

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO (CHÁ) DE ERVA-MATE (*Ilex
paraguariensis*) SOBRE PARÂMETROS OXIDATIVOS EM
RATOS DIABÉTICOS**

Roxane Freire Duarte

Orientador: Luiz Carlos Kucharski

Co-orientador: Fernanda Freitas Caregnato

Trabalho escrito com base no modelo da revista *Free Radicals Research*

RESUMO

A diabetes melito (DM) se caracteriza por um grupo de distúrbios metabólicos identificados por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou de ambos. A diabetes causa hiperglicemia crônica, que é um fator desencadeador de aumento na produção de radicais livres, que são responsáveis por um agravamento da doença. A Erva-mate *Ilex paraguariensis* é uma espécie nativa das regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, principal componente da bebida popularmente conhecida como chimarrão. Vários trabalhos têm mostrado diferentes benefícios do consumo do chá mate devido a sua habilidade em combater as espécies reativas de oxigênio, já que possui em sua composição polifenóis, que são capazes de inibir a glicosilação não-enzimática das proteínas e a formação dos produtos finais dessa glicação, os AGE's que também são produzidas em excesso na diabetes. Foram utilizados os tecidos renais (córtex e medula), fígado e músculo de ratos Wistar machos. O objetivo foi apurar se o chimarrão era capaz de reverter o estresse oxidativo gerado pela diabetes. Para verificar os danos à proteínas e lipídios realizamos as técnicas de Carbonil e TBARS, onde córtex renal e fígado, do grupo dos diabéticos, apresentaram resultados significativos; para avaliar as defesas antioxidantes não-enzimáticas, utilizamos TRAP, onde somente o grupo dos Dbt no córtex mostrou resultados significativos. Podemos constatar que os órgãos reagem de diferentes formas ao tratamento com chá, ora combatendo, ora produzindo radicais livres.

Palavras-chave: estresse oxidativo, glicação, córtex renal, polifenóis, cafeína

1. INTRODUÇÃO

A Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma espécie nativa das regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, onde é popularmente conhecida como erva-mate [1]. É uma espécie que apresenta importância do ponto de vista econômico e social, devido ao hábito vinculado a essa macro região, que consiste no consumo do chimarrão e do tererê [2]. Nos países sul-americanos, o extrato de *Ilex paraguariensis* é consumido como mate, em proporções que chegam a um litro por dia, por milhões de pessoas e constitui a principal alternativa ao café e chá [3]. O mate é usado na medicina popular para o tratamento de artrite, reumatismo e outras doenças inflamatórias, dores de cabeça, obesidade, hipertensão, doenças hepáticas e distúrbios intestinais. Especula-se que o mate seja diurético, hipocolesterolêmico, e tenha propriedades lipolíticas [4].

Alguns autores sugerem que a ingestão da infusão pode ser uma importante fonte de minerais essenciais e vitaminas [5] e que essa planta provavelmente apresente propriedades farmacêuticas [6]. Um estudo sobre a composição mineral da erva-mate comercial revelou que a infusão apresenta altas concentrações de potássio, magnésio, manganês, intermediárias de enxofre, cálcio e fósforo, baixas de alumínio e zero de cádmio e chumbo. Além disso, as altas concentrações de potássio na infusão são importantes para pessoas hipertensas, podendo ser considerada uma característica farmacêutica [6].

Vários trabalhos têm mostrado diferentes benefícios do consumo do chá mate, devido a sua habilidade em combater as espécies reativas de oxigênio, e relacionam

essa propriedade com a atividade da enzima peroxidase. Isso significa, do ponto de vista biológico, que os polifenóis agem de forma similar as 293 enzimas antioxidantes naturais dos organismos. Esse potencial antioxidante é devido aos níveis de polifenóis presentes no chá [7,8]. O mate, ingerido como suplemento dietético, é capaz de aumentar as defesas antioxidantes contra os radicais livres, particularmente no desenvolvimento da aterosclerose [4]. *Ilex paraguariensis* contém as maiores concentrações de derivados de cafeíol, em comparação com as demais espécies de *Ilex*, que além de terem concentrações muito baixas, apresentam uma grande variação nas suas concentrações de ácido dicafeoilquínico. As altas concentrações desse composto é que conferem ao mate a sua capacidade antioxidante [9]. Numerosos fitoquímicos foram identificados como responsáveis pelos benefícios do mate na saúde. Entre eles, os dois mais citados são as metilxantinas e os polifenóis. As xantinas que são encontradas na *I. paraguariensis* são teobromina e cafeína, onde a cafeína é encontrada em maior concentração [10].

