



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

**EFEITO DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) SOBRE O METABOLISMO DE
RATOS TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação de Mestrado

Luana Ferreira Gomes

Porto Alegre, 2012

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

**EFEITO DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) SOBRE O METABOLISMO DE
RATOS TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

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

Luana Ferreira Gomes

Orientador: Luiz Carlos Kucharski

Coorientadora: Anapaula Sommer Vinagre

Porto Alegre, 2012

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador, Prof. Luiz Carlos Kucharski, que sem dúvida foi a pessoa mais importante para a realização desse trabalho. Obrigada por ter sido sempre presente, por ter ajudado e participado de todas as fases do trabalho e por me incentivar nos novos caminhos.

Aos integrantes do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada do Departamento de Fisiologia da UFRGS pela ajuda nos experimentos e pela amizade. Todos foram imprescindíveis! Um agradecimento especial à Priscila Koller Goerl, que participou de tudo, desde o início, e ajudou muito no tratamento dos animais.

À Prof^ª. Maria Flávia Ribeiro, pela ajuda com os kits de ELISA, mas principalmente pelas conversas e pelos conselhos. Também à Prof. Maria Beatriz Ferreira, pela paciência ao me ajudar a analisar os resultados.

Aos integrantes da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela ajuda no cuidado dos animais.

Aos meus pais e meus irmãos pela compreensão, carinho e incentivo e por tudo que fizeram por mim, sempre.

Aos amigos, aos colegas de mestrado e da pós-graduação e àqueles que estão sempre presentes, me ajudando nos momentos difíceis e comemorando junto comigo as alegrias.

À fonte financiadora de pesquisa FIPE- HCPA.

À UFRGS pelo conhecimento.

RESUMO

A obesidade é definida por um acúmulo excessivo de gordura na forma de tecido adiposo. É um problema crescente, resultando em significativa morbidade e mortalidade por doenças relacionadas, bem como uma redução da qualidade de vida. O acúmulo excessivo de tecido adiposo que caracteriza a obesidade está diretamente relacionado ao desenvolvimento patologias que, coletivamente, compõem a chamada síndrome metabólica. O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo, mas também é capaz de secretar substâncias com muitos efeitos biológicos e importante papel endócrino, como a leptina e o TNF- α . A erva-mate é uma espécie nativa das regiões subtropicais e temperadas da América do Sul. Estudos mostram efeitos benéficos associados à erva-mate, como a capacidade hipocolesterolêmica, anti-inflamatória, anti-obesidade e cardioprotetora. Tem se atribuído esses efeitos benéficos a uma série de substâncias bioativas presentes na erva-mate, como as xantinas, dentre elas a cafeína, os polifenóis, os derivados de cafeiol, como o ácido clorogênico, e as saponinas. Assim, o presente estudo testou a hipótese de que a erva-mate pode reverter as alterações metabólicas causadas pela obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica. Foram utilizados ratos Wistar machos, tratados com dieta controle ou dieta hiperlipídica e água ou erva-mate, formando 4 grupos experimentais. Foram avaliados o peso dos animais, a ingestão de alimento e bebida, o volume de tecido adiposo retroperitoneal e epididimal, foi realizado o teste de tolerância à glicose, foram avaliados os níveis de glicose, insulina, leptina, triglicerídeos, colesterol total e glicerol plasmáticos, a captação e oxidação de glicose e a lipólise e lipogênese *in vitro*. Os resultados demonstram que o modelo de dieta usado foi capaz de induzir um perfil metabólico associado à obesidade. Isto é evidenciado pelo aumento do peso final, da gordura abdominal, maior resistência à insulina, diminuição da captação e metabolização da glicose pelo tecido adiposo, aumento dos níveis de triglicerídeos e glicerol plasmáticos. No tecido adiposo, houve uma redução da lipogênese nos grupos com dieta hiperlipídica. Em relação à lipólise, foi observado um aumento da liberação de glicerol no grupo dieta controle com erva-mate e de ácidos graxos no grupo dieta hiperlipídica com água. Entretanto, a erva-mate não foi capaz de reverter todos os parâmetros alterados pela dieta hiperlipídica, melhorando apenas os níveis de triglicerídeos plasmáticos. Apesar disso, o presente trabalho traz resultados novos para a literatura, visto que não foram encontrados estudos que avaliem a influência da erva-mate sobre o metabolismo do tecido adiposo.

ABSTRACT

Obesity is defined by an excessive accumulation of fat in the form of adipose tissue. It is an ever-increasing problem nowadays, and has resulted in significant levels of morbidity and mortality caused by associated diseases, as well as reduced quality of life. The excessive accumulation of adipose fat in cases of obesity is directly related to the development of pathologies which collectively make up the so-called “metabolic syndrome”. Although adipose tissue is the body’s main source of energy, it is also able to secrete substances which produce a number of biological effects. In addition to this, it also plays an important endocrinal role by producing leptin and TNF- α . *Erva-mate* is a species of plant which is native to the sub-tropical and temperate regions of South America. Studies have demonstrated the benefits related to *erva-mate*, such as improved hypocholesterolemic, anti-inflammatory, anti-obesive and cardioprotective capacity. These beneficial effects have been attributed to a series of bioactive substances which are present in *erva-mate*, such as xanthins (including caffeine), polyphenols, derivatives of cafeoyl (such as chlorogenic acid) and saponins. The purpose of this study was to test the hypothesis that *erva-mate* can reverse the metabolic alterations caused by obesity which has been induced by a hyperlipid diet. Male Wistar rats were divided into four experimental groups, and were given either a control diet or a hyperlipidic diet with water or *erva-mate*. The weight of the animals, their intake of food and liquids, and the volume of retroperitoneal and epididymal adipose tissue were all assessed. The rats were also tested for glucose tolerance, and the levels of glucose, insulin, leptin, triglycerides, total plasmatic cholesterol and glycerol, captation and oxidation of glucose, and lipolysis and lipogenesis *in vitro* were all tested. The results show that the model of diet used was able to induce a metabolic profile associated to obesity. This is borne out by the increase in final weight and in abdominal fat, by an increased resistance to insulin, by the decrease in the captation and metabolisation of glucose by the adipose tissue, and by the increase in the levels of plasmatic triglycerides and glycerol. In the case of the adipose tissue, there was a reduction in lipogenesis in the groups fed with a hyperlipidic diet. As regards lipolysis, it was noted that there was an increase in the liberation of glycerol in the group fed with the control diet and *erva-mate*, and of fatty acids in the group fed with the hyperlipidic diet and water. Therefore the *erva-mate* was not able to reverse all the parameters altered by the hyperlipidic diet, and was only able to improve the levels of plasmatic triglycerides. In spite of this, the study succeeded in breaking new ground, since it appears this was the first experiment to assess the influence of *erva-mate* on the metabolism of adipose tissue.

LISTA DE ABREVIATURAS

2DG: 2-deoxi-D-[1-¹⁴C]-glicose
AIN: American Institute of Nutrition
AMPc: adenosina monofosfato cíclico
ANOVA: análise de variância
CHO: carboidrato
ENDEF: Estudo Nacional da Despesa Familiar
GLUT: transportador de glicose
HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HOMA-IR: homeostatic model assessment
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Pesquisa
IL-6: interleucina-6
IMC: Índice de Massa Corporal
IRS-1: substrato 1 do receptor de insulina
LIP: lipídeo
NEFA: ácidos graxos não esterificados
NFκB: fator nuclear κ-B
PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio 1
PI3K: fosfatidil-inositol-3-cinase
PKA: proteína cinase A
POF: Pesquisa de Orçamentos Familiares
PTN: proteína
TGF-β: fator transformador de crescimento β
TNF-α: fator de necrose tumoral-α
TTG: Teste de Tolerância à Glicose
UEA: Unidade de Experimentação Animal
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular
WHO: World Health Organization

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELAS

Tabela 1 - Quadro de análise nutricional das dietas (em 100 gramas).....	19
Tabela 2 - Composição da dieta hiperlipídica (%).....	20
Tabela 3 - Ingestão de comida e bebida e consumo calórico por animal/dia.....	34
Tabela 4 - Peso e relação entre peso do tecido/peso do animal, em porcentagem, dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal.....	35

FIGURAS

Figura 1 - Caixa de ratos com sistema de registro de consumo de comida e bebida BioDAQ®.....	24
Figura 2 - Detalhe do sistema de registro BioDAQ®: consumo de comida e bebida.....	24
Figura 3 - Avaliação do peso dos ratos submetidos a dieta hiperlipídica tratados com erva-mate. A. Peso final dos animais. B. Variação de peso dos animais.....	33
Figura 4 - Teste de Tolerância à Glicose, após a ingestão de soro glicosado (50%).....	36
Figura 5 - Índice de Resistência à Insulina (HOMA-IR).....	37
Figura 6 - Avaliação da concentração plasmática de glicose (A), insulina (B) e leptina (C) de ratos submetidos à dieta hiperlipídica tratados com erva-mate.....	38

Figura 7 - Avaliação do metabolismo da glicose de ratos submetidos à dieta hiperlipídica tratados com erva-mate. A. Captação de 2-deoxi-D-[1- ¹⁴ C]-glicose no tecido adiposo retroperitoneal. B. Oxidação de [U- ¹⁴ C]-glicose no tecido adiposo retroperitoneal.....	39
Figura 8 - Avaliação da concentração plasmática de triglicerídeos (A), colesterol (B) e glicerol (C) de ratos submetidos à dieta hiperlipídica tratados com erva-mate.....	41
Figura 9 - Lipogênese (conversão de ¹⁴ C-glicose em ¹⁴ C-lipídios) no tecido adiposo retroperitoneal de ratos submetidos à dieta hiperlipídica tratados com erva-mate.....	42
Figura 10 - Avaliação da atividade lipolítica em tecido adiposo retroperitoneal de ratos submetidos à dieta hiperlipídica tratados com erva-mate A. Concentração de glicerol no meio de incubação da lipólise. B. Concentração de ácidos graxos livres no meio de incubação da lipólise.	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBESIDADE E SAÚDE PÚBLICA	1
1.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA OBESIDADE	5
1.3 ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i>)	8
1.4 COMPOSIÇÃO DA ERVA-MATE	10
2. HIPÓTESE	16
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 ANIMAIS	18
4.2 TRATAMENTO	18
4.2.1 Ração	18
4.2.2 Chá de erva-mate	20
4.2.3 Grupos	21
4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	22
4.3.1 Avaliação da ingestão de alimento e de bebida	23
4.3.2 Peso corporal	25
4.3.3 Determinação de parâmetros morfométricos	25
4.3.4 Teste de tolerância à glicose	25
4.3.5 Determinação da glicose, dos triglicerídeos, do colesterol total e do glicérol plasmáticos	26
4.3.6 Determinação da leptinemia e insulinemia	27
4.3.7 HOMA-IR	27

4.3.8	Determinação da captação e oxidação de glicose no tecido adiposo retroperitoneal	27
4.3.9	Determinação da lipogênese e lipólise	29
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4.5	BIOSEGURANÇA	31
5.	RESULTADOS	32
5.1	PARÂMETROS METABÓLICOS E MORFOMÉTRICOS	32
5.2	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	35
6.	DISCUSSÃO	44
7.	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE E SAÚDE PÚBLICA

O sobrepeso e a obesidade são definidos por um acúmulo excessivo de gordura na forma de tecido adiposo, que apresenta riscos para a saúde (WHO, 2011). A obesidade pode ser avaliada de forma direta em adultos por meio do Índice de Massa Corporal (IMC), que é calculado pelo peso corporal, em quilogramas, dividido pelo quadrado da altura, em metros. A Organização Mundial de Saúde (WHO) aceita um índice de massa corporal de 18,5 a 24,9 kg/m² como saudável; de 25 a 29,9 kg/m² como sobrepeso; e acima de 30 kg/m² como obesidade, sendo subdividida em obesidade grau I (IMC ≤ 30 e $\geq 34,9$ kg/m²), obesidade grau II (IMC ≤ 35 e $\geq 39,9$ kg/m²) e obesidade grau III (IMC ≥ 40 kg/m²).

A obesidade é um problema crescente, resultando em significativa morbidade e mortalidade por doenças relacionadas com o aumento do peso, bem como uma redução da qualidade de vida (HASLAM & JAMES, 2005). Nos Estados Unidos, entre 2009-2010, 40,6 milhões de mulheres e 37,6 milhões de homens, com 20 anos ou mais, eram obesos. Isso significa que mais de um terço da população adulta (35,7%) era obesa nesse período. Já entre as crianças e adolescentes, com idades entre 2 e 19 anos, mais de 5 milhões de meninas e aproximadamente 7 milhões de meninos eram obesos entre 2009-2010. Apesar desses índices, a prevalência de obesidade nos Estados Unidos, que teve um grande aumento durante as últimas décadas do século 20, recentemente parece

ter tido uma diminuição da taxa de aumento ou até mesmo estagnado o crescimento (OGDEN *et al.*, 2012).

Já no Brasil, há um aumento acelerado do excesso de peso e da obesidade em todas as idades a partir de 5 anos. Em crianças entre 5 e 9 anos de idade e entre adolescentes, a frequência do excesso de peso praticamente triplicou nos últimos 20 anos, alcançando entre um quinto e um terço dos jovens. Em adultos, o excesso de peso vem aumentando continuamente desde meados da década de 1970 e, no momento, é encontrado em cerca de metade dos brasileiros. Comparando as pesquisas de 1974-75 (Estudo Nacional da Despesa Familiar – ENDEF) e de 2008-09 (Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF), o excesso de peso em homens adultos saltou de 18,5% para 50,1%, e nas mulheres foi de 28,7% para 48%. Esse crescimento projeta que, em cerca de dez anos, o excesso de peso poderá alcançar dois terços da população adulta do Brasil (IBGE, 2010).

A causa fundamental da obesidade e do sobrepeso é um desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas. Porém, a etiologia da obesidade não é de fácil identificação, uma vez que a mesma é caracterizada como uma doença multifatorial, ou seja, é resultado de uma complexa interação entre fatores comportamentais, genéticos, endócrinos, fisiológicos e psicológicos (ARÇARI *et al.*, 2009). Globalmente, tem havido um aumento da ingestão de alimentos ricos em gordura, sal e açúcares, mas pobres em vitaminas, minerais e outros micronutrientes, juntamente com um estilo de vida que requer apenas baixos níveis de atividade física para a subsistência (WHO, 2011). Inúmeras mudanças ambientais favorecem esses novos hábitos, como: a maior disponibilidade de alimentos e alimentos altamente palatáveis, relativamente baratos e com alto teor de energia, o crescimento da indústria

do *fast-food* e um maior tempo para socializar, junto com um costume de socializar com alimentos e bebidas (HILL & PETERS, 1998; KOPLAN & DIETZ, 1999).

A análise de pesquisas de orçamento familiar realizadas no Brasil até 2002-2003 revela uma tendência crescente de substituição de alimentos básicos e tradicionais da dieta brasileira (como arroz, feijão e hortaliças) por bebidas e alimentos industrializados (como refrigerantes, biscoitos, carnes processadas e comida pronta), implicando em um aumento na densidade energética das refeições e padrões de alimentação capazes de comprometer a autorregulação do balanço energético dos indivíduos e aumentar o risco de obesidade na população (IBGE, 2010).

Além da substituição de alimentos básicos por alimentos mais calóricos, outro problema está relacionado ao tamanho das porções. Desde 1970, a indústria alimentícia e os restaurantes têm aumentado o tamanho dessas porções de alimentos vendidas como uma estratégia econômica. Do ponto de vista do mercado, pacotes enormes chamam a atenção para um novo produto e parecem mais vantajosos ao comprador. Obviamente, porções maiores fornecem mais energia, mas também incentivam as pessoas a comerem mais (YOUNG & NESTLE, 2002).

A prevalência de sobrepeso e obesidade também está relacionada aos alimentos consumidos fora de casa, como observado nos Estados Unidos, onde essa prática representava 34% do orçamento alimentar em 1970, mas alcançaram 47% do orçamento na década de 1990 (YOUNG & NESTLE, 2002). As refeições feitas fora de casa geralmente possuem níveis maiores de gordura total e saturada, colesterol e sódio, além de serem pobres em fibras e cálcio, contribuindo negativamente para a qualidade nutricional das dietas (LIN & FRAZÃO, 1997). Estudo de Garcia *et al.* (2012) comprova que o consumo de *fast-food* é um dos fatores determinantes para ocorrência

de obesidade, principalmente nos casos de obesidade mórbida, e é o comportamento que exerce maior influência sobre o peso.

Estudos epidemiológicos descreveram correlações entre o tipo de lipídeo consumido na dieta e a incidência de certas doenças metabólicas. Dietas ricas em ácidos graxos saturados aumentam a resistência à insulina e a incidência de doenças cardiovasculares. Por sua vez, aquelas ricas em ácidos graxos mono e poli-insaturados, protegem contra o desenvolvimento dessas doenças (DE QUEIROZ *et al.*, 2009).

Em um desenvolvimento paralelo, as oportunidades na vida diária para gastar energia diminuíram: as crianças assistem mais televisão, a educação física foi significativamente reduzida nas escolas, muitos bairros não têm calçadas e parques para caminhar, o local de trabalho tornou-se cada vez mais automatizado, as tarefas domésticas são atendidas por máquinas para poupar trabalho e caminhar ou andar de bicicleta foi substituído pelo uso de automóveis, mesmo para pequenas distâncias (KOPLAN & DIETZ, 1999).

Com base no estudo de Allison e colaboradores (1999), a obesidade exerce a segunda maior contribuição para as taxas de mortalidade nos Estados Unidos, perdendo apenas para o hábito de fumar. O mesmo estudo ainda estimou o número anual de mortes atribuíveis à obesidade em cerca de 280.000 e, analisando a mortalidade por categorias de IMC, avaliou que mais de 80% de mortes atribuíveis à obesidade ocorreu em pessoas com $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$.

Além de taxa de mortalidade, no entanto, a obesidade ainda aumenta substancialmente a morbidade e os gastos com saúde e prejudica a qualidade de vida (ALLISON *et al.*, 1999). Estima-se que adultos obesos gastam em torno de 37% a mais com despesas médicas anuais do que adultos com peso normal, e que 5,3% dos gastos públicos com despesas em saúde nos Estados Unidos são destinados a doenças

relacionadas à obesidade (FINKELSTEIN *et al.*, 2003). Assim, a obesidade deve ser encarada como um problema de saúde pública e deve ser alvo de programas que visem reduzir o aumento nas taxas de obesidade.

1.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA OBESIDADE

O acúmulo excessivo de tecido adiposo que caracteriza a obesidade está diretamente relacionado ao desenvolvimento patologias como diabetes *mellitus* tipo 2, doença coronariana, acidente vascular cerebral, osteoartrite, apneia do sono e cânceres de mama, colo e ovário (KAHN & FLIER, 2000). Ainda, algumas alterações coexistem comumente em indivíduos obesos como, por exemplo, hiperglicemia, hiperlipidemia e hipertensão arterial sistêmica. A adiposidade leva ao desenvolvimento simultâneo dessas alterações funcionais que, coletivamente, compõem a chamada síndrome metabólica (DE QUEIROZ *et al.*, 2009). Perdas modestas de peso, entre 5 a 10% do peso corporal, podem melhorar esse quadro, aumentando a tolerância à glicose, diminuindo a hiperlipidemia e retornando a pressão arterial a níveis normais (KOPLAN & DIETZ, 1999).

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo. Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triglicerídeos em seu citoplasma, sem que isto seja nocivo para sua integridade funcional. Essas células possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar triglicerídeos em períodos em que a oferta de energia é abundante, e para mobilizá-los pela lipólise quando há déficit

calórico. A regulação desses processos ocorre por meio de nutrientes e sinais aferentes dos tradicionais sistemas neurais e hormonais, e depende das necessidades energéticas do indivíduo (AHIMA & FLIER, 2000).

Em decorrência de estudos mais recentes, foi atribuído ao tecido adiposo a capacidade de secretar substâncias com muitos efeitos biológicos e importante papel endócrino. Com a descoberta de uma ampla gama de proteínas secretadas pelo tecido adiposo, denominadas adipocinas, um novo conceito sobre a função biológica deste tecido vem surgindo, consolidando a ideia de este tecido ser não apenas um fornecedor e armazenador de energia, mas sim, um órgão dinâmico envolvido em uma variedade de processos metabólicos e fisiológicos (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006).

A estrutura proteica, assim como a função fisiológica das adipocinas identificadas até o momento, é altamente variada e compreende proteínas relacionadas ao sistema imune, como as citocinas clássicas – fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), fatores de crescimento (fator transformador de crescimento β – TGF- β) e proteínas da via complemento alternativa (adipsina). Outras adipocinas estão envolvidas na regulação da pressão sanguínea (angiotensinogênio), homeostase vascular (inibidor do ativador de plasminogênio 1 – PAI-1), homeostase glicêmica (adiponectina) e angiogênese (fator de crescimento endotelial vascular – VEGF) (FRÜHBECK *et al.*, 2001).

Entretanto, a adipocina que tem chamado atenção em especial é a leptina, um hormônio descoberto em 1994. A leptina tem o tecido adiposo branco como seu maior sítio de produção. Uma vez na circulação sanguínea ela se liga a receptores específicos no sistema nervoso, levando ao sistema nervoso central um sinal de saciedade que reflete a quantidade existente de energia em forma de gordura no organismo. Agindo por intermédio de receptores, a leptina modifica a expressão e a atividade de inúmeros

peptídeos hipotalâmicos, que regulam o apetite e o gasto de energia, e sinaliza o estado nutricional do organismo a outros sistemas fisiológicos, modulando a função de várias glândulas alvo. Além disso, a leptina é também uma citocina capaz de induzir uma resposta imune pró-inflamatória (NEGRÃO & LICINIO, 2000).

A secreção e a concentração de leptina no plasma são diretamente proporcionais ao volume dos adipócitos e não apenas a quantidade total de gordura armazenada. Sabe-se que na obesidade as células do tecido adiposo são caracterizadas por hipertrofia dos adipócitos, e o aumento no tamanho aparentemente precede o aumento no número de células de gordura. Portanto, em obesos a leptina vai ser produzida e secretada em grandes quantidades, podendo contribuir para um característico estado pró-inflamatório da obesidade (SKURK *et al.*, 2007). Quanto à regulação hormonal, a insulina e os glicocorticóides têm efeito estimulador nas concentrações circulantes de leptina, bem como os estrogênios e TNF- α . O TNF- α modula positivamente a secreção de leptina pelos adipócitos, tendo-se demonstrado uma associação independente entre a leptinemia e o nível circulante desta interleucina (WAJCHENBERG, 2000).

O TNF- α é uma citocina imunomodulatória e pró-inflamatória que age diretamente no adipócito regulando acúmulo de gordura e interferindo diretamente em diversos processos dependentes de insulina, como a homeostase glicêmica e o metabolismo de lipídios. Seu efeito mais intenso é a inibição da lipogênese e aumento da lipólise, elevando os ácidos graxos livres na circulação (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). O efeito do aumento da lipólise produzido pelo TNF- α pode ser atribuído à redução dos níveis de perilipinas nos adipócitos, pois esta diminuição de perilipinas tem sido encontrada em tecido adiposo de sujeitos obesos (DUNCAN *et al.*, 2007). Esta citocina também está envolvida na indução de aterogênese, participando da migração de monócitos e da sua conversão em macrófagos na parede endotelial por meio da ativação

do fator nuclear κ -B (NF κ B), desencadeando mudanças inflamatórias na parede vascular.

Quanto à resistência à insulina, em humanos obesos existe uma forte correlação inversa entre TNF- α e metabolismo de glicose devido à supressão da sinalização da insulina, que reduz a fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e da fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3K), levando a uma redução da síntese e translocação do transportador de glicose (GLUT-4) para a membrana (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007).

A menor sensibilidade dos adipócitos em relação à sinalização da insulina, incluindo o efeito antilipolítico deste hormônio, pode contribuir para o aumento da lipólise basal na obesidade. Também foi observada uma redução da lipólise estimulada por receptores beta-adrenérgicos na obesidade (DUNCAN *et al.*, 2007).

1.3 ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)

Ilex paraguariensis St. Hil., da família das aquifoliáceas, é uma espécie nativa da América do Sul, encontrada principalmente no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (HECK & DE MEJIA, 2007). No Brasil ela pode ser encontrada nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Sua área de ocorrência natural é de, aproximadamente, 450.000 Km², o que equivale a quase 5% do território brasileiro (FAOSTAT, 2009). O Brasil é o segundo maior produtor mundial e, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Pesquisa (IBGE), produziu em 2007 pouco mais de 225 toneladas de erva-mate, com valor estimado em 87 milhões de reais.

As folhas e caules finos de *Ilex paraguariensis* são amplamente utilizados para preparar erva-mate. A erva-mate é usada para preparar quatro tipos de bebidas: o chimarrão, consumido no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Paraguai; o tererê, consumido na região centro-oeste do Brasil e Paraguai; o mate solúvel, um produto suave e de aroma agradável obtido a partir da “queima” da erva-mate, o qual é consumido no sul e sudeste do Brasil e Argentina na forma de bebidas refrescantes; e o chá mate, fabricado e consumido como qualquer outro chá de ervas, comercializado em saquinhos (saches) (BASTOS *et al.*, 2007).

Atualmente, o extrato aquoso da erva-mate é consumido numa taxa de mais de um litro por dia por milhões de pessoas e constitui a principal alternativa para o café e o chá (MOSIMANN *et al.*, 2006). O maior consumidor nacional de erva-mate é o estado do Rio Grande do Sul, com 65% do total, seguido pelos estados do Paraná (17%), de Santa Catarina (12%) e Mato Grosso do Sul (3%) (MORAIS, 2009).

As folhas da erva-mate não são consumidas na sua forma bruta e precisam ser submetidas a vários estágios de processamento antes de estarem prontas para a comercialização. As condições de processamento são bastante variadas, dependendo de cada produtor e do objetivo final em relação ao sabor e estilo do mate (HECK & DE MEJIA, 2007). O processamento da erva mate ocorre basicamente em cinco etapas: a colheita, feita de forma manual; o sapeco, que é utilizado para evitar que as folhas da erva-mate escureçam e deve ocorrer em no máximo 24 horas após a colheita; a secagem, que reduz a quantidade de umidade das folhas de aproximadamente 11% para 4,5%; a trituração, onde a granulometria do produto, a proporção entre folhas e caules e a adição ou não de outros compostos vai determinar o tipo comercial de erva-mate; o envelhecimento, processo em que as folhas, agora já secas, são mantidas dentro de câmaras pelo período de 12 meses para adquirir algumas características relacionadas ao

sabor e aroma; e o empacotamento, em que a erva é dividida conforme a quantidade desejada e embalada (JACQUES, 2005; GIULIAN, 2005; BASTOS *et al.*, 2007; HECK & DE MEJIA, 2007).

As condições de processamento, como o tempo e a temperatura utilizados nas etapas de secagem, além de outros parâmetros como o sexo da planta, a variabilidade genética e o tipo de solo, água e fertilizantes, podem variar entre os diversos produtores e têm influência direta sobre a qualidade, as características sensoriais e a quantidade de substâncias bioativas do produto final (RESENDE *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2007). A disponibilidade dessas substâncias bioativas nas bebidas também depende da solubilidade dos compostos envolvidos e de como o mate é preparado (tempo de extração e temperatura) e ingerido (GIULIAN, 2005).

1.4 COMPOSIÇÃO DA ERVA-MATE

Ilex paraguariensis é uma planta que apresenta amplo perfil nutricional, visto que seu extrato contém inúmeras vitaminas, como a vitamina A, C e E e as vitaminas do complexo B, e minerais, como o potássio, magnésio, cálcio, manganês, ferro, selênio, fósforo e zinco, dentre outros. Além disso, a erva-mate apresenta em sua constituição compostos químicos voláteis e muitos polifenóis, principalmente os derivados cafeoil, como o ácido clorogênico, e alguns flavonoides, como a rutina, quercetina, canferol e luteolina. Além dos polifenóis, a erva-mate ainda contém saponinas e metilxantinas, as quais são atribuídas muitas das propriedades farmacológicas (HECK & DE MEJIA, 2007; BRACESCO *et al.*, 2011).

A erva-mate foi e é muito utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas doenças. Estudos atribuem à erva-mate os efeitos hepatoprotetor, diurético, colerético, hipocolesterolêmico, antirreumático, antitrombótico, anti-inflamatório, anti-obesidade e cardioprotetores, explicando assim a sua popularidade (KANG *et al.*, 2012).

Diz-se ainda que é uma bebida estimulante, capaz de eliminar a fadiga e estimular a atividade física e mental, e que sua ação excitatória é mais prolongada que a do café, não deixando, porém, efeitos colaterais ou residuais como irritabilidade e insônia. Atribui-se essa capacidade estimulante do mate às xantinas (JACQUES, 2005; MOSIMANN *et al.*, 2006).

Xantinas pertencem a uma classe de alcalóides de purinas encontradas principalmente no café, nos chás e no chocolate. As xantinas encontradas no mate são teofilina, teobromina e cafeína (ATHAYDE *et al.*, 2000), sendo que dessas três substâncias, a cafeína é a encontrada em maior concentração, seguida pela teobromina (ITO *et al.*, 1997).

A cafeína está presente em uma grande quantidade de alimentos (cerca de 60 espécies de plantas no mundo contêm esse composto). É vastamente utilizada como substância psicoativa de bebidas e também nos remédios do tipo analgésicos, medicamentos contra gripe e inibidores de apetite (DESLANDES *et al.*, 2004). Esse alcalóide é, atualmente, o estimulante mais utilizado em alimentos, bebidas e medicamentos por ser de baixo custo e facilmente encontrado (PACHECO *et al.*, 2007).

Os efeitos colaterais em curto prazo da cafeína incluem palpitações, distúrbios gastrintestinais, ansiedade, tremor, aumento da pressão arterial e insônia. Por outro lado, cafeína influencia os sistemas nervoso, cardíaco e renal. Seu efeito sobre o sistema nervoso central é responsável pelo aumento das funções psíquicas e resulta em um aprimoramento das funções cerebrais e melhora da atividade mental. Ela também

acelera o metabolismo basal e consumo de oxigênio pelos tecidos do corpo, estimulando a termogênese e a oxidação de gordura (BASTOS *et al.*, 2007).

O extrato de *Ilex paraguariensis* tem sido apontado como um potente inibidor de espécies reativas de oxigênio, sendo considerado benéfico para o fígado e o coração. As reações biológicas que envolvem radicais livres têm se tornado uma área de intenso interesse para estudos, visto que esse tipo de reação tem um importante papel no dano tecidual, responsável pelo desenvolvimento de doenças nos organismos vivos (SCHINELLA *et al.*, 2000). O excesso de radicais livres pode estar envolvido com a diabetes e a aterosclerose (GUGLIUCCI, 1996).

Alguns estudos epidemiológicos sugerem que uma elevada ingestão de flavonoides e outros compostos fenólicos, através do consumo de chás e vegetais, está associada a uma diminuição do risco de doença cardiovascular. No trabalho realizado por Mosimann *et al.* (2006), o mate, ingerido como suplemento dietético, foi capaz de aumentar as defesas antioxidantes contra os radicais livres, particularmente no desenvolvimento da aterosclerose. Sabe-se que seu efeito antioxidante é proporcional à concentração de polifenóis da erva-mate (SCHINELLA *et al.*, 2000).

Um polifenol é uma estrutura que apresenta mais de um anel aromático contendo pelo menos um grupo hidroxila ligado em cada anel. Esta classe de produtos é uma das que apresenta o maior grupo de substâncias conhecidas no reino vegetal e encontram-se disponíveis nos frutos, sementes, flores e cascas (OLIVEIRA, 2005).

Os derivados de cafeiol são polifenóis encontrados em grandes quantidades na erva-mate, principalmente o ácido cafeico, o ácido clorogênico e os ácidos dicafeoilquínicos. As altas concentrações desses compostos é que conferem ao mate a sua capacidade antioxidante (FILIP *et al.*, 2000). Os flavonoides também são compostos fenólicos vastamente distribuídos em plantas e o seu consumo foi associado

à prevenção de doenças crônicas como o câncer e doenças cardiovasculares (SANTOS & BLATT, 1998; DE MEJIA *et al.*, 2005).

No sul do Brasil, o consumo de mate e de carne vermelha, e conseqüentemente de gordura saturada, é maior do que nos outros estados do país, embora a incidência de doença cardiovascular não varie ao longo do Brasil. Pensa-se que o mate possa estar contribuindo para a proteção dessa população contra doenças coronarianas e cardíacas (MOSIMANN *et al.*, 2006).

Mais recentemente, a redução do colesterol plasmático e na progressão das lesões aórticas causadas pela aterosclerose foram mostradas em coelhos alimentados com uma dieta enriquecida com colesterol quando associadas ao uso do extrato de *Ilex paraguariensis* (MOSIMANN *et al.*, 2006). Outro estudo, realizado em camundongos tratados com dieta hiperlipídica e erva-mate, também mostrou que o mate possui efeitos hipolipidêmicos, reduzindo o colesterol total e o triglicérideo plasmáticos, e que foi capaz de reduzir significativamente o ganho de peso corporal e a quantidade de gordura visceral, mostrando possíveis efeitos anti-obesidade (KANG *et al.*, 2012).

Algumas pesquisas mostram outras evidências de que o mate possui efeitos sobre a perda de peso. Em um dos estudos que investigou essa proposta, Martinet e colaboradores (1999) encontraram uma diminuição no quociente respiratório de homens e mulheres não obesos quando consumiram mate, indicando um aumento da oxidação de gorduras.

Outro trabalho avaliou os efeitos de uma infusão feita com folhas de *Ilex paraguariensis*, guaraná (sementes de *Paullinia cupana*) e damiana (folhas de *Turnera diffusa*) em pacientes com excesso de peso. A preparação de ervas foi capaz de provocar uma grande desaceleração do esvaziamento gástrico, assim como uma antecipação da sensação de plenitude gástrica e conseqüente saciedade precoce, modulando o complexo

processo fisiológico de ingestão alimentar. Isso foi seguido de uma considerável perda de peso após 45 dias ingerindo essa infusão (ANDERSEN & FOGH, 2001).

Foi descrito que o efeito do mate na perda de peso, ainda não bem esclarecido, poderia ter relação com a concentração de cafeína por essa substância ter propriedades lipolíticas. Especulou-se também que a perda de peso estaria relacionada às concentrações de saponinas, que seriam capazes de interferir no metabolismo do colesterol e na absorção dos lipídeos ingeridos (DICKEL *et al.*, 2007).

Saponinas são encontradas em vários tipos de plantas e acredita-se que seja um dos fatores responsáveis pelo distinto sabor amargo do mate (GNOATTO *et al.*, 2005). Sua estrutura possui uma parte da molécula com característica lipofílica e outra parte hidrofílica, determinando uma propriedade de redução da tensão superficial da água e ação como detergente e emulsificante. O comportamento anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membranas determinam um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a capacidade de causar desorganização das membranas de células sanguíneas (ação hemolítica) e de formar complexos com esteróides, razão pela qual freqüentemente apresenta ação antifúngica e hipocolesterolemiantes (SCHENKEL *et al.*, 2000).

De particular importância são os achados de Ferreira *et al.* (1997), os quais demonstraram que as saponinas isoladas da *Ilex paraguariensis*, bem como o extrato aquoso da planta, inibiram *in vitro* a difusão passiva de ácido cólico através de membrana de celulose, mimetizando, assim, a inibição da absorção intestinal de ácidos biliares e, conseqüentemente, de colesterol. Han e colaboradores (2005) ainda relataram que as saponinas inibiram a atividade da lipase pancreática *in vitro*.

Estudo usando suplementação de erva-mate em ratos encontrou tanto uma redução significativa no tamanho dos adipócitos, quanto uma redução da leptina plasmática, indicando outra forma pela qual o mate pode interferir nos fatores associados à obesidade (PANG *et al.*, 2008).

Os efeitos lipolíticos da cafeína e outras metilxantinas já estão bem caracterizados. Estes compostos estimulam a lipólise pelo aumento dos níveis de AMP cíclico por dois mecanismos: pelo antagonismo dos receptores A1-adenosina e pela inibição da atividade da fosfodiesterase evitando a quebra do AMP cíclico e estimulando a lipólise (DUNCAN *et al.*, 2007). Assim a ingestão de metilxantinas presente em alguns tipos de alimentos pode contribuir para perda de peso pelo aumento da oxidação de gordura e termogênese.

2. HIPÓTESE

Considerando os efeitos benéficos atribuídos à *Ilex paraguariensis*, o presente estudo pretende testar a hipótese de que o quadro de obesidade e as alterações metabólicas produzidas pela dieta hiperlipídica poderiam ser revertidas ou melhoradas com o tratamento com erva-mate.

3. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos metabólicos do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) relacionados à obesidade induzida por uma dieta contendo alto teor de gordura em ratos.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a ingestão de alimento e de bebida;
- Determinar parâmetros morfométricos, como o peso, a quantidade de gordura retroperitoneal e a quantidade de gordura epididimal;
- Analisar o efeito do tratamento sobre a glicose, insulina, leptina, triglicerídeos, colesterol e glicerol plasmáticos;
- Determinar o efeito do tratamento sobre o metabolismo do tecido adiposo através da captação e oxidação de glicose;
- Avaliar a atividade lipogênica e lipolítica no tecido adiposo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

O presente estudo foi realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em parceria com o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Foram utilizados ratos Wistar machos de 2 meses de idade. Todos os animais foram fornecidos pela Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e mantidos durante o período experimental neste local nas condições habituais do biotério com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura de 22 ± 2 °C, alimentados com ração e água ou chá *ad libitum*.

Todo o experimento segue o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publicação No 80-23, revisada 1996), e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.

4.2 TRATAMENTO

4.2.1 Ração

A ração utilizada nos experimentos foi produzida pela Prag Soluções Comércio e Serviços Ltda, empresa especializada em produzir rações padronizadas sob encomenda

para experimentação animal. Tanto a dieta hiperlipídica quanto a dieta controle foram fornecidas pela mesma empresa, visto que a quantidade de micronutrientes adicionados à dieta pode variar de uma marca de ração para a outra e essa variação poderia interferir nos resultados do estudo. Foi utilizada a quantidade de micronutrientes para rações de ratos recomendada pelo *American Institute of Nutrition* (AIN).

Nas duas dietas, controle e hiperlipídica, foi utilizada proteína integral de soja como base para a fonte protéica. As dietas diferiam na proporção de macronutrientes e no valor calórico, como mostrado nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Quadro de análise nutricional das dietas (em 100 gramas)

NUTRIENTE	DIETA CONTROLE		DIETA HIPERLIPÍDICA	
	CALORIAS	GRAMAS	CALORIAS	GRAMAS
Carboidratos	240	66	100	25
Proteínas	88	22	80	20
Lipídeos	36	4	450	50
Total	364	-	630	-

Tabela 2 - Composição da dieta hiperlipídica (%)

COMPOSIÇÃO	PESO	CHO	PTN	LIP
Farelo comercial	20,5	13,32	4,51	0,41
Proteína de soja	15,9	1,27	14,63	-
DL-Metionina	0,3	-	0,3	-
Lisina	0,3	-	0,3	-
Sacarose	10	10	-	-
Gordura animal (banha comercial)	49	-	-	49
Óleo de soja	1	-	-	1
Mistura mineral	2	-	-	-
Mistura vitamínica	1	-	-	-
Total	100	24,59	19,74	50,41

4.2.2 Chá de erva-mate

Para o preparo do chá de *Ilex paraguariensis* foi utilizada uma marca comercial de erva-mate do Rio Grande do Sul padronizada e de mesmo lote (Barão® de Cotegipe, Tradicional). O extrato era preparado, diariamente, misturando 70g de erva-mate em um litro de água a 80°C, simulando-se a temperatura para o chimarrão. Após 15 minutos, o extrato era coado e deixado esfriar até atingir a temperatura ambiente antes de ser oferecido aos animais (HENRICHS & MALAVOLTA, 2001; GOMES, 2009; PEDROSO, 2010; SILVA *et al.*, 2011).

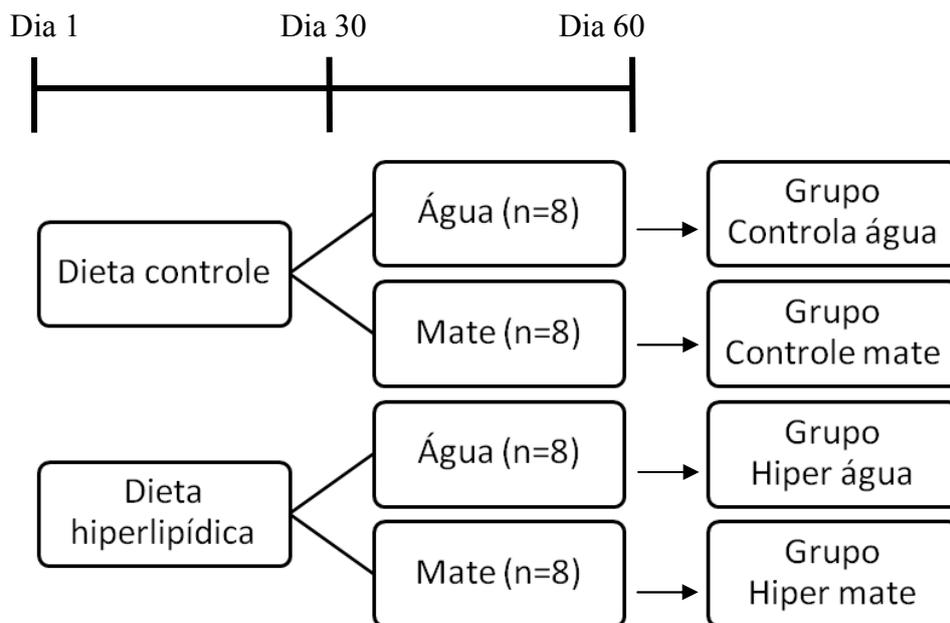
4.2.3 Grupos

Foram utilizados 32 animais, inicialmente divididos aleatoriamente em 2 grupos: 16 animais receberam dieta controle e 16 animais receberam dieta hiperlipídica por 60 dias. Foram mantidos 4 animais por caixa.

Durante os primeiros 30 dias todos os animais tiveram acesso à água *ad libitum*. Passados os primeiros 30 dias, os animais alimentados com dieta controle foram divididos em dois subgrupos: 8 animais receberam somente extrato aquoso de erva-mate e os 8 animais restantes permaneceram recebendo somente água. Da mesma forma, os animais alimentados com dieta hiperlipídica foram divididos em dois subgrupos, recebendo extrato aquoso de erva-mate ou água nos últimos 30 dias. Os primeiros 30 dias, em que os animais recebem apenas dieta hiperlipídica, tem como objetivo alterar o perfil lipídico, mimetizando um quadro de obesidade.

Assim, tivemos os seguintes grupos experimentais: 1- animais alimentados com dieta controle e que receberam apenas água durante todo o período experimental (Controle água); 2- animais alimentados com dieta controle e que receberam chimarrão nos últimos 30 dias (Controle mate); 3- animais alimentados com dieta hiperlipídica e que receberam apenas água durante todo o período experimental (Hiper água); 4- animais tratados com dieta hiperlipídica e que receberam extrato aquoso de erva-mate nos últimos 30 dias (Hiper mate).

A intenção deste protocolo experimental foi produzir, em um primeiro momento, um quadro de alteração metabólica pelos 30 dias de dieta hiperlipídica para depois avaliar se o tratamento com erva-mate poderia reverter ou prevenir o agravamento deste quadro. Para a avaliação destes resultados, manteve-se um grupo controle com dieta hiperlipídica, por todo o período experimental, tomando somente água.



Tanto o chá de erva-mate como a água eram trocados por preparações frescas todos os dias aproximadamente às 17 horas devido ao fato de os ratos possuírem hábitos noturnos. A comida oferecida e a maravalha usada nas caixas também foram trocadas diariamente para que se mantivesse um bom nível de higiene e não interferisse na saúde dos animais.

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após o período de 60 dias de tratamento os animais foram pesados e mortos por decapitação. O sangue troncular foi coletado para as avaliações bioquímicas e metabólicas. Os tecidos adiposo retroperitoneal e epididimal de cada animal foram rapidamente coletados, avaliados morfometricamente, fracionados e congelados nas condições apropriadas.

O sangue foi retirado no momento da decapitação e coletado em tubos contendo gel separador (BD Vacutainer®). Após 30 minutos, foi realizada a separação do soro e do coágulo através de centrifugação (Centrífuga marca Eppendorf) a 1500 a 2000g por 10 minutos. O soro foi armazenado para posteriores análises. Os tecidos e soro de cada animal foram utilizados nas técnicas citadas a seguir.

Todos os procedimentos experimentais que ocorreram após a retirada dos tecidos e sangue dos animais foram realizados no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) – UFRGS.

4.3.1 Avaliação da ingestão de ração e de bebida

Os animais tiveram estes parâmetros avaliados no final dos 60 dias de tratamento. Para isso, os animais foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas BioDAQ®, onde foi possível mensurar a ingestão de ração e de bebida com o uso de pequenas balanças que monitoram o consumo e o comportamento alimentar do animal (Figuras 1 e 2). Os animais foram mantidos durante 48 horas nas gaiolas, sendo as primeiras 24 horas para adaptação do animal, e, portanto, apenas os dados das últimas 24 horas foram utilizados. Durante este período, foram mantidas as condições habituais do biotério e os animais receberam ração e água ou chá normalmente. As gaiolas metabólicas utilizadas foram cordialmente cedidas pela Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.



Figura 1 – Caixa de ratos com sistema de registro de consumo de ração (1) e bebida (2) BioDAQ®



Figura 2 – Detalhe do sistema de registro BioDAQ®: consumo de ração (1) e bebida (2)

4.3.2 Peso corporal

O peso dos animais foi avaliado no início e no final do período experimental e foi representado em gramas. A partir desses dados, calculou-se a variação de peso dos animais durante o período experimental (peso final menos o peso inicial).

4.3.3 Determinação de parâmetros morfométricos

Os tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal dos animais foram retirados, secados e pesados para a determinação do peso do tecido e da relação entre o peso do tecido e o peso do animal.

4.3.4 Teste de tolerância à glicose

No final do período experimental, os animais foram submetidos ao Teste de Tolerância à Glicose. Após um jejum de 6 horas, os animais tiveram sua glicemia medida com tiras de teste para dosagem de glicemia capilar (Acuutrend – Roche). Esse método permite que a glicemia seja dosada com uma quantidade muito pequena de sangue do animal.

Logo após essa primeira dosagem, chamada de tempo zero, os animais receberam, por gavagem, soro glicosado 50% na dose de 4 μ L por grama de rato (aproximadamente 1,5mL por animal). A partir da gavagem, o tempo foi marcado e novas dosagens de glicemia com as tiras de teste foram feitas nos tempos 15, 30, 60 e

120 minutos para acompanhar a evolução do quadro glicêmico dos animais. O resultado dos níveis de glicemia foi expressado em mg/dL.

4.3.5 Determinação da glicose, dos triglicerídeos, do colesterol total e do glicerol plasmáticos

A glicemia, os triglicerídeos e o colesterol total foram determinados em duplicata com a utilização de testes colorimétricos enzimáticos (LABTEST Diagnóstica). Usaremos o exemplo da glicose.

A medida de glicose foi realizada conforme as instruções presentes na bula do kit. Utilizou-se 10 μ L de amostra (plasma). Preparou-se uma série de tubos de ensaio, um com o reagente colorimétrico mais água destilada (branco) para calibrar o espectrofotômetro e o outro com o reagente mais um padrão com uma concentração conhecida de glicose. Nos demais tubos contendo o plasma sanguíneo foram adicionados 1 mL do reagente colorimétrico para realizar a medição. Agitou-se em vórtex e após incubou-se as amostras por 15 minutos à 37°C em banho metabólico do tipo Dubnoff. Após a incubação, a absorbância do ensaio foi lida em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 505 nm, e a concentração de glicose foi calculada conforme indicado no protocolo do kit.

Os testes de triglicerídeos e colesterol seguiram o mesmo protocolo, observando-se atentamente as instruções presentes nas bulas dos kits (LABTEST Diagnóstica).

O glicerol plasmático foi quantificado em duplicata com o kit fotométrico enzimático para glicerol (R-Biopharm) e seu resultado foi expresso em g/L.

4.3.6 Determinação da leptinemia e insulinemia

As concentrações plasmáticas de insulina e de leptina foram determinadas em duplicata pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) com kit específico para plasma de rato (Millipore).

4.3.7 HOMA-IR

Para a análise da resistência à insulina, utilizou-se o índice HOMA-IR (*homeostatic model assessment*), que foi calculado a partir dos resultados de insulina e glicemia plasmáticas. Foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum } (\mu\text{U/mL})}{22,5}$$

4.3.8 Determinação da captação e oxidação de glicose no tecido adiposo retroperitoneal

Captação de glicose: o tecido adiposo retroperitoneal foi retirado, fatiado e colocado em tubos plásticos de 5mL, previamente pesados, contendo 1000μl de solução fisiológica (Ringer Bicarbonato) e 0,15 μCi de 2-deoxi-D-[1-¹⁴C]-glicose (2DG) (55 mCi/mmol – Amersham International). Os tubos foram pesados novamente para a determinação do peso dos tecidos. A seguir, foi feita a substituição da fase gasosa por

carbogênio (O_2/CO_2 , na proporção 95:5% v/v). Os tubos foram então fechados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff sob agitação constante por 60 minutos e a $37^\circ C$.

As amostras foram removidas do meio de incubação, lavadas duas vezes em solução fisiológica gelada, com o objetivo de retirar o excesso de radioatividade adsorvida ao tecido, secas em papel filtro e colocadas em frascos com tampa rosca contendo 1 mL de água bidestilada. Após, estes frascos foram congelados e fervidos alternadamente para romper as células e liberar conteúdo captado pelo tecido.

Os resultados da captação de glicose foram expressos pela razão da radioatividade contida no meio interno (2DG captada pelo tecido) e no meio externo (meio de incubação) (T/M: dpm/mL meio interno dividido por dpm/mL de meio externo), conforme descrito por Machado *et al.* (1991).

Oxidação de glicose: amostras de tecidos fatiados foram colocadas em solução fisiológica gelada, acrescida de 10mM de HEPES, pH 7,4. Em seguida os tecidos foram secos em papel filtro e colocados em vidros com tampa de borracha contendo 0,15 μCi de $[U-^{14}C]$ -glicose (glicose uniformemente marcada) (55 mCi/mmol – Amersham International) e 10 mM glicose. Às tampas de borracha acoplou-se um vidro em formato de “J” com um poço no qual era inserido uma tira de papel 3MM para captação do $^{14}CO_2$ resultante da oxidação da glicose uniformemente marcada. Os tecidos foram aerados com carbogênio ($O_2:CO_2$, 95:5% v/v), as tampas foram fechadas e vedadas com parafilme. A incubação foi de 60 minutos, a $37^\circ C$ com agitação constante. A reação de oxidação foi interrompida injetando-se 0,25 mL de TCA 50% no meio de incubação, através da tampa de borracha, e nos poços foi injetado 0,25 mL de NaOH. A reação de “captação do $^{14}CO_2$ ” durou pelo menos 12 horas. Após este período, foram retirados os

vidros em formato de “J” e colocados em viais com 10 mL do líquido de cintilação, os quais foram levados a um contador LKB-Wallac, para determinar a formação do $^{14}\text{CO}_2$ (TORRES *et al.*, 2001). Os resultados foram expressos em μM /grama de tecido/hora de incubação.

4.3.9 Determinação da lipogênese e lipólise

Lipogênese: conversão de ^{14}C -glicose em ^{14}C -lipídios

Ao final do período experimental, o tecido adiposo retroperitoneal foi retirado, pesado e incubado em Ringer bicarbonato com $0,15\mu\text{Ci}$ de ^{14}C -glicose (Amersham International) e 10mM de glicose não marcada. A seguir foi feita a substituição da fase gasosa por carbogênio. Os tubos foram fechados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff por 60 minutos sob agitação constante a 37°C . Após a incubação, as amostras foram homogeneizadas em uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1,v/v), utilizando-se um homogeneizador com pistilo de teflon, e armazenadas para posterior extração dos lipídios.

A extração dos lipídios foi realizada conforme o método descrito por Folch *et al.* (1957). Ao homogeneizado foi adicionado 1ml de solução fisiológica, os tubos foram agitados e centrifugados por 10min a 1500rpm. A fase superior (salina) foi aspirada com uma pipeta Pasteur e desprezada. Foram repassados 2ml da fase inferior (clorofórmica) para tubos viais e deixados na capela por 1-2 dias para evaporar o clorofórmio. Por fim, foram adicionados 5ml de líquido de cintilação aos tubos, agitados e colocados para contar a radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida (beta) (LKB-Wallac). Os resultados foram expressos em nmol de ^{14}C -glicose

convertidos em ^{14}C -lipídios totais $\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido. $\cdot\text{h}^{-1}$ de incubação (GARÓFALO *et al.*, 1996).

Determinação da lipólise *in vitro*

Fatias de gordura retroperitoneal foram incubadas em frascos com 1 ml de solução fisiológica de rato (pH 7,4) contendo 1% de albumina bovina, 5mM de glicose fria e solução de adrenalina e ácido ascórbico ($2,5 \times 10^{-4}\text{M}$). Os frascos foram aerados com carbogênio (95% O₂:5% CO₂), fechados e incubados por 60 minutos a 37°C. Após a incubação, o meio de incubação foi retirado e guardado em tubos do tipo Eppendorf para posterior dosagem de ácidos graxos e glicerol.

A determinação dos ácidos graxos e do glicerol foi realizada em duplicata com o kit enzimático colorimétrico para ácidos graxos livres (Roche Diagnostics), tendo seu resultado expresso em nM/grama de tecido/hora de incubação. Já o glicerol foi quantificado em duplicata com o kit fotométrico enzimático para glicerol (R-Biopharm) e seu resultado foi expresso em mM/grama de tecido/hora de incubação.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o auxílio do software estatístico *SPSS for Windows* versão 17.0. A normalidade dos resultados foi analisada pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Todas as variáveis testadas apresentaram distribuição normal.

Para a avaliação dos efeitos do tempo e tratamento na curva glicêmica nos grupos e entre os grupos, utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, quando indicado. Para a análise das demais variáveis, utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, quando indicado. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média, e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4.5 BIOSEGURANÇA

Durante a execução da metodologia proposta, os pesquisadores envolvidos usaram luvas de procedimentos cirúrgicos e aventais para sua própria proteção. Quando foi necessário, utilizaram também máscara e óculos de proteção. Além destes cuidados, a preparação das soluções ocorreu dentro de capela de exaustão.

O descarte dos resíduos não-tóxicos ocorreu no sistema de esgoto comum. Os demais resíduos foram encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para procedimento correto de eliminação. As carcaças dos animais foram congeladas e descartadas conforme o procedimento padrão da Unidade de Experimentação Animal do HCPA. Os outros resíduos biológicos foram entregues ao Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS para procedimento de eliminação.

5. RESULTADOS

5.1 PARÂMETROS METABÓLICOS E MORFOMÉTRICOS

O peso dos animais foi aferido no primeiro dia, antes de os animais começarem a receber as rações especiais, e nesse momento o peso era semelhante em todos os grupos. Passados 60 dias, ao final do período experimental, os animais foram novamente pesados para determinarmos o peso final. Os resultados mostram que houve diferença significativa entre as dietas pela ANOVA de 2 vias ($P=0,001$), demonstrando que os animais alimentados com Dieta Hiperlipídica tiveram medidas de peso final significativamente maiores que os animais tratados com Dieta Controle. Não houve efeito isolado das bebidas ($P=0,538$), porém houve interação entre as variáveis ($P=0,031$) (Fig. 3.A).

Usando os valores dos pesos inicial e final dos animais, calculou-se a variação de peso durante os 60 dias de tratamento. Novamente, os animais que receberam Dieta Hiperlipídica apresentaram uma variação de peso ao longo do período experimental significativamente maior do que os animais que receberam Dieta Controle ($P=0,001$). Não houve efeito significativo das bebidas ($P=0,354$), mas houve interação entre as variáveis ($P=0,038$) (Fig. 3.B).

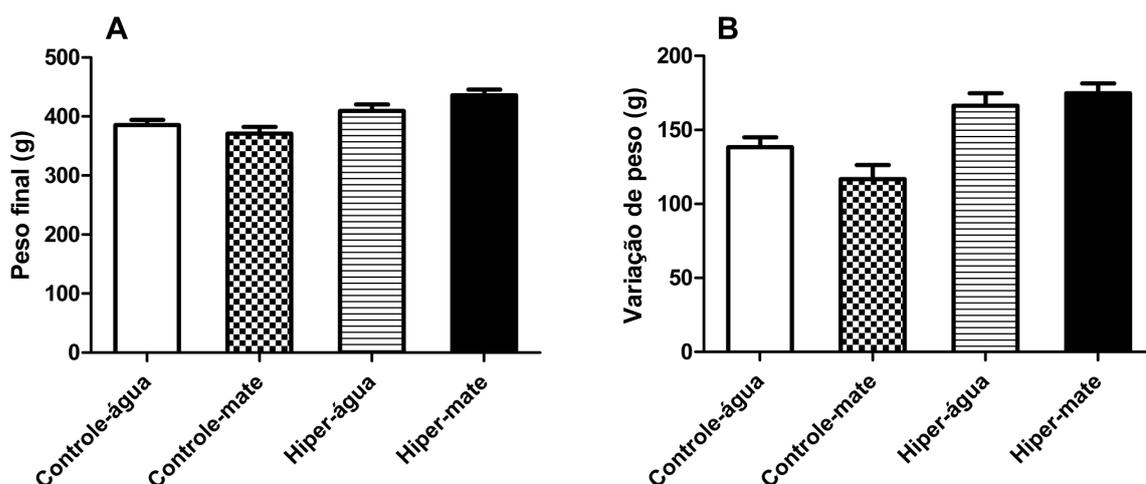


Fig. 3. Avaliação do peso dos ratos submetidos a dieta hiperlipídica tratados com erva-mate. **A.** Peso final dos animais. **B.** Variação de peso dos animais. ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. $n = 7-8$ animais por grupo.

No final do período experimental, a ingestão de ração e de bebida (água ou chá de erva-mate) dos animais foi avaliada em gaiolas metabólicas durante 24 horas. A ingestão calórica dos animais por dia foi calculada a partir das informações nutricionais das rações. A ingestão de ração e bebida não apresentou diferenças significativas em ANOVA de 2 vias: não houve efeito significativo das dietas e das bebidas, e também não houve interação entre as variáveis estudadas. Porém, no consumo calórico houve diferença significativa entre as dietas, mostrando que os animais que receberam Dieta Hiperlipídica tiveram um consumo calórico maior do que os animais que receberam Dieta Controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Ingestão de ração e bebida e consumo calórico por animal/dia

	Dieta Controle água	Dieta Controle mate	Dieta Hiperlipídica água	Dieta Hiperlipídica mate
Consumo de ração (g)	6,23 ± 2,83	5,51 ± 2,69	7,31 ± 1,29	5,47 ± 1,55
Consumo de bebida (g)	23,59 ± 9,00	20,67 ± 7,85	14,59 ± 2,54	11,47 ± 2,85
Consumo calórico (kcal)	22,69 ± 10,30	20,06 ± 9,78	46,15 ± 8,12	34,49 ± 9,75

ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os valores são apresentados como média ± E.P.M e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. n=3 animais por grupo.

O peso dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal, em gramas, e a relação entre o peso do tecido/peso do animal, em porcentagem, estão representados na Tabela 4. Nos 4 parâmetros mostrados na tabela, houve diferença significativa apenas entre as dietas, sendo que os animais alimentados com Dieta Hiperlipídica tiveram médias de peso superiores quando comparados aos animais que receberam Dieta Controle. Não houve efeito das bebidas e nem interação entre as duas variáveis estudadas.

Tabela 4 – Peso e relação entre peso do tecido/peso do animal, em porcentagem, dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal

	Dieta Controle água	Dieta Controle mate	Dieta Hiperlipídica água	Dieta Hiperlipídica mate
Retroperitoneal (g)	4,21 ± 0,51	2,36 ± 0,25	9,57 ± 1,35	9,89 ± 0,69
Retroperitoneal (%)	1,09 ± 0,13	0,64 ± 0,06	2,32 ± 0,30	2,28 ± 0,18
Epididimal (g)	5,03 ± 0,47	3,69 ± 0,41	10,37 ± 1,16	10,87 ± 0,41
Epididimal (%)	1,30 ± 0,12	1,00 ± 0,10	2,53 ± 0,26	2,50 ± 0,12

ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os valores são apresentados como média ± E.P.M e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. n=7-8 animais por grupo.

5.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

A Figura 4 mostra o Teste de Tolerância à Glicose, onde estão representados os valores da glicemia basal (tempo 0) e o padrão temporal de resposta à sobrecarga de glicose (tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a ingestão de glicose por gavagem). Não houve diferença significativa entre os grupos no valor basal ($P=1,000$), e após 120 minutos os grupos Controle água ($P=0,666$) e Controle mate ($P=0,146$) retornam ao valor inicial. Porém, os grupos Dieta Hiperlipídica água e Dieta Hiperlipídica mate, após 120 minutos, permaneceram com a glicemia significativamente maior que o valor basal ($P=0,001$). Nos animais que receberam Dieta Hiperlipídica, podemos notar que os que beberam água apresentaram um pico na glicemia no tempo 15 minutos, enquanto

que nos animais que beberam extrato de erva-mate houve um atraso nesse pico, que só aparece no tempo 30 minutos.

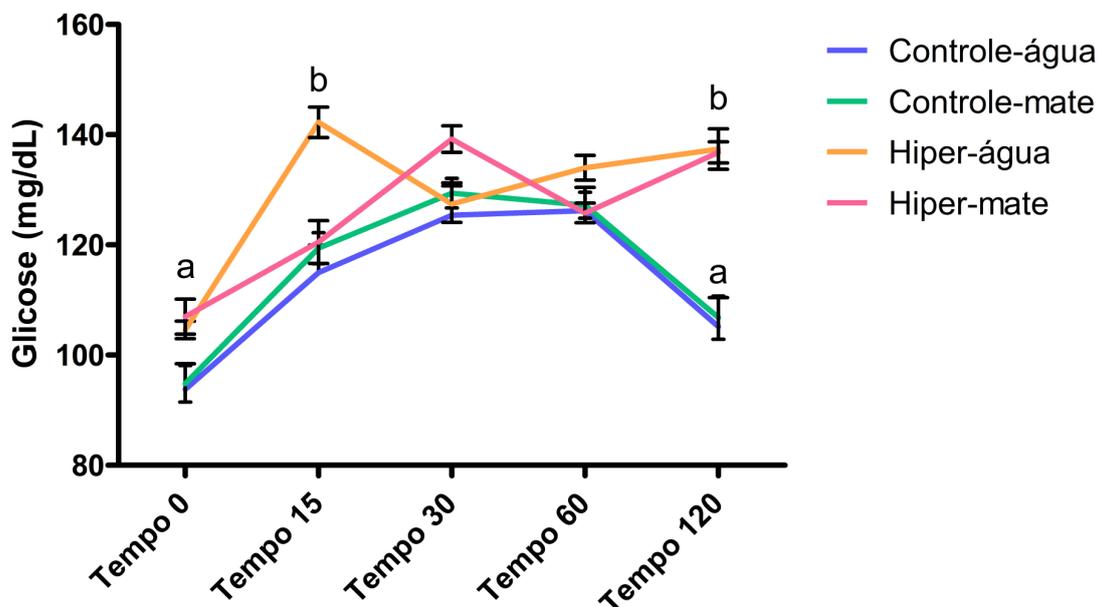


Fig. 4. Teste de Tolerância à Glicose, após a ingestão de soro glicosado (50%). ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos com $P < 0,05$. $n = 5$ animais por grupo.

O Índice de Resistência à Insulina (HOMA-IR), na Figura 5, mostra que houve efeito da dieta ($P = 0,001$), ou seja, nos animais alimentados com Dieta Hiperlipídica, o HOMA-IR é maior. Não houve efeito significativo das bebidas sobre o HOMA-IR ($P = 0,982$), mas houve interação entre as variáveis estudadas ($P = 0,003$), o que significa que efeito de maiores níveis de HOMA-IR com a Dieta Hiperlipídica dependeu do uso do mate.

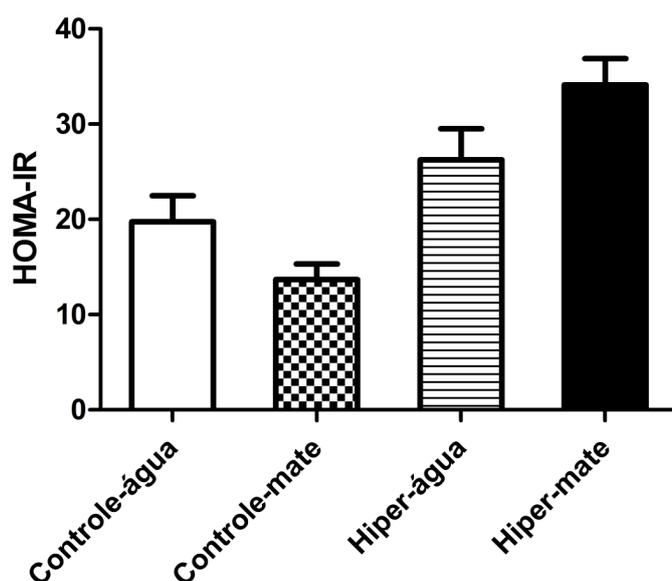


Fig. 5. Índice de Resistência à Insulina (HOMA-IR). ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. $n=7-8$ animais por grupo.

Os níveis de glicose sofreram a influência da dieta ($P=0,001$), sendo que os animais tratados com Dieta Hiperlipídica apresentaram uma glicemia maior que os com Dieta Controle. Entretanto, não houve influência das bebidas ($P=0,305$), o que mostra que água e erva-mate não alteraram significativamente a glicemia. Também não houve interação entre essas duas variáveis ($P=0,298$), mostrando que os níveis de glicose aumentaram com a dieta, independentemente do uso do mate. Na Dieta Controle, com água ou mate, o nível de glicose foi o mesmo. O mesmo ocorreu na Dieta Hiperlipídica (Fig. 6.A).

Os níveis de insulina sofreram influência da dieta ($P=0,002$), sendo que os níveis foram superiores nos animais tratados com Dieta Hiperlipídica, mas não houve influência da bebida ($P=0,122$). Houve interação entre essas duas variáveis ($P=0,001$), mostrando que o efeito de aumento dos níveis de insulina dependeu do uso da erva-mate. Assim, o aumento de insulina ocorreu quando o mate foi associado à Dieta

Hiperlipídica. Já o mate associado à Dieta Controle não alterou os níveis de insulina (Fig. 6.B).

Os animais que receberam Dieta Hiperlipídica ainda apresentaram níveis significativamente maiores de leptina, quando comparados aos animais que receberam Dieta Controle ($P=0,001$). Não houve efeito da bebida pela ANOVA de 2 vias ($P=0,311$), o que demonstra que mate ou água não alteraram significativamente os níveis de leptina. Houve interação entre as variáveis estudadas ($P=0,036$) (Fig. 6.C).

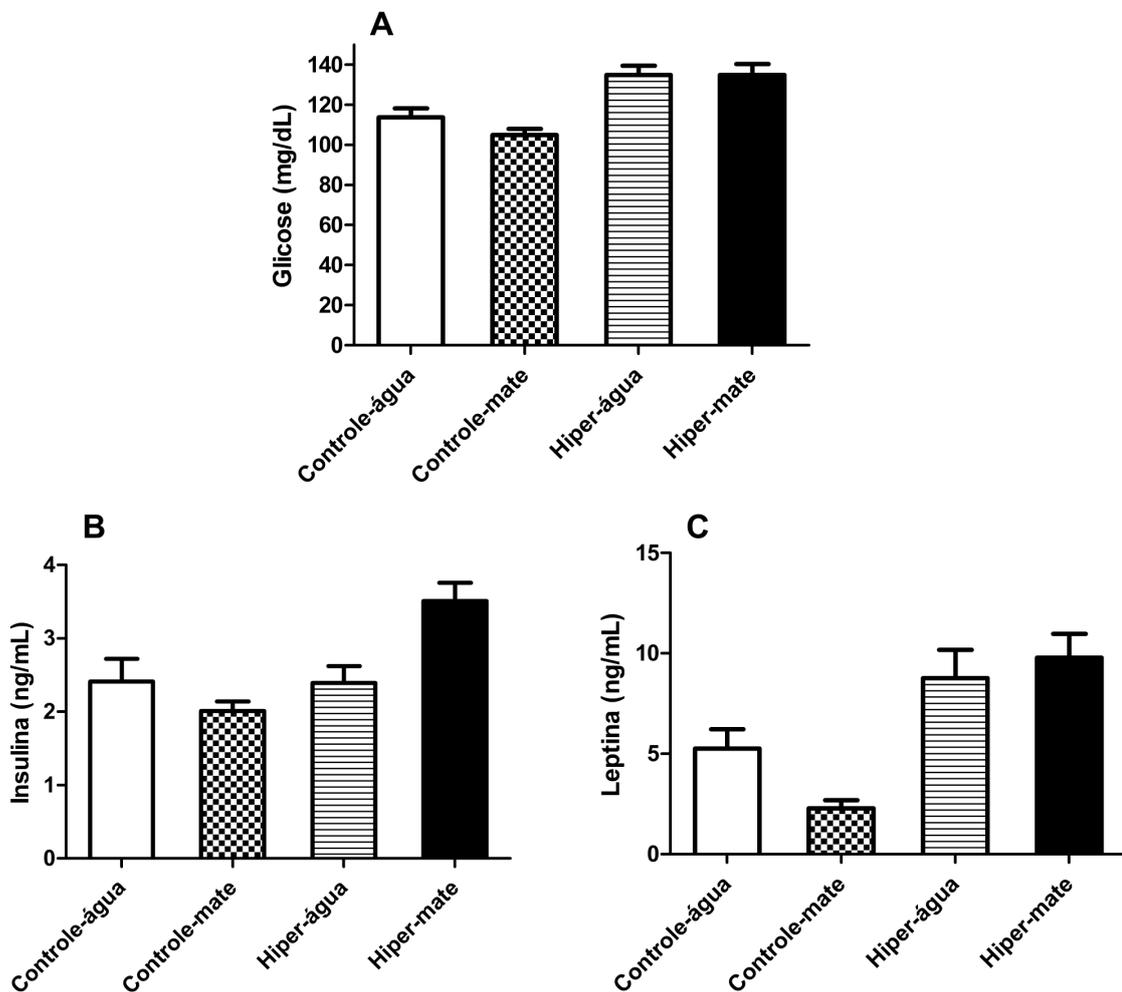


Fig. 6. Avaliação da concentração plasmática de glicose (A), insulina (B) e leptina (C) de ratos submetidos à dieta hiperlipídica tratados com erva-mate. ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M e as diferenças foram consideradas significativas quando $P<0,05$. $n=6-8$ animais por grupo.

A captação de 2-deoxi-D-[1-¹⁴C]-glicose no tecido adiposo retroperitoneal *in vitro* sofreu influência da dieta ($P=0,001$), em que níveis menores foram encontrados nos animais tratados com Dieta Hiperlipídica. A ANOVA mostra ainda influência da bebida ($P=0,010$), em que o tecido adiposo retroperitoneal dos animais que receberam erva-mate conseguiu captar níveis maiores de glicose quando comparado aos animais que receberam água. Além disso, houve interação entre essas duas variáveis ($P=0,037$), o que significa que o efeito da bebida dependeu da dieta. Assim, o mate aumentou a captação de glicose na Dieta Controle, porém, na Dieta Hiperlipídica, o mate não exerceu efeito (Fig. 7.A).

Na Figura 7.B podemos observar que a dieta exerceu efeito significativo sobre a oxidação de [U-¹⁴C]-glicose no tecido adiposo retroperitoneal ($P=0,001$), sendo a oxidação menor nos animais que receberam Dieta Hiperlipídica. Não houve efeito da bebida ($P=0,835$) e nem interação entre as duas variáveis ($P=0,830$).

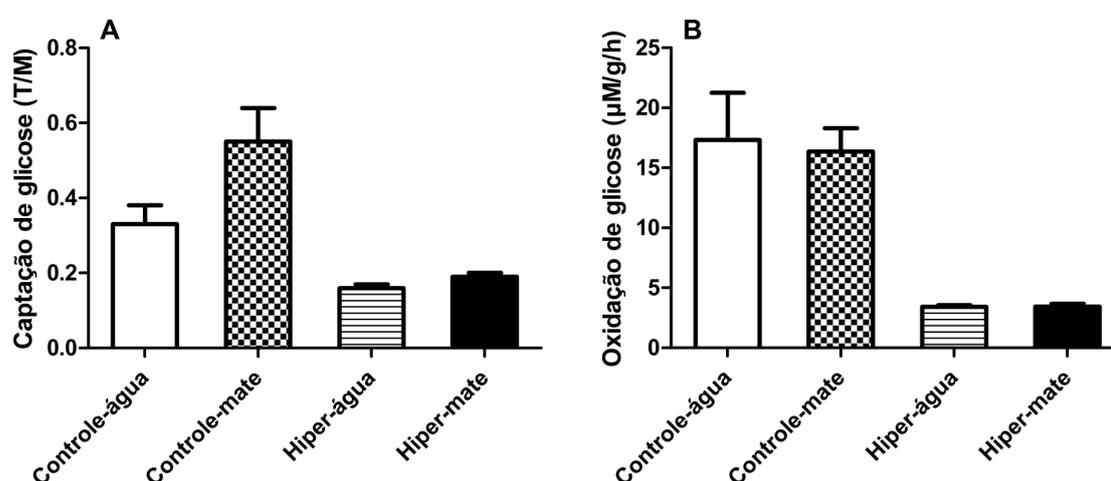


Fig. 7. Avaliação do metabolismo da glicose de ratos submetidos à dieta hiperlipídica tratados com erva-mate. **A.** Captação de 2-deoxi-D-[1-¹⁴C]-glicose no tecido adiposo retroperitoneal. **B.** Oxidação de [U-¹⁴C]-glicose no tecido adiposo retroperitoneal. ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os valores são apresentados como média ± E.P.M e as diferenças foram consideradas significativas quando $P<0,05$. $n=4-8$ animais por grupo.

Os animais que receberam a Dieta Hiperlipídica apresentaram um valor significativamente maior de triglicerídeos, quando comparado com os animais que receberam a Dieta Controle ($P=0,001$). Já em relação às bebidas, houve uma diminuição significativa nos níveis de triglicerídeos nos animais que receberam erva-mate, em comparação com os que receberam água ($P=0,001$). Como não houve interação entre as variáveis estudadas ($P=0,725$), isso significa que o padrão dos níveis de triglicerídeos nos animais da Dieta Controle que receberam erva-mate e água foi similar ao padrão observado nos animais com Dieta Hiperlipídica. Ou seja, o mate diminuiu esses níveis em ambas as dietas (Fig. 8.A).

No colesterol plasmático (Fig. 8.B) não houve diferenças significativas entre as dietas ($P=0,115$) e nem entre as bebidas ($P=0,104$), o que indica que as dietas e as bebidas não foram capazes de, isoladamente, alterar os níveis de colesterol de forma significativa. Apesar disso, houve interação entre as variáveis ($P=0,023$).

Já a Figura 8.C mostra que o glicerol plasmático foi alterado significativamente pelas dietas ($P=0,002$), sendo que os animais tratados com Dieta Hiperlipídica apresentaram níveis maiores de glicerol plasmático. Já em relação às bebidas, não houve diferença significativa entre os animais que receberam água ou erva-mate ($P=0,122$). Também não houve interação entre as variáveis ($P=0,328$), o que indica que a Dieta Hiperlipídica não dependeu das bebidas para aumentar os níveis de glicerol no plasma.

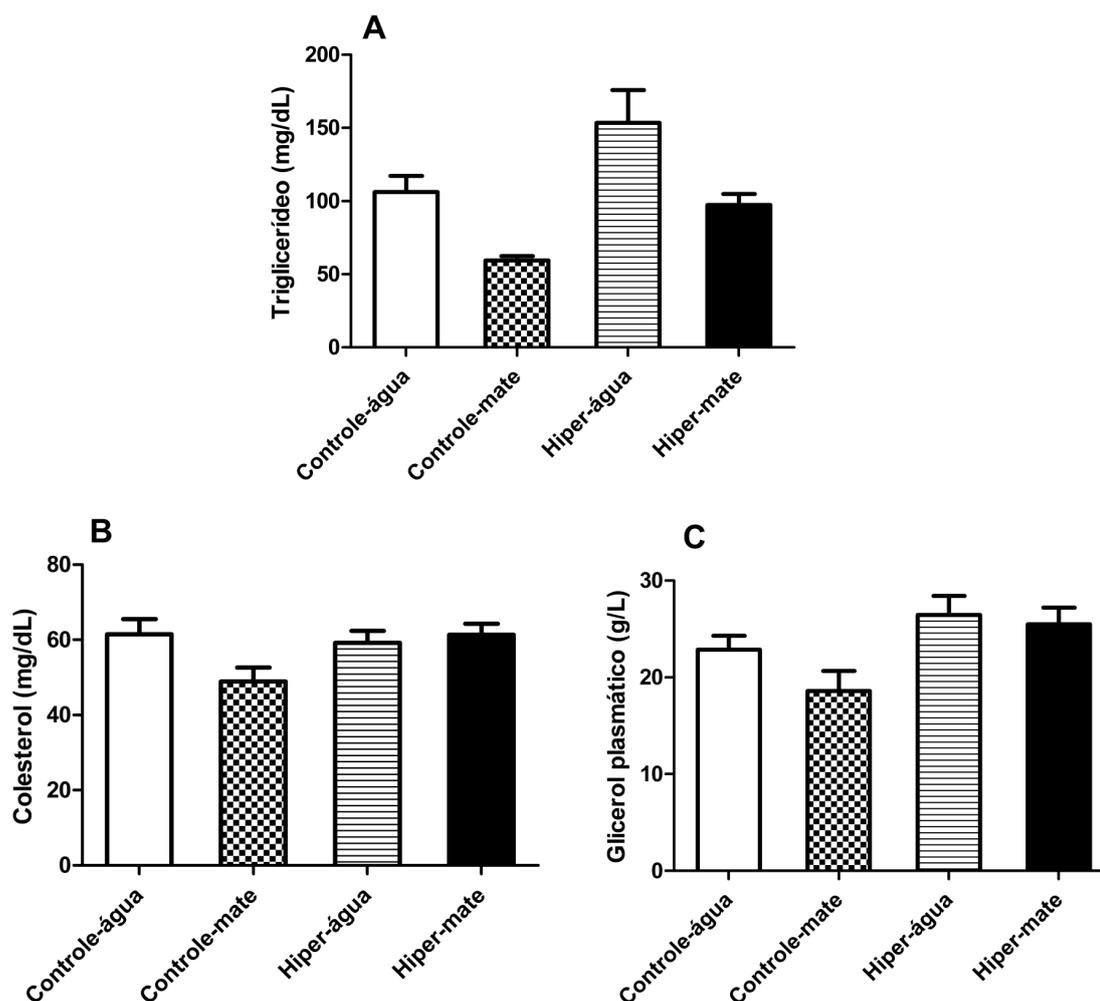


Fig. 8. Avaliação da concentração plasmática de triglicerídeos (A), colesterol (B) e glicerol (C) de ratos submetidos à dieta hiperlipídica tratados com erva-mate. ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. $n = 7-8$ animais por grupo.

A lipogênese *in vitro* no tecido adiposo retroperitoneal foi significativamente menor nos animais que receberam Dieta Hiperlipídica, comparado aos animais que receberam Dieta Controle ($P = 0,001$). Não houve efeito significativo das bebidas ($P = 0,138$) ou interação entre as variáveis ($P = 0,138$) (Figura 9).

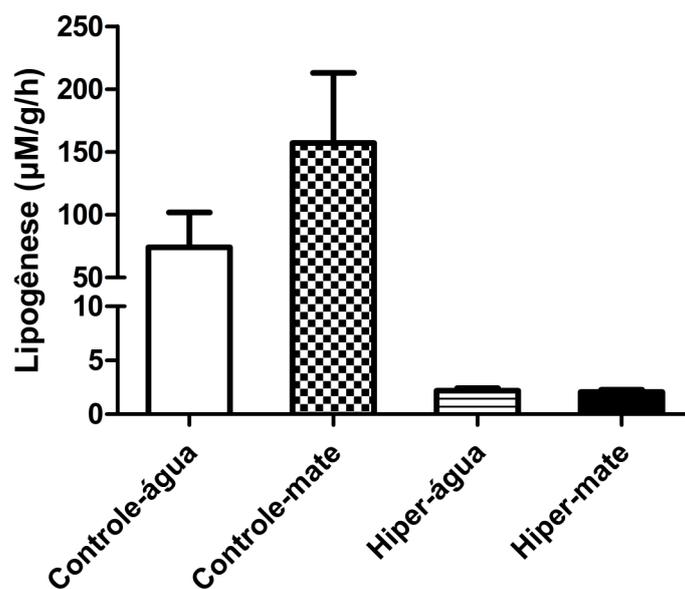


Fig. 9. Lipogênese (conversão de ^{14}C -glicose em ^{14}C -lipídios) no tecido adiposo retroperitoneal de ratos submetidos à dieta hiperlipídica tratados com erva-mate. ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. $n=7-8$ animais por grupo.

A Figura 10 mostra os resultados dos níveis de glicerol e ácidos graxos livres no meio de incubação do experimento de lipólise feita no tecido adiposo retroperitoneal. Assim, com esses resultados podemos demonstrar a capacidade lipolítica desse tecido. Na Figura 10.A notamos que há um aumento significativo na concentração de glicerol no meio de incubação dos animais que consumiram Dieta Controle em comparação aos que receberam Dieta Hiperlipídica, quando as dietas são comparadas por ANOVA de 2 vias ($P=0,024$). Em relação às bebidas, não houve efeito significativo, mostrando que água ou erva-mate não alteraram a concentração de glicerol no meio de incubação ($P=0,080$). Houve interação entre as variáveis ($P=0,025$), o que significa que, conforme a dieta, a erva-mate determinou um padrão na concentração de glicerol. Na Dieta Controle, a erva-mate aumentou o glicerol na lipólise e na Dieta Hiperlipídica, mate não exerceu efeito.

Em relação aos ácidos graxos, não houve efeito significativo das dietas ($P=0,390$) e nem das bebidas ($P=0,111$), demonstrando que, isoladamente, nem a Dieta Controle ou Hiperlipídica, e nem água ou mate foram capazes de alterar os níveis de ácidos graxos liberados na lipólise. Porém, houve interação entre as variáveis estudadas ($P=0,001$), o que significa que os menores níveis de ácidos graxos com a Dieta Hiperlipídica dependeram do uso da erva-mate (Fig. 10.B).

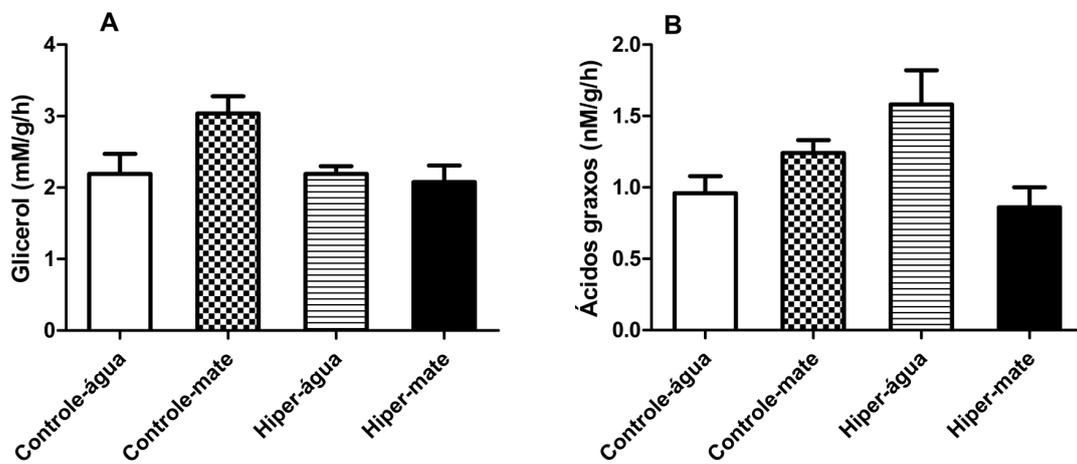


Fig. 10. Avaliação da atividade lipolítica em tecido adiposo retroperitoneal de ratos submetidos à dieta hiperlipídica tratados com erva-mate **A.** Concentração de glicerol no meio de incubação da lipólise. **B.** Concentração de ácidos graxos livres no meio de incubação da lipólise. ANOVA de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. $n=6-8$ animais por grupo.

6. DISCUSSÃO

Os estudos com o uso de dietas hiperlipídicas têm se tornado cada vez mais importantes em função dos sérios problemas de saúde que vem sofrendo a população humana e porque lançam propostas para amenizar esse problema.

Este estudo seguiu metodologia e protocolos experimentais já descritos na literatura. Em relação ao preparo do extrato aquoso, este foi feito segundo o trabalho de Heinrichs e Malavolta (2001), a fim de se obter um extrato o mais similar possível com o chimarrão. Além disso, a técnica de oferecer o extrato como única forma de hidratação, com o uso de bebedouros, já havia sido descrita anteriormente por Mosimann *et al.* (2006). O método de preparo e a forma de oferecer o extrato também foram utilizados em outros estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (GOMES, 2009; PEDROSO, 2010; RESENDE, 2010; SILVA *et al.*, 2011).

Em relação às dietas, o modelo utilizado mostrou resultado esperado para o peso e para a variação de peso dos animais. Os animais alimentados com a dieta hiperlipídica tiveram um aumento significativo nesses parâmetros, aproximadamente 12%, quando comparados com os animais que receberam a ração controle. O trabalho de Assis *et al.* (2012), que tratou ratos Wistar por 12 meses com uma ração hiperlipídica de composição nutricional semelhante, também mostrou aumento significativo no peso final e na variação de peso dos animais. Entretanto, quando tratamos os animais com erva-mate, não observamos alterações desses parâmetros de forma isolada. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Melo *et al.* (2007), que também não encontrou diferenças significativas na evolução ponderal de ratos Wistar tratados com dieta suplementada em lipídeos e que receberam ou não extrato de *Ilex paraguariensis*.

Por outro lado, estudos que utilizavam outros modelos animais, principalmente camundongos, e que avaliaram os efeitos da erva-mate, encontraram uma diminuição significativa no peso dos animais, tratados ou não com dietas hiperlipídicas (PANG *et al.*, 2008; ARÇARI *et al.*, 2009; HUSSEIN *et al.*, 2011a; KANG *et al.*, 2012). Os métodos de preparo e o fornecimento da erva-mate aos animais também variaram entre esses artigos, dificultando a comparação dos resultados.

A ingestão de comida e bebida ao final do período experimental não variou de forma significativa entre os grupos. Esse resultado corrobora com estudo de Melo e colaboradores (2007), que não encontrou diferenças significativas no consumo alimentar de ratos Wistar tratados com dieta controle ou suplementada com lipídeos que receberam extrato de erva-mate ou água, ao final de 5 semanas de tratamento. Já em camundongos, os resultados são controversos, pois um estudo encontrou uma diminuição significativa na ingestão de dieta rica em gordura e um aumento da saciedade em animais tratados com erva-mate; outro estudo não encontrou diferenças na ingestão de dieta hiperlipídica em camundongos tratados com erva-mate (ARÇARI *et al.*, 2009; HUSSEIN *et al.*, 2011a). As diferenças podem ser explicadas pela variação no tempo de tratamento, pelo metabolismo dos animais de linhagens variadas e por diferenças no protocolo experimental. Também devemos admitir que o protocolo experimental teve limitações quanto ao pequeno número amostral e ao curto tempo de avaliação dessa ingestão, visto que o ideal seria obter uma média de vários períodos de amostragem.

O consumo calórico foi maior nos animais que consumiram a dieta hiperlipídica, independente da bebida ingerida. Esse aumento pode ser explicado pela diferença na densidade calórica das dietas oferecidas, visto que a dieta hiperlipídica possui 73% a mais de calorias que a dieta controle. O mesmo ocorreu com o peso dos tecidos

adiposos retroperitoneal e epididimal, em gramas, e a relação entre o peso do tecido/peso do animal, em porcentagem, que foram significativamente maiores nos animais tratados com dieta hiperlipídica. Sabe-se que o excesso de calorias ingeridas na dieta é convertido em estoques de gordura no tecido adiposo branco (CURI *et al.*, 2002), que armazena e fornece ácidos graxos conforme as necessidades energéticas do organismo e protege os outros órgãos e tecidos do acúmulo ectópico de gordura e da consequente lipotoxicidade que esse fenômeno provoca (DE QUEIROZ *et al.*, 2009).

No TTG, os animais tratados com a dieta hiperlipídica permaneceram com a glicemia significativamente maior que os animais tratados com a dieta controle após 120 minutos de uma sobrecarga de glicose por gavagem, resultado que está provavelmente ligado à intolerância à glicose. A ingestão aumentada de gordura está associada com a diminuição da sensibilidade à insulina e aumento do risco de desenvolvimento de diabetes, independentemente da obesidade (CURI *et al.*, 2002). Há evidências de que os ácidos graxos em excesso podem modificar o funcionamento das células β das ilhotas pancreáticas afetando a secreção e, possivelmente, a síntese de insulina, principalmente em dietas ricas em gorduras saturadas (banha de porco) (CURI *et al.*, 2002; LIN & SUN, 2010). Outros estudos mostraram que dietas ricas em lipídeos são capazes de provocar essas alterações no TTG em ratos Wistar e em Hamsters (COSTA *et al.*, 2011; ASSIS *et al.*, 2012).

A possível resistência à insulina causada pela dieta hiperlipídica, demonstrada pelo TTG, foi novamente encontrada no Índice de Resistência à Insulina (HOMA-IR), onde esses animais apresentaram níveis significativamente maiores de HOMA-IR quando comparados com os animais que receberam ração controle. Esse índice tem como objetivo avaliar a sensibilidade à insulina e a atividade das células β pancreáticas, utilizando somente os valores de glicemia e insulinemia de jejum. Em uma ampla

consulta feita nos principais indexadores bibliográficos, foi encontrado apenas um trabalho relacionando obesidade e erva-mate com o cálculo do HOMA-IR (HUSSEIN *et al.*, 2011b). Entretanto, esse estudo foi realizado com camundongos com obesidade e diabetes geneticamente induzidos, o que dificulta a comparação direta dos resultados. De qualquer forma, o estudo mencionado encontrou uma redução significativa causada pelo mate nos animais obesos e diabéticos, enquanto em nosso estudo, o extrato de erva-mate não alterou o HOMA-IR.

A dosagem de glicemia, feita com kit colorimétrico específico, mostrou que a glicemia de jejum é significativamente maior nos animais que receberam dieta hiperlipídica quando comparado aos animais que receberam dieta controle, e que a erva-mate não apresentou efeito. A hiperglicemia causada por dietas ricas em gordura ou pela obesidade já é suficientemente conhecida (BRAND-MILLER *et al.*, 2002).

A insulinemia de jejum nos animais alimentados com dieta hiperlipídica foram significativamente maiores do que nos animais controles. Essa elevação na concentração plasmática da insulina provavelmente foi um mecanismo compensatório encontrado pelo organismo para manter as concentrações adequadas de glicose em um estado de menor sensibilidade à insulina. Numa tentativa de manter os níveis de glicose de jejum dentro das faixas normais, em indivíduos com resistência à insulina que ainda não progrediu para uma quadro de diabetes *mellitus* tipos 2, há um aumento na secreção de insulina pelas células β pancreáticas, o que parece contribuir, a médio e/ou longo prazo, para a falência da glândula e o estabelecimento de um posterior quadro de diabetes (KAHN, 2003). O aumento da massa de tecido adiposo retroperitoneal nos animais usados no estudo, já comentado anteriormente, também pode estar envolvido no desenvolvimento da resistência à insulina, pois é reconhecido que existe uma forte

associação entre obesidade e resistência à insulina, principalmente relacionado ao aumento da adiposidade abdominal (GOODPASTER *et al.*, 1999).

O extrato de erva-mate não alterou os níveis plasmáticos de insulina de forma isolada, mas aumentou significativamente a insulinemia quando associado à dieta hiperlipídica, em comparação a todos os outros grupos. Apenas o estudo de Pang *et al.* (2008) avaliou o efeito da ingestão de extrato de *Ilex paraguariensis* sobre a insulinemia em camundongos. Porém, nesse trabalho, os camundongos que recebiam erva-mate misturada a uma dieta hiperlipídica apresentaram níveis de insulina plasmática significativamente menores do que o grupo que recebeu apenas dieta hiperlipídica, sem o extrato de erva-mate. Assim, além do modelo animal e da metodologia diferentes, o estudo mostra resultados divergentes, dificultando a comparação entre os estudos.

O grupo dieta hiperlipídica que recebeu erva-mate teve seus níveis de insulina aumentados tanto em relação aos animais controle, quanto em relação ao grupo controle da dieta hiperlipídica. Este resultado provavelmente pode estar relacionado com uma atuação direta de algum composto da erva-mate sobre o processo de secreção da célula β pancreática. Ammala e colaboradores (1993) demonstraram que o AMPc, pela ativação da proteína cinase A (PKA) aumenta o influxo de cálcio pelos canais de cálcio do tipo-L dependentes de voltagem, assim elevando a concentração de cálcio intracelular e acelerando a exocitose das vesículas com insulina. O AMPc também promove a liberação de insulina pela interação direta com a maquinaria secretora, sendo responsável por 80% deste efeito secretor. Islam e colaboradores (1995) demonstraram o efeito da cafeína em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos obesos onde foi observado um aumento da atividade do AMPc, levando a fosforilação dos canais de cálcio dependentes de voltagem. A cafeína também produziu uma inibição dos canais de potássio dependentes de ATP, induzindo a liberação de insulina das células β

pancreáticas em presença de concentrações de glicose que não estimulariam essas células.

Em relação aos níveis plasmáticos de leptina podemos observar que há um aumento significativo na leptinemia dos animais tratados com a dieta hiperlipídica, quando comparados aos animais controles. Esse resultado já era esperado, visto que a leptina é um hormônio primariamente sintetizado e secretado pelos adipócitos maduros e pode atuar como um regulador da massa de gordura corporal. A perda de estoques de gordura diminui a produção de leptina, enquanto que o ganho de peso aumenta sua produção (CURI *et al.*, 2002). No presente estudo, conforme já mencionado, os animais tratados com dieta hiperlipídica tiveram um aumento significativo no peso do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal. Sabe-se ainda que a produção de leptina está diretamente relacionada com o tamanho das células adiposas, e não apenas com o número de adipócitos ou com a quantidade de gordura depositada (SKURK *et al.*, 2007). Dessa forma, para podermos tirar algumas conclusões mais fortemente embasadas, seria necessário analisar o tecido adiposo dos animais utilizados nesse experimento.

Não houve efeito isolado da bebida nos níveis de leptina plasmática, o que demonstra que mate ou água não alteraram significativamente a síntese e secreção desse hormônio no modelo utilizado nesse estudo. Outros trabalhos que avaliam a influência da erva-mate sob a leptinemia de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica são bastante controversos. Dois estudos relatam que a erva-mate reduz os níveis de leptina, enquanto que outro mostra um aumento na leptinemia nos animais que receberam erva-mate (PANG *et al.*, 2008; HUSSEIN *et al.*, 2011a; KANG *et al.*, 2012).

Não podemos esquecer que uma variedade de fatores metabólicos e endócrinos contribuem para regular a produção de leptina. Os glicocorticóides, os estrógenos e as

citocinas inflamatórias aumentam os níveis de leptina ao passo que baixas temperaturas, estimulação adrenérgica, hormônio do crescimento, andrógenos e fumo parecem diminuir os níveis de leptina (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007). Assim, a cafeína presente na erva-mate, por ter a propriedade de ativar o sistema simpático, pode reduzir os níveis de leptina nos animais controle. Entretanto, este fato não foi observado nos animais com dieta hiperlipídica.

Os resultados de captação e oxidação de glicose pelo tecido adiposo retroperitoneal *in vitro* nos mostram a capacidade do tecido adiposo de captar e metabolizar a glicose. Nos animais tratados com dieta hiperlipídica, os dois parâmetros encontram-se reduzidos em comparação aos animais controles, resultado provavelmente associado à resistência à insulina encontrada nesses animais. Em indivíduos normais, a insulinemia se eleva após uma refeição, estimulando a captação de glicose pelos tecidos periféricos, tais como músculo e tecido adiposo. Nesses tecidos, a insulina é o principal hormônio regulador da captação de glicose, que pode então ser oxidada, acumulada em glicogênio ou servir para a síntese de triglicérides (LIN & SUN, 2010). No tecido adiposo, a insulina estimula a lipogênese e inibe a lipólise. Entretanto, em indivíduos resistentes à insulina, a captação de glicose no músculo e no tecido adiposo está reduzida (CURI *et al.*, 2002). No tecido adiposo incapaz de captar glicose também é esperada uma redução da oxidação de glicose. Dessa forma, a diminuição na captação e oxidação de glicose encontrada em nosso estudo nos animais que ingeriram a dieta hiperlipídica confirma o quadro de resistência à insulina já demonstrados nos resultados do HOMA-IR e da insulinemia.

A captação de glicose sofreu ainda efeitos da erva-mate, sendo que os animais tratados com mate tiveram um aumento na captação de glicose quando comparados com os animais que receberam apenas água. Houve também um aumento significativo na

captação de glicose no grupo dieta controle que recebeu erva-mate em relação a todos os outros grupos, mostrando que, dependendo da dieta oferecida, o mate exerceu diferentes efeitos. A quantificação da captação de glicose é feita *in vitro*, onde o tecido adiposo é incubado em meio líquido contendo glicose marcada e solução fisiológica, sem a presença de insulina. Apesar desse fato, trabalhos demonstram que existe a possibilidade da ativação de translocação do GLUT4 por uma ação independente da insulina, como, por exemplo, no exercício (FOLEY *et al.*, 2011). Nos indexadores pesquisados, não foram encontrados artigos com resultados semelhantes.

A resistência à insulina nos tecidos periféricos provoca também uma diminuição na metabolização de glicose pelos tecidos insulino-dependentes (músculo e tecido adiposo) e estimula a lipólise para gerar substratos energéticos. A principal enzima envolvida no processo de lipólise é a lipase hormônio sensível, que em estados normais tem a insulina como seu mais importante inibidor fisiológico. Esta enzima pode ser ativada por um processo de fosforilação, que é catalisado pela proteína cinase A (PKA) dependente de AMP cíclico. Em indivíduos normais, no estado pós-prandial a insulina atua reduzindo a atividade da lipase por diminuir o AMP cíclico ou aumentando a atividade da fosfoproteína fosfatase, inibindo assim a lipólise. Porém, no caso de resistência à insulina, esse hormônio é incapaz de inativar a lipase hormônio sensível e o processo de lipólise é ativado, liberando ácidos graxos e glicerol do tecido adiposo (CURI *et al.*, 2002). Os níveis de triglicerídeos e glicerol plasmáticos encontrados nos animais que receberam dieta hiperlipídica no presente trabalho são condizentes com o quadro de resistência à insulina relatado acima. Tanto os triglicerídeos quanto o glicerol plasmático estão significativamente maiores nos animais que receberam dieta hiperlipídica quando comparados aos animais controle.

Nos triglicerídeos, há ainda um efeito da erva-mate, que causou uma diminuição nos triglicerídeos plasmáticos, independente da dieta fornecida. Essa redução nos triglicerídeos causada pela erva-mate já havia sido relatada em outros estudos que avaliaram o efeito da *Ilex paraguariensis* sobre a obesidade induzida geneticamente ou por dieta hiperlipídica (PANG *et al.*, 2008; ARÇARI *et al.*, 2009; HUSSEIN *et al.*, 2011a; HUSSEIN *et al.*, 2011b). No grupo controle tratado com erva-mate, a redução nos triglicerídeos plasmáticos encontrada pode ter sido causada pelo aumento da lipogênese observada nesse grupo. Uma redução dos triglicerídeos plasmáticos foi encontrada no trabalho de Estadella *et al.* (2004), onde o fígado teve um aumento na atividade lipogênica, que pode ser devido ao suprimento dos triglicerídeos circulantes, sem aumentar a β -oxidação. Já no grupo hiperlipídico com erva-mate, a redução dos triglicerídeos pode ter sido causada pela metabolização pelos tecidos periféricos, como observado em ratos com dieta palatável hiperlipídica, onde o acúmulo de lipídeos intramuscular provavelmente foi causado pelo aumento da captação, produzido pela dieta hiperlipídica (ESTADELLA *et al.*, 2004).

Ainda sobre o perfil lipídico dos animais, o colesterol não apresentou diferenças significativas relacionadas à dieta ou ao tipo de bebida oferecida.

Uma das principais ações metabólicas do tecido adiposo é a biossíntese de triglicerídeos, chamada de lipogênese. A lipogênese no tecido adiposo retroperitoneal *in vitro* foi significativamente menor nos animais que receberam dieta hiperlipídica. A lipogênese é estimulada pela insulina, que aumenta a captação e a oxidação da glicose nos tecidos adiposo e muscular, disponibilizando, assim, substratos para a síntese de ácidos graxos (CURI *et al.*, 2002). Portanto, a diminuição da lipogênese no tecido adiposo pode ser novamente explicada pela resistência à insulina nesse tecido, que impede a correta captação de substratos para a síntese de lipídeos. Santos *et al.* (2012),

trabalhando com ratos Wistar tratados com dieta pobre em proteínas e rica em carboidratos, não observaram uma diferença significativa entre a lipogênese no tecido adiposo retroperitoneal incubado com ou sem insulina, mas encontraram um aumento no peso do tecido adiposo retroperitoneal, semelhante ao que foi encontrado em nosso estudo. O trabalho de Estadella e colaboradores (2004), usando ratos Wistar machos com dieta hiperlipídica, observou um aumento da lipogênese na carcaça, mas uma diminuição no tecido retroperitoneal, embora tenham aumentado as reservas de lipídeo em ambos locais. Dietas ricas em lipídeos reduzem a atividade das enzimas lipogênicas e a atividade lipogênica nas gorduras retroperitoneal e inguinal (GAIVA *et al.*, 2001; ROTHWELL *et al.*, 1983), mas aumenta a atividade da lipoproteína lipase na gordura visceral (ROBERTS *et al.*, 2002).

Além da lipogênese, outra habilidade do adipócito é a lipólise dos triglicerídeos, liberando ácidos graxos livres e glicerol. Este processo é estimulado principalmente por catecolaminas e ocorre durante o jejum ou quando a demanda energética é alta, como no exercício físico e em situações de estresse, devido à intensa solicitação simpática (LAFONTAN, 2005). Este processo depende da ativação da lipase hormônio sensível, que pode ser ativada por um processo de fosforilação, que é catalisado pela proteína cinase A (PKA) dependente de AMPc. Com a lipólise, os triglicerídeos são separados em ácidos graxos livres e glicerol. Os ácidos graxos livres liberados se ligam à proteína ligadora de ácidos graxos, são levados à membrana celular e são transportados para o meio extracelular pela proteína transportadora de ácidos graxos. Já o glicerol é transportado para o exterior através de transportadores específicos, proteínas pertencentes à família das aquagliceroporinas (aquaporina 7) (CURI *et al.*, 2002).

O aumento no estímulo da lipólise pode ocorrer pela cafeína, além das ações das catecolaminas. Bellet *et al.* (1968), em estudo feito com humanos e cachorros,

observaram um aumento plasmático de ácidos graxos livres e nas concentrações de excreção urinária de catecolaminas após a ingestão de cafeína ou café, e sugeriram que o aumento da lipólise foi, em parte, devido ao aumento da liberação de catecolaminas. No entanto, outros estudos realizados mostraram que a cafeína também aumenta a lipólise através do aumento direto nas concentrações de AMPc no tecido, ativando a lipase hormônio-sensível e promovendo a lipólise. Os autores destes estudos mostraram que, na presença de hormônios lipolíticos, como a adrenalina, a cafeína atua sinergicamente e provoca um aumento das concentrações de AMPc maior do que o aumento causado pelos hormônios por si só (ACHESON *et al.*, 2004). Assim, há evidências de que a cafeína estimula a mobilização de lipídeos e a oxidação de gordura.

Em nosso estudo, a lipólise foi realizada *in vitro* em tecido adiposo retroperitoneal, em meio aquoso contendo adrenalina para estimular o processo. A quantificação da lipólise foi feita pela dosagem do glicerol e dos ácidos graxos que foram liberados nesse meio aquoso após a incubação do tecido. A dosagem de glicerol mostrou um aumento significativo no grupo dieta controle que recebeu erva-mate, quando comparado com os demais grupos. Esse aumento pode ser causado por estímulo da cafeína presente na erva-mate, que pode ter agido de forma sinérgica com a adrenalina presente no meio, aumentando assim a lipólise. No grupo que recebeu dieta hiperlipídica e erva-mate, a influência da cafeína pode não ter sido suficiente para estimular a lipólise visto que, nesses animais, o metabolismo do tecido está alterado pelos efeitos negativos da dieta hiperlipídica. A liberação de glicerol é uma medida mais direta para quantificação da lipólise, pois o glicerol não sofre re-esterificação pelo tecido, como é o caso dos ácidos graxos, além de ter um processo de liberação do tecido adiposo mais simples que aquele visto nos ácidos graxos.

Em relação aos níveis de ácidos graxos da lipólise *in vitro*, podemos observar que encontramos níveis maiores nos animais com dieta hiperlipídica que receberam água. Durante o processo de lipólise, os triglicerídeos sofrem degradação e síntese, pois os ácidos graxos não esterificados (NEFA) podem ser novamente captados e re-esterificados (VAUGHAN & STEINBERG, 1963). Trabalhos demonstram que podemos encontrar diferenças na capacidade de re-esterificação do tecido adiposo de ratos dependendo se utilizamos fragmentos de tecidos ou adipócitos isolados, além da própria composição dos NEFA no meio de incubação resultante dos processos lipolíticos e de re-esterificação (RACLOT & OUDART, 2000). Baseado nestas informações, podemos inferir que de alguma forma os animais com dieta hiperlipídica tratados com erva-mate tiveram uma atividade de re-esterificação menor que os animais que receberam água, o que pode estar relacionado a uma diferença na composição dos NEFA armazenados durante o tratamento. Assim, para termos um melhor esclarecimento deste processo, devemos analisar a composição dos ácidos graxos presentes no tecido adiposo retroperitoneal dos diferentes tratamentos.

Vários estudos têm mostrado que o tamanho da célula de gordura pode ter uma importância para a lipólise, pois existe uma correlação positiva entre a taxa basal de lipólise e o tamanho da célula de gordura (ARNER, 1988). Em humanos, a maior atividade lipolítica das catecolaminas foi encontrada em depósitos viscerais, seguida dos tecidos subcutâneos, e por último nos depósitos subcutâneos periféricos (LEIBEL *et al.*, 1989).

Nos animais controle que receberam erva-mate podemos observar uma melhora em alguns parâmetros bioquímicos, como nos triglicerídeos, no HOMA-IR e na leptina, que de alguma forma podem estar relacionados com os parâmetros morfométricos,

como uma tendência de redução no peso dos tecidos adiposos e na variação de peso dos animais durante o período experimental.

Finalmente, podemos concluir que o uso da erva-mate parece demonstrar alguns efeitos benéficos sobre os níveis circulantes de lipídeos. Por outro lado, nos animais tratados com dieta hiperlipídica a erva-mate pode provocar um estímulo direto sobre o pâncreas, aumentando a secreção de insulina, onde já se observa um processo de resistência à insulina, levando provavelmente a um agravamento desse quadro e à síndrome metabólica.

7. CONCLUSÕES

Este estudo não comprovou a hipótese de que a erva-mate exerça uma proteção ao desenvolvimento da obesidade e alterações metabólicas produzidas pela dieta hiperlipídica. Até em alguns aspectos, há uma piora dos parâmetros com o uso do mate, como é o caso do HOMA-IR e da insulina. Um efeito de melhora do perfil lipídico parece haver somente sobre os triglicerídeos, mas esse efeito é independente da dieta. Usando como exemplo o peso do tecido adiposo retroperitoneal e epididimal, o HOMA-IR e os triglicerídeos, parece demonstrar uma tendência de melhora desses parâmetros com o mate nos animais tratados com a dieta controle, apesar de essa não ter sido a hipótese estudada.

Contudo, o presente estudo traz resultados novos para a literatura, visto que não foram encontrados artigos que avaliem a influência da erva-mate sobre o metabolismo do tecido adiposo.

REFERÊNCIAS

ACHESON, K.J.; GREMAUD, G.; MEIRIM, I.; MONTIGON, F.; KREBS, Y.; FAY, L.B.; GAY, L.J.; SCHNEITER, P.; SCHINDLER, C.; TAPPY, L. Metabolic effects of caffeine in humans: lipid oxidation or futile cycling? **Am J Clin Nutr**, v.79, n.1, p.40-6, 2004.

AHIMA, R.S.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab**, v.11, n.8, p.327-32, 2000.

ALLISON, D.B.; FONTAINE, K.R.; MANSON, J.E.; STEVENS, J.; VANITALLIE, T.B. Annual deaths attributable to obesity in the United States. **JAMA**, v.282, n.16, p.1530-8, 1999.

AMMALA, C.; ASHCROFT, F.M.; RORSMAN, P. Calcium- independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single beta-cells. **Nature**, v.363, p.356-358, 1993.

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**, v.14, p.243-250, 2001.

ARÇARI, D.P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T.W.; OLIVEIRA, K.A.; FUNCK, A.; PEDRAZZOLI, J.; DE SOUZA, M.F.; SAAD, M.J.; BASTOS, D.H.; GAMBERO, A.; CARVALHO, O.; RIBEIRO, M.L. Antiobesity Effects of *yerba maté* Extract (*Ilex paraguariensis*) in High-fat Diet-Induced Obese Mice. **Obesity**, v. 17, n. 12, p. 2127 – 2133, 2009.

ARNER, P. Control of lipolysis and its relevance to development of obesity in man. **Diabetes Metab Rev**, v.4, n.5, p.507-15, 1988.

ASSIS, A.M.; RIEGER, D.K.; LONGONI, A.; BATTU, C.; RAYMUNDI, S.; DA ROCHA, R.F.; ANDREAZZA, A.C.; FARINA, M.; ROTTA, L.N.; GOTTFRIED, C.; GONÇALVES, C.A.; MOREIRA, J.C.; PERRY, M.L. High fat and highly thermolyzed fat diets promote insulin resistance and increase DNA damage in rats. **Exp Biol Med**, v.234, n.11, p.1296-304, 2009.

ATHAYDE, M. L., COELHO, G. C., SCHENKEL, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St-Hil. **Phytochemistry**, n. 55, p. 853 - 857, 2000.

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

BELLET, S.; KERSHBAUM, A.; FINCK, E.M. Response of free fatty acids to coffee and caffeine. **Metabolism**, v. 17, n. 8, p. 702-7, 1968.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **J Ethnopharmacol**, v.136, n.3, p.378-84, 2011.

BRAND-MILLER, J.C.; HOLT, S.H.; PAWLAK, D.B.; MCMILLAN, J. Glycemic index and obesity. **Am J Clin Nutr**, v.76(suppl), p.281S-5S, 2002.

COSTA, R.R.; VILLELA, N.R.; SOUZA, M.G.; BOA, B.C.; CYRINO, F.Z.; SILVA, S.V.; LISBOA, P.C.; MOURA, E.G.; BARJA-FIDALGO, T.C.; BOUSKELA, E. High fat diet induces central obesity, insulin resistance and microvascular dysfunction in hamsters. **Microvasc Res**, v.82, n.3, p.416-22, 2011.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: MAnole, 2002. 580p.

DE MEJIA, E.G.; SONG, Y.S.; RAMIREZ-MARES, M.V.; KOBAYASHI, H. Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1966 - 1973, 2005.

DE QUEIROZ, J.C.F; ALONSO-VALE, M.I.C.; CURI, R.; LIMA, F.B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.53, n.5, p.582-594, 2009.

DESLANDES, A.C.; VEIGA, H.; CAGY, M.; PIEDADE, R.; POMPEU, F.; RIBEIRO, P. Effects of caffeine on visual evoked potential (p300) and neuromotor performance. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.62, n.2b, p.385-390, 2004.

DICKEL, M.L.; RATES, S.M.; RITTER, M.R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.60-71, 2007.

DUNCAN, R.E.; AHMADIAN, M.; JAWORSKI, K.; SARKADI-NAGY, E.; SUL, H.S. Regulation of lipolysis in adipocytes. **Annu Rev Nutr**, v.27, p.79-101, 2007.

ESTADELLA, D.; OYAMA, L.M.; DAMASO, A.R.; RIBEIRO, E.B.; OLLER DO NASCIMENTO, C.M.. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v.20, n.2, p.218-24, 2004.

FAOSTAT - Food and Agricultural Organization Statistics Division. **[Production]**. 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>.

FERREIRA, F.; VÁZQUEZ, A.; GÜNTNER, C.; MOYNA, P. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by *Ilex paraguariensis* St.Hil. Saponins. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 79 - 81, 1997.

FILIP, R.; LOTITO, S.B.; FERRARO, G.; FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437 - 1446, 2000.

FINKELSTEIN, E.A.; FIEBELKORN, I.C.; WANG, G. National medical spending attributable to overweight and obesity: how much, and who's paying? **Health Aff (Millwood)**, v.Suppl Web Exclusives, p.W3-219-26, 2003.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, H.S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, n.226, p.497-503, 1957.

FOLEY, K.; BOGUSLAVSKY, S.; KLIP, A. Endocytosis, Recycling, and Regulated Exocytosis of Glucose Transporter 4. **Biochemistry**, v.50, n.15, p.3048-3061, 2011.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.; LIMA, F.B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.50, n.2, p.216-29, 2006.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.; LIMA, F.B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J Pediatr**, v.83, n.5 Suppl, p.S192-203, 2007.

FRÜHBECK, G.; GOMEZ-AMBROSI, J.; MURUZABAL, F.J.; BURRELL, M.A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.280, n.6, p.E827-47, 2001.

GAIVA, M. H.; COUTO, R.;C.; OYAMA, L.M.; COUTO, G.E.; SILVEIRA, V.L.; RIBERIO, E.B.; NASCIMENTO, C.M. Polyunsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. **Br J Nutr**, v.86, n.3, p.371-7, 2001.

GARCIA, G.; SUNIL, T.S.; HINOJOSA, P. The fast food and obesity link: consumption patterns and severity of obesity. **Obes Surg**, v.22, n.5, p.810-8, 2012.

GARÓFALO, M.A.R.; KETTELHUT, I.C.; ROSELINO, J.E.; MIGLIORINI, R.H. Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. **J Auton Nerv Syst**, v.60, p.206-208, 1996.

GIULIAN, Raquel. **Estudo da composição elementar da erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Física. 2005.

GNOATTO, S.B.C.; SCHENKEL, E.P.; BASSANI, V.L. HPLC method assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n.4, p.723-726, 2005.

GOMES, L.F. **Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre aspectos do metabolismo de ratos normais e diabéticos**. 58 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de medicina. Curso de Nutrição. Porto Alegre 2009.

GOODPASTER, B.H.; KELLEY, D.E.; WING, R.R.; MEIER, A.; THAETE, F.L. Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. **Diabetes**, v.48, n.4, p.839-47, 1999.

GUGLIUCCI, Alejandro. Antioxidant effects of *Ilex Paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 224, p. 338 - 344, 1996.

HAN, L.; ZHENG, Y.; YOSHIKAWA, M.; OKUDA, H.; KIMURA, Y. Anti-obesity effects of chikusetsusaponins isolated from *Panax japonicus* rhizomes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.5, p.9, 2005.

HASLAM, D.W.; JAMES, W.P. Obesity. **Lancet**, v.366, n.9492, p.1197-209, 2005.

HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v.72, n.9, p.138-151, 2007.

HEINRICHS, R.; MALAVOLTA, E. Composição mineral do produto comercial da erva-mate. **Ciência Rural de Santa Maria**, v.31, n.5, p.781-785, 2001.

HILL, J.O.; PETERS, J.C. Environmental contributions to the obesity epidemic. **Science**, v.280, n.5368, p.1371-4, 1998.

HUSSEIN, G.M.; MATSUDA, H.; NAKAMURA, S.; HAMAOKA, M.; AKIYAMA, T.; TAMURA, K.; YOSHIKAWA, M. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) promotes satiety and body weight lowering in mice: involvement of glucagon-like peptide-1. **Biol Pharm Bull**, v.34, n.12, p.1849-55, 2011a.

HUSSEIN, G.M.; MATSUDA, H.; NAKAMURA, S.; AKIYAMA, T.; TAMURA, K.; YOSHIKAWA, M. Protective and ameliorative effects of mate (*Ilex paraguariensis*) on metabolic syndrome in TSOD mice. **Phytomedicine**, v.19, n.1, p. 88-97, 2011b.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. POF 2008-2009: desnutrição cai e peso das crianças brasileiras ultrapassa padrão internacional. Comunicação Social, 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1699&id_pagina=1.

ISLAM, M.S.; LARSSON, O.; NILSSON, T.; BERGGREN, P.O. Effects of caffeine on cytoplasmic free Ca²⁺ concentration in pancreatic beta-cells are mediated by interaction with ATP-sensitive K⁺ channels and L-type voltage-gated Ca²⁺ channels but not the ryanodine receptor. **Biochem J**, v.306 (Pt 3), p.679-86, 1995.

ITO, E.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Theophylline metabolism in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, n. 2, p. 323 - 230, 1997.

JACQUES, Rosângela Assis. **Caracterização química da erva-mate (*Ilex paraguariensis*):** Aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantiosobre a composição química. 139 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. Porto Alegre, 2005.

KAHN, B.B.; FLIER, J.S. Obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 106, n. 4, p. 473-81, 2000.

KANG, Y.R.; LEE, H.Y.; KIM, J.H.; MOON, D.I.; 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. **Lab Anim Res**, v.28, n.1, p.23-9, 2012.

KOPLAN, J.P.; DIETZ, W.H. Caloric imbalance and public health policy. **JAMA**, v.282, n.16, p.1579-81, 1999.

LAFONTAN, M. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.45, p.119-46, 2005.

LEIBEL, R.L.; EDENS, N.K.; FRIED, S.K. Physiologic basis for the control of body fat distribution in humans. **Annu Rev Nutr**, v.9, p.417-43, 1989.

LIN, B.H; FRAZÃO, E. Nutritional quality of foods at and away from home. **FoodReview**, n.20, p.33-40, 1997.

LIN, Y.; SUN, Z. Current views on type 2 diabetes. **J Endocrinol**, v.204, n.1, p.1-11, 2010.

MACHADO, V.L.A.; WASSERMANN, G.F.; MARQUES, M. In vitro effect of insulin on the uptake of glucose and α -Aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle (*Chrysemys dorbigni*). **Gen Comp Endocrinol**, v.82, p.8-13, 1991.

MARTINET, A.; HOSTETTMANN, K.; SCHUTZ, Y. Thermogenic effects of commercially available plant reparations aimed at treating human obesity. **Phytomedicine**, v.6, p.231-238, 1999.

MELO, S.S.; NUNES, N.S.I.; BAUMGARTEN, C.; TRESSOLDI, C.; FACCIN, G.; ZANUZO, K.; MICHELS, M.K.; CUNHA, N.; SPECHT, S.; SILVA, M.W. Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis* a.st. Hil.) sobre o perfil metabólico em ratos alimentados com dietas hiperlipídicas. **Alim. Nutr.**, v.18, n.4, p.439-447, 2007.

MORAIS, Elayne Cristina. **Avaliação dos efeitos hipocolesterolêmico, antioxidante e anti-inflamatório da infusão de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em indivíduos normolipidêmicos ou dislipidêmicos, usuários ou não de estatina.** Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. Área de concentração: Análises Clínicas. Florianópolis, 2009.

MOSIMANN, A. L. P.; WILHELM-FILHO, D.; SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors**, v. 26, p. 59 - 70, 2006.

NEGRÃO, A.B.; LICINIO, J. Leptina: o diálogo entre adipócitos e neurônios. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.44, n.3, p.205-214, 2000.

OGDEN, C.L.; CARROLL, M.D.; KIT, B.K.; FLEGAL, K.M. Prevalence of Obesity in the United States, 2009–2010. **NCHS Data Brief**, n.82, 2012.

OLIVEIRA, Marco Aurelio. **Extração de polifenóis da semente de cacau (*Theobroma Cacao*)**. 72 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Florianópolis, 2005.

PACHECO, A.H.R.N.; BARREIROS, N.S.R.; SANTOS, I.S.; KAC, G. Consumo de cafeína entre gestantes e a prevalência do baixo peso ao nascer e da prematuridade: uma revisão sistemática. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, n.12, p.2807-2819, 2007.

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**, v. 476, n.2, p.178-185, 2008.

PEDROSO, G.L.; MENDES, R.H.; PERSH, K.; JAHN, M.P.; KUCHARSKI, L.C. Efeito do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre o metabolismo de ratos machos. **Rev HCPA**, v.30, n.3, p.241-246, 2010.

RACLOT, T.; OUDART, H. Net release of individual fatty acids from white adipose tissue during lipolysis in vitro: evidence for selective fatty acid re-uptake. **Biochem J**, v.348 Pt 1, p.129-36, 2000.

RESENDE, M.D.V.; STURION, J.A.; 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, progênies, indivíduos e clones**. Colombo-PR: Embrapa Florestas (Circular Técnica), v. 43, p. 1 - 67, 2000.

RESENDE, Pedro Ernesto. **Caracterização estrutural e avaliação biológica da fração enriquecida em saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate)**. 55 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de farmácia. Curso de Farmácia. Porto Alegre 2010.

ROBERTS, C.K.; BARNARD, R.J.; LIANG, K.H.; VAZIRI, N.D. Effect of diet on adipose tissue and skeletal muscle VLDL receptor and LPL: implications for obesity and hyperlipidemia. **Atherosclerosis**, v.161, n.1, p.133-141, 2002.

ROTHWELL, N.J.; STOCK, M.J.; TRAYHURN, P. Reduced lipogenesis in cafeteria-fed rats exhibiting diet-induced thermogenesis. **Biosci Rep**, v.3, n.3, p.217-24, 1983.

SANTOS, M.D.; BLATT, C.T.T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, n.2, 1998.

SANTOS, M.P.; FRANCA, S.A.; SANTOS, J.T.; BUZELLE, S.L.; BERTOLINI, G.L.; GAROFALO, M.A.; KETTELHUT, I.C.; FRASSON, D.; CHAVES, V.E.; KAWASHITA, N.H. A low-protein, high-carbohydrate diet increases fatty acid uptake and reduces norepinephrine-induced lipolysis in rat retroperitoneal white adipose tissue. **Lipids**, v.47, n.3, p.279-89, 2012.

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**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, Cap. 27, p. 597 - 622, 2000.

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; DE BUSCHIAZZO, M.P.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, n. 2, p. 357 - 360, 2000.

SILVA, R.D. BUENO, A.L.S.; GALLON, C.W.; GOMES, L.F.; KAISER, S.; PAVEL, 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**, v.82, p.818–826, 2011.

SKURK, T.; ALBERTI-HUBER, C.; HERDER, C.; HAUNER, H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.92, n.3, p.1023-1033, 2007.

TORRES, I.L.S.; CAMARO, C.D.; SILVEIRA-CUCCO, S.N.; MICHALOWSKI, M.B.; CORRÊA, J.B.; PERRY, M.L.S.; DALMAZ, C. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices. **Journal of Medical Biology Research**, v.34, p.11-116. 2001.

VAUGHAN, M.; STEINBERG, D. Effect of Hormones on Lipolysis and Esterification of Free Fatty Acids during Incubation of Adipose Tissue in Vitro. **J Lipid Res**, v.4, p.193-9, 1963.

WAJCHENBERG, B.L. Tecido Adiposo como Glândula Endócrina. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.44, n.1, p.13-20, 2000.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Databesa on Body Mass Index: BMI classification. Disponível em: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. Atualizado em março de 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.

YOUNG, L.R.; NESTLE, M. The contribution of expanding portion sizes to the US obesity epidemic. **Am J Public Health**, v.92, n.2, p.246-9, 2002.