003.

Bravo, L. Poliphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr Rev**, 56 (11):317-33, 1998.

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

Cardozo-Junior, E.L.; Ferrarese-Filho, O.; Cardozo-Filho, L.; Ferrarese, M.L.L.; Donaduzzi, C.M.; Sturion, J.A. Methylxanthines and phenolic compounds contents in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **J Food Compost Anal**, 20:1-10, 2007.

Carini, M.; Facino, R.M.; Aldini, G.; Calloni, M.; Colombo, L.C. haracterization of phenolic antioxidants from maté (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/Tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, 12: 1813-19, 1998.

Carini D.J., Christ D.D., Duncia J.V., Pierce M.E. The discovery and development of angiotensin II antagonists. **Pharm Biotechnol**, 11:29-56, 1998.

Chandra, S.; Mejia, E.G. 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**, 52:3583-89, 2004.

Cintra, R.M.G.; Mancini Filho, J. Antioxidant activity of spices in different systems. **Abstract Book**, p90, 1996.

Clark, J.M.; Brancati, F.L.; Diehl, A.M. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. **Am J Gastroenterol**, 98:960-67, 2003.

Clark, J.M.; Diehl, A.M. Nonalcoholic fatty liver disease: an underrecognized cause of cryptogenic cirrhosis. **J Am Med Assoc**, 289:3000 -04, 2003.

Clifford, M.N.; Ramirez-Martinez, J.R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents on maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food C Hem**, (35):13-21, 1990.

Clifford, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. **J Sci Food Agric**, 79: 362-72, 1999.

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**, 83:2907-10, 1998.

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

De Stefani, E.; Fierro, L.; Mendilaharsu, M.; Ronco, A.; Larrinaga, M.T.; Balbi, J.C.; Alonso, S.; Deneo-Pellegrini, H. Meat intake, 'mate' drinking and renal cell cancer in Uruguay: a case-control study. **Br J Cancer**, 78:1239-43, 1998.

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

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

Degáspari, C.H.; Waszczynskyj, N. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica**, 5: 33-40, 2004.

Dunstan, D.W.; Daly, R.M.; 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**, 25(10):1729-36, 2002.

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa):** Cultivo da Erva-mate. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-mate/CultivodaErvaMate>>. Acesso em: 22 de setembro 2006.

Esmelindro, M.C.; Toniazzi, G.; Waczuk, A. et al. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciênc Tecnol Aliment**, 22 (2): 199-04, 2002.

Espósito, P.G.; D'Alessio, M.A.; Barbieri, M. Primary and secondary prevention of atherosclerosis: is there a role for antioxidants? **Diabetes Metab**, 25:298-06, 1999.

Farooqi, I. S. et al. Partial leptin deficiency and human adiposity. **Nature**, 414:34–35, 2001.

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**, 35:147-52, 2003.

Feinstein, R.; Kanety, H.; Papa, M.Z.; Lunenfeld, B.; Karasik, A. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **J of Biol Chem**, 268: 26055–58, 1993.

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**, 21(6A):3903-08, 2001.

Filip, R.S.; Lotito, S.B.; Ferraco, G.; Raga, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Res**; 20(10):1437-46, 2000.

Filip, R.; López, P.; Giberti, G.; Coussio, J.; Ferraro, G. Phenolic compounds in seven south american *Ilex* species. **Fitoterapia**, 72:774-78, 2001.

Fonseca, C.A.; Otto, S.S.; Paumgarten, F.J.; Leitão, A.C. Nontoxic, mutagenic, and clastogenic activities of Mate-Chimarrão (*Ilex paraguariensis*). **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, 19:333-46, 2000.

Francisch, R.P.; Pereira, L.O.; Lancha, Jr. A.H. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. **Rev Paul Educ Fis**, 117-40, 2001.

Freitas, C.S.; Klopfer, M.; Vieira, P.; Francischi, R.; Santos, R.; Pereira, L. et al. Perfil das mulheres obesas que procuram o programa de atividade física da Escola de Educação Física e Esporte. In: **V Congresso de Iniciação Científica e III Simpósio de Pós Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, São Paulo**, 1998:87-88, 1998.

