



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA

**EFEITOS DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) SOBRE O METABOLISMO DE  
AMINOÁCIDOS E DE LIPÍDIOS EM RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado

RAQUEL D'AGOSTINI SILVA

Porto Alegre

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA



RAQUEL D'AGOSTINI SILVA

**EFEITOS DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) SOBRE O METABOLISMO DE  
AMINOÁCIDOS E DE LIPÍDIOS EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Orientador: Luiz Carlos Rios Kucharski

Porto Alegre

2013

CIP – Catalogação na Publicação

Silva, Raquel D'Agostini

Efeitos da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre o metabolismo de aminoácidos e a síntese de proteínas em ratos Wistar / Raquel D'Agostini Silva. – 2013. 72 f. : il. color.

Orientador : Luiz Carlos R. Kucharski.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Erva-mate. 2. Aminoácidos. 3. Síntese de Proteínas. 4. Metabolismo. I. Kucharski, Luiz Carlos R., orient. II. Título.

Raquel D'Agostini Silva

**Efeitos da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre o metabolismo de aminoácidos e de lipídios em ratos Wistar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

**Data da Avaliação:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Parecer:** \_\_\_\_\_

**Comissão Examinadora:**

---

**Alex Sander da Rosa Araújo (Relator)**  
Prof. Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia – UFRGS

---

**Ingrid Dalira Schweigert Perry**  
Prof<sup>a</sup>. Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica – UFRGS

---

**Ubiratan Fabres Machado**  
Prof. Doutor Ciências: Fisiologia Humana – USP

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa dissertação à minha mãe Iara Ana e aos meus irmãos Andressa e Maurício. Obrigada pelo incentivo, apoio e confiança depositados em mim. Vocês são a razão pela qual eu escrevo e em todas as minhas ações existe um pouquinho de cada um de vocês.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador, Prof. Luiz Carlos Kucharski, por ter me acolhido e por ter acreditado no meu trabalho e no meu potencial, por todas as horas de bancada compartilhadas, pelos ensinamentos, risadas, conversas, conselhos, pela paciência, tolerância, estímulo e dedicação, os meus mais sinceros agradecimentos. Foi realmente uma honra trabalhar contigo nesses dois anos.

À Priscila Raquel Koller Goerl, minha querida e eficiente aluna de iniciação científica, que sempre foi meu braço direito e muitas vezes também o esquerdo nos experimentos e nos períodos de tratamento dos animais. Muito obrigada por toda a ajuda.

Ao Prof. Matheus Parmegiani Jahn, por todo o incentivo e apoio durante a minha graduação, como meu orientador, por me encorajar a continuar no mestrado e por ter aberto tantas oportunidades para mim. Obrigada pelo exemplo e por participar tão ativamente da minha formação.

À todos os meus colegas e amigos do LaMEC que me acompanharam nessa trajetória sem os quais os meus experimentos não seriam viáveis, mas, principalmente, sem os quais o mestrado não teria a mesma graça: Ana Lúcia Hoefel, Claudia Vieira Marques, Aline Gonçalves da Silva, Camila Lüdke Rossetti, Lucas Sulzbach Rilho, Charles Budaszewski Pinto, Jorge Felipe, Matheus Kingeski, Tiago Leal Martins, Luana Ferreira Gomes, Márcia Trapp, Luciano Stürmer Fraga, Anapaula Vinagre e a Claudia Chiarel Almeida. Foi um prazer conviver com todos vocês, obrigada pela amizade e por tornarem meus dias muito mais alegres.

À minha querida “miga” Elen Thegla Sander Inohara, obrigada de coração por todas as conversas, pelas muitas horas de estudo juntas, por compartilhar das mesmas angústias e medos, pela ajuda nos experimentos, mas principalmente, obrigada pelos conselhos, pelas risadas, pela grande amizade, pelo carinho e pelo apoio em todas as horas.

A todo o pessoal da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do HCPA, principalmente a Marta, a Fabíola, a Rosa e ao Eduardo.

Ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) do PPG em Ciências Farmacêuticas, em especial, ao Pedro Ernesto de Resende pela ajuda com o processamento da erva-mate e com as análises de cromatografia líquida e ao George González Ortega pela parceria.

A Barão de Cotegipe, pelo fornecimento do material necessário e ao Célio por sempre ser tão prestativo.

Ao Laboratório de Espécies Ativas de Oxigênio (LEAO), principalmente a Professora Adriane Belló e a Tânia, que sempre mantiveram as portas abertas e emprestaram o leitor de ELISA ou os tubos de carbogênio nas horas mais críticas. Um agradecimento especial ao Professor Alex Sander da Rosa Araújo pela disponibilidade em me ajudar sempre, pela orientação no estágio e pelos valiosos conselhos.

A minha família, pelo apoio e amor incondicional e pela paciência e compreensão por todas as vezes em que eu não pude estar junto por causa das provas do mestrado, pelos experimentos ou pela dissertação. Especialmente a minha mãe Iara Ana D'Agostini, por ter me proporcionado uma educação de qualidade e principalmente, por ter me ensinado as maiores virtudes que um ser humano pode ter: humildade, lealdade, ética, moral, caráter e sinceridade. Aos meus irmãos Andressa e Maurício D'Agostini que sempre foram os meus exemplos na área acadêmica e na vida.

Ao meu namorado, companheiro e amigo Eduardo Pasini, o qual sempre teve as melhores palavras nos momentos em que eu mais precisei, que aguentou as minhas crises de identidade e de existência durante o mestrado (e antes dele também), pela paciência nas horas em que eu estive ausente, pela paciência que a convivência comigo exige, pelos ensinamentos e exemplos que tu me deste, pelo conhecimento musical e geográfico, pela amizade, amor e carinho dedicados a mim. Este trabalho também é teu. Obrigado por tudo.

As minhas amigas Tábata Rahel, Maiane Rodrigues, Caroline Santini, Camila Peccin, Audrin L. Scopel Bueno e Mircéia Cunha que mesmo longe sempre torceram e continuam torcendo por mim. Obrigada pelo apoio e pela compreensão quanto a minha ausência.

À fonte financiadora de pesquisa FIPE-HCPA.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e ao PPG Fisiologia da UFRGS pelo conhecimento.

## RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) é uma espécie nativa da América do Sul, muito utilizada no preparo de bebidas estimulantes. As folhas e ramos utilizados no preparo destas bebidas não são consumidos na sua forma *in natura* ou bruta, ao contrário, eles passam por uma série de processamentos industriais como o sapeco, secagem, moagem e envelhecimento. As condições de processamento podem modificar as características sensoriais assim como podem influenciar diretamente a quantidade final de substâncias bioativas presentes na erva-mate. As principais classes de compostos bioativos encontrados na erva-mate são as metilxantinas, os polifenóis e as saponinas. Essas substâncias são responsáveis por uma série de efeitos benéficos, como a atividade antioxidante, hipocolesterolemiantes, anti-obesidade, anti-inflamatória e cardioprotetora. Porém, não foram encontrados na literatura, estudos que correlacionem a atividade da erva-mate sobre o metabolismo de proteínas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o metabolismo de aminoácidos e de lipídios em ratos tratados com extrato aquoso de erva-mate comercial e bruta. Foram utilizados 30 ratos Wistar machos divididos em três grupos: grupo controle (CTR): animais tratados com ração padrão e água *ad libitum*, grupo da erva-mate comercial (COM) e grupo da erva-mate bruta (BRU): animais tratados com ração padrão e extrato de erva-mate comercial ou bruta *ad libitum*, respectivamente. Além da captação do ácido aminoisobutírico (AIB-<sup>14</sup>C), da oxidação de L-alanina-<sup>14</sup>C e da síntese de proteínas a partir de Leucina-<sup>14</sup>C, também foram avaliados o peso corporal, os níveis séricos de insulina, glicose, colesterol total, triglicerídeos, ureia, proteínas totais e os índices das gorduras retroperitoneal e epididimal e a respectiva atividade lipolítica desses tecidos. O tratamento com o extrato de erva-mate comercial aumentou significativamente a captação de AIB-<sup>14</sup>C no fígado. Ambos os tratamentos com extrato aquoso de erva-mate comercial e bruta reduziram drasticamente a síntese de proteínas no fígado e o peso das gorduras retroperitoneais e aumentaram os níveis de lipólise do tecido adiposo epididimal. Apenas o grupo COM reduziu significativamente o ganho de peso dos animais enquanto que apenas o grupo BRU reduziu os níveis séricos de triglicerídeos. Ambos os extratos COM ou BRU não modificaram o metabolismo de proteínas no músculo sóleo. Este trabalho demonstrou pela primeira vez que a erva-mate é capaz de interferir no metabolismo hepático de aminoácidos e no metabolismo de lipídeos, sem interferir no metabolismo de proteínas do músculo esquelético. Além disso, foi observado que alguns efeitos estão diretamente relacionados a proporção entre os compostos bioativos presentes nos extratos, visto que os extratos de erva-mate comercial e bruta diferiram em vários resultados.

## ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) is a native specie from South America, widely used in the preparation of stimulant drinks. The leaves and branches used in these drinks are not consumed in the natural or gross form, rather, they undergo a series of industrial processes such as singeing, drying, milling and aging. The processing conditions can modify the sensory characteristics and can directly influence the final amount of bioactive substances present in yerba mate. The major classes of bioactive compounds found in yerba mate are methylxanthines, polyphenols and saponins. These substances are responsible for a number of beneficial effects such as antioxidant activity, cholesterol lowering activity, anti-obesity, anti-inflammatory and cardioprotective effects. However, weren't found in the literature, studies that correlate the activity of yerba mate on proteins metabolism. The aim of this study was to evaluate the amino acids and lipids metabolism on rats treated with aqueous extract of commercial or gross yerba mate. We used 30 male Wistar rats divided into three groups: control water group (CW): animals treated with standard chow and water *ad libitum*, commercial mate group (CM) and gross mate group (GM): animals treated with standard chow and aqueous extract of commercial or gross yerba mate *ad libitum*, respectively. Beyond the uptake of aminoisobutyric acid (AIB-<sup>14</sup>C), the oxidation of L-alanine-<sup>14</sup>C and protein synthesis from Leucine-<sup>14</sup>C, were also evaluated body weight, seric levels of insulin, glucose, total cholesterol, triglycerides, urea, total protein and fat contents of retroperitoneal and epididymal and the lipolytic activity of these tissues. The treatment with the commercial yerba mate extract significantly increased uptake of AIB-<sup>14</sup>C in the liver. Both treatments with aqueous extract of commercial and gross yerba mate drastically reduced protein synthesis in the liver and retroperitoneal fat weight and increased levels of epididymal adipose tissue lipolysis. Only the CM group significantly reduced the weight gain of the animals while only the GM group reduced levels of seric triglycerides. Both extracts CM or GM did not change the protein metabolism in the soleus muscle. This study first demonstrated that yerba mate is able to interfere with the hepatic metabolism of amino acid and lipid metabolism, without interfering with protein metabolism in skeletal muscle. Moreover, it was observed that some effects are directly related to the ratio of bioactive compounds present in the extracts, whereas extracts of commercial yerba mate and gross yerba mate differed in several outcomes.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><sup>14</sup>C</b>	–	Carbono 14 (isótopo radioativo)
<b>AIB</b>	–	Ácido aminoisobutírico
<b>AMPc</b>	–	Adenosina monofosfato cíclico
<b>ANOVA</b>	–	Análise de variância
<b>aP2</b>	–	Proteína ligadora do ácido graxo do adipócito
<b>ATP</b>	–	Trifosfato de adenosina
<b>Aw</b>	–	Atividade aquosa
<b>BRU</b>	–	Grupo extrato aquoso de erva-mate bruta
<b>CAT</b>	–	Catalase
<b>CEUA</b>	–	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CL-UV</b>	–	Cromatografia Líquida Ultravioleta
<b>CLAE</b>	–	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CNEN</b>	–	Comissão Nacional de Energia Nuclear
<b>COM</b>	–	Grupo extrato aquoso de erva-mate comercial
<b>CREAL</b>	–	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
<b>CTR</b>	–	Grupo controle
<b>DPM</b>	–	Desintegrações por minuto
<b>EPI</b>	–	Equipamento de Proteção Individual
<b>EPM</b>	–	Erro Padrão da Média
<b>FAS</b>	–	Ácido graxo sintase
<b>GPx</b>	–	Glutathione peroxidase
<b>GSH</b>	–	Glutathione reduzida
<b>HCPA</b>	–	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
<b>HDL</b>	–	Lipoproteína de alta densidade
<b>HMG</b>	–	<i>3-hidroxi-3-metilglutaril</i>
<b>HMGR</b>	–	HMG CoA redutase
<b>IQ25</b>	–	Intervalo interquartil 25
<b>IQ75</b>	–	Intervalo interquartil 75
<b>KRB</b>	–	Krebs Ringer Bicarbonato
<b>LaMEC</b>	–	Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada
<b>LDL</b>	–	Lipoproteína de baixa densidade

<b>LOOH</b>	–	Hidroperóxidos lipídicos
<b>MeAIB</b>	–	Ácido $\alpha$ -metil-aminoisobutírico
<b>mRNA</b>	–	RNA mensageiro
<b>NIH</b>	–	<i>National Institutes of Health</i>
<b>PC</b>	–	Piruvato carboxilase
<b>PEPCK</b>	–	Fosfoenolpiruvato-carboxiquinase
<b>pH</b>	–	Potencial de hidrogênio
<b>PMSF</b>	–	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
<b>PN-1</b>	–	Padrão Nacional 1
<b>PON-1</b>	–	Paraoxanase-1
<b>POPOP</b>	–	<i>2-p-phenylenebis 5-phenyloxazole</i>
<b>PPAR<math>\gamma</math>2</b>	–	Receptor $\gamma$ 2 ativado por proliferadores de peroxissomos
<b>PPO</b>	–	<i>2,5-diphenyloxazole</i>
<b>RNA</b>	–	Ácido ribonucleico
<b>SNK</b>	–	<i>Student Newman Keuls</i>
<b>SOD</b>	–	Superóxido dismutase
<b>SREBP-1</b>	–	Proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis
<b>TBARs</b>	–	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	–	Ácido tricloroacético
<b>U-<sup>14</sup>C</b>	–	Uniformemente marcado
<b>UCP2</b>	–	Proteína desacopladora 2
<b>UCP3</b>	–	Proteína desacopladora 3
<b>UEA</b>	–	Unidade de Experimentação Animal
<b>UFRGS</b>	–	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>UV</b>	–	Ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### FIGURAS

- Figura 1** – Ilustração botânica das folhas, flores e frutos da erva-mate (*Ilex paraguariensis*).....01
- Figura 2** – Principais compostos isolados da *Ilex paraguariensis*.....07
- Figura 3** – Cromatogramas das saponinas encontradas no extrato aquoso de erva-mate bruta e no extrato aquoso de erva-mate comercial.....29
- Figura 4** – Variação de peso dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta durante os dias 0, 30 e 60 do período experimental.....30
- Figura 5** – Índice de gordura epididimal e índice de gordura retroperitoneal dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta após 60 dias de tratamento.....32
- Figura 6** – Níveis de triglicerídeos séricos dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta.....34
- Figura 7** – Níveis de insulina sérica dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta.....34
- Figura 8** – Captação de ácido aminoisobutírico (AIB) [U-14C] no músculo sóleo dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta.....35
- Figura 9** – Síntese de proteínas a partir de leucina [U-14C] no músculo sóleo dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta.....36
- Figura 10** – Oxidação de L-alanina [U-14C] no músculo sóleo dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta.....36

**Figura 11** – Captação de ácido aminoisobutírico (AIB) [U-14C] no fígado dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta.....37

**Figura 12** – Síntese de proteínas a partir de leucina [U-14C] no fígado dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta.....38

**Figura 13** – Oxidação de L-alanina [U-14C] no fígado dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta.....38

**Figura 14** – Lipólise estimulada da gordura epididimal (A) e da gordura retroperitoneal (B) dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta.....40

## **TABELAS**

**Tabela 1** – Aminoácidos glicogênicos e cetogênicos.....15

**Tabela 2** – Composição da ração padrão oferecida aos ratos (Nuvilab CR1 - Nuvital®).....22

**Tabela 3** – Teores totais de saponinas, metilxantinas (cafeína e teobromina) e polifenóis no extrato aquoso da erva-mate comercial e no extrato aquoso da erva-mate bruta.....28

**Tabela 4** – Índice morfométrico do músculo sóleo, fígado, coração e tecido adiposo marrom dos grupos controle (CTR), erva-mate comercial (COM) e erva-mate bruta (BRU).....31

**Tabela 5** – Concentrações séricas de colesterol total, glicose, ureia e proteínas totais nos grupos controle (CTR), erva-mate comercial (COM) e erva-mate bruta (BRU).....33

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>1.1 Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)</b> .....	01
1.1.1 <i>Aspectos botânicos</i> .....	01
1.1.2 <i>Distribuição geográfica</i> .....	02
1.1.3 <i>Origem, uso e importância socioeconômica da erva-mate</i> .....	02
1.1.4 <i>Processamento da erva-mate</i> .....	04
1.1.5 <i>Composição química e propriedades farmacológicas da erva-mate</i> .....	06
<b>1.2 Aminoácidos</b> .....	11
1.2.1 <i>Transporte de aminoácidos</i> .....	12
1.2.2 <i>Oxidação de aminoácidos</i> .....	14
1.2.3 <i>Síntese de proteínas</i> .....	15
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	18
<b>2.1 Objetivos Específicos</b> .....	18
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	19
<b>3.1 Animais</b> .....	19
<b>3.2 Erva-mate</b> .....	19
3.2.1 <i>Preparação do extrato aquoso de erva-mate bruta e comercial</i> .....	20
<b>3.3 Compostos bioativos da erva-mate</b> .....	20
3.3.1 <i>Metilxantinas</i> .....	21
3.3.2 <i>Polifenóis</i> .....	21
3.3.3 <i>Saponinas</i> .....	21
<b>3.4 Tratamento e procedimentos experimentais</b> .....	22
<b>3.5 Parâmetros morfométricos</b> .....	23
<b>3.6 Procedimentos experimentais <i>in vitro</i></b> .....	23
3.6.1 <i>Captação de ácido aminoisobutírico (AIB) [<math>U-^{14}C</math>]</i> .....	23
3.6.2 <i>Formação de dióxido de carbono <math>^{14}CO_2</math> a partir de L-alanina [<math>U-^{14}C</math>]</i> .....	24
3.6.3 <i>Síntese de proteínas a partir de leucina [<math>U-^{14}C</math>]</i> .....	25
3.6.4 <i>Lipólise</i> .....	25
<b>3.7 Análises bioquímicas</b> .....	26
<b>3.8 Análise estatística</b> .....	26
<b>3.9 Biossegurança</b> .....	27

<b>4 RESULTADOS</b> .....	28
<b>4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – Análise dos compostos bioativos dos extratos aquosos de erva-mate comercial e bruta</b> .....	28
4.1.1 <i>Análise qualitativa</i> .....	28
4.1.2 <i>Análise quantitativa</i> .....	28
<b>4.2 Ganho de peso corporal</b> .....	30
<b>4.3 Parâmetros morfométricos</b> .....	31
<b>4.4 Análises Bioquímicas</b> .....	33
<b>4.5 Experimentos <i>in vitro</i></b> .....	35
4.5.1 <i>Captação de AIB, síntese de proteínas e oxidação de L-alanina no músculo sóleo</i> .....	35
4.5.2 <i>Captação de AIB, síntese de proteínas e oxidação de L-alanina no fígado</i> .....	37
4.5.3 <i>Lipólise Estimulada</i> .....	40
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	51
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	53

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

### 1.1.1 Aspectos botânicos

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) também conhecida como mate ou congonha, é uma espécie arbórea nativa da América do Sul da família Aquifoliaceae. A família Aquifoliaceae compreende aproximadamente 660 espécies, sendo a maioria delas pertencentes ao gênero *Ilex*. Ocorrem no Brasil cerca de 60 espécies de *Ilex* (Agostini e Chesini, 2001).

A árvore apresenta uma copa densa e muito ramificada podendo chegar até 15 metros de altura, porém, quando podada, não passa de 7 metros e em sistemas agrícolas com adensamento e podas, a altura não ultrapassa 2 metros. O caule possui cor acinzentada, geralmente com 20 a 25 centímetros de diâmetro, podendo alcançar 50 centímetros (Mazuchowski, 1989). As folhas são de coloração verde escura, de 6 a 20 centímetros de comprimento, simples, oblongas, alternas, curto-pecioladas, com margens crenadas ou serradas (Figura 1). As flores são pequenas, brancas, unissexuais, em fascículos axilares, ocorrendo normalmente na mesma inflorescência flores masculinas e femininas. Produz frutos avermelhados, globosos, de polpa carnososa com 5 a 8 sementes (Lorenzi, 2008). Floresce de outubro a novembro e dá frutos de março a junho. Pode ocorrer em regiões montanhosas e suporta temperaturas de até seis graus negativos (resiste inclusive em regiões onde comumente ocorrem tempestades de neve). A planta necessita de um regime com não menos de 1200 mm de chuva anual e temperatura entre 21°C - 22°C (Heck e De Mejia, 2007).