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um derivado da xantina, quimicamente relacionada com outras xantinas: teofilina (1,3-dimetilxantina) e teobromina (3,7-dimetilxantina). Elas se diferenciam pela potência de suas ações farmacológicas sobre o sistema nervoso central (SNC) [11]. A biotransformação da cafeína ocorre em maior proporção no fígado, no qual existe maior concentração de citocromo P450 1A2, enzima responsável pelo metabolismo desta substância [12]. Acredita-se que a cafeína possua mecanismos de ação central e periférica que podem desencadear importantes alterações metabólicas e fisiológicas [13] e que a ação estimulante da cafeína no SNC envolve a estimulação do sistema nervoso simpático, aumentando a liberação e, conseqüentemente, a ação das catecolaminas [14]. Uma segunda teoria pressupõe o efeito direto da cafeína sobre o músculo esquelético com alteração de

íons, particularmente sódio e potássio; inibição da fosfodiesterase, possibilitando um aumento na concentração de adenosina monofosfato cíclica (AMPc); efeito direto sobre a regulação metabólica de enzimas semelhantes às fosforilases (PHOS); e aumento na mobilização de cálcio através do retículo sarcoplasmático e, conseqüentemente, aumento dos níveis intracelulares de cálcio nos músculos, facilitando a estimulação-contração do músculo esquelético, aumentando a eficiência da contração [15]. Ela também acelera o metabolismo basal e o consumo de oxigênio pelos tecidos do corpo, estimulando a termogênese e a oxidação de gordura [16]

Evidências sugerem que os polifenóis podem modular a absorção e o metabolismo da glicose. Estudos têm relatado que um consumo elevado de café pode ser associados com um risco menor de diabetes tipo 2. Esse efeito pode ser atribuído ao ácido clorogênico, principal composto fenólico presente na erva-mate. Entretanto os mecanismos de ação do ácido clorogênico no metabolismo da glicose não estão completamente elucidados. Porém, alguns derivados sintéticos do ácido clorogênico inibiram a glicose-6-fosfatase *in vitro* e *in vivo* após administração intravenosa ou intraperitoneal, causando uma redução dos picos glicêmicos. Outro mecanismo proposto é a inibição do transporte de glicose pelas células intestinais. Alguns compostos fenólicos presentes no chá verde são capazes de interagir com SGLT1, o principal co-transportador de glicose no intestino delgado, inibindo o transporte de glicose provavelmente por mecanismos competitivos [17].

As condições de processamento da *llex*, como o tempo e a temperatura utilizados nas etapas de secagem, além de outros parâmetros como a variabilidade genética, tipo de solo, água e fertilizantes, podem variar entre os diversos produtores e têm influência direta sobre a qualidade, características organolépticas e a quantidade de substâncias bioativas do produto final [16,18]. 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 [19].

Os antioxidantes encontrados no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* tiveram seu efeito comprovado e considerado extremamente potente *in vitro*. De qualquer forma, pouco se sabe a respeito da biodisponibilidade dessas substâncias [20].

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados e por isso podem ser extremamente reativos e capazes de atacar inúmeras biomoléculas [21]. Os danos causados pelos radicais livres está relacionado com morte e degeneração celular e com inúmeras doenças, entre elas: diabetes, aterosclerose, insuficiência renal, entre outras. O estresse oxidativo ocorre quando a velocidade de geração das Espécies Reativas à Oxigênio (ERO) são superiores à capacidade de eliminação das mesmas.

Aragno e Mathers [22,23] demonstraram que o aumento das ERO e, conseqüentemente, dos danos, induzidos pela diabetes em vários tecidos, estão associados à geração de reações defensivas, para neutralizar tais danos, com o aumento da produção de moléculas antioxidantes.

A diabetes melito (DM) se caracteriza por um grupo de distúrbios metabólicos identificados por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou de ambos. A hiperglicemia crônica da diabetes está associada com danos a longo prazo, disfunções e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sangüíneos. Sintomas de severa hiperglicemia incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, algumas vezes polifagia e visão borrada. Disfunção

do crescimento e suscetibilidade a certas infecções também podem acompanhar a hiperglicemia crônica. Hipertensão e anormalidades no metabolismo de lipoproteínas também são geralmente associados com a diabetes.

Uma das principais bases moleculares das complicações diabéticas, devido à hiperglicemia, é a glicação de proteínas. Nesse processo, hexoses reagem de forma não-enzimática com os grupos amino das proteínas, resultando em produtos iniciais da glicação, como, por exemplo, a hemoglobina glicada [20]. Numa segunda fase da rota de glicação, uma série complexa de rearranjos e reações oxidativas, levam esse produto inicial a reagir novamente com proteínas e a formar os produtos finais da glicosilação não-enzimática, conhecidos como AGEs (*advanced glycated end-products*). Os AGEs são a forma final e estável dessa reação e são cumulativos no organismo, ou seja, suas concentrações não retornam ao normal mesmo quando a hiperglicemia é corrigida [20,24]. Podem ser encontrados no plasma, células e tecidos e se acumulam na parede arterial, no mesângio e glomérulo renais e em outras membranas. Esse acúmulo de proteínas glicadas pode fornecer sítios catalisadores ativos estáveis da formação de radicais livres. A aminoguanidina é um inibidor da glicosilação e atenua o desenvolvimento de uma gama de complicações vasculares nos diabéticos. No entanto, alguns problemas de toxicidade foram encontrados nos ensaios clínicos com esta droga. Por isso, se realizam estudos com compostos botânicos capazes de inibir o processo e servir como protótipo de futuros medicamentos. Sabe-se que extratos de ervas como *Ilex paraguariensis*, que possuem alta concentração de antioxidantes, têm essa capacidade [24].