Fried, S. K.; Bunkin, D. A.; Greenberg, A. S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. **J Clin Endocrin Metab**, 83:847–50, 1998.

Friedman, J. M.; Halaas, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, 395:763–70, 1998.

Furukawa, S.; Fujita, T.; Shimabukuro, M.; Iwaki, M.; Yamada, Y.; Nakajima, Y.; Nakayama, O.; Makishima and Shimomura, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**, 114:1752–61, 2004.

Giada, M.L.R.; Mancine-Filho, J. Avaliação da atividade antioxidante in vitro de compostos fenólicos de alimentos. **Nutrire**, (28):91-107, 2004.

Gnoatto, S.C.; 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.

Gorzalczany, S.; Filip, R.; Alonso, M.R.; Mino, J.; Ferraro, G.E.; Acevedo, C. Choleric effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. **J Ethnopharmacol**, 75(2-3):291-94, 2001.

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

Gugliucci, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of Human LDL in vivo. **Biochem and Biophys Res**, 224:338-44, 1996.

Glugliucci, A.; Menini, T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides*. **Life Sci**, (71): 693-05, 2002.

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

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**, 51:5655-60, 1991.

Hainault, I. Adipose tissue-specific increase in angiotensinogen expression and secretion in the obese (fa/fa) Zucker rat. **Am J Physiol Endocrin Metab**, 282:59-66, 2002.

Heck, I. e Mejia, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **J Food Sci**, 72(9):R138-R151, 2007.

Herling, A.W.; 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**, 386(1): 75-82, 1999.

Hotamisligil, G. S.; Shargill, N. S.; Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Sci**, 259:87-91, 1993.

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

**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)**. Estado Nutricional, Precisão das Estimativas e Totais da População. 2002-2003. Disponível em:  
><http://www.ibge.gov.br/home/estatística/populacao/condicaodevida/pof/2002analise/tab01e.pdf>< Acesso em: 20 agosto 2007.

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



Jebb, S.A. Obesity: from molecules to man. **The Nutrition Society Medical Lecture**. 58:1-14, 1999.

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

Karakayas, E.L. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. **Int J Food Sci Nutr**, (52): 501-08, 2001.

Kim, J.B.; Spiegelman, B.M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. **Genes Dev**, 10:1096-07, 1996.

Kim, J.K.; Wi, J.K.; Youn, J.H. Metabolic impairment precedes insulin resistance in skeletal muscle during high-fat feeding in rats. **Diabetes**, 45:651-58, 1996.

Klopfer, M.; Francischi, R.; Camargo, R.; Vieira, P.; Oquendo, L.; Freitas, C.S. et al. Moderate energy restriction with or without aerobic exercise: a comparison of three methods In: Diet and the metabolic syndrome – International Symposium, **Ystad**, 65, 1999.

Kuczmarski, R.J.; Flegal, K.M.; Campbell, S.M.; Johnson, C.L. Increasing prevalence of overweight among US adults: The national health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. **JAMA**, 272:205-11, 1994.

Laranjinha, J.Á.; Almeida, L.M.; Madeira, V.M. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. **Bioch Pharm**, 48: 487-94, 1994.

Lunceford, N. and Gugliucci, A. *Ilex paraguariensis* inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, 76:419-27, 2005.

Mahan, L.K.; Escott-Stump, S. Krause: **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 1998.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. and Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr**, 79:727–47, 2004.

Mancine-Filho, J.; Moreira, A.V.B. Efeito dos compostos fenólicos de especiarias sobre lípidos polinsaturados. **Rev Bras Ciênc Farm**, 9:130-33, 2003.

Martinez, J.A. Body-weight regulation: causes of obesity. **Proc Nutr Soc**, 59:337-45, 2000.

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**, 73(11):1141-47, 2007.

Miranda, D.D.; Arçari, D.P.; Pedrazzoli, J. Jr.; Carvalho, P.D.; Cerutti, S.M.; Bastos, D.H.; Ribeiro, M.L. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced D.N.A. damage and D.N.A. repair in mice. **Mutagenesis**, 24(4):375-81, 2008.

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

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

Monteiro, M.C. e Trugo L.C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Quim Nova**, 28(4): 637-41, 2005.

Monteiro, C.A.; Mondini, L.; Souza, A.L.M.; Popkin, B.M. 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**, 247-55, 1995.

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**, 137 (10): 2196-01, 2007.

Moore, M.C.; Cardin, S.; Edgerton, D.S.; Farmer, B.; Neal, D.W.; Lutz, M.; Cherrington, A.D. Unlike mice, dogs exhibit effective glucoregulation during low-dose portal and peripheral glucose infusion. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 286(2):E226-E233, 2004.

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

Mulhall, B.P.; Ong, J.P.; Younossi, Z.M. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. **J Gastroenterol Hepatol**, 17:1136–43, 2002.

Nardini, M.; Cirillo, E.; Natella, F. and Scaccini, C. Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption. **J Agric Food Chem**, 50 (20): 5735–41, 2002.

Neiva, T.J.C.; Morais, L.; Polack, M.; Simões, C.M.O.; D'amico, E.A. Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation. **Phytother Res**, 13: 597-00, 1999.

Oldham, K.M.; Wise, S.R.; Chen, L.; Stacewicz-Sapuntzakis, M.; Burns, J.; Bowen, P.E.; A longitudinal evaluation of oxidative stress in trauma patients. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, 189-97, 2002.

Olthof, M.R.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Extensively Absorbed in Humans. **J Nutr**, 131:66-71, 2001.

Olthof, M.R.; Hollman, P.C.H.; Buijsman, M.N.C.P.; Katan, M.B. Human Nutrition and Metabolism Chlorogenic Acid, Quercetin-3-Rutinoside and black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans. **J Nutr**, 133:1806-14, 2003.

Papanicolaou, D.A.; Wilder, R.L.; Manolagas, S.C.; Chrousos, G.P. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. **Ann Intern Med**, 128:127-37, 1998.

Parker, J.C.; VanVolkenburg, M.A.; Levy, C.B.; Martin, W.H.; Burk, S.H.; Kwon, Y.; Giragossian, C.; Gant, T.G.; Carpino, P.A.; McPherson, R.K.; Vestergaard P.; Treadway, J.L. Plasma glucose levels are reduced in rats and mice treated with an inhibitor of glucose-6-phosphate translocase. **Diabetes**, 47(10):1630-36, 1998.

Pereira, L.O.; Francischi, R.P.; Klopfer, M.; Perroti, A.C.; Campos, P.L.; Sawada, L.A. et al. Different intensities of physical activities with or without hypocaloric diet: effects on body composition, food consumption and plasmatic profile in obese women. **Med Sci Sports Exerc**, 30:238, 1998.

Pereira, L.O.; Francischi, R.P.; Klopfer, M.; Sawada, L.A.; Santos, R.; Vieira, P. et al. Obesidade e suas Implicações – Ação da Atividade Física e Controle Nutricional. **Rev Bras Nutr Clin**, 14:9-17, 1999.

Pereira, L.O.; Klopfer, M.; Vieira, P.; Francischi, R.P.; Camargo, R.S.; Freitas, C., et al. The evaluation of the best strategy to increase muscle mass and improve health in obese women. **Proc Nutr Soc**, 59:99, 1999.

Pool-Zobel, B. L.; 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 Mutag**, 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**, 93(1):93-99, 2005.

Pradhan, A.D.; Manson, J.E.; Rifai, N.; Buring, J.E.; Ridker, P.M. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **JAMA**, 286:327-34, 2001.

Ramirez-Mares, M.V.; Chandra, S.; Mejia, E.G. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutat Res**, 554:53-65, 2004.

Reaven, G.M. Syndrome X: 6 years later. **J Intern Med**, 736:13-22, 1994.

Ricco, R.A.; Wagner, M.L.; Gurni, A.A. Estudio comparativo de flavonoides en seis especies austrosudamericanas del género *Ilex*. **Acta Farm Bonaer**, 10:29-35, 1991.

Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic Biol Med**, 20(7): 933-56, 1996.

Rodriguez de Sotillo, D.V.R.; Hadley, M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (*fa/fa*) Zucker rats. **J of Nutritional Biochemistry**, 13:717-26, 2002.

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

Sartipy, P. and Loskutoff, D. J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci USA**, 100:7265-70, 2003.

Scalbert, A.; Williamson, G.; Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. **Journal of Nutrition**, 130: 2073S-85S, 2000.

Scalbert, A.; Johnson, I.T. and Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **Am J Clin Nutr**, 81: S215-217, 2005.

Schinella, G.R.; Troiani, G.; Dávila, V.; Buschiazzo, P.M.; Tournier, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochem and Biophys Res Commun**, 269:357-60, 2000.

Schutz, Y. Macronutrients and Energy Balance in Obesity. **Metabolism**, 44:7-11, 1995.

Sclafani, A.; Springer, D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. **Physiol Behav**, 17:461-71, 1976.

Shahidi, F.; Wanasundara, P.D. Phenolic antioxidants. **Rev Food Sci Nutr**, 32(1):67-103, 1992.

Shi, Y. L.; James, A. E.; Benzie, I. F.; Buswell, J. A. Mushroom-derived preparations in the prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage to cellular D.N.A.. **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**, 2:800-03, 1996.

Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of D.N.A. damage in individual cells. **Exp Cell Res**, 175: 184-91, 1998.

Soares, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev Nutr**, 15(1): 71-81, 2002.

Stein, F.L.P.; Schmidt, B.; Furlong, E.B.; Souza-Soares, L.A.; Soares, M.C.; Vaz, M.R.; Muccillo Baisch, A.L. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biol Res Nurs**, 7(2):146-56, 2005.

Strauss, R. Childhood obesity. **Curr Probl Pediatr**, 29:1-29, 1999.

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**, 19: 966–70, 1996.

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

Tsao, T. S.; Lodish, H. F. and Fruebis, J. ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. **Eur J Pharmacol**, 440:213–21, 2002.

Unger, R. H. The physiology of cellular liporegulation. **Annu Rev Physiol**, 65:333–47, 2003.

Uysal, K. T.; Wiesbrock, S. M.; Marino, M. W.; and Hotamisligil, G. S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. **Nature**, 389:610–14, 1997.

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**, 75:1005-09, 1985.

Vinson, J.A.; Dabbag, Y.A. Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. **Nutr Res**, 18:1067-70, 1998.

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

Weinsier, R.L.; Hunter, G.R.; Heini, A.F.; Goran, M.I.; Sell, S.M. The etiology of obesity: relative contribution of metabolic factors, diet, and physical activity. **Am J Med**, 105:145-50, 1998.

Weisberg, S.P.; Hunter, D.; Huber, R.; Lemieux, J.; Slaymaker, S.; Vaddi, K.; Charo, I.; Leibel, R.L.; Ferrante, A.W. Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **J Clin Invest**, 116:115-24, 2006.

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

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

Wildey, M.B.; Pampalone, S.Z.; Pelletier, R.L.; Zive, M.M.; Elder, J.P.; Sallis, J.F. Fat and sugar levels are high in snacks purchased from student stores in middle schools. **J Am Diet Assoc**, 100:319-22, 2000.

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

Yoshioka, K.; Yoshida, T.; Kondo, M. Brown adipose tissue thermogenesis and metabolic rate contribute to the variation in obesity among rats fed a high fat diet. **Japan J Physiol**, 42:673-80, 1992.

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**, 269:25735-741, 1994.

Ziccardi, P.; Nappo, F.; Giugliano, G.; Esposito, K.; Marfella, R.; Cioffi, M.; D'Andrea, F.; Molinari, A.M.; Giugliano, D. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and imp. **Circulation**, 105:804-09, 2002.