*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.

Franz Eugen Köhler,  
*Köhler's Medizinal-Pflanzen*

**Figura 1** – Ilustração botânica das folhas, flores e frutos da erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

### 1.1.2 Distribuição geográfica

O gênero *Ilex* possui distribuição natural em zonas tropicais, subtropicais e temperadas da América do Sul, exceto, em regiões desérticas. A *Ilex paraguariensis* está distribuída em uma área de aproximadamente 540.000 km<sup>2</sup> (latitude de 21° até 30°S e longitudes de 48°30' até 56°10'W) em altitudes que variam entre 500 a 1500 metros sobre o nível do mar, compreendendo territórios do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (Mazuchowski, 1989, Heck e De Mejia, 2007). Sua área de dispersão no Brasil é de 450.000 km<sup>2</sup> abrangendo o centro-sul e sudoeste do Paraná, quase todo o estado de Santa Catarina, centro-norte do Rio Grande do Sul, sul do Mato Grosso do Sul e manchas em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Valduga, 2003). Na Argentina abrange a Província de Misiones, parte da Província de Corrientes e pequena parte da Província de Tucumã e no Paraguai a área entre os rios Paraná e Paraguai. No Brasil, sua distribuição representa cerca de 5% do território nacional e na América do Sul corresponde a 3% da área (Mazuchowski, 1989).

### 1.1.3 Origem, uso e importância socioeconômica da erva-mate

O consumo de bebidas a base de erva-mate tem origem a centenas de anos. As folhas eram utilizadas pelos antigos aborígenes da América do Sul e também pelos Incas, Guaranis e Quíchuas. O nome “mate” tem origem da palavra quéchua “mati” que significa cuia, um vasilhame feito do porongo (fruto da *Lagenaria siceraria*), que juntamente com a bomba (canudo de metal com um pequeno filtro achatado em uma das pontas) é utilizada até os dias de hoje para fazer a infusão, bebida conhecida pelo nome de “chimarrão” (Reitz *et al.*, 1988). Os jesuítas espanhóis conheceram o hábito do “mate” ao entrar em contato com os índios Guarani e espalharam o uso da erva-mate entre os “não-índigenas”, efetuando a sua industrialização, comercialização e desenvolvendo técnicas de germinação de sementes (Mazuchowski, 1989).

As folhas e ramos da erva-mate são utilizadas no preparo de quatro diferentes tipos de bebidas: o chimarrão ou mate, consumidos no sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai; o tererê, consumido principalmente no Paraguai e no centro-oeste do Brasil; o mate solúvel, muito popular no sudeste do Brasil, principalmente em São Paulo e Rio de Janeiro; e o chá mate, consumido no sul e sudeste do Brasil e Argentina (Bastos *et al.*, 2007, Morais *et al.*, 2009, Bracesco *et al.*, 2011).

O tradicional chimarrão consumido no sul do Brasil é preparado com uma grande quantidade de erva-mate previamente umedecida e compactada em um dos lados da cuia, servido com água quente e bebido através da bomba (que atua como um filtro para as pequenas partículas de erva-mate). O tererê, bebida original do Paraguai, é preparado com erva-mate (na mesma disposição do chimarrão), porém, ao invés de uma cuia, o tererê é servido em uma guampa (chifre bovino) com água gelada ou em outras variações com suco de limão, laranja ou leite. Tanto o mate solúvel como o chá mate são obtidos a partir da “torra” da erva-mate, porém, o mate solúvel é consumido na forma de bebidas refrescantes, como um chá gelado, podendo ser também flavorizado e o chá mate é preparado como qualquer outro chá de ervas em sachês e normalmente é consumido quente.

Além do uso para a preparação das bebidas anteriormente citadas, na última década, houve um aumento expressivo do uso da erva-mate como ingrediente de outros produtos não tradicionais, tais como cervejas, balas e cremes. Até o ano de 2006 foram registradas cerca de 30 patentes internacionais de produtos feitos com *Ilex paraguayensis*, dentre eles pode-se encontrar: cosméticos com efeitos emagrecedores, suplementos termogênicos/redutores de peso, bebidas energéticas, suplementos para redução de glicose e colesterol, bebida para prática esportiva, cosméticos de cabelo, entre outros (Bastos *et al.*, 2007, Bracesco *et al.*, 2011).

Nos países sul-americanos, o chimarrão ou tererê são consumidos por milhões de pessoas em proporções de quase um litro ou mais por dia e constituem as principais alternativas ao café e ao chá (Mosimann *et al.*, 2006). O ato de beber chimarrão é um processo contínuo e normalmente acompanha atividades diárias, de tal forma, que 1 litro pode ser bebido em cerca de 1 hora. O consumo de erva-mate tem uma importante conotação social e o ato de oferecer e compartilhar cuias em uma roda de chimarrão é comparável com as cerimônias do chá em algumas culturas orientais (Bracesco *et al.*, 2011).

A Argentina é o maior produtor de erva-mate do mundo, possuindo cerca de 203.000 hectares de área colhida, o que representa uma produção de mais ou menos 273.000 toneladas de erva-mate por ano. O Brasil é o segundo maior produtor, com 71.000 hectares de área colhida e produção de 230.000 toneladas de erva-mate com valor estimado em 119 milhões de reais por ano (FAOSTAT, 2011, IBGE, 2010). O Uruguai possui o maior valor per capita de consumo: 6-8kg de erva-mate/pessoa/ano, enquanto que a Argentina está em segundo lugar com 5kg/pessoa/ano. Apenas quatro estados do Brasil possuem o hábito de beber chimarrão ou tererê (Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul) e portanto, o seu consumo per capita é reduzido em comparação a outros países (Bracesco *et al.*, 2011).

#### 1.1.4 *Processamento da erva-mate*

As folhas e os ramos da erva-mate normalmente não são consumidos e comercializados na sua forma bruta ou *in natura*, ao contrário, eles passam por diversas etapas de processamento resultando no produto final que é a erva-mate destinada à fabricação de chimarrão, ou simplesmente designada de “erva-mate comercial”. A indústria ervateira é o setor que processa a matéria-prima alimentícia da erva-mate e modifica as condições de processamento, modificando o sabor e o aroma, de acordo com o tipo de produto que se deseja produzir (Heck e De Mejia, 2007). O beneficiamento da erva-mate para chimarrão normalmente consiste em: colheita, sapeco, secagem, trituração, armazenagem, moagem, mistura, empacotamento e distribuição (Schifel, 1997 *apud* Valduga, 2003).

O sapeco mecânico consiste em um processo realizado logo após a colheita, onde as folhas e alguns ramos da erva-mate são colocados em contato direto com as chamas da queima de lenha de uma fornalha. A erva-mate disposta sobre um transportador de correia é conduzida até o sapecador, onde desloca-se em queda livre por cerca de um metro de altura, em escoamento cruzado com as labaredas da fornalha, o que ocorre em cerca de 2 segundos. Após esta etapa ela é escoada juntamente com os gases de combustão através de um grande cilindro de ferro. As folhas e ramos de erva-mate são elevadas até determinada altura e depois escoam em cascata devido ao movimento giratório e a presença de aletas dispostas na parede interna desse cilindro, avançando gradativamente pela ação da força de arraste dos gases da combustão e pela inclinação das aletas (Valduga, 2003). A temperatura varia de 250 °C a 500°C, e a erva-mate pode permanecer nessas temperaturas pelo intervalo de dez segundos a um minuto (Agostini e Chesini, 2001). Esta etapa é crucial, pois a ação prolongada das chamas pode queimar as folhas e a falta de calor das labaredas pode causar o seu enegrecimento por oxidação, comprometendo assim, o sabor, o aroma, o aspecto e a qualidade do produto. Quando bem executado, o sapeco resulta em folhas de coloração uniforme, verde-amareladas tendendo a verde-oliva e desprendem aroma agradável (Souza, 1937 *apud* Valduga, 2003). A finalidade desta operação é de abrir os vasos da folha e estômatos através de uma intensa sudação, provocando redução da umidade para impedir a fermentação e inativando enzimas que poderiam ocasionar o escurecimento das folhas (peroxidases e polifenoloxidasas) (Agostini e Chesini, 2001).

Na etapa de secagem ou torrefação o calor é indireto, usa-se a secagem por convecção em um secador rotativo (parecido com o cilindro rotativo da etapa do sapeco), existindo, também, aletas internas para o direcionamento do escoamento da folhas, axialmente ao eixo

do secador. A secagem é feita com gases oriundos da combustão de lenha em uma fornalha. Neste processo a umidade das folhas passa de aproximadamente 11% para 4,5%. Esta operação pode necessitar de até 4 horas para estar completa, dependendo das condições operacionais e do secador (Maccari e Santos, 2000). Além do secador rotativo, podem ser encontrados em algumas ervateiras do Brasil, os secadores de correia perfurada ou secadores de esteira. Quando o processo de secagem é realizado no secador rotativo, a trituração ocorre logo após o sapeco e antes da etapa de secagem. Quando o processo de secagem é realizado no secador de esteira, a trituração ocorre após a etapa de secagem (Valduga, 2003).

A erva-mate é triturada em trituradores automatizados e passa a denominar-se cancheada, constituindo-se no subproduto para as indústrias de beneficiamento, utilizada especialmente para a preparação do chá mate e erva para chimarrão.

A erva-mate cancheada é “estacionada” ou armazenada em sacos ou barris por um período de tempo, para que se acentuem as suas propriedades. O tempo de envelhecimento ou armazenamento depende se o produto é destinado ao mercado interno ou do tipo exportação. Para o mercado interno, o período de armazenagem varia de 3 a 15 dias, enquanto que, para o produto destinado ao mercado externo, o período de armazenagem é de no mínimo 3 meses a 1 ano (para que o produto adquira coloração amarela e sabor característico). Após esse período a erva-mate é então peneirada, misturada nas proporções adequadas de folhas, goma e palitos, de acordo com o produto desejado e com a legislação vigente. Na erva-mate para chimarrão, efetua-se a moagem do material para reduzir a granulometria, utilizando-se um moinho de soque. Conforme o tipo de produto também são feitas misturas ou adicionados ingredientes para a geração de produtos diferenciados. Dependendo da granulometria, da proporção entre folhas, goma e ramos e dos produtos adicionados, a erva-mate pode ser classificada como: erva-mate tradicional para chimarrão (padrão nacional-1 – PN-1), pura folha, moída grossa, erva-mate para tererê, composto de erva-mate (com adição de outros chás), erva-mate com adição de açúcar, entre outras (Valduga, 2003). Por fim, o produto final é empacotado em sacos de papel, plástico ou laminado com rotulagem impressa (conforme legislação) e está pronto para ser distribuído e comercializado.

Sabe-se que as condições de processamento, tais como tempo e temperatura utilizados nas etapas de sapeco e secagem, assim como outros parâmetros como o solo, época do ano, clima e variabilidade genética variam entre os fabricantes e têm influência direta sobre a qualidade, características sensoriais e quantidade de substâncias bioativas do produto final (Heck e De Mejia, 2007; Bastos *et al.*, 2007; Resende *et al.*, 2000). Nas etapas de sapeco, secagem ou torrefação ocorrem reações de pirólise, ocasionadas pelas altas temperaturas,

resultando em uma mudança significativa da composição química das folhas. Isto pode ser observado durante o sapeco das folhas de erva-mate, onde ocorre uma redução do conteúdo de glicose e frutose, com conseqüente aumento no teor de sacarose, devido à desidratação e condensação dos monossacarídeos (Paredes, 2000).

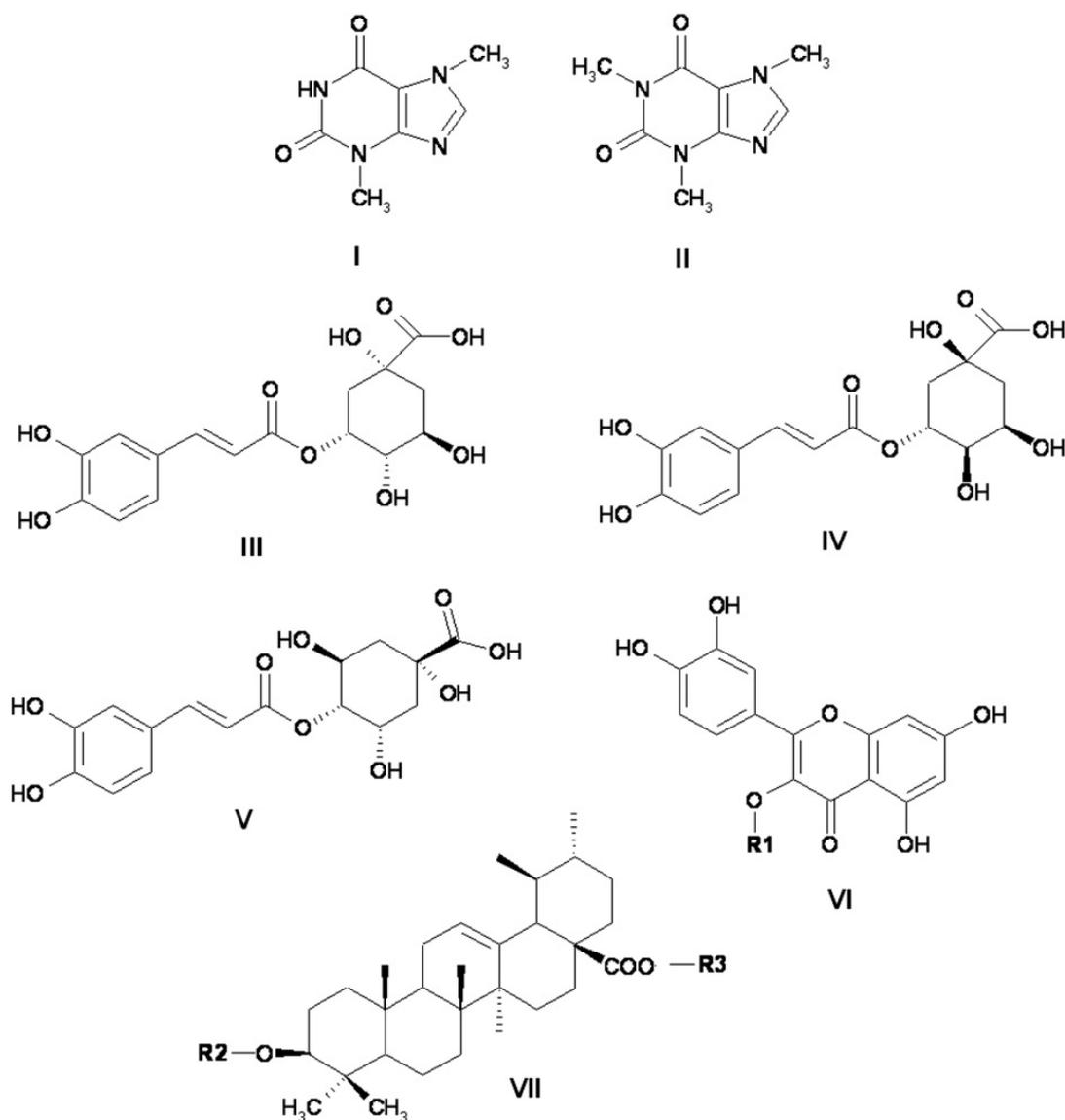
De fato, Esmelindro *et al.* (2002) demonstraram que as etapas de processamento industrial como o sapeco e a secagem das folhas de erva-mate em diferentes linhas de processamento, diminuíram significativamente os níveis de cafeína e proteína em comparação com folhas de erva-mate que só foram secas por 5 minutos em um micro-ondas.

Outro estudo de Cardozo *et al.* (2007) analisou a variação da concentração de metilxantinas (cafeína e teobromina) e compostos fenólicos (ácido clorogênico e ácidos caféicos) em folhas de 16 progênies de erva-mate correlacionando-as com a procedência e local de cultivo. Foram encontradas diferenças significativas nos teores de metilxantinas totais e nos teores de cafeína e teobromina entre as progênies, e, a localidade de cultivo e procedência influenciaram significativamente nestes parâmetros. Também houve diferenças significativas entre as quantidades de polifenóis totais, ácido clorogênico e ácido caféico entre as progênies quando relacionados com a localidade de cultivo.

Em um recente estudo publicado pelo nosso laboratório (Silva *et al.*, 2011) foi verificado que o extrato aquoso de erva-mate bruta ou *in natura* apresentou quantidades significativamente maiores de saponinas totais, metilxantinas totais, cafeína, teobromina e açúcares totais quando comparado ao extrato aquoso de erva-mate comercial, demonstrando a influência da temperatura nos estágios de processamento da erva-mate sobre a quantidade de compostos bioativos no produto final.

### 1.1.5 Composição química e propriedades farmacológicas da erva-mate

A erva-mate é rica em uma variedade de substâncias bioativas que têm demonstrado importantes atividades biológicas benéficas à saúde. Estas substâncias podem ser divididas em três grandes grupos. O grupo das metilxantinas - onde os principais representantes são a teofilina, a teobromina e a cafeína - sendo a cafeína a que está presente em maiores quantidades seguida pela teobromina; o grupo dos polifenóis, tendo como principais representantes os ácidos dicafeiolquínicos e o ácido clorogênico, além de outros flavonoides como a rutina, a quercitina e o canferol; e o grupo das saponinas, onde os principais representantes são a matesaponina-1, matesaponina-3, chikusetsusaponina, entre outras saponinas triterpênicas.



**Figura 2** – Principais compostos isolados da *Ilex paraguariensis*. **Metilxantinas:** (I) teobromina e (II) cafeína. **Polifenóis:** (III) ácido neoclorogênico; (IV) ácido clorogênico; (V) ácido criptoclorogênico e (VI) rutina (R1:  $\beta$ -D-rutinosídeo). **Saponinas:** (VIIa) matesaponina-1 (R2:  $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopiranosil; R3:  $\beta$ -D-glucopiranosil) and (VIIb) matesaponina-3 (R2:  $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopiranosil; R3:  $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil). Fonte: Silva *et al.*, 2011.

Além dos inúmeros fitoquímicos, também apresenta amplo perfil nutricional contendo aminoácidos, fibras insolúveis, vitamina A, vitaminas do complexo B (B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>), C e E, ferro, fósforo, cromo, cálcio, potássio, magnésio, zinco, níquel, cobre, manganês, sódio e alumínio (Bastos *et al.*, 2007, Heck e De Mejia, 2007, Vieira *et al.*, 2008).

Algumas propriedades farmacológicas da erva-mate já eram conhecidas pelos índios sul-americanos e são utilizadas até hoje na medicina popular. É utilizada como estimulante, por eliminar a fadiga e estimular a atividade física e mental, no tratamento de artrite, reumatismo, e outras doenças inflamatórias, dores de cabeça, obesidade, por aumentar a

frequência cardíaca e melhorar a circulação sanguínea, para tratar doenças renais e reduzir a pressão arterial, como inibidora de apetite, como digestiva, por acelerar o peristaltismo favorecendo a evacuação e como diurética (Fagundes, 1980, Mosimann *et al.*, 2006).

Muitas das propriedades da erva-mate citadas acima se devem a grande quantidade de metilxantinas que ela contém. Metilxantinas são uma classe de alcaloides de purinas. Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que possuem ao menos um átomo de nitrogênio no seu anel carbônico, essa estrutura indica que os alcaloides são derivados de aminoácidos ou de purinas. A cafeína e seu precursor teobromina são produzidas por mais de 60 espécies subtropicais, incluindo o café (*Coffea arabica*), o chá verde (*Camellia sinensis*), a erva-mate (*Ilex paraguariensis*), o guaraná (*Paullinia cupana*), a cola (*Cola nitida*) e o cacau (*Theobroma cacao*) (Ashihara, 1996).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) uma das metilxantinas encontrada em maior concentração na erva-mate, é uma das substâncias derivadas de plantas com que o público em geral é mais familiarizado e seu consumo normalmente está associado a efeitos adversos à saúde. Os efeitos colaterais a curto prazo incluem: ansiedade, insônia, hiperglicemia, tremores, náuseas, dores estomacais, aumento da pressão arterial, suor frio e taquicardia. Por outro lado, a cafeína também apresenta diversos efeitos benéficos ou desejáveis. Ela age no sistema nervoso central estimulando principalmente áreas corticais aumentando a vigilância e atividade mental, dando a sensação de maior concentração ou foco, aumenta a atividade do sistema simpático e por consequência os níveis de noradrenalina e adrenalina circulantes, possui efeitos sistêmicos acelerando o metabolismo e o consumo de oxigênio pelos tecidos, estimula a termogênese e aumenta a oxidação de lipídeos (Bastos *et al.*, 2007).

Pang *et al.* (2008) avaliaram o efeito do tratamento com extrato de *Ilex paraguariensis* adicionado a dieta hiperlipídica de ratos obesos. O extrato foi preparado através de uma extração alcoólica (15%) de 500 kg de erva-mate. O solvente foi filtrado e evaporado e a pasta restante foi seca por pulverização e adicionada na ração hiperlipídica em uma proporção de 0,24%. A suplementação da dieta hiperlipídica com o extrato de erva-mate reduziu significativamente o peso corporal, o peso das gorduras viscerais, o tamanho dos adipócitos, os lipídeos hepáticos e sanguíneos, a glicemia e os níveis de leptina e insulina em comparação ao grupo que consumia somente a dieta hiperlipídica. Além disso, o extrato reverteu a regulação para baixo induzida pela dieta hiperlipídica nos genes envolvidos na adipogênese ou termogênese do tecido adiposo epididimal, como o receptor  $\gamma 2$  ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR $\gamma 2$ ), a proteína ligadora do ácido graxo do adipócito (aP2), a proteína

1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1), a ácido graxo sintase (FAS), a HMG-CoA redutase (HMGR) e as proteínas desacopladoras (UCP-2 e UCP-3). Este estudo confirmou a habilidade da cafeína em estimular a termogênese, a oxidação de gorduras e a lipólise e demonstrou que a *Ilex paraguariensis* pode exercer um efeito protetor contra obesidade induzida por dietas hiperlipídicas em ratos.

Polifenóis são uma classe de compostos que contém ao menos um anel benzênico vinculado a um ou mais grupos de hidroxila (Heck e De Mejia, 2007). Muito do sabor, odor e coloração de diversos vegetais são gerados pela presença de compostos fenólicos. Estão amplamente distribuídos na natureza, encontrando-se presentes em frutos, folhas, sementes, flores e cascas. Os níveis de polifenóis encontrados nos extratos de erva-mate são superiores aos encontrados no chá verde (*Cammelia sinensis*) e semelhantes aos do vinho tinto (Bracesco *et al.*, 2011).

Os ácidos clorogênicos e ácidos cafeiolquínicos são potentes antioxidantes atuando como doadores de hidrogênio ou de elétrons para os radicais livres e como quelantes de íons de metais de transição (Bastos, 2007). De fato a atividade antioxidante da erva-mate foi confirmada por Gugliucci (1995) quando ele observou que a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) *in vitro* era inibida pelo extrato de *Ilex paraguariensis*. No ano seguinte, 1996, Gugliucci testou o efeito antioxidante *in vivo*, em plasma de seres humanos. Ele coletou o plasma de indivíduos em jejum uma hora antes e uma hora após o consumo de 500mL de extrato aquoso de erva-mate e verificou que a auto-oxidação induzida por cobre nas LDLs dos indivíduos após o uso agudo do extrato de erva-mate estava diminuída.

Após estes estudos pioneiros na área, diversos outros foram realizados incluindo diferentes protocolos, dietas e modelos animais. Menini *et al.* (2007) demonstraram que a ingestão aguda do extrato aquoso de erva-mate inibiu a oxidação das lipoproteínas de alta densidade (HDL) induzida por radicais peroxil e preservou as apolipoproteínas A-1 e a atividade enzimática da paraoxonase-1<sup>1</sup> (PON-1). Matsumoto *et al.* (2009) investigaram os efeitos a curto e longo prazo do chá mate em mulheres saudáveis. Este estudo demonstrou que o consumo agudo de chá mate por uma semana promoveu uma redução na oxidação lipídica e aumentou a capacidade antioxidante no plasma assim como aumentou a expressão gênica das enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx). Boaventura *et al.* (2012) avaliaram o efeito a longo prazo (90 dias) da

---

<sup>1</sup> Paraoxonase-1 (PON1) é uma enzima antioxidante carregada pela HDL, que tem um efeito protetor contra a formação de placas de ateroma.

ingestão do chá mate com ou sem intervenção dietética em marcadores de estresse oxidativo em indivíduos dislipidêmicos. Na intervenção dietética os pacientes eram aconselhados a consumir maiores quantidades de frutas, legumes e vegetais. O estudo demonstrou que o grupo que recebeu apenas intervenção dietética e o grupo que consumiu chá mate + intervenção dietética aumentaram o consumo de vitamina C. Além disso, todos os grupos (chá mate; intervenção dietética; e chá mate + intervenção dietética) apresentaram um aumento na capacidade antioxidante do plasma e dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), porém, não houve diferença significativa nos valores de hidroperóxidos lipídicos (LOOH), carbonilas ou paraoxonase-1.

As saponinas são compostos amargos, solúveis em água, formadores de espuma, encontrados em diversos tipos de plantas e acredita-se ser um dos fatores responsáveis pelo sabor amargo da erva-mate (Heck e De Mejia, 2007). Sua estrutura possui uma parte da molécula com característica hidrofílica ou solúvel (glicose) e outra parte lipofílica ou lipossolúvel (triterpeno), o que confere a propriedade de redução da tensão superficial da água atuando como surfactante e também como detergente e emulsificante. O comportamento anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com proteínas, esteroides e fosfolípidios de membranas determinam um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias. Dentre essas vale destacar a capacidade hemolítica (desorganizando as membranas de células sanguíneas), a de formar complexos com esteroides, razão pela qual frequentemente apresenta ação antifúngica e hipocolesteremiante, a capacidade de inibir a lipase pancreática e a capacidade de interferir no metabolismo do colesterol pela inibição da difusão passiva do ácido cólico, resultando na inibição da absorção intestinal de ácidos biliares e, conseqüentemente, de colesterol (Ferreira, 1997; Schenkel *et al.*, 2000, Hann *et al.*, 2002 ).

Han *et al.* (2002) examinaram os efeitos das saponinas isoladas da *Platycodi radix* sobre os depósitos de gordura em camundongos induzidos a obesidade com dieta rica em gordura. A dieta rica em gordura suplementada com saponinas preveniu o aumento de peso, o aumento de tecido adiposo e a esteatose hepática em relação ao grupo de camundongos que recebeu apenas a dieta hiperlipídica. Nesse mesmo estudo foi verificado que ratos que receberam administração oral de uma emulsão de óleo de milho com saponinas apresentaram uma redução dos triglicerídeos plasmáticos (logo após a administração da emulsão) em comparação aos ratos que receberam apenas a emulsão de óleo de milho isolada. Este grupo de pesquisa já havia demonstrado que as saponinas são capazes de inibir a lipase pancreática *in vitro*, portanto, os possíveis efeitos antiobesidade observados nos camundongos e a redução

dos triglicerídeos plasmáticos observada nos ratos que consumiram a emulsão lipídica seja decorrente da inibição da absorção intestinal das gorduras pela inibição da lipase pancreática.

Mosimann *et al.* (2006) analisaram o efeito do tratamento com extrato aquoso de erva-mate durante o período de 2 meses sobre coelhos alimentados com dieta rica em colesterol. O consumo do extrato de erva-mate não alterou o perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos e HDL-colesterol), o colesterol hepático e nem os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na aorta, no fígado ou no soro, assim como não modificou a atividade de enzimas antioxidantes no fígado e na aorta desses animais. Porém, a área de lesão aterosclerótica foi significativamente menor no grupo que recebeu dieta rica em colesterol + extrato de erva-mate (35,4%) do que no grupo que recebeu apenas dieta rica em colesterol (60,1%). Em adição, o colesterol aórtico do grupo com dieta rica em colesterol + extrato aquoso de erva-mate foi quase a metade (36,8µg/mg de proteína) em relação ao grupo que recebeu apenas dieta rica em colesterol (73,98µg/mg de proteína). Estes efeitos podem estar novamente correlacionados aos efeitos hipocolesterolêmicos das saponinas presentes na erva-mate.

Recentemente foi realizado um estudo com humanos dislipidêmicos ou hipercolesterolêmicos que faziam uso crônico de estatinas. Neste estudo foi verificado que o tratamento com o extrato aquoso de erva-mate ou chá mate (20 ou 50mg/mL) por 40 dias reduziu os níveis de LDL-colesterol tanto nos indivíduos do grupo controle (que não apresentavam dislipidemias e nem estavam fazendo uso de estatinas) quanto nos indivíduos com colesterol elevado/indivíduos com dislipidemias que faziam uso contínuo de estatinas. Além disso o tratamento com o extrato ou chá mate aumentou significativamente o HDL-colesterol (6,2%) após 40 dias nos indivíduos hipercolesterolêmicos (Morais *et al.*, 2009). O possível mecanismo para a redução do LDL-colesterol seria pela inibição da absorção do colesterol no intestino ou até mesmo pela inibição da síntese de colesterol no fígado ocasionada pela presença de saponinas e dos outros compostos no extrato de erva-mate.

## 1.2 Aminoácidos

A estrutura geral de um aminoácido envolve um grupamento amina ( $-\text{NH}_2$ ), um grupamento carboxila ( $-\text{COOH}$ ) e um hidrogênio ligados a um carbono  $\alpha$ . Além destes, o carbono  $\alpha$  também encontra-se ligado a uma cadeia lateral, também conhecida como grupamento radical ou grupo R. O grupo R é que determina a identidade de um aminoácido

específico (Campbell, 2000). Grande parte dos aminoácidos não possuem grupos ionizáveis adicionais na cadeia lateral ou grupamento R, e, ao pH fisiológico, são "neutros". Os aminoácidos que possuem na sua cadeia lateral um grupo receptor de prótons são definidos como aminoácidos "catiônicos" ou "básicos" e aqueles que têm um ou mais grupos carboxila extras são chamados aminoácidos "aniônicos" ou "ácidos". Em soluções aquosas com pH neutro os aminoácidos são íons dipolares, ou seja, possuem o grupo  $\alpha$ -amino protonado e o grupo  $\alpha$ -carboxila dissociado. Esta característica faz com que as moléculas sejam insolúveis em lipídeos e, portanto, incapazes de difundirem-se através das bicamadas lipídicas (Kilberg e Häussinger, 1992).

Os aminoácidos desempenham um papel fundamental em diversos processos biológicos. Além de serem os precursores da síntese de proteínas, os aminoácidos são utilizados como combustíveis energéticos, como transportadores/doadores de átomos de carbono e de nitrogênio, como neurotransmissores, como componentes de sistemas de tamponamento e também como osmólitos orgânicos. O transporte dessas moléculas através das membranas celulares é essencial para a geração e manutenção do reservatório (*pool*) intracelular de aminoácidos que é utilizado nos processos de síntese de proteínas, transporte para organelas e metabolismo citoplasmático (Kilberg e Häussinger, 1992).

O termo "transporte" abrange os eventos necessários para a transferência mediada de um soluto através da membrana em ambas as direções: influxo (do meio extracelular para o meio intracelular) e o efluxo (do meio intracelular para o meio extracelular). Operacionalmente o transporte mediado consiste em um processo de três etapas: a ligação do soluto ao receptor em um dos lados da membrana; a translocação através da membrana; e finalmente, a liberação do soluto no outro lado da membrana. O termo captação refere-se apenas ao influxo de moléculas (Kilberg e Häussinger, 1992).

### 1.2.1 *Transporte de Aminoácidos*

A transferência de solutos hidrofílicos (como os aminoácidos) através da bicamada lipídica da membrana requer estruturas mediadoras adequadas que são denominadas carreadores ou transportadores. Estas estruturas são caracterizadas por possuírem sítios de ligação ou sítios receptores que reconhecem o substrato e então a passagem do mesmo através da membrana pode ser permitida ou impelida em uma ou outra direção como resultado desse reconhecimento. As propriedades de reconhecimento definem a reatividade de um transportador a substratos específicos e um conjunto de transportadores dotados com as

mesmas propriedades de reconhecimento forma um sistema de transporte. Diversos sistemas medeiam o transporte de aminoácidos através das membranas. Diferentes membranas possuem conjuntos distintos de transportadores (Kilberg e Häussinger, 1992).

Existem ao menos sete sistemas de transporte de aminoácidos conhecidos em mamíferos (com exceção dos transportadores específicos de enterócitos e blastócitos). Os sistemas A e ASC são sistemas dependentes de  $\text{Na}^+$  e fazem transporte de aminoácidos neutros. O sistema A transporta aminoácidos com cadeias laterais não ramificadas, preferencialmente glicina, alanina, metionina, glutamina e iminoácidos como a prolina. Metilaminas como a sarcosina e betaína são substratos desse sistema, para as quais, o ácido  $\alpha$ -metil-aminoisobutírico (MeAIB) foi desenvolvido como um modelo análogo não metabolizável para identificação de transporte via sistema A (Kilberg e Häussinger, 1992). O influxo de  $\text{Na}^+$  para a célula é acoplado ao influxo dos aminoácidos, por transporte ativo secundário, movido pela diferença de gradiente de potencial eletroquímico para o  $\text{Na}^+$  ocasionado e mantido pela bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. O outro sistema de transporte dependente de  $\text{Na}^+$  é o sistema ASC que transporta aminoácidos com cadeias laterais lineares de diferentes comprimentos como a alanina, glutamina, treonina, serina e cisteína. O sistema L também é responsável pelo transporte de aminoácidos neutros, porém, este sistema é independente de  $\text{Na}^+$ . Transporta aminoácidos com cadeias laterais lineares ou ramificadas de diferentes comprimentos e estruturas aromáticas como fenilalanina, leucina, isoleucina, glutamina, cisteína, metionina e o análogo ácido aminoisobutírico (AIB). Glutamina, asparagina e histidina são transportadas pelo sistema N. O sistema  $X_{AG}^-$  e o sistema  $X_c^-$  são responsáveis pelo transporte de aminoácidos aniônicos. Porém, o sistema  $X_{AG}^-$  é dependente de  $\text{Na}^+$  e transporta ácido aspártico e ácido glutâmico. O sistema  $X_c^-$  é independente de  $\text{Na}^+$  e transporta glutamato e cistina (um aminoácido tripolar). Por fim, o sistema  $y^+$  (independente de  $\text{Na}^+$ ) transporta aminoácidos catiônicos como a lisina e arginina (Kilberg e Häussinger, 1992).

Os ácidos aminoisobutírico (AIB) e  $\alpha$ -metil-aminoisobutírico (MeAIB) ligados a elementos radioativos como  $^{14}\text{C}$  e  $^3\text{H}$ , são amplamente utilizados em preparações biológicas para quantificação da captação de aminoácidos. Esses aminoácidos não são passíveis de metabolização celular, portanto, acumulam-se na célula de uma maneira semelhante aos aminoácidos naturais (Debons e Pittmann, 1962). O análogo MeAIB é utilizado em estudos para a identificação de captação de aminoácidos via sistema A e ASC, enquanto que o análogo AIB pode ser utilizado para identificação de captação de aminoácidos tanto pelo

sistema A e ASC (transporte ativo dependente de sódio) quanto pelo sistema L (difusão facilitada).

Em organismos multicelulares, incluindo mamíferos, a atividade e capacidade dos sistemas de transporte de aminoácidos são modulados ou afetados por uma série de sinais de controle e mecanismos reguladores ativos em diferentes níveis de organização. A regulação dos sistemas de transporte de aminoácidos consiste em mecanismos de controle em nível celular, como regulações adaptativas, em nível de populações de células, com modulações ocasionadas por proliferação celular e densidade, ou em nível de organismo, com modulações por sinais químicos como hormônios ou neurotransmissores que podem afetar diferentes tecidos e órgãos (Kilberg e Häussinger, 1992).

### 1.2.2 *Oxidação de Aminoácidos*

Embora não existam reservas de aminoácidos em mamíferos, em situações de estresse como septicemia ou jejum prolongado, o tecido muscular pode fornecer aminoácidos através da degradação de suas proteínas. Os aminoácidos resultantes da degradação de proteínas, dependendo da situação fisiológica, podem ser: 1) reutilizados para síntese de novas proteínas; 2) precursores de glicose através da gliconeogênese (aminoácidos glicogênicos); 3) precursores de ácidos graxos ou corpos cetônicos (aminoácidos cetogênicos); 4) oxidados a CO<sub>2</sub>, ATP e água (Kettelhut *et al.*, 1988).

Quando degradados, os esqueletos carbonados dos aminoácidos são separados dos seus grupos aminas. O nitrogênio amínico é transferido para o  $\alpha$ -Cetoglutarato (Ciclo de Krebs) para produzir glutamato, enquanto que a quebra do esqueleto carbonado dos aminoácidos segue duas rotas gerais e a diferença entre elas depende do produto final obtido. Quando a oxidação resultar em piruvato e oxaloacetato, este aminoácido é considerado um aminoácido glicogênico, pois o piruvato pode ser transformado em oxaloacetato (através da piruvato carboxilase) e o oxaloacetato é o ponto de partida para a produção de glicose na via da gliconeogênese. Um aminoácido cetogênico é aquele que é degradado para produzir acetil-CoA ou acetoacetil-CoA, levando a formação de corpos cetônicos. A maioria dos aminoácidos são glicogênicos, enquanto o restante se divide em glicogênicos e cetogênicos, com exceção do aminoácido leucina que é apenas cetogênico (tabela 1). O esqueleto carbonado dos aminoácidos também podem dar origem a intermediários metabólicos como  $\alpha$ -Cetoglutarato, succinil-CoA e fumarato que entram diretamente no ciclo do ácido cítrico. O oxaloacetato é um intermediário chave na degradação dos esqueletos carbonados dos

aminoácidos por causa do seu papel duplo, tanto no ciclo do ácido cítrico como na gliconeogênese. Os aminoácidos degradados a aceti-CoA e acetoacetyl-CoA são utilizados no ciclo do ácido cítrico, mas os mamíferos não podem sintetizar glicose a partir de acetyl-CoA. Esse fato é a base da distinção entre aminoácidos glicogênicos e cetogênicos (Campbell, 2000).

**Tabela 1** – Aminoácidos glicogênicos e cetogênicos

Glicogênicos	Cetogênicos	Glicogênico e Cetogênico
Aspartato Asparagina		Isoleucina
Alanina Glicina Serina		Lisina
Treonina Cisteína Glutamato	Leucina	Fenilalanina
Glutamina Arginina Prolina		Triptofano
Histidina Valina Metionina		Tirosina

Fonte: Mary K. Campbell, Bioquímica 3ª edição, 2000.

### 1.2.3 Síntese de Proteínas

A síntese de proteínas é necessária para a renovação das células e tecidos, produção de neurotransmissores, hormônios, anticorpos, enzimas, estruturas celulares, nos processos de cicatrização, hiperplasia, hipertrofia, entre outros. A biossíntese de proteínas requer a presença de todos os aminoácidos constituintes. Se um dos 20 aminoácidos estiver ausente ou em concentrações limitantes, a biossíntese de proteínas será inibida. Alguns organismos como a *Escherichia coli*, podem sintetizar todos os aminoácidos de que necessitam. Outras espécies incluindo o homem, podem sintetizar apenas alguns desses aminoácidos, mas não todos e, nem em quantidades suficientes para as suas necessidades, especialmente se estiverem em fase de desenvolvimento. Os aminoácidos que não podemos sintetizar são conhecidos como aminoácidos essenciais, pois é necessário obtê-los através de fontes alimentares. Cerca da metade dos aminoácidos não são sintetizados pelo nosso organismo: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. A arginina e histidina são essenciais apenas durante a infância, pois passamos a sintetizá-los nas outras fases da vida. Os aminoácidos não são armazenados (a não ser nas proteínas) e, assim, as fontes alimentares de aminoácidos essenciais são requeridas em intervalos regulares de tempo (Campbell, 2000).

A síntese de proteínas é principalmente estimulada pela insulina, que é um hormônio anabólico liberado pelas células  $\beta$  do pâncreas. A insulina estimula a captação de aminoácidos assim como os processos de síntese proteica (como transcrição de genes, formação dos polissomas, velocidade de tradução dos mRNA e a síntese dos fatores de iniciação e alongação) em diversos tecidos (Nelson e Cox, 2005).

Como vimos acima a captação ou transporte de aminoácidos e a síntese de proteínas podem ser estimulados ou inibidos através de substâncias químicas, assim como os hormônios. Sabe-se que a cafeína presente na erva-mate estimula o sistema simpático, aumentando os níveis de adrenalina e noradrenalina na corrente sanguínea (Bastos *et al.*, 2007). As catecolaminas parecem exercer um papel importante na regulação do transporte de aminoácidos. Pariza *et al.* (1977) demonstraram que o tratamento de culturas de hepatócitos com adrenalina aumentou os níveis de AMPc e estimulou o transporte ou captação de AIB dependente de  $\text{Na}^+$ . Também já foi demonstrado que a suplementação com extrato de erva-mate pode modificar os níveis plasmáticos do hormônio insulina, o qual é um potente estimulador da captação de aminoácidos e da síntese de proteínas (Pang *et al.*, 2008).

Além disso, outros estudos demonstram que o bloqueio da liberação de noradrenalina de nervos periféricos por 24 ou 48 horas aumenta em 20% a taxa de proteólise em músculos sóleos incubados. O aumento agudo da proteólise após o bloqueio adrenérgico sugere a existência de um tônus adrenérgico inibitório em músculos esqueléticos oxidativos que restringe a proteólise (Navegantes *et al.*, 1999). Em concordância com essa sugestão foi encontrado que a adição de adrenalina e noradrenalina *in vitro*, reduzem a taxa de degradação proteica em aproximadamente 15 a 20% nos músculos sóleo e extensor longo dos dedos em ratos normais (Navegantes *et al.*, 2000).

Em um recente estudo publicado pelo nosso laboratório (Silva *et al.*, 2011) foi verificado que o extrato aquoso de erva-mate bruta reduziu a gordura abdominal e epididimal de ratos que receberam dieta padrão sem, no entanto, alterar o ganho de peso desses animais. Outros estudos também encontraram uma redução significativa da gordura abdominal ou epididimal, sem qualquer alteração no ganho de peso, tanto em ratos saudáveis tratados com extrato aquoso de erva-mate e dieta padrão, como em ratos que consumiram dieta padrão e frações isoladas dos frutos e folhas da erva-mate (Pedroso *et al.*, 2010, Resende *et al.*, 2012).

Alguns efeitos produzidos pela erva-mate ainda não estão completamente esclarecidos, particularmente em relação aos mecanismos fisiológicos que desencadeiam a redução de gorduras sem reduzir o ganho de peso corporal. O mecanismo pelo qual a cafeína interfere no metabolismo dos lipídeos já está bem definido e caracterizado. (Dunkan *et al.*,

2007). Contudo, não foram encontrados na literatura estudos que avaliassem os efeitos da erva-mate sobre o metabolismo de aminoácidos ou sobre a síntese de proteínas.

A hipótese deste trabalho é que a cafeína e outros compostos presentes no extrato aquoso de erva-mate podem influenciar o metabolismo de aminoácidos (captação e oxidação) e a síntese de proteínas no fígado e no músculo desses animais. E como os efeitos biológicos dependem diretamente da quantidade de substâncias bioativas (metilxatinas, saponinas e polifenóis) encontradas na erva-mate, a outra hipótese é que a erva-mate bruta (sem processamento industrial) pode apresentar resultados diferentes quando comparada a erva-mate comercial.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o metabolismo de aminoácidos e de proteínas no músculo e fígado e o metabolismo lipídico de ratos tratados com extrato aquoso de erva-mate comercial e bruta.

### 2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a captação de ácido amino-isobutírico ( $^{14}\text{C}$ -AIB) no músculo sóleo e fígado;
- Avaliar a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  pela oxidação de L-alanina- $^{14}\text{C}$  no músculo sóleo e fígado;
- Determinar a síntese de proteínas a partir de Leucina- $^{14}\text{C}$  no músculo sóleo e fígado;
- Avaliar a concentração sérica do hormônio insulina;
- Determinar os níveis séricos de glicose, colesterol total, proteínas totais, ureia e triglicerídeos.
- Avaliar o ganho de peso dos animais durante o período experimental.
- Determinar os parâmetros morfométricos: músculo sóleo, coração, fígado, gordura epididimal, gordura retroperitoneal e gordura marrom.
- Avaliar a atividade lipolítica das gorduras retroperitoneal e epididimal.
- Determinar qualitativa e quantitativamente os compostos bioativos (polifenóis, metilxantinas e saponinas) presentes no extrato aquoso de erva-mate comercial e no extrato aquoso de erva-mate bruta.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos machos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar com 2 meses de idade,  $\sim 230 \pm 40$ g, advindos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Todos os animais foram mantidos durante o período experimental na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), nas condições habituais do biotério com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Os ratos foram alocados em caixas plásticas conforme os grupos, em número mínimo de três e número máximo de quatro animais por caixa. A identificação dos animais foi feita através de pequenas marcas feitas com caneta/pincel atômico 1100-P (marca PILOT®) na base do rabo desses animais.

Os procedimentos executados obedeceram ao Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório desenvolvido pelo Instituto de Recursos de Animais de Laboratório (NIH, 2010) e está de acordo com a lei N.º 11.794/2008 da Constituição Federal que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) sob o número 1104-48.

#### 3.2 Erva-mate

Para a preparação dos extratos foram utilizados dois tipos de erva-mate:

***Erva-mate bruta:*** Foram selecionados 6 kg de folhas e ramos de erva-mate *in natura* em uma proporção de 70:30 (w/w), respectivamente. Este material foi sapecado e após, triturado em um moinho de corte (SK1 Retsch, Alemanha) com uma peneira de aço de 2mm. As folhas e ramos para a produção da erva-mate bruta foram gentilmente doados pela empresa Barão Comércio Indústria de Erva-mate, Barão de Cotegipe, RS, Brasil.

***Erva-mate comercial:*** Foi comprado em um comércio local (Porto Alegre, RS) cerca de 6 kg de erva-mate Barão de Cotegipe® (marca comercial do Rio Grande do Sul) padrão nacional-1 (PN-1) contendo 70% folhas, 30% outras partes do ramo, registrada no Ministério da Saúde e IBAMA. Foram compradas embalagens individuais de 1 kg cada, todas do mesmo lote de fabricação.

### *3.2.1 Preparação do extrato aquoso de erva-mate bruta e comercial*

As infusões eram preparadas da seguinte forma: aquecia-se 1 litro de água da torneira com um aquecedor elétrico em um Becker até 80°C (simulando a temperatura do chimarrão) e então eram adicionadas 70g de erva-mate comercial. Essa solução era misturada rapidamente com um bastão de vidro para dissolver toda a erva-mate e após 15 minutos era filtrada com um coador de pano e deixava-se esfriar. Este mesmo processo era repetido também com a erva-mate bruta. Após o resfriamento estes extratos eram colocados nos bebedouros e oferecidos imediatamente aos animais. A preparação desses extratos era realizada diariamente sempre ao final da tarde (entre 17h e 18h) devido ao hábito noturno desses animais, para que o extrato fosse fornecido no momento do despertar e consumido logo após ser preparado, minimizando assim as perdas de compostos fenólicos voláteis.

### **3.3 Compostos bioativos da erva-mate**

As análises foram realizadas utilizando-se o equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Shimadzu Class LC-10® (Kyoto, Japão), provido de um sistema controlador FCV-10 AL, um sistema de bomba LC-10AD, um injetor automático (20 lacete µL) SIL-10A, e um detector ultravioleta visível SPD 10-A 90. Os dados foram processados pelo software LC-10 CLASS. Uma coluna de fase reversa (Phenomenex ® RP-18, 250 x 3,9 mm id, 4 mm) foi utilizada. Os resultados foram expressos pela média de três injeções. A homogeneidade da preparação dos extratos foi controlada cuidadosamente ao longo do processo nas análises de cromatografia líquida das metilxantinas, dos polifenóis e das saponinas.

### 3.3.1 *Metilxantinas*

Um sistema isocrático utilizando metanol:água (40:60, v/v) foi aplicado, utilizando uma taxa de fluxo de 1,1 mL/min e detecção a 280 nm (Gnoatto *et al.*, 2007). A cafeína e a teobromina foram identificadas por comparação com compostos padrão e a concentração de ambas nos extratos foi determinada pelas médias das curvas padrão. As análises foram realizadas em triplicata sendo os resultados expressos pela média  $\pm$  EPM das três determinações. O teor de metilxantinas totais foi expresso como a soma das concentrações de cafeína e teobromina.

### 3.3.2 *Polifenóis*

Um sistema gradiente foi aplicado utilizando ácido acético a 2% (v/v) (fase A) e metanol:água 85% (v/v) (fase B). As etapas de gradiente foram 31% B (10 min), 31-56% B (10 min), 56% B (8 min), 56-77% B (12 min), 77-56% B (5 min) e 56-31% de B (5 min). O fluxo foi de 0,7 mL/min e a detecção com um comprimento de onda de 340 nm. A identificação dos principais polifenóis presentes no extratos por detecção MS e a validação do método de CL-UV foi realizada de acordo com trabalho anterior (Silva *et al.*, 2007). As análises foram realizadas em triplicata sendo os resultados expressos pela média  $\pm$  EPM das três determinações. O conteúdo total de polifenóis foi calculado pelas médias das curvas padrão de ácido clorogênico e rutina e expresso como a soma de sete picos principais presentes no cromatograma.

### 3.3.3. *Saponinas*

Um sistema gradiente foi aplicado utilizando ácido fosfórico a 0,1% (v/v) (fase A) e acetonitrilo (fase B). As etapas de gradiente foram 30-45% de B (40 min), 45% de B (5 min), e 45-30% de B (20 min), taxa de fluxo de 0,9 mL/min e a detecção foi a 205 nm (Silva *et al.*, 2007). As matesaponinas 1 e 3 foram identificadas por comparação com os compostos padrão. As análises foram realizadas em triplicata sendo os resultados expressos pela média  $\pm$  EPM das três determinações. O teor de saponinas foi calculado pelas médias da curva padrão de matesaponina-3 e expressa como a soma de sete picos principais presentes no cromatograma, que mostraram espectros de UV característico destes compostos ( $\lambda$  máx.: 205 nm).

### 3.4 Tratamento e procedimentos experimentais

Todos os ratos consumiram ração padrão peletizada (Tabela 2) e água *ad libitum* até a divisão deles em três grupos: grupo controle (CTR) (n = 10): grupo de animais tratados com ração padrão e água *ad libitum*; grupo erva-mate comercial (COM) (n = 10): grupo de animais tratados com ração padrão e extrato aquoso de erva-mate comercial PN-1 *ad libitum* (como única forma de hidratação) e grupo erva-mate bruta (BRU) (n = 10): grupo de animais tratados com ração padrão e extrato aquoso de erva-mate bruta *ad libitum* (como única forma de hidratação). O peso dos animais foi aferido no início, no meio e no final do período experimental (0, 30 e 60 dias) utilizando-se uma balança semianalítica para pesagem de animais. A partir desses dados, calculou-se a variação de peso dos animais durante o primeiro e segundo mês de tratamento (peso final menos o peso inicial).

Após o período de nove semanas de tratamento os animais foram mortos por decapitação para posteriores análises morfométricas, bioquímicas e metabólicas do sangue e tecidos. O sangue troncular foi coletado após decapitação e depositado em tubos com gel separador de soro e ativador de coágulo de 8mL (Vacuette®). Após foi realizada a centrifugação do sangue para obtenção do soro (Centrifuga Digital MTDIII Plus) em 1510xg por 10 minutos. O soro foi separado e congelado em triplicatas de eppendorfs de 1,5mL a -20°C para análises posteriores.

**Tabela 2** – Composição da ração padrão oferecida aos ratos (Nuvilab CR1 - Nuvital®).

Informação Nutricional	Porcentagem em 1000g
Umidade (máx.)	12,50%
Proteína Bruta (min.)	22,00%
Extrato Etéreo (min.)	4,00%
Matéria Fibrosa (máx.)	8,00%
Matéria Mineral (máx.)	10,00%
Cálcio (máx.)	1,40%
Fósforo (min.)	0,80%

**Composição:** Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico e aminoácidos.

### 3.5 Parâmetros morfométricos

Após a decapitação foram excisados os músculos sóleo, o coração, o fígado, as gorduras retroperitoneal, epididimal e gordura marrom. Esses órgãos e tecidos foram pesados (balança analítica) para a determinação da relação entre o peso do órgão/tecido e o peso do animal (Pimentel *et al.*, 2012).

### 3.6 Procedimentos experimentais *in vitro*

#### 3.6.1 Captação de ácido aminoisobutírico (AIB) [ $U-^{14}C$ ]

Amostras de tecido hepático (300 - 400mg) e muscular (sóleo; 100 – 150mg) foram fatiadas e depositadas em tubos plásticos de 5mL, previamente pesados, contendo 1mL de solução fisiológica (Krebs Ringer Bicarbonato)<sup>2</sup> e 0,15  $\mu$ Ci de ácido aminoisobutírico (AIB- $[U^{14}C]$ ) (Du Pont 2,2 GBq/mmol, 60 mCi/mmol). Os tubos foram pesados novamente para a determinação do peso dos tecidos. Os tubos foram aerados com carbogênio ( $O_2:CO_2$ , 95:5% v/v) por 30 segundos, tampados e submetidos a incubação em banho metabólico do tipo Dubnoff sob agitação constante por 60 minutos a temperatura de 37°C.

Transcorrido esse período, as reações teciduais foram interrompidas por imersão no gelo. As amostras de tecido foram removidas do meio de incubação, lavadas três vezes em solução fisiológica gelada, com o objetivo de retirar o excesso de radioatividade do tecido, secas em papel filtro e colocadas em tubos (pirex) com tampa rosca contendo 1mL de água destilada. Os tubos foram congelados a -20 °C e posteriormente fervidos por 25 minutos. Este procedimento (congelamento – fervura) foi repetido por mais duas vezes consecutivas para romper as células e promover a liberação do conteúdo de AIB- $^{14}C$  captado pelos tecidos. Sendo este meio considerado o “meio interno” e, o meio de incubação o “meio externo”.

Amostras de 100 $\mu$ L do meio interno e do meio externo foram transferidas para flaconetes contendo 2,5mL de líquido de cintilação [tolueno-triton X-100 (2:1); PPO (0,4%),

---

<sup>2</sup> Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) – (118 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,3 mM  $CaCl_2$ , 1,2 mM  $KH_2PO_4$ , 1,2 mM  $MgSO_4$  e 24,8 mM  $NaHCO_3$ ; pH 7,4).

POPOP (0,01%)]. A radioatividade foi medida em desintegrações por minuto (DPM) com a utilização de um contador de radioatividade  $\beta$  LKB-Wallac.

Os resultados da captação de AIB- $^{14}\text{C}$  foram expressos pela radioatividade contida no meio interno (tecido – T) e no meio externo (meio de incubação - M) (T/M: dpm/mL meio interno dividido por dpm/mL de meio externo), conforme descrito por Machado *et al.* (1991).

### 3.6.2 Formação de dióxido de carbono $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-alanina [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]

Amostras de tecido hepático (300 - 400mg) e muscular (sóleo; 100 – 150mg) foram fatiadas e depositadas em tubos de vidro, previamente pesados, contendo 1mL de solução fisiológica Krebs Ringer Bicarbonato, 0,15  $\mu\text{Ci}$  de L-alanina[ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ] (L-alanina uniformemente marcada) (Amersham International - 55 mCi/mmol) e 5 mM de alanina não marcada, pH 7,4.

Nas tampas de borracha foi acoplado um vidro em formato de “J” com um poço contendo uma tira de papel Whatman 3MM, dobrada em forma de “W”, utilizada para a captação do  $^{14}\text{CO}_2$  resultante da oxidação da alanina uniformemente marcada. Os tubos foram aerados com carbogênio ( $\text{O}_2:\text{CO}_2$ , 95:5% v/v) por 30 segundos, tampados e vedados com parafilme. A incubação foi realizada em banho metabólico tipo Dubnoff durante 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$  com agitação constante.

Transcorrido esse período, a reação de oxidação foi interrompida injetando-se 0,25 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50% no meio de incubação e 0,25mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2N no poço contendo a tira de papel 3MM. Ambas as aplicações foram realizadas através das tampas de borracha utilizando-se uma seringa com agulha 25x7.

Os tubos permaneceram lacrados e imóveis por 12 horas, em temperatura ambiente, para promover a fixação total do  $^{14}\text{CO}_2$  nas tiras de papel. Após este período as tiras de papel 3MM foram transferidas para flaconetes, devidamente identificados, contendo 2,5mL de líquido de cintilação. A radioatividade foi estimada com a utilização de um contador LKB-Wallac calibrado com uma curva de correção para desintegrações por minuto (DPM). Os resultados de formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de L-alanina- $^{14}\text{C}$  foram expressos em nmoles de  $^{14}\text{CO}_2$  por grama de tecido por hora de incubação (Torres *et al.*, 2001).

### 3.6.3 Síntese de proteínas a partir de Leucina [ $U-^{14}C$ ]

Amostras de tecido hepático (200 - 500mg) e muscular (sóleo; 50 – 150mg) foram fatiadas e depositadas em tubos de incubação, previamente pesados, contendo 1mL de solução fisiológica Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) acrescida de 0,1mM (1%) de fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF), 0,15 $\mu$ Ci de leucina[ $U-^{14}C$ ] (Amersham International: 11,7 GBq/mmol, 315 mCi/mmol) e 5mM de leucina não marcada, pH 7,4.

Os tubos foram aerados com carbogênio (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> - 95:5% - v/v) por 30 segundos, tampados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff a 37°C sob agitação constante durante 180 minutos. Após o período de incubação, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo. Os tecidos foram lavados três vezes com solução fisiológica KRB (para retirar o excesso de radioatividade), secos em papel filtro e transferidos para eppendorfs contendo 500 $\mu$ l de água destilada. As amostras foram então homogeneizadas com um macerador de tecidos (Omni Mixer).

Para a quantificação total das proteínas- $^{14}C$  sintetizadas, 200 $\mu$ l de cada uma das amostras homogeneizadas foram pipetadas em quadrados de papel (2x2cm) 3MM Whatman. Esses papéis foram secos em estufa a 50 °C por 10 minutos. Após a secagem, os papéis foram incubados com TCA 10% (em quantidade suficiente para cobrir os papéis) por 10 minutos, para que ocorresse a precipitação das  $^{14}C$ -proteínas. A seguir, para a eliminação dos lipídeos, os papéis foram lavados sob agitação constante, duas vezes com álcool 95% por 10 minutos e uma vez com éter por 5 minutos. Quando secos, os papéis foram transferidos para flaconetes contendo 2,5mL de líquido de cintilação e a radioatividade foi quantificada em contador LKB-Wallac calibrado com uma curva de correção para DPM. Os resultados foram expressos em  $\mu$ moles de leucina- $^{14}C$  incorporada em proteína- $^{14}C$  por grama de tecido por hora de incubação (Richardson *et al.*, 1997).

### 3.6.4 Lipólise

Amostras de tecido adiposo epididimal (500 – 750mg) e tecido adiposo retroperitoneal (400 – 650mg) foram fatiadas e depositadas em tubos de incubação, previamente pesados e identificados, contendo 1mL de solução fisiológica KRB acrescida de 5mM de glicose fria e 1% de albumina bovina. Os tubos foram pesados novamente para a determinação do peso dos tecidos. Após esta etapa, eram adicionados 20 $\mu$ L de solução de adrenalina em ácido ascórbico ( $2,5 \times 10^{-4}M$ ) para a lipólise estimulada.

Os tubos foram aerados com carbogênio (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> - 95:5% - v/v) por 30 segundos, tampados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff a 37°C sob agitação constante durante 60 minutos. Após o período de incubação, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo. O meio de incubação das amostras foi retirado e transferido para eppendorfs para a determinação do glicerol. Os resultados foram expressos em mmol de glicerol por grama de tecido por tempo de incubação (Chernick, 1969).

### **3.7 Análises bioquímicas**

As concentrações séricas de glicose, colesterol total, triglicerídeos, proteínas totais e ureia foram determinadas através de kits enzimáticos colorimétricos comerciais (Labtest Diagnóstica SA®). A leitura das amostras foi realizada em microplacas (96 poços) em uma leitora de Elisa espectrofotométrica (Biochrom Anthos® Zenyth 200rt) contra o branco do reagente.

A insulina sérica foi determinada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) para insulina rato/camundongo – Cat. #EZRMI-13K (Merck Millipore®) e analisada com o software MasterPlex® ReaderFit. A leitura das microplaca de insulina foi realizada em leitora de Elisa espectrofotométrica (Biochrom Anthos® Zenyth 200rt).

### **3.8 Análise estatística**

Para o cálculo do número mínimo de animais, foi utilizado o Computer Programs for Epidemiologists (WINPEPI – versão 9.1). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 95%, desvio padrão assumido de 20,33 unidades, erro aceitável de 6,43 unidades, perda esperada de 5%, chegando a um “n” amostral de 10 animais por grupo (3 grupos = 30 animais no total). Os valores do cálculo foram obtidos em experimentos prévios e na literatura (Resende *et al.*, 2012, Silva *et al.*, 2011, Pedroso *et al.*, 2010).

Para determinar se os dados possuíam distribuição normal foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram expressos como média e erro padrão da média (Média ±EPM). Para a comparação entre os dois extratos foi utilizado o test t de Student. Para a comparação entre os grupos experimentais com dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via com pós teste de Student Newman Keuls (SNK). Dados não paramétricos foram expressos como mediana e intervalos interquartis (IQ25-IQ75). Para comparação entre os grupos experimentais com dados não

paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou  $P < 0,05$ . As análises foram realizadas com o programa SigmaStat 3.1 (Jandel Corporation).

### **3.9 Biossegurança**

Durante a execução do trabalho os pesquisadores envolvidos usaram equipamentos de proteção individual (EPIs) como luvas de procedimentos cirúrgicos, tocas, pró-pés e aventais. Além destes cuidados, a preparação de soluções ocorreu dentro de capelas de exaustão. O descarte das carcaças ocorreu de acordo com as normas da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Resíduos não tóxicos foram descartados no sistema de esgoto comum. Os resíduos químicos foram encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS e os resíduos biológicos foram encaminhados ao Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS para procedimento padrão de eliminação.

O manuseio de material radioativo ocorreu em local designado para este fim, nas dependências do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) com o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) adequado. O material radioativo foi descartado de acordo com a Norma CNEN- NE-6.05 de 1985, elaborada pela Comissão Nacional de Energia Nuclear.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – Análise dos compostos bioativos dos extratos aquosos de erva-mate comercial e bruta

#### 4.1.1 Análise qualitativa

Os cromatogramas de saponinas, polifenóis e metilxantinas de ambos os extratos aquosos (erva-mate comercial e bruta) apresentaram constituição química muito semelhante. Na análise das saponinas o perfil cromatográfico evidenciou a presença de sete diferentes picos que apresentaram espectros de UV característicos de saponinas. Foram detectadas as seguintes saponinas: Matessaponina 1, Matessaponina 3 e Chikusetsusaponina (Figura 3). O perfil cromatográfico dos polifenóis também evidenciou a presença de sete diferentes picos, dois deles sendo o ácido clorogênico e a rutina e os cinco restantes derivados cafeiolquínicos, enquanto que, o perfil cromatográfico das metilxantinas evidenciou a presença de dois picos: a teobromina e a cafeína.

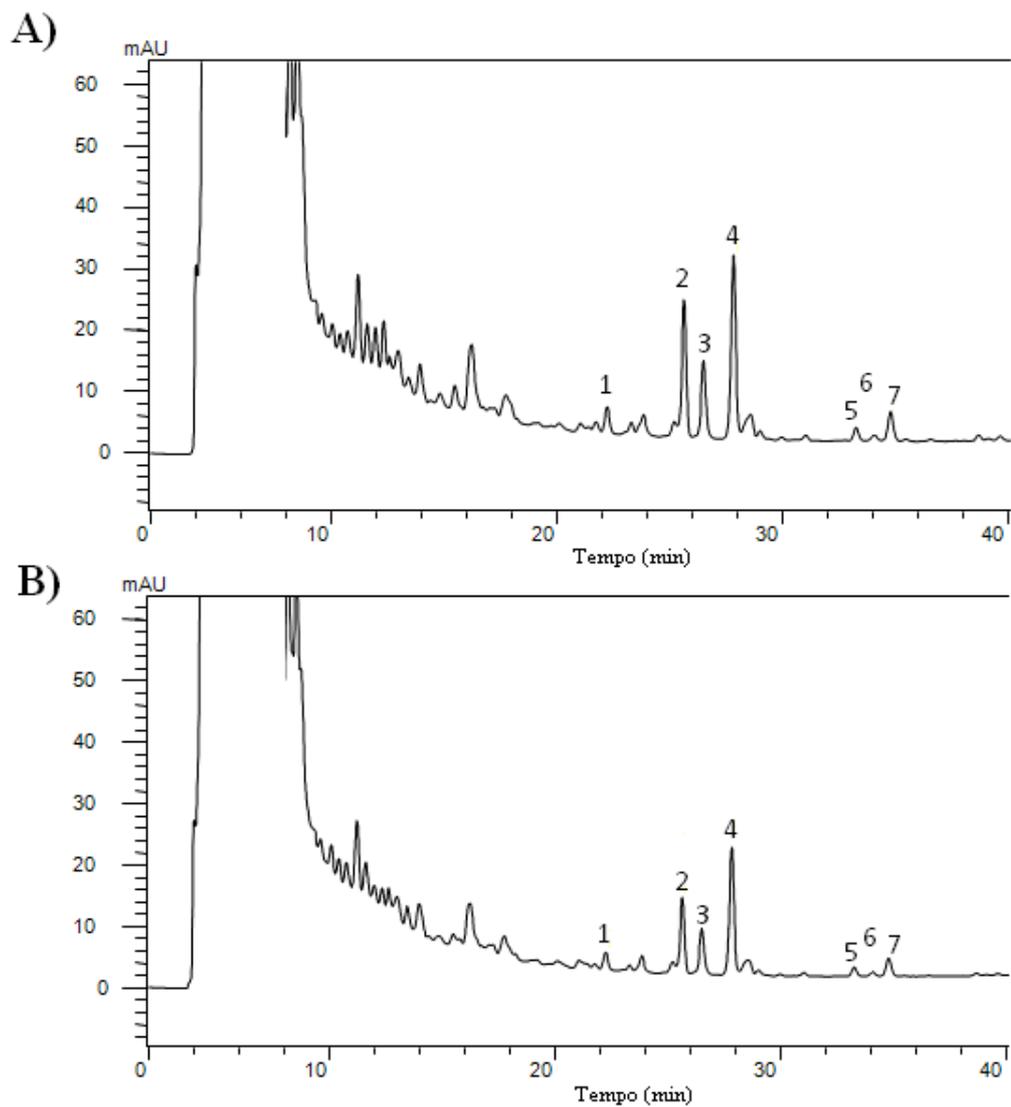
#### 4.1.2 Análise quantitativa

Em termos quantitativos os extratos não apresentaram diferença significativa no teor de polifenóis e metilxantinas totais. Os extratos diferiram apenas na quantidade de teobromina ( $P=0,037$ ) e saponinas totais ( $P=0,001$ ) ambas presentes em maiores quantidades no extrato aquoso de erva-mate bruta, sendo o teor de saponinas 1.7 vezes maior do que o encontrado no extrato aquoso comercial (Tabela 3).

**Tabela 3** – Teores totais de saponinas, metilxantinas (cafeína e teobromina) e polifenóis no extrato aquoso da erva-mate comercial e no extrato aquoso da erva-mate bruta.

	Erva-mate comercial ( $\mu\text{g/mL}$ )	Erva-mate bruta ( $\mu\text{g/mL}$ )
Saponinas totais	313,5 $\pm$ 4,42	496,65 $\pm$ 4,73 *
Polifenóis totais	5786,1 $\pm$ 65,85	6353,6 $\pm$ 289,92
Metilxantinas totais	893,17 $\pm$ 5,77	920,15 $\pm$ 17,84
Cafeína	743,26 $\pm$ 7,31	754,74 $\pm$ 13,22
Teobromina	149,9 $\pm$ 2,12	165,4 $\pm$ 4,56 *

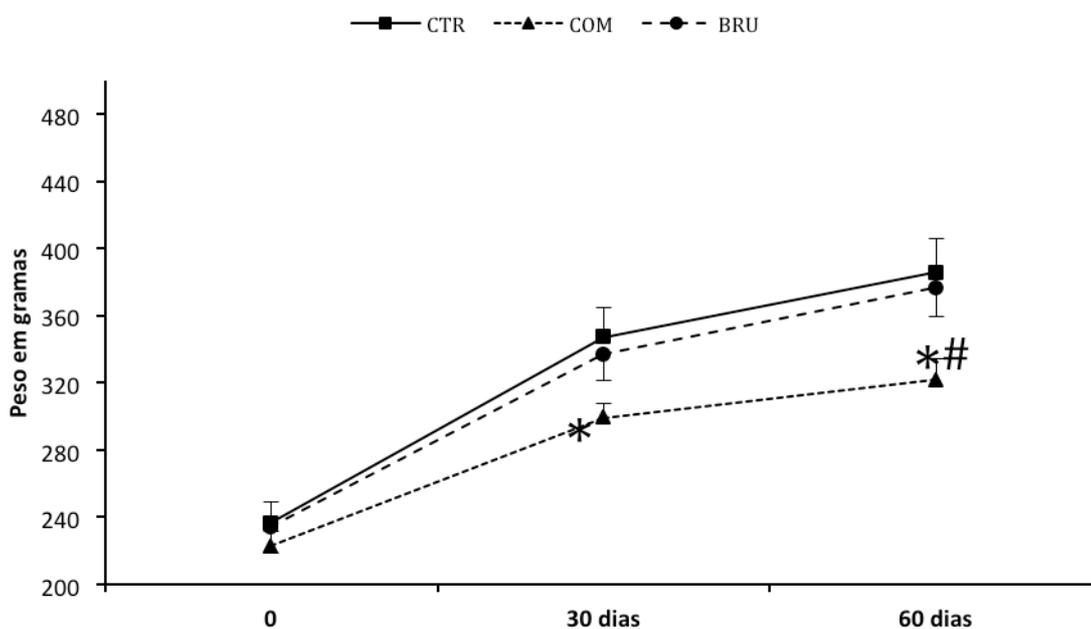
Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). (\*) Estatisticamente diferente do extrato aquoso de erva-mate comercial ( $P < 0,05$ , teste t de Student). As análises foram realizadas em triplicata sendo os resultados expressos pela média das três determinações.



**Figura 3** – Cromatogramas das saponinas encontradas no extrato aquoso de erva-mate bruta (A) e no extrato aquoso de erva-mate comercial (B). Saponinas: (1) matesaponina-3, (3) matesaponina-1, (4) chikusetsusaponina, (2; 5; 6; 7) picos de saponinas não identificadas.

## 4.2 Ganho de peso corporal

Os animais foram pesados no início do experimento (dia 0) e não houve diferença significativa entre as médias de peso dos grupos (CTR:  $236,82 \pm 12,97\text{g}$ , COM:  $223,29 \pm 8,52\text{g}$  e BRU:  $234,5 \pm 15,78\text{g}$ ). Os animais tratados com extrato aquoso de erva-mate bruta não apresentaram diferença significativa no ganho de peso tanto no primeiro mês ( $336,82 \pm 15,44\text{g}$ ) quanto no segundo mês de tratamento ( $376,61 \pm 17,23\text{ g}$ ) em relação ao grupo controle ( $347,49 \pm 17,8\text{g}$  e  $386,07 \pm 20,02\text{g}$ ). Nos animais tratados com extrato aquoso de erva-mate comercial houve uma redução significativa do ganho de peso corporal no primeiro mês ( $299,62 \pm 8,75\text{g}$ ;  $P=0,02$ ) em relação ao grupo controle ( $347,49 \pm 17,8\text{g}$ ;) e esta redução se manteve significativa no segundo mês de tratamento ( $322,27 \pm 12,27\text{g}$ ) tanto em relação ao grupo controle ( $386,07 \pm 20,02\text{g}$ ;  $P=0,02$ ) como em relação ao grupo da erva-mate bruta ( $376,61 \pm 17,23\text{ g}$ ;  $P=0,03$ ) (Figura 4).



**Figura 4** – Variação de peso dos animais dos grupos controle (CTR), erva-mate comercial (COM) e erva-mate bruta (BRU) durante os dias 0, 30 e 60 do período experimental. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM. (\*) Estatisticamente diferente do grupo controle ( $P < 0,05$ , ANOVA de uma via com pós-teste de SNK). (#) Estatisticamente diferente do grupo da erva-mate bruta ( $P < 0,05$ , ANOVA de uma via com pós-teste de SNK).

### 4.3 Parâmetros morfométricos

Os índices morfométricos (mg de tecido/g de peso corporal) do músculo sóleo, fígado, coração e tecido adiposo marrom não foram alterados pelo tratamento com os extratos de erva-mate (comercial ou bruta), como pode ser observado na Tabela 4.

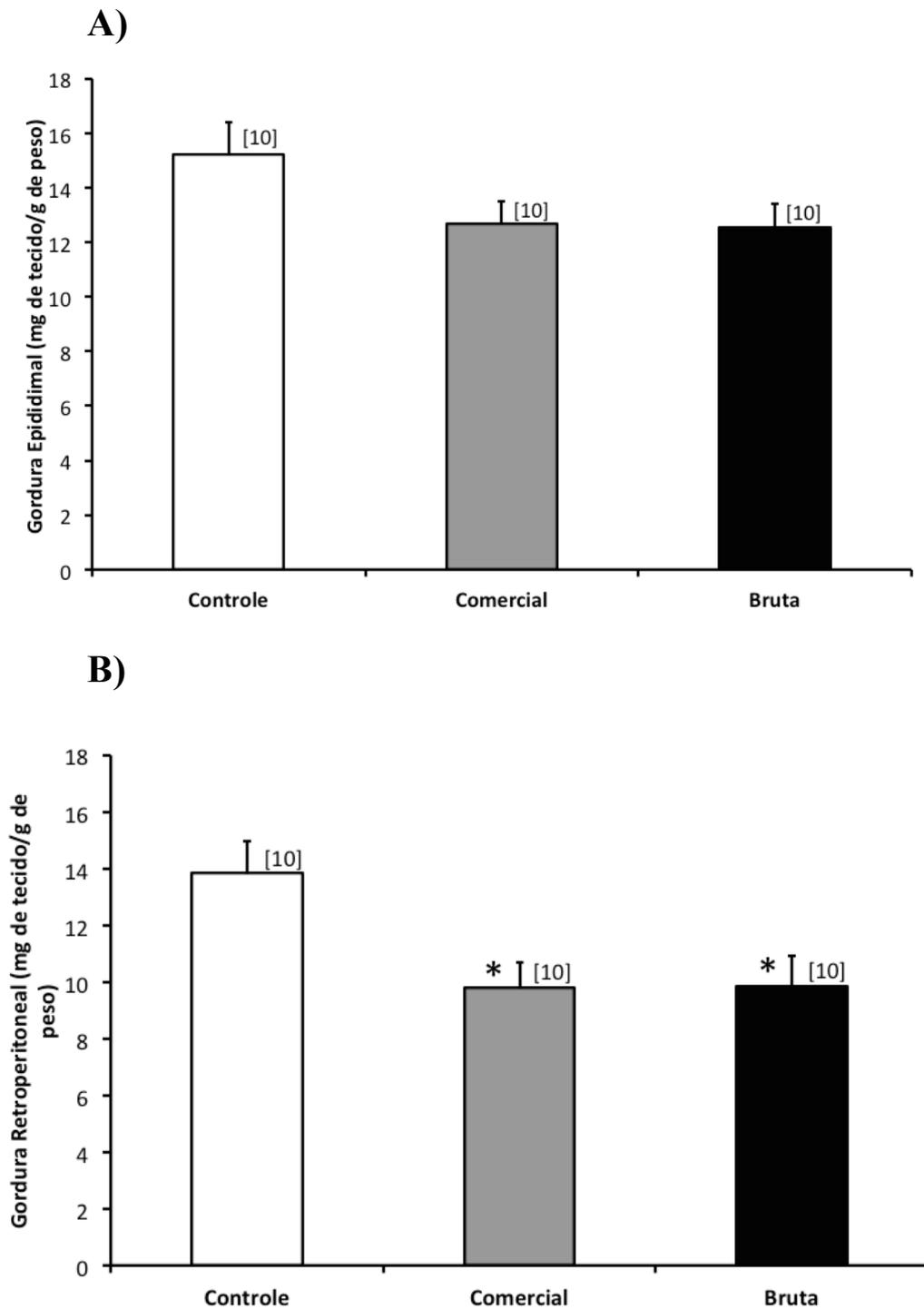
O índice de gordura epididimal não foi estatisticamente diferente entre os grupos da erva-mate (comercial ou bruta) e o grupo controle. Porém, podemos observar uma porcentagem menos expressiva de 17% e 18% na média do grupo da erva-mate comercial e na média do grupo da erva-mate bruta, respectivamente, em relação a média do grupo controle (Figura 5A).

Ambos os grupos tratados com o extrato aquoso de erva-mate comercial ou o extrato aquoso de erva-mate bruta apresentaram uma redução estatisticamente significativa no índice de gordura retroperitoneal em relação ao grupo controle ( $P=0,03$  e  $P=0,01$ , respectivamente). As médias dos índices de gordura retroperitoneal dos animais que receberam os extratos de erva-mate (comercial ou bruta) foram cerca de 29% menor do que a média do índice de gordura retroperitoneal do grupo controle (Figura 5B). Não houve diferença significativa no índice de gordura retroperitoneal entre os grupos tratados com extratos de erva-mate comercial e bruta.

**Tabela 4** – Índice morfométrico do músculo sóleo, fígado, coração e tecido adiposo marrom dos grupos controle (CTR), erva-mate comercial (COM) e erva-mate bruta (BRU).

	CTR [10]	COM [10]	BRU [10]
Músculo Sóleo (mg/g de tecido)	0,88 ± 0,02	0,84 ± 0,03	0,81 ± 0,02
Fígado (mg/g de tecido)	32,90 ± 0,68	32,15 ± 0,54	33,72 ± 0,90
Coração (mg/g de tecido)	2,92 ± 0,06	2,79 ± 0,05	2,76 ± 0,06
Tecido Adiposo Marrom (mg/g de tecido)	0,92 ± 0,07	0,87 ± 0,07	0,77 ± 0,06

Os dados estão expressos como média ± EPM. O número de animais está representado entre colchetes. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $P > 0,05$ , ANOVA de uma via com pós-teste de SNK).



**Figura 5** – Índice de gordura epididimal (**A**) e índice de gordura retroperitoneal (**B**) dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta após 60 dias de tratamento. Os dados estão expressos como média ± EPM. O número de animais está representado entre colchetes. (\*) Estatisticamente diferente do grupo controle ( $P < 0,05$ , ANOVA de uma via com pós-teste de SNK).

#### 4.4 Análises Bioquímicas

Os tratamentos com extrato aquoso de erva-mate comercial ou bruta não exerceram efeitos significativos sob as concentrações séricas de colesterol total, glicose, ureia ou proteínas totais como pode ser observado na tabela 5.

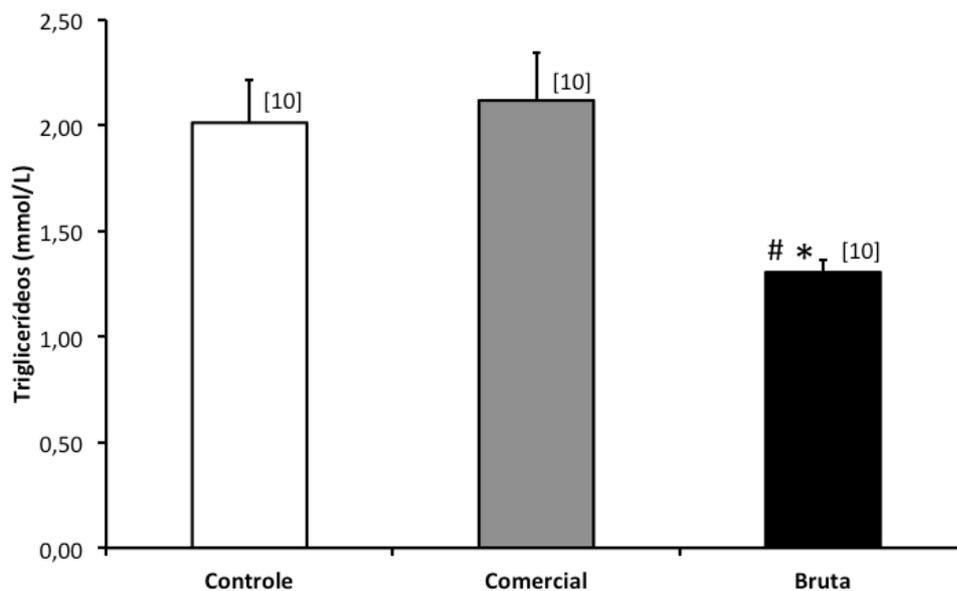
**Tabela 5** – Concentrações séricas de colesterol total, glicose, ureia e proteínas totais nos grupos controle (CTR), erva-mate comercial (COM) e erva-mate bruta (BRU).

	<b>CTR</b> [10]	<b>COM</b> [10]	<b>BRU</b> [10]
Colesterol Total (mmol/L)	1,95 ± 0,09	1,84 ± 0,11	2,17 ± 0,10
Glicose (mmol/L)	5,87 ± 0,10	6,05 ± 0,15	6,05 ± 0,23
Ureia (mmol/L)	9,69 ± 0,24	9,48 ± 0,31	10,02 ± 0,42
Proteínas Totais (g/dL)	7,76 ± 0,12	7,70 ± 0,09	7,66 ± 0,14

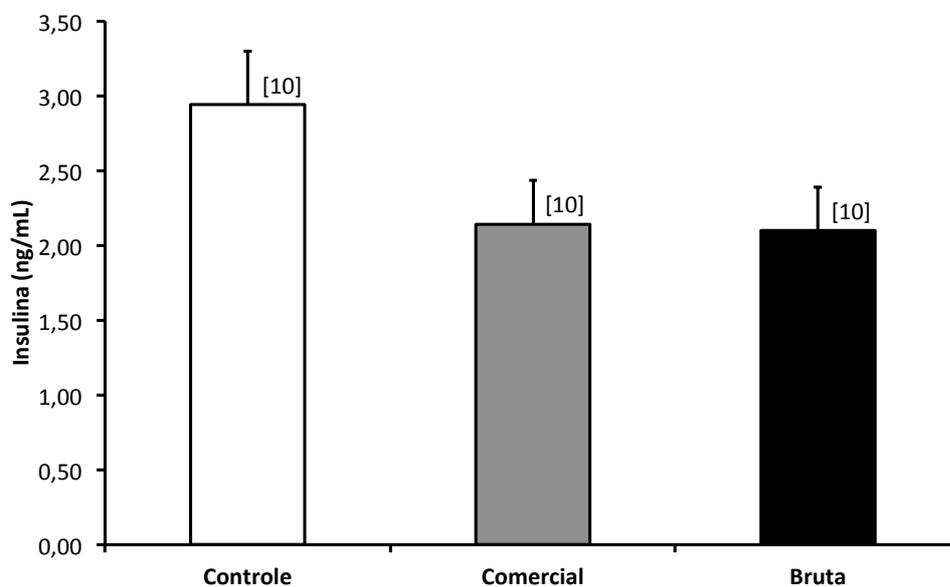
Os dados estão expressos como média ± EPM. O número de animais está representado entre colchetes. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $P > 0,05$ , ANOVA de uma via com pós-teste de SNK).

Conforme podemos observar na Figura 6 os animais tratados com extrato aquoso de erva-mate bruta apresentaram níveis significativamente menores de triglicerídeos séricos ( $1,30 \pm 0,06$  mmol/L) tanto em relação aos animais do grupo controle ( $2,01 \pm 0,06$  mmol/L;  $P=0,01$ ) quanto em relação aos animais tratados com extrato aquoso de erva-mate comercial ( $2,12 \pm 0,23$  mmol/L;  $P=0,01$ ).

Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos de insulina entre os grupos (CTR:  $2,94 \pm 0,36$ ; COM:  $2,14 \pm 0,29$ ; BRU:  $2,10 \pm 0,29$ ). Porém, observou-se uma porcentagem menos expressiva de cerca de 16% na média do grupo da erva-mate comercial e 28% na média do grupo da erva-mate bruta em relação a média do grupo controle (Figura 7).



**Figura 6** – Níveis de triglicerídeos séricos dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais está representado entre colchetes. (\*) Estatisticamente diferente do grupo controle ( $P < 0,05$ , ANOVA de uma via com pós-teste de SNK). (#) Estatisticamente diferente do grupo erva-mate comercial ( $P < 0,05$ , ANOVA de uma via com pós-teste de SNK).



**Figura 7** – Níveis de insulina sérica dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais está representado entre colchetes. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ , ANOVA de uma via com pós-teste de SNK).

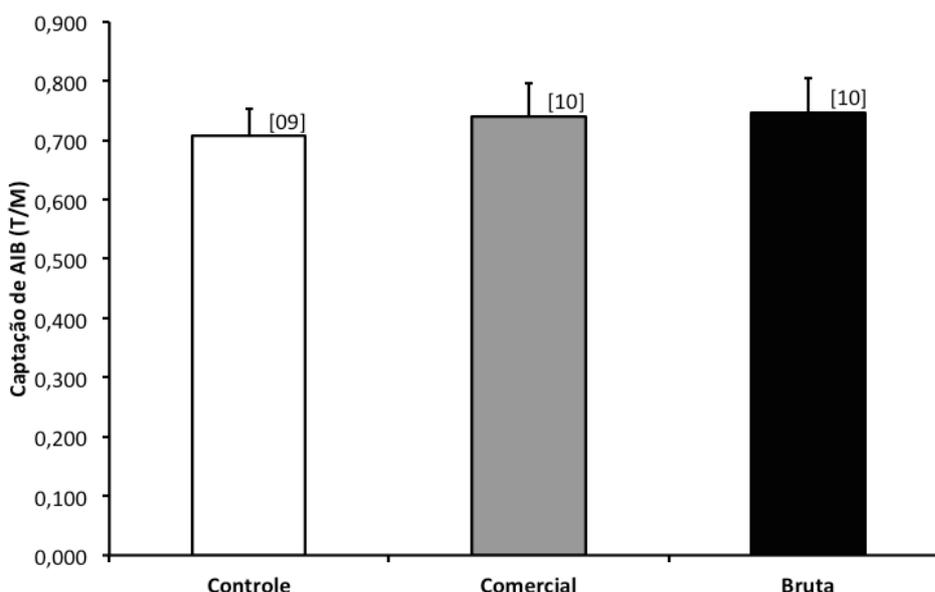
## 4.5 Experimentos *in vitro*

### 4.5.1 Captação de AIB, síntese de proteínas e oxidação de L-alanina no músculo sóleo

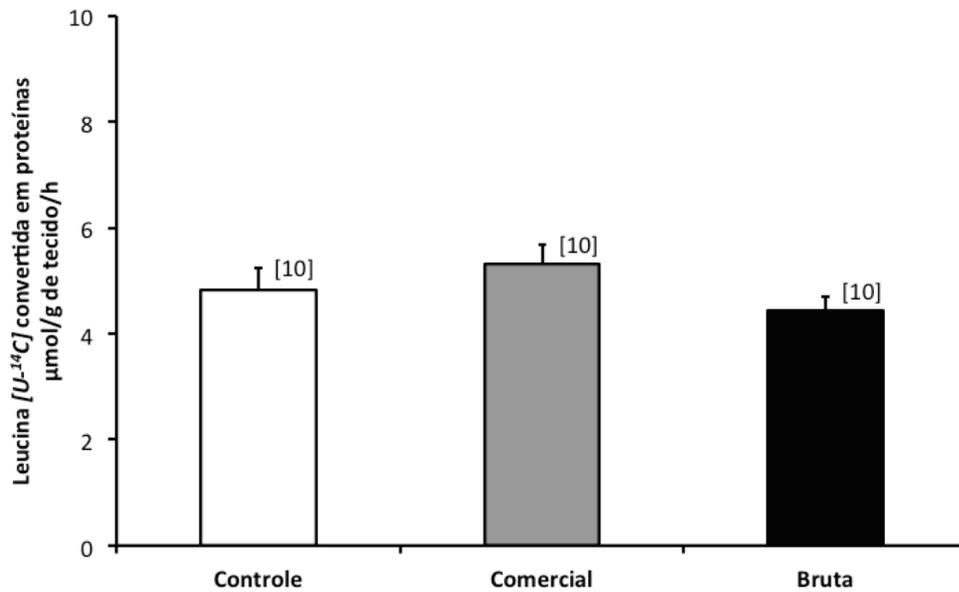
Não houve diferença estatisticamente significativa entre a captação de AIB [ $U-^{14}C$ ] no músculo sóleo dos grupos da erva-mate comercial ( $0,739 \pm 0,05$ ) e da erva-mate bruta ( $0,744 \pm 0,05$ ) em relação ao grupo controle ( $0,705 \pm 0,04$ ) como pode ser observado na figura 8.

O tratamento com extrato aquoso de erva-mate comercial ou bruta não exerceu efeito significativo sobre os valores de síntese de proteínas a partir da leucina [ $U-^{14}C$ ] no músculo sóleo desses animais (CTR:  $4,80 \pm 0,43$ ; COM:  $5,31 \pm 0,36$  e BRU:  $4,42 \pm 0,28$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido/h) (Figura 9).

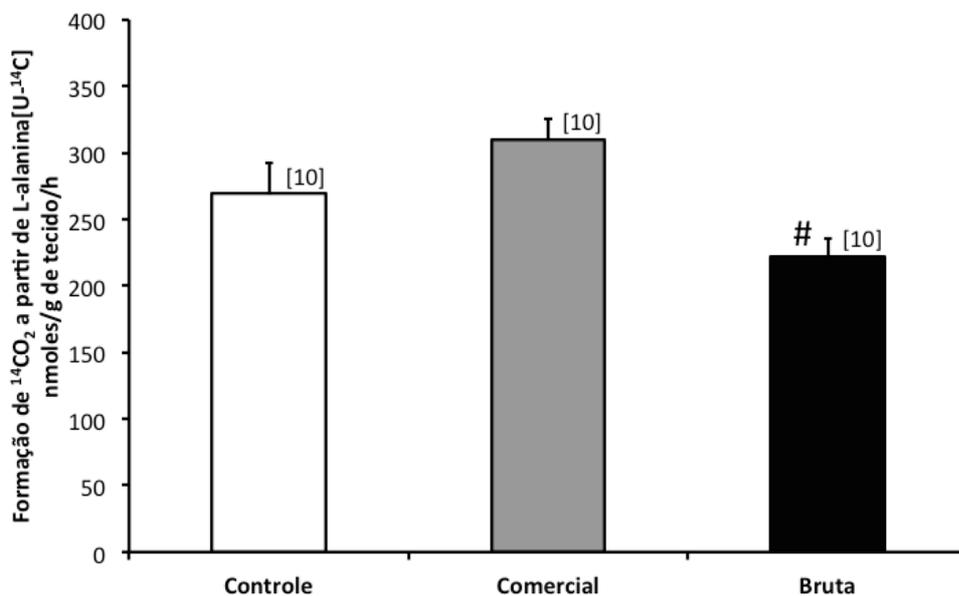
Os tratamentos com extrato aquoso de erva-mate comercial ou com extrato aquoso de erva-mate bruta também não exerceram efeitos significativos sobre a formação de  $^{14}CO_2$  a partir da oxidação de L-alanina no músculo sóleo quando comparados ao grupo controle. Entretanto, os animais tratados com extrato aquoso de erva-mate bruta apresentaram uma formação significativamente menor na formação de  $^{14}CO_2$  ( $P=0,006$ ) no músculo sóleo quando comparados aos animais tratados com extrato aquoso de erva-mate comercial (Figura 10).



**Figura 8** – Captação de ácido aminoisobutírico (AIB) [ $U-^{14}C$ ] no músculo sóleo dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais está representado entre colchetes. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ , ANOVA de uma via com pós-teste de SNK).



**Figura 9** – Síntese de proteínas a partir de leucina [U-<sup>14</sup>C] no músculo sóleo dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta. Os dados estão expressos como média ± EPM. O número de animais está representado entre colchetes. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ , ANOVA de uma via com pós-teste de SNK).



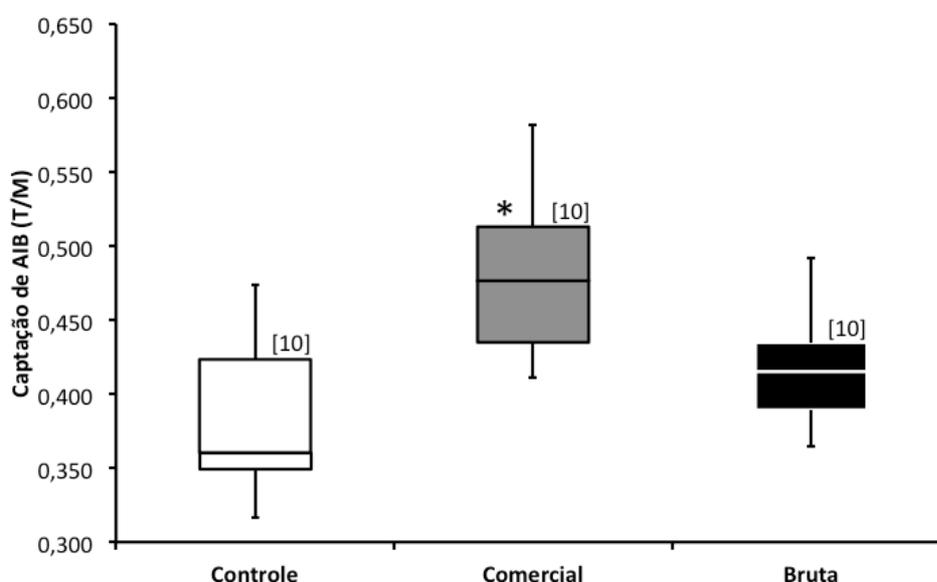
**Figura 10** – Oxidação de L-alanina [U-<sup>14</sup>C] no músculo sóleo dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta. Os dados estão expressos como média ± EPM. O número de animais está representado entre colchetes. (#) Estatisticamente diferente do grupo erva-mate comercial ( $P < 0,05$ , ANOVA de uma via com pós-teste de SNK).

#### 4.5.2 Captação de AIB, síntese de proteínas e oxidação de L-alanina no fígado

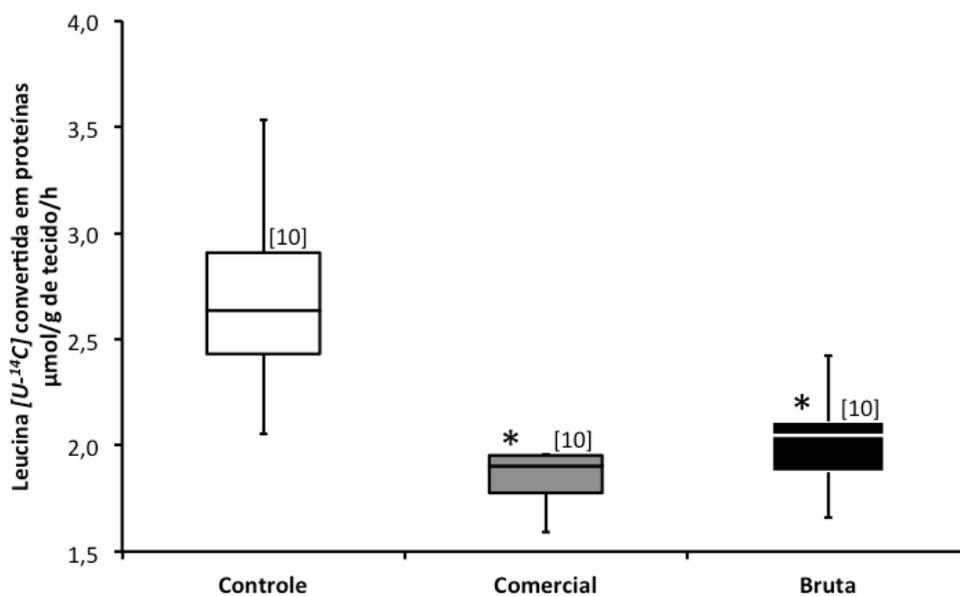
O tratamento com o extrato aquoso de erva-mate comercial aumentou significativamente a captação de AIB no fígado ( $P=0,02$ ), um aumento em cerca de 30% em relação a mediana do grupo controle. O tratamento com o extrato aquoso de erva-mate bruta não foi capaz de aumentar significativamente a captação de AIB no fígado assim como o tratamento com o extrato de erva-mate comercial o fez, porém, observou-se um aumento de cerca de 15% na mediana do grupo da erva-mate bruta em relação a mediana do grupo controle (Figura 11).

A síntese de proteínas no fígado também foi alterada pelo tratamento com os extratos de erva-mate. Houve uma redução significativa na síntese de proteínas no fígado tanto nos animais que receberam extrato aquoso comercial ( $P=0,001$ ) quanto nos que receberam extrato aquoso de erva-mate bruta ( $P=0,001$ ). Não houve diferença significativa na síntese de proteínas entre os grupos tratados com extratos de erva-mate (comercial e bruta) (Figura 12).

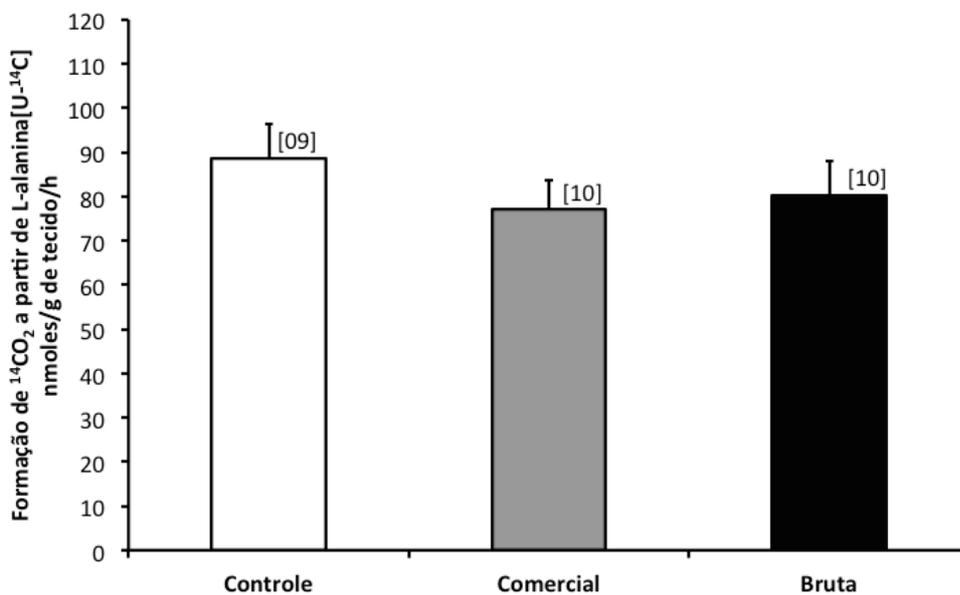
O tratamento com os extratos de erva-mate comercial ou bruta não exerceu efeito significativo sobre a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  (oxidação de L-alanina [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]) no fígado desses animais em relação ao grupo controle (Figura 13).



**Figura 11** – Captação de ácido aminoisobutírico (AIB) [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ] no fígado dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta. Os dados estão expressos como mediana e intervalos interquartis (IQ25 e IQ75). O número de animais está representado entre colchetes. (\*) Estatisticamente diferente do grupo controle ( $P < 0,05$ , Kruskal-Wallis com pós teste de Tukey).



**Figura 12** – Síntese de proteínas a partir de leucina [ $U-^{14}C$ ] no fígado dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta. Os dados estão expressos como mediana e intervalos interquartis (IQ25 e IQ75). O número de animais está representado entre colchetes. (\*) Estatisticamente diferente do grupo controle ( $P < 0,05$ , Kruskal-Wallis com pós teste de Tukey).

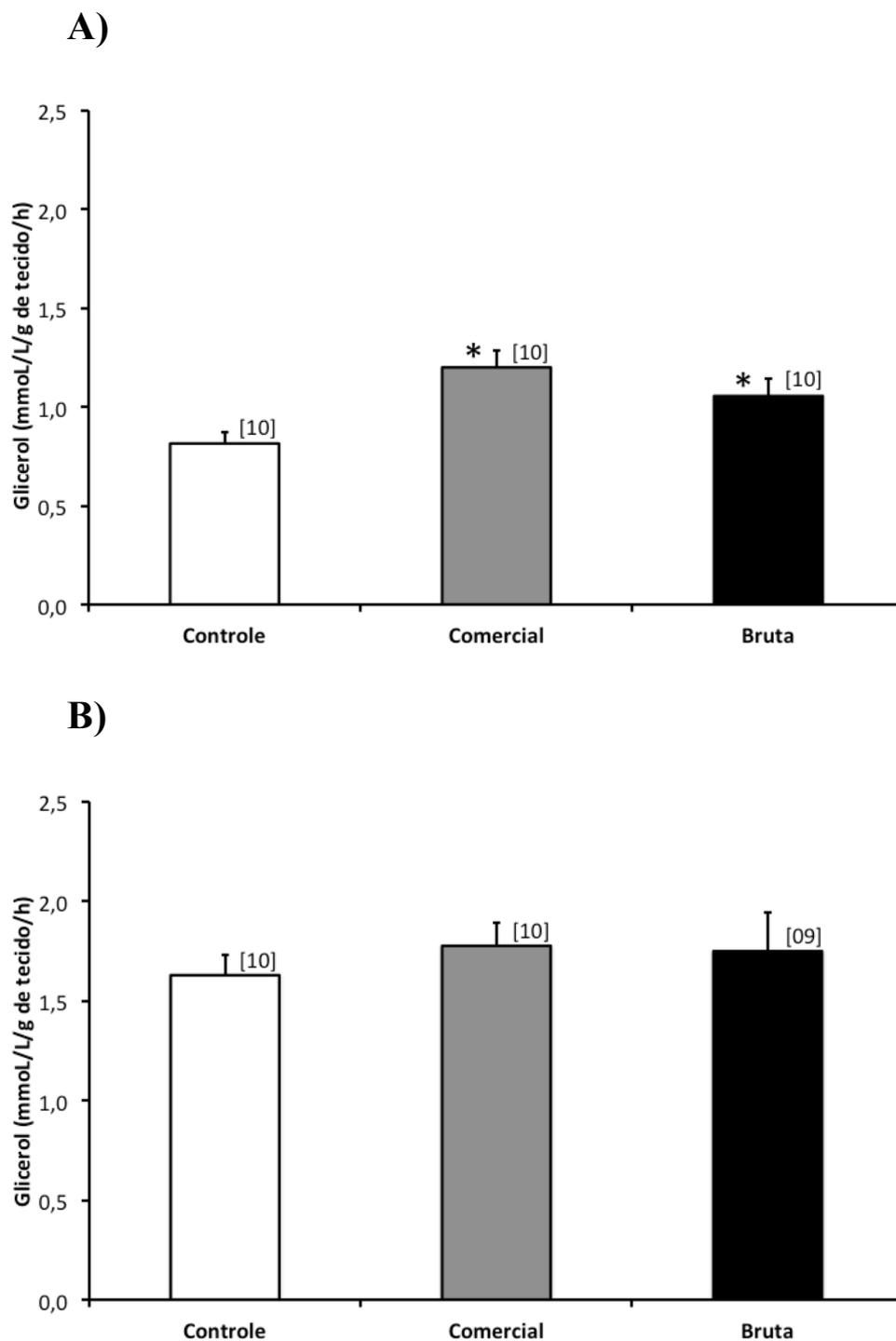


**Figura 13** – Oxidação de L-alanina [ $U-^{14}C$ ] no fígado dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta. Os dados estão expressos como média ± EPM. O número de animais está representado entre colchetes. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ , ANOVA de uma via com pós-teste de SNK).

#### 4.5.3 *Lipólise Estimulada*

O tratamento com os extratos de erva-mate (comercial ou bruta) modificou significativamente a lipólise estimulada da gordura epididimal. Como pode ser observado na Figura 14A houve um aumento significativo dos níveis de glicerol no meio de incubação tanto nos animais que consumiram extrato aquoso de erva-mate comercial ( $P=0,005$ ) quanto nos animais que consumiram extrato aquoso de erva-mate bruta ( $P=0,042$ ) em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa nos níveis de glicerol entre os grupos tratados com extratos de erva-mate (comercial e bruta).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de glicerol da lipólise estimulada da gordura retroperitoneal dos grupos tratados com extrato de erva-mate comercial e com extrato de erva-mate bruta em relação ao grupo controle. Porém, pode-se observar um pequeno aumento de 9,2% e de 7,3% na média de glicerol do grupo erva-mate comercial e no grupo da erva-mate bruta, respectivamente, em relação a média de glicerol do grupo controle (Figura 14B).



**Figura 14** – Lipólise estimulada da gordura epididimal (A) e da gordura retroperitoneal (B) dos animais dos grupos controle, erva-mate comercial e erva-mate bruta. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais está representado entre colchetes. (\*) Estatisticamente diferente do grupo controle ( $P < 0,05$ , ANOVA de uma via com pós-teste de SNK).

## 5 DISCUSSÃO

Os efeitos benéficos atribuídos a erva-mate se devem basicamente a sua composição química, que é rica em diversas substâncias bioativas como as metilxantinas, saponinas e polifenóis. Entretanto, dependendo do tipo de extração empregada, os extratos podem apresentar quantidades totalmente diferentes de compostos, visto que algumas substâncias presentes na erva-mate apresentam maior solubilidade em solventes polares e outras em solventes apolares e ou necessitam de altas temperaturas para serem extraídas. O número de trabalhos que avaliam os efeitos da erva-mate sobre o metabolismo de ratos, camundongos ou humanos vem crescendo a cada ano, porém, há muita divergência entre os estudos no tipo de matéria-prima utilizada, tempo e temperaturas utilizados na extração e os tipos de solventes da extração. Visto que não existe uma padronização para a preparação dos extratos entre os estudos biológicos, torna-se essencial uma análise qualitativa e quantitativa das substâncias bioativas presentes em cada extrato, para tornar possível a comparação entre diferentes trabalhos e viabilizar a correlação entre os efeitos metabólicos e os compostos presentes. Com este propósito, foi realizada uma análise cromatográfica das metilxantinas, saponinas e polifenóis em ambos os extratos aquosos de erva-mate comercial e bruta.

Na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) verificamos que os níveis de polifenóis totais não diferiram entre os extratos de erva-mate comercial ou bruta, porém, o extrato aquoso de erva-mate bruta apresentou maiores quantidades de teobromina e saponinas totais do que o extrato aquoso de erva-mate comercial. Estes resultados foram, em parte, semelhantes aos encontrados em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, que também demonstrou que ambos os extratos de erva-mate (comercial ou bruta) apresentaram quantidades semelhantes de polifenóis totais. E também que o extrato aquoso de erva-mate bruta possuía maiores quantidades de metilxantinas totais, cafeína, teobromina e um teor quatro vezes maior de saponinas do que o extrato aquoso de erva-mate comercial (Silva *et al.*, 2011). Os autores deste estudo sugerem que como a erva-mate bruta não passa por nenhum tipo de processamento industrial, como o sapeco ou a secagem, ela acaba conservando maiores quantidades de metilxantinas (cafeína e teobromina) e saponinas devido às metilxantinas serem termo-sensíveis e as saponinas serem instáveis à elevações de temperatura, podendo sofrer reações de hidrólise. Por fim, estas reações ocasionadas pelas altas temperaturas, podem acarretar em modificações na composição da erva-mate e do extrato aquoso.

Os teores de metilxantinas totais e cafeína não diferiram entre os extratos de erva-mate (comercial e bruta). Esse foi um resultado um tanto quanto controverso, pois diversos estudos demonstram que a cafeína normalmente apresenta perdas durante as etapas de processamento, sendo inclusive, utilizada como controle de qualidade no processamento de chás e café (Schmalko e Alzamora, 2001, Esmelindro *et al.*, 2002, Silva *et al.*, 2011). Segundo Schmalko e Alzamora (2001), esta redução nos teores de cafeína provavelmente se dá pela difusão desse composto através do tecido da planta e sua consequente evaporação da superfície, ou seja, quanto maior a temperatura, maior o coeficiente de difusão e maior a pressão de vapor. Entretanto, o mesmos autores relatam que um aumento na atividade aquosa (Aw) poderia reduzir a pressão de vapor da cafeína devido a sua alta solubilidade em água e assim reduzir as perdas deste composto. De fato, um estudo feito por Bastos *et al.* (2006) relacionou a quantidade de substâncias bioativas presentes nas infusões de chimarrão com as etapas de processamento e o teor de umidade da erva-mate e demonstrou que o conteúdo de cafeína e de ácidos cafeiolquínicos das infusões aumentava com as etapas de processamento. Quanto maior o processamento, menor o teor de umidade e maior a quantidade de sólidos solúveis presente nas folhas, demonstrando uma correlação linear entre a quantidade de sólidos solúveis e substâncias bioativas.

Já está bem estabelecido na literatura que a quantidade de metilxantinas, polifenóis e saponinas pode variar em função de diversos outros fatores, entre eles a época do ano, o local de cultivo, a quantidade de nutrientes do solo, o clima, a variabilidade genética, além é claro, do tempo e temperatura utilizados nas etapas de processamento. (Resende *et al.*, 2000, Esmelindro *et al.*, 2002, Cardozo, 2007). Portanto, mesmo utilizando-se o mesmo protocolo e o mesmo tipo de matéria-prima, como no caso dos estudos feitos pelo nosso grupo de pesquisa (Silva *et al.*, 2011), dificilmente obteremos os mesmos resultados em termos de composição química de um estudo para o outro, pois essas substâncias bioativas podem variar por outros fatores diferentes daqueles relacionados apenas ao processamento.

Na análise qualitativa da CLAE não foi detectada a presença de teofilina e ambos os extratos de erva-mate (comercial ou bruta) não diferiram em termos de composição química, o que está de acordo com trabalhos anteriores (Schubert *et al.*, 2006, Gnoatto *et al.*, 2007, Silva *et al.*, 2011).

O tratamento com extrato aquoso de erva-mate comercial diminuiu significativamente o ganho de peso tanto no primeiro mês quanto no segundo mês do período experimental em relação ao grupo controle e no segundo mês em relação ao grupo que recebia extrato aquoso de erva-mate bruta. Muitos estudos demonstram que o tratamento com extrato de erva-mate

ou chá mate reduz significativamente o ganho de peso corporal, sendo essa perda associada a fatores como: desaceleração do esvaziamento gástrico, aumento da saciedade, redução da ingesta alimentar e/ou redução da gordura corporal/visceral (Andersen e Fogh, 2001, Arçari *et al.*, 2009, Hussein *et al.*, 2011, Kang *et al.*, 2012). Todavia, todos esses estudos refletem a perda de peso em animais previamente obesos ou induzidos a obesidade com dietas ricas em gordura. Além do que, com exceção do estudo de Andersen e Fogh (2001) que foi realizado em humanos, todos os outros estudos utilizaram camundongos ou linhagens específicas de camundongos para o desenvolvimento de obesidade ou síndrome metabólica, o que difere muito do nosso modelo e dificulta a comparação entre os resultados.

Em adição, ambos os tratamentos com extrato aquoso de erva-mate (comercial ou bruta) reduziram significativamente o peso da gordura retroperitoneal (30%) em relação ao grupo controle. Também houve uma redução de 17% e 18% das médias de gordura epididimal do grupo da erva-mate comercial e do grupo da erva-mate bruta, respectivamente, entretanto essas diferenças não foram significativas. Estes dados sugerem que a perda de peso dos animais tratados com o extrato de erva-mate comercial não seja apenas pela perda de gordura corporal, tendo em vista que o grupo tratado com erva-mate bruta também apresentou o mesmo percentual de redução de gordura sem apresentar redução de peso. Esse resultado está de acordo com um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa que utilizou o mesmo modelo experimental e demonstrou que ambos os tratamentos com dieta padrão e extrato aquoso de erva-mate (comercial ou bruta) reduziram significativamente o peso das gorduras retroperitoneal e epididimal, sem no entanto, alterar o ganho de peso ou a ingesta alimentar de ratos Wistar (Silva *et al.*, 2011). Especula-se que a perda de peso observada no grupo da erva-mate comercial ou a não redução de peso observada no grupo da erva-mate bruta não estão relacionadas a quantidade total de substâncias bioativas em si, mas a proporção entre elas, visto que mesmo apresentando maiores quantidades de saponinas e teobromina, o extrato de erva-mate bruta não exerceu o mesmo efeito sobre o peso. Pedroso *et al.* (2010) e Resende *et al.*, (2012) também encontraram redução significativa da gordura abdominal ou epididimal, sem qualquer alteração no ganho de peso ou no peso final, tanto em ratos saudáveis tratados com extrato aquoso de erva-mate e dieta padrão, como em ratos que consumiram dieta padrão e frações isoladas de saponinas dos frutos e folhas da erva-mate.

Os tratamentos com erva-mate (comercial e bruta) aumentaram significativamente os níveis de glicerol presentes na lipólise da gordura epididimal. Um aumento nos níveis de glicerol no meio de incubação indica que a atividade lipolítica do tecido está aumentada. Todavia, o aumento desta atividade não se refletiu no peso da gordura epididimal, que não

diferiu entre os grupos tratados com erva-mate comercial e bruta e o grupo controle. Em contrapartida, não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de glicerol presentes na lipólise da gordura retroperitoneal, porém, os grupos tratados com os extratos de erva-mate comercial ou bruta apresentaram redução significativa do peso da gordura retroperitoneal em relação ao grupo controle. Estes resultados controversos indicam que alguns tecidos parecem ser metabolicamente mais ativos e, portanto, mais sensíveis a atividade lipolítica, como é o caso do tecido adiposo retroperitoneal, que mesmo com um aumento não significativo de 9,2% (grupo erva-mate comercial) e 7,3% (grupo da erva-mate bruta) nas médias dos níveis de glicerol, reduziu significativamente (30%) o peso das gorduras retroperitoneais. Já o tecido adiposo epididimal, mesmo com um aumento significativo de 48% (grupo da erva-mate comercial) e 31% (grupo da erva-mate bruta) das médias dos níveis de glicerol liberados pela lipólise, não foi capaz de reduzir significativamente o peso das gorduras epididimais (observou-se uma redução de 17% e 18% nas médias de peso da gordura dos animais tratados com erva-mate comercial e bruta, respectivamente, em relação ao grupo controle). O aumento da atividade lipolítica e a redução do peso das gorduras já foram relatados em diversos outros estudos, tanto em ratos que consumiram dieta padrão (Resende *et al.*, 2012, Silva *et al.*, 2011, Pedroso *et al.*, 2010) quanto em camundongos e ratos tratados com dietas hiperlipídicas (Resende *et al.*, 2013, Kang *et al.*, 2012, Arçari *et al.*, 2009, Pang *et al.*, 2008). Na maior parte destes estudos os autores correlacionam estes efeitos principalmente devido a presença de metilxantinas. De fato, os efeitos lipolíticos da cafeína e outros derivados do chá e café já estão bem definidos e caracterizados. A lipólise é estimulada pelo aumento dos níveis celulares de AMPc por meio de dois mecanismos: o antagonismo dos receptores de adenosina A1 e/ou através da inibição da atividade da fosfodiesterase. Os receptores de adenosina predominam em adipócitos maduros e diferenciados, onde eles inibem a atividade da adenilil-ciclase, suprimindo dessa forma a lipólise. O antagonismo de receptores A1 resulta em uma desinibição da atividade da adenilil-ciclase e consequente aumento da lipólise. As metilxantinas também podem inibir a atividade da fosfodiesterase, impedindo a quebra de AMPc, estimulando dessa forma a lipólise em células de gordura (Duncan *et al.*, 2007).

Os índices morfométricos do fígado, músculo sóleo, coração e tecido adiposo marrom não foram modificados pelo consumo do extrato aquoso de erva-mate comercial ou bruta. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Pimentel *et al.* (2012) que avaliaram o peso do fígado e músculos gastrocnêmios de ratos tratados com dieta padrão e extrato aquoso de erva-mate. Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas nas

médias de peso dos órgãos ou tecidos do grupo tratado em relação ao grupo controle (água). Em contrapartida, foram encontrados outros estudos que demonstraram que o extrato de erva-mate ocasionou redução ou aumento significativo no peso do fígado, índice do fígado (peso do fígado/peso corporal) e peso do coração. Porém, foram estudos realizados em camundongos com síndrome metabólica (obesidade e diabetes) ou em camundongos induzidos a obesidade por dietas hiperlipídicas e, normalmente, esses modelos experimentais já apresentam alterações morfológicas decorrentes da própria dieta ou doença, impossibilitando a comparação desses dados (Hussein *et al.*, 2011, Kang *et al.*, 2012).

Os níveis séricos de colesterol total, glicose, ureia ou proteínas totais também não foram modificados pelos tratamentos com ambos os extratos de erva-mate (comercial ou bruta). Porém, o tratamento com extrato aquoso de erva-mate bruta reduziu significativamente os níveis de triglicerídeos, tanto em relação ao grupo controle, como em relação ao grupo da erva-mate comercial. Esses resultados corroboram com os encontrados no estudo de Resende *et al.* (2012) que avaliou os efeitos do extrato aquoso de erva-mate comercial e dos extratos com frações dos frutos e frações de saponinas da erva-mate sobre o metabolismo de ratos com dieta padrão pelo período de 30 dias. Neste estudo foi observado que, em geral, os tratamentos não modificaram os níveis séricos de colesterol total, creatinina, ureia e glicose em relação ao grupo controle, com exceção do grupo que recebeu o extrato dos frutos da erva-mate, o qual apresentou aumento significativo da glicose. Além disso, todos os extratos reduziram significativamente os níveis de triglicerídeos séricos. Os autores deste estudo sugerem que a redução dos triglicerídeos séricos parece estar associada com o conteúdo de saponinas, visto que essa redução foi maior no grupo do extrato dos frutos e no grupo das frações de saponinas, justamente os grupos que apresentavam maiores quantidades de saponinas e também pela ausência de outros compostos (metilxantinas e polifenóis) no grupo das frações de saponinas. O estudo de Han *et al.* (2002), já citado na introdução, também demonstrou que ratos que receberam uma administração oral de óleo de milho com saponinas apresentaram redução significativa dos níveis de triglicerídeos plasmáticos 1, 2, 3 e 4 horas após a gavagem em comparação aos ratos que receberam apenas a gavagem com óleo de milho e veículo (solução fisiológica). Ademais, estudos realizados tanto em camundongos, quanto em ratos, demonstraram que a administração de dietas hiperlipídicas suplementadas com saponinas aumentaram significativamente a excreção de gorduras (triglicerídeos) nas fezes desses animais. (Han *et al.*, 2002, Resende *et al.*, 2013). Isto poderia explicar a redução de triglicerídeos séricos observada em nosso estudo, uma vez que ela ocorreu apenas nos

animais do grupo tratado com extrato aquoso de erva-mate bruta, sendo que este apresentou maiores quantidades de saponinas em relação ao extrato aquoso de erva-mate comercial.

Diversos estudos na literatura relataram aumento significativo sobre a glicemia pós prandial e/ou sobre as concentrações de insulina após o consumo de café ou o consumo de cafeína, tanto em indivíduos saudáveis, como em indivíduos diabéticos (Graham *et al.*, 2001, Lane *et al.*, 2004, Krebs *et al.*, 2012). A cafeína isolada parece exercer efeitos agudos maiores nas concentrações de glicose plasmática e nos níveis de insulina quando comparada ao café, visto que o último apresenta outras substâncias além da cafeína, que tem ação hipoglicêmica direta, como é o caso dos ácidos clorogênicos, trigonelina e magnésio (Gavrielia *et al.*, 2013). Um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa já havia demonstrado que o consumo do extrato aquoso de erva-mate bruta era capaz de aumentar significativamente a glicemia plasmática em relação ao grupo controle e ao grupo que recebia extrato aquoso de erva-mate comercial (Silva *et al.*, 2011). Porém, esse resultado não foi observado no estudo atual. O extrato aquoso de erva-mate contém grandes quantidades de cafeína, além de conter também ácidos clorogênicos, magnésio e uma variedade de compostos já citados anteriormente. Como esses outros compostos podem possuir efeito antagonista aos da cafeína, isto é, reduzindo os níveis glicêmicos, parece que o efeito sobre a glicemia depende das proporções entre as substâncias bioativas, o que explicaria a falta de efeito sobre os níveis séricos de glicose neste estudo, visto que a quantidade de cafeína e metilxantinas totais não diferiu entre os extratos de erva-mate (comercial e bruta). Ademais, a insulina é um importante hormônio liberado pelas células  $\beta$  do pâncreas que está diretamente envolvido com o metabolismo anabólico, produzindo aumento de captação de glicose, síntese de glicogênio, aumento da captação de aminoácidos e de síntese proteica, entre outros efeitos, em diversos tecidos (Aires, 2008). Portanto, sabendo que a cafeína estimula o sistema simpático, aumentando os níveis de adrenalina e noradrenalina circulantes e que esses podem regular a liberação de insulina e, essa por sua vez, a captação de aminoácidos e a síntese de proteínas, tornou-se indispensável a avaliação dos efeitos dos tratamentos com ambos os extratos de erva-mate (comercial ou bruta) sobre os níveis séricos deste hormônio através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

Os extratos de erva-mate (comercial ou bruta) não alteraram significativamente os níveis de insulina, porém, observou-se uma redução de cerca de 16% na média do grupo da erva-mate comercial e de 28% na média do grupo da erva-mate bruta em relação a média do grupo controle. Pimentel *et al.* (2012) também não observaram diferenças significativas nos níveis séricos de insulina entre o grupo de ratos tratados com extrato de erva-mate (dieta

padrão) e o grupo controle (água). Todavia, em um estudo realizado com ratos Sprague-Dawley foi observado que a dieta hiperlipídica suplementada com um extrato liofilizado de erva-mate reduziu significativamente os níveis plasmáticos de insulina (36%) em relação ao grupo que recebeu apenas dieta hiperlipídica, sem o extrato de erva-mate (Pang *et al.*, 2008). Especula-se que esta redução de insulina plasmática encontrada tanto no estudo de Pang *et al.* (2008) como no nosso estudo possa ser decorrente da estimulação da cafeína sobre o sistema simpático. Quando estimulado, o sistema simpático pode inibir a secreção de insulina e estimular a liberação de glucagon (Aires, 2008).

Este estudo avaliou pela primeira vez os efeitos do tratamento com extrato aquoso de erva-mate (comercial ou bruta) sobre a captação e oxidação de aminoácidos e a síntese de proteínas no fígado e no músculo de ratos Wistar pelo período de 60 dias. A captação do análogo ácido aminoisobutírico (AIB) no músculo sóleo não foi alterada por nenhum dos tratamentos com extrato aquoso de erva-mate comercial ou bruta. O transporte de aminoácidos do músculo esquelético participa na modulação do metabolismo de aminoácido interórgãos, entretanto, são conhecidos apenas alguns possíveis candidatos para a regulação desses transportadores no músculo. A regulação do fluxo individual de aminoácidos pode, teoricamente, ocorrer via interações agudas entre os diferentes sistemas de transporte pela concentração relativa dos seus substratos ou pela magnitude de gradientes iônicos ou ainda por mudanças na expressão gênica dos transportadores. Em princípio, hormônios, fatores de crescimento, mediadores de citocinas, etc. poderiam modular qualquer um dos citados anteriormente ou todos eles juntos (Kilberg e Häussinger, 1992). Entre os principais hormônios estudados na modulação da captação de aminoácidos pelo músculo esquelético estão a insulina e o hormônio do crescimento. Como foi visto anteriormente, a insulina age estimulando tanto a captação de glicose como a captação de aminoácidos e também a síntese proteica. Porém, tanto o extrato aquoso de erva-mate comercial quanto o extrato aquoso de erva-mate bruta não alteraram significativamente os níveis séricos de insulina e consequentemente não ocasionaram estimulação adicional da captação de AIB ou da síntese de proteínas no músculo sóleo. Além disso, mesmo que a cafeína tenha exercido algum efeito sobre o sistema simpático, estimulando a liberação de adrenalina e noradrenalina, o estudo de Warner *et al.* (1990) demonstrou que infusões *in vivo* de hormônios catabólicos como glucagon, adrenalina e cortisol não apresentaram nenhum efeito sobre a captação de AIB em músculos sóleos de ratos Sprague-Dawley.

Outros estudos demonstram ainda que a liberação tônica de noradrenalina pela inervação simpática nas fibras musculares esqueléticas juntamente com as catecolaminas

(adrenalina e noradrenalina) secretadas pela glândula adrenal, poderiam proteger o músculo esquelético da proteólise, podendo inclusive, exercer uma ação anabólica neste músculo (Navegantes *et al.*, 1999, Navegantes *et al.*, 2000). No entanto, os valores de síntese de proteínas a partir de leucina [U-<sup>14</sup>C] no músculo sóleo não foram modificados pelos tratamentos com os extratos de erva-mate. A oxidação da L-alanina [U-<sup>14</sup>C] no músculo sóleo também não foi modificada significativamente por ambos os tratamentos com extrato aquoso de erva-mate comercial ou bruta em relação ao grupo controle. Entretanto, foi observada diferença significativa entre o grupo da erva-mate comercial comparado ao grupo da erva-mate bruta. A média de oxidação e formação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> dos animais que receberam extrato aquoso de erva-mate bruta foi significativamente menor do que a média dos animais que receberam extrato aquoso de erva-mate comercial. De fato esta diferença se deu pois ambos os extratos parecem ter efeitos antagônicos sobre a oxidação de L-alanina. No tratamento com o extrato aquoso de erva-mate comercial observa-se um pequeno aumento da oxidação, porém, este aumento não foi grande o suficiente para diferir do grupo controle e no tratamento com o extrato aquoso de erva-mate bruta observa-se uma pequena redução da oxidação que também não foi grande o suficiente para diferir do grupo controle. Novamente observamos que os efeitos da erva-mate estão relacionados as proporções entre os compostos presentes na erva e não a quantidade total de compostos bioativos em si. Em uma ampla pesquisa realizada nos principais indexadores bibliográficos não foram encontrados outros estudos que avaliassem a correlação do café, chá verde ou erva-mate e a síntese de proteínas ou oxidação de L-alanina no músculo esquelético.

O tratamento com o extrato aquoso de erva-mate comercial aumentou significativamente a captação de AIB no fígado (30%) em relação ao grupo controle. O grupo tratado com extrato aquoso de erva-mate bruta não apresentou aumento significativo da captação de AIB no fígado, porém, observou-se um aumento de cerca de 15% na mediana deste grupo em relação a mediana do grupo controle. A regulação dos sistemas de transporte de aminoácidos no fígado, principalmente o sistema de transporte A, é mediada por diversos hormônios, entre eles glucagon, insulina, glicocorticoides e catecolaminas. Em geral estes hormônios alteram a velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) dos sistemas de transporte através de um aumento no número de transportadores ativos na membrana, seja através da ativação de transportadores já existentes na membrana ou através da síntese de novos transportadores (Kilberg e Häussinger, 1992). Neste estudo, apenas a concentração sérica da insulina foi avaliada, entretanto, sabemos que a erva-mate contém cafeína a qual pode aumentar a concentração de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) circulantes. Um estudo

demonstrou que o tratamento de uma cultura de hepatócitos com adrenalina aumentou os níveis de AMP cíclico (AMPC) e estimulou o transporte de AIB dependente de  $\text{Na}^+$  (Pariza *et al.*, 1977). Como a captação de AIB no fígado é uma técnica realizada *in vitro* e nestas condições não foram adicionados hormônios (catecolaminas ou insulina), especula-se que o aumento de catecolaminas circulantes *in vivo* decorrentes da presença de cafeína nos extratos induziu potencial aumento no número de transportadores ativos na membrana *in vivo* e que estes persistiram capazes de alterar esta resposta *in vitro*.

A síntese de proteínas a partir de leucina [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ] no fígado foi drasticamente reduzida ( $P = 0,001$ ) por ambos os tratamentos com extrato aquoso de erva-mate comercial (27%) e bruta (23%). Porém, não foi observada diferença significativa nos níveis de oxidação e produção de  $^{14}\text{CO}_2$  entre os grupos que receberam extrato de erva-mate (comercial ou bruta) e o grupo controle. Estes resultados foram um tanto inesperados visto que um aumento na captação de aminoácidos no fígado, de uma forma geral, pode resultar em dois estados metabólicos: o estado anabólico ou pós-absortivo, quando há abundância de substratos e o tecido capta mais glicose e aminoácidos e estimula a síntese de proteínas, glicogênio e ácidos graxos; ou o estado catabólico caracterizado por uma maior captação de aminoácidos e ácidos graxos para a produção de energia (oxidação), gliconeogênese e glicogenólise (Aires, 2008). Se a captação de aminoácidos está aumentada e a síntese de proteínas está reduzida, isto poderia sugerir que o tecido se encontra em um estado mais catabólico, porém, a oxidação de aminoácidos permaneceu inalterada. Uma explicação plausível é que uma parte dos aminoácidos captados possam estar sendo desviados para a via gliconeogênica. Além disso, estes resultados poderiam confirmar o possível efeito das catecolaminas sobre o pâncreas: reduzindo a liberação de insulina e aumentando os níveis de glucagon, conseqüentemente, estimulando a captação de AIB, reduzindo a síntese de proteínas e possivelmente desviando parte dos aminoácidos captados para a produção de glicose (gliconeogênese) no fígado. Na ampla pesquisa realizada na literatura não foram encontrados outros trabalhos que relacionassem o consumo de erva-mate e o metabolismo de aminoácidos e proteínas. Até o presente momento apenas um estudo correlacionou o consumo de erva-mate com a oxidação da glicose no fígado. Neste estudo foi observado que ambos os grupos tratados com extrato aquoso das folhas da erva-mate, extrato etanólico dos frutos da erva-mate e com extrato de frações de saponinas apresentaram redução significativa da oxidação de glicose [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ] no fígado (Resende *et al.*, 2012). No entanto, não foram avaliados outros parâmetros como captação de glicose [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ], glicogênese ou gliconeogênese nesse estudo para efetiva avaliação do estado metabólico.

Por fim, nossos dados demonstraram que os tratamentos com erva-mate possuem um amplo espectro de ações sobre o metabolismo de ratos Wistar: tanto no metabolismo lipídico, aumentando os níveis de lipólise e reduzindo o índice de gorduras e triglicerídeos séricos, como já vinha sendo demonstrando na literatura e, agora também sobre o metabolismo de proteínas, principalmente sobre o metabolismo hepático, estimulando a captação de aminoácidos e reduzindo a síntese de proteínas, provavelmente desviando alguns desses aminoácidos para outras vias. Portanto, são necessários mais estudos para esclarecer se a cafeína ou outras substâncias presentes na erva-mate, realmente são capazes de elevar os níveis de catecolaminas circulantes e se não existem outros hormônios ou vias metabólicas que também possam estar sendo afetados pelo tratamento com o extrato de erva-mate.

## 6 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou pela primeira vez que os tratamentos com o extrato aquoso de erva-mate comercial e bruta são capazes de interferir no metabolismo hepático de aminoácidos e proteínas, sem no entanto, alterar o metabolismo de proteínas do músculo esquelético em ratos Wistar, sendo estes resultados comprovados *in vitro*. Além disso, o estudo confirmou a capacidade dos extratos de erva-mate (comercial e bruta) de interferir com o metabolismo de lipídios, tanto *in vivo* através da redução do peso da gordura retroperitoneal e dos níveis séricos de triglicérides, quanto *in vitro*, aumentando os níveis de glicerol na lipólise estimulada da gordura epididimal.

Além disso, foi demonstrado que os efeitos dos tratamentos não têm um relação dose-dependente, isto é, não significa dizer que um extrato que contenha mais compostos, como no caso, o extrato aquoso de erva-mate bruta, possa exercer efeitos de maior magnitude do que o extrato de erva-mate comercial. Alguns efeitos estão diretamente relacionados a proporção entre os compostos bioativos presentes nos extratos, visto que os resultados diferiram em diversos parâmetros e em algumas vezes foram até antagônicos.

Mais estudos são necessários para estabelecer se outras vias metabólicas, fatores ou hormônios podem estar sendo influenciados pelo tratamento com a erva-mate e se esses resultados se repetem em diferentes modelos animais ou em diferentes preparações de extratos.

## 7 PERSPECTIVAS

Como no trabalho uma das hipóteses é de que alguns dos efeitos da erva-mate estejam sendo desencadeados por meio da ativação do sistema simpático e pelo consequente aumento de catecolaminas circulantes (noradrenalina e adrenalina), seria importante que se realizasse uma análise dos níveis desses hormônios tanto na corrente sanguínea como nos tecidos hepáticos e muscular e também na glândula adrenal.

Além disso, seria importante avaliar a via gliconeogênica, através da quantificação e/ou atividade das enzimas fosfoenolpiruvato-carboxiquinase (PEPCK) e piruvato carboxilase (PC) para confirmar se os aminoácidos podem estar sendo desviados para esta rota metabólica.

Outra linha de investigação é a análise molecular de proteases dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  envolvidas na degradação proteica no músculo esquelético. Pode-se quantificar através de Western Blot as calpaínas subunidades I e II responsáveis pela proteólise, e as calpastatins que são inibidoras da atividade das calpaínas e portanto inibidoras da degradação proteica nas células.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, F., CHESINI, R. Determinação da composição nutricional da erva-mate em infusão. 2001. 61f. Especialização em tecnologia dos alimentos. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul. 2001.
- AIRES, M. M. Fisiologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1232 p.
- ANDERSEN, T., FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 2001. 14(3), 243-250 p.
- ARÇARI, D. P., BARTCHEWSKY, W., SANTOS, T. W., OLIVEIRA, K. A., FUNCK, A., PEDRAZZOLI, J., SOUZA, M. F. F., SAAD, M. J., BASTOS, D. H. M., GAMBERO, A., CARVALHO, P. O., RIBEIRO, M. L. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat-diet-induced obese mice. *Obesity*, 2009. 17, 2127–2133 p.
- ASHIHARA, H., MONTEIRO, A. M., GILLIES, F. M., CROZIER, A. Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. *Plant Physiology*, 1996. 111, 747-753 p.
- BASTOS, D. H. M., DE OLIVEIRA, D. M., MATSUMOTO, R. L. T., CARVALHO, P. O., RIBEIRO, M. L., Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 2007. 1(1), 37-46 p.
- BASTOS, D. H. M., FORNARI, A. C., QUEIROZ, Y. S., TORRES, E. A. F. S. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of Yerba Maté (*Ilex Paraguariensis*) leaves. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2006. 49(3), 399-404 p.
- BOAVENTURA, B. C. B., DI PIETRO, P. F., STEFANUTO, A., KLEIN, G. A., MORAIS, E. C., ANDRADE, F., WAZLAWIK, E., DA SILVA, E. L. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. *Nutrition*, 2012. 28, 657–664 p.
- BRACESCO, N., SANCHEZ, A. G., CONTRERAS, V., MENINI, T., GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011. 136, 378-384 p.
- CAMPBELL, M. K. Bioquímica. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 752 p.
- CARDOZO JR, E. L., FERRARESE-FILHO, O., FILHO, L. C., FERRARESE, M. L. L., DONADUZZI, C. M., STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007. 20, 553-558 p.
- CHERNICK, S. S. Determination of glycerol in acyl glycerols. *Methods in Enzymology, Lipids*, 1969. 4, 627-630 p.
- DEBONS, A. F., PITTMANN, J. A. Stimulation of alpha aminoisobutyric amino acid <sup>14</sup>C uptake in thyrotropin. *Endocrinology*, 1962. 70(6), 937 p.

- DUNCAN, R.E., AHMADIAN, M., JAWORSKI, K., SARKADI-NAGY, E., SUL, H.S. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annual Review of Nutrition*, 2007. 27, 79-101 p.
- ESMELINDRO, M. C., TONIAZZO, G., WACZUC, A., DARIVA, C., DE OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2002. 22(2), 193-204 p.
- FAGUNDES, G. C. P. Cevando o mate. 2ª edição. Porto Alegre: Habitasul, 1980.
- FAOSTAT - Food and Agricultural Organization Statistics Division. [Production]. 2011. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE>
- FERREIRA, F. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by *Ilex paraguariensis* St.Hil. Saponins. *Phytotherapy Research*, 1997. 11, 79-81 p.
- GAVRIELIA, A., FRAGOPOULOUA, E., MANTZOROSB, C. S., YANNAKOULIA, M. Gender and body mass index modify the effect of increasing amounts of caffeinated coffee on postprandial glucose and insulin concentrations; a randomized, controlled, clinical trial. *Metabolism Clinical and Experimental*, 2013. No prelo.
- GNOATTO, S. C. B., BASSANI, V. L., COELHO, G. C., SCHENKEL, E. P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., aquifoliaceae). *Química Nova*, 2007. 30(2), 304–307 p.
- GRAHAM, T. E., SATHASIVAM, P., ROWLAND, M., MARKO, N., GREER, F., BATTRAM, D. Caffeine ingestion elevates plasma insulin response in humans during an oral glucose tolerance test. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2001. 79, 559–565 p.
- GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996. 2, 338-344 p.
- GUGLIUCCI, A., STAHL, A. J. Low-density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochemistry & Molecular Biology International*, 1995. 35, 47-56 p.
- HANN, L. K., ZENG, Y. N., XU, B., OKUDA, H., KIMURA, Y. Saponins from *Platycodi radix* ameliorate high fat diet-induced obesity in mice. *Journal of Nutrition*, 2002. 132, 2241-2245 p.
- HECK, C. I., DE MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, 2007. 72 (9), 138-150 p.
- HUSSEIN, G. M. E., MATSUDA, H., NAKAMURA, S., AKIYAMA, T., TAMURA, K., YOSHIKAWA, M. Protective and ameliorative effects of maté (*Ilex paraguariensis*) on metabolic syndrome in TSOD mice. *Phytomedicine*, 2011. 19, 88–97 p.
- IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção agrícola municipal: Culturas temporárias e permanentes, 2010. Vol. 37, Brasil. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010\\_Publicacao\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010_Publicacao_completa.pdf)

- KANG, Y. R., LEE, H. Y., KIM, J. H., MOON, D. O., SEO, M. Y., PARK, S. H., CHOI, K. H., KIM, C. R., KIM, S. H., OH, J. H., CHO, S. W., KIM, S. Y., KIM, M. G., CHAE, S. W., KIM, O., OH, H. G. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Laboratory Animal Research*, 2012. 28(1), 23-29 p.
- KETTELHUT, I. C., WING, S. S., GOLDBERG, A. L. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. *Diabetes Metabolism Reviews*, 1988. 4, 751-772 p.
- KILBERG, M. S., HAUSSINGER, D. Mammalian amino acid transport: Mechanisms and Control. New York: Plenum Press, 1992. 303 p.
- KREBS, J. D., PARRY-STRONG, A., WEATHERALL, M., CARROLL, R. W., DOWNIE, M. A cross-over study of the acute effects of espresso coffee on glucose tolerance and insulin sensitivity in people with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 2012. 61(9), 1231-1237 p.
- LANE, J. D., BARKAUSKAS, C. E., SURWIT, R. S., FEINGLOS, M. N. Caffeine impairs glucose metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2004. 27, 2047–2048 p.
- LORENZI, H., MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2<sup>a</sup> ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 90-91 p.
- MACCARI, A. J., SANTOS, A. P. R. Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. MCT/CNPq/PADCT, Curitiba, PR, 2000.
- MACHADO, V. L. A., WASSERMANN, G. F., MARQUES, M. *In vitro* effect of insulin on the uptake of glucose and  $\alpha$ -aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle (*Chrysemys dorsalis*). *General and Comparative Endocrinology*, 1991. 82, 8-13 p.
- MATSUMOTO, R. L. T., BASTOS, D. H. M. Effects of maté tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009. 57, 1775–1780 p.
- MAZUCHOWSKI, J. Z. Manual de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill). Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural. EMATER, Paraná, 1989. 104p.
- 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 Medica*, 2007. 73(11), 1141-1147 p.
- MORAIS, E. C., STEFANUTO, A., KLEIN, G. A., BOAVENTURA, B. C. B., ANDRADE, F., WASLAWIK, E., DI PIETRO, P. F., MARASCHIN, M., SILVA, E. L. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dislipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009. 57, 8316–8324 p.
- MOSIMANN, A. L. P., FILHO, D. W., SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *BioFactors*, 2006. 26, 59-70 p.

- NAVEGANTES, L. C., RESANO, N. M., MIGLIORINI, R. H., KETTELHUT, I. C. Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 1999. 277, E883-E889 p.
- NAVEGANTES, L. C., RESANO, N. M., MIGLIORINI, R. H., KETTELHUT, I. C. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 2000. 279, E663-E668 p.
- NELSON, D. L., COX, M. M. Hormonal regulation and integration of mammalian metabolism. In: Lehninger Principles of Biochemistry. 4<sup>a</sup> ed. W. H. Freeman and Company, New York, 2005. 23, 881-919 p.
- PANG, J., CHOI, Y., PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008. 476(2), 178-185 p.
- PAREDES, A. M., VALDEZ, E. C., KANSIG, R. Variación de los hidratos de carbono durante el sapeco. Anais do II congresso Sul-Americano de erva-mate. Encantado, RS, 2000. 178-181 p.
- PARIZA, M. W., BUTCHER, F. R., BECKER, J. E., POTTER, V. R. 3':5'-cyclic AMP: independent induction of amino acid transport by epinephrine in primary cultures of adult rat liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977. 74(1), 234-237 p.
- PEDROSO, G. L., MENDES, R. H., PERSCH, K., JAHN, M. P., KUCHARSKI, L. C. Efeito do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre o metabolismo de ratos machos. *Revista HCPA*, 2010. 30(3), 241-246 p.
- PIMENTEL, G. D., LIRA, F. S., ROSA, J. C., CARIS, A. V., PINHEIRO, F., RIBEIRO, E. B., NASCIMENTO, C. M. O., OYAMA, L. M. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2012. No prelo.
- REITZ, R., KLEIN, R. M., REIS, A. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: CORAG, 1988.
- RESENDE, M. D. V., CARVALHO, A. S., CARVALHO, A. P., SIMEÃO, R.M., FERNANDES, J.S.C. Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela EMBRAPA: resultados da avaliação genética de populações, progênes, indivíduos e clones. Colombo-PR: Embrapa Florestas, 2000. 43, 1-67 p.
- RESENDE, P. E. de. Atividade de frações bioativas de mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) sobre o metabolismo de ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- RESENDE, P. E., VERZA, S. G., KAISER, S., GOMES, L. F., KUCHARSKI, L. C., ORTEGA, G. G. The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012. 144, 735-740 p.

- RICHARDSON, N. A.; ANDERSON, A. J.; SARA, V. R. The effects of insulin/IGF-I on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *General and Comparative Endocrinology*, 105: 287-293, 1997.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. et al. (Orgs.). *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. 2ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000. 27, 597-622 p.
- SCHMALKO, M. E., ALZAMORA, S. M. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during yerba maté processing. *Drying Technology*, 2001. 19, 599–610 p.
- SCHUBERT, A., ZANIN, F. F., PEREIRA, D. F., ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* St. Hill (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, 2006. 29(6), 1233-1236 p.
- SILVA, F. A., PAVEI, C., ORTEGA, G. G., BASSANI, V. L., LIMA, E. L., DINIZ, D. G. A., MOREIRA, J. C. F. Validation of an LC method for polyphenol assay in extractive solutions from *Ilex paraguariensis* (Mate). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2007. 30(20), 3119–31 p.
- SILVA, R. D., BUENO, A. L. S., GALLON, C. W., GOMES, L. F., KAISER, S., PAVEI, C., ORTEGA, G. G., KUCHARSKI, L.C., JAHN, M. P. The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male wistar rats. *Fitoterapia*, 2011. 82(6), 818-826 p.
- TORRES, I. L.; GAMARO, G. D.; SILVEIRA-CUCCO, S. N.; MICHALOWSKI, M. B.; CORREA, J. B.; PERRY, M. L.; DALMAZ, C. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO<sub>2</sub> in hippocampal and cerebral cortex slices. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2001. 34, 111-116 p.
- VALDUGA, A. T., FINZER, J. R., MOSELE, S.H. *Processamento de erva-mate*. Erechim: EdiFAPES, 2003. 184 p.
- VIEIRA, M. A., ROVARIS, A. A., MARASCHIN, M., DE SIMAS, K. N., PAGLIOSA, C. M., PODESTA, R., AMBONI, R. D. M. C., BARRETO, P. L. M., AMANTE, E. R. Chemical Characterization of Candy Made of Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) Residue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. 56, 4637–4642 p.
- WARNER, B. W., HASSELGREN, P.-O., HUMMEL, R. P., JAMES, J. H., PEDERSEN, P., FISCHER, J. E. Effect of catabolic hormone infusion on protein turnover and amino acid uptake in skeletal muscle. *The American Journal of Surgery*, 1990. 159, 295-300 p.