Diabetes experimental: O modelo experimental de DM contribui para o entendimento das causas, conseqüências e tratamento desta doença. Para o seu desenvolvimento são utilizadas toxinas químicas (aloxano, estreptozotocina,

queladores de zinco), animais transgênicos, entre outros. A estreptozotocina (STZ) é empregada na indução da diabetes experimental devido a sua seletividade de ação sobre as células β das ilhotas pancreáticas. A estreptozotocina é uma nitrosuréia derivada de um fungo – *Streptomyces griseus* – que produz severa insuficiência de insulina em ratos, simulando então a diabetes tipo I [25]. Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com este modelo de diabetes do tipo I há alguns anos, buscando esclarecer diversos aspectos da doença [26]. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito sobre alguns indicadores de estresse oxidativo do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em ratos controle e diabéticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) – UFRGS e mantidos durante o período experimental pela Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, nas condições habituais do biotério com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura de 22 °C, alimentados com ração e água ou chá *ad libitum*.

A morte dos animais foi realizada por decapitação, e foram rapidamente retirados os rins, separados em córtex e medula, fígado e músculo e congelados à menos 70°C para posterior dosagens dos parâmetros de estresse oxidativo, no Centro de Estudos de Estresse Oxidativo, no Departamento de Bioquímica da UFRGS. As carcaças dos animais foram congeladas e posteriormente descartadas de acordo com a rotina da UEA – HCPA.

2.2 Protocolo Experimental

O diabetes foi induzido por uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) na dose de 70 mg/kg [27]. A STZ foi diluída em tampão citrato de sódio (0,01M, pH 4,5) e injetada até 10 minutos após a diluição dessa substância. Os animais controle receberam o mesmo volume de tampão citrato de sódio. Três dias após a injeção de STZ ou tampão foi feita a primeira dosagem glicêmica, com a retirada de sangue da veia caudal e a glicemia foi obtida com o auxílio de um glicosímetro (ACCU-CHEK). Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentaram concentração de glicose plasmática superior a 250mg/dL [28].

Após uma semana de diabetes, foi iniciado o tratamento com o chá. Foram utilizados 30 animais, que foram pesados e divididos em quatro grupos experimentais, e mantidos durante 5 semanas sob tratamento: 6 animais CTR-Água (animais controle tratados com água), 6 animais CTR-Chá (animais controle tratados com chá de erva-mate), 9 animais DBT-Água (animais diabéticos tratados com água) e 9 animais DBT-Chá (animais diabéticos tratados com chá de erva-mate). Foram mantidos 3 animais por caixa.

Como os ratos diabéticos ingerem uma quantidade de água cerca de três vezes maior do que os ratos controle, o chá foi preparado com esta correção. Para os ratos controle utilizamos 70g de erva-mate, misturada a um litro de água a 80°C, por 15 min, posteriormente coado e deixado esfriar até atingir a temperatura ambiente [29,30]. Após o período de 5 semanas de tratamento os animais foram mortos para posterior análises. Os órgãos: rins (separados em córtex e medula), fígado e músculo, foram retirados, pesados e congelados à -70°C para posterior análise dos parâmetros de estresse oxidativo.

2.3 Parâmetros de dano oxidativo

Como índice de peroxidação lipídica, utilizou-se a formação de espécie reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante uma reação de aquecimento do ácido, que é amplamente adotado como um método para avaliação do estado oxidativo dos lipídios, como descrito anteriormente [31]. As amostras foram homogenizadas com 0,6 mL de 10% de ácido tricloroacético (TCA) e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% (TBA, 4,6-*Dihydroxypyrimidine-2-tiol*), aquecidas a 90°C, por 25 min. A quantificação dos níveis de TBARS foi realizada através da leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol de malondeialdeído (MDA)/ mg de proteína.

O dano oxidativo a proteínas foi determinado através da quantificação de grupos carbonil, baseados na reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), como previamente descrito [32]. Resumidamente, as proteínas foram precipitadas pela adição de 20% de TCA, redissolvido em DNPH e absorbância lida em espectrofotômetro a 370nm. Os resultados foram expressos como μmol de carbonil/ mg de proteína.

2.4 Defesas antioxidantes não-enzimáticas

Para análise do potencial antioxidante não enzimático das estruturas foi estimado o potencial antioxidante total (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR) [33]. A reação é iniciada pela adição de luminol (5-Amino-2,3-dihidro-1,4-phthalazinedione, 4 mm) - para acompanhamento da produção de radical na presença

do composto AAPH (2,2'-azobis-2-methylpropionamidine- dicloridrate de 10 mm) - uma fonte de radicais livres, que produz radical peróxido a taxa constante - em tampão glicina (0,1 M) pH 8,6, em temperatura ambiente, resultando em uma emissão de luminescência estável. A quimioluminescência foi lida em um contador de cintilação líquida (Wallace 1409), sendo as leituras realizadas a cada minuto. As amostras adicionadas diminuem a luminescência proporcionalmente ao seu potencial antioxidante. As emissões de luminescência foram monitoradas por 40 minutos após a adição da amostra e a área sob a curva foi utilizada para fins de cálculo (UAC). No TAR, os resultados do protocolo foram expressos como porcentagem da produção de radicais livres em relação ao controle (sistema de contagens considerado como 100% da produção de radicais).

2.5 Análise estatística

As concentrações médias de TBARS, carbonil e dos níveis de defesas antioxidante não-enzimáticas em ratos diabéticos tratados ou não com erva-mate foram comparados através de análise de variância de uma via (ANOVA), sendo as diferenças discriminadas através de teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Composição do extrato aquoso – erva mate

Foram determinados os teores de polifenóis (Tabela 1), metilxantinas (Tabela 2) e saponinas de três preparações do extrato aquoso semelhantes às que foram oferecidas aos animais durante todo o tratamento.

A Tabela 1 mostra as quantidades dos polifenóis que, pela técnica cromatográfica aplicada, puderam ser identificados. Porém, outras 3 quantidades de compostos que não tiveram sua natureza química totalmente elucidada foram encontrados e há fortes indícios de que sejam derivados do ácido cafeiolquínico, assim como o ácido neoclorogênico, clorogênico e criptoclorogênico. Portanto, esses compostos são os constituintes principais presentes no extrato aquoso de *I. paraguariensis*.

Quanto às metilxantinas apresentadas na Tabela 2, pode-se observar que a concentração de cafeína no extrato é aproximadamente 5 vezes superior a concentração de teobromina. Isso indica que a cafeína é a metilxantina encontrada em maiores quantidades no extrato aquoso que foi oferecido aos animais durante o período experimental.

Ainda foram realizados dois métodos de análises exploratórias com o objetivo de quantificar saponinas nas amostras, porém nenhum dos métodos foi capaz de detectar a quantidade existente de saponinas no extrato. Provavelmente, o método de preparo do extrato de erva-mate utilizado no estudo não é um método adequado para extração de saponinas.

3.2 Indução do Diabetes

Dos 20 animais que receberam a injeção de estreptozotocina, 18 apresentaram glicemia acima de 250 mg/dL, três dias após a indução do diabetes, e foram divididos nos dois grupos experimentais já citados anteriormente. Os 2 animais que não atenderam ao critério de seleção foram descartados do experimento. Além destes, outros 12 animais não diabéticos (controle) foram incluídos no experimento. Não houve perdas adicionais durante o período experimental.

3.3 Parâmetros de Dano oxidativo

A figura 1 nos mostra que córtex renal teve um aumento significativo do dano lipídico no grupo Dbt água, comparados com os outros grupos, e uma redução no grupo Dbt chá. Os valores de TBARS foram maiores no córtex renal comparado com os outros tecidos analisados. A medula renal e o músculo não apresentaram alterações significativas nos níveis de TBARS. O fígado também teve um aumento significativo da lipoperoxidação no grupo Dbt água, mas o chá não foi capaz de reverter este efeito no grupo Dbt chá. A figura 2 apresenta os resultados dos danos causados às proteínas. Novamente o córtex renal do grupo Dbt água teve um aumento da carbonilação das proteínas e o grupo dos diabéticos tratados com chá, apresentaram uma redução dos níveis de carbonilação, quando comparados com o diabético tratado com água. Na medula renal o grupo dos diabéticos teve uma diminuição de danos à proteína, sendo que no grupo Dbt chá, esta diminuição foi significativa. No fígado, o grupo Dbt chá teve nível de carbonilação significativamente

aumentado em relação ao grupo Ctr água. O músculo novamente não teve alterações significativas nos níveis de carbonilação.

3.4 Perfil de defesas antioxidantes não-enzimáticas

O córtex renal apresentou um aumento das defesas antioxidantes, conforme mostrado na Figura 3, nos diabéticos tratados com chá e água. Indicando então que quanto menor o valor do TRAP obtido, maior são os níveis das defesas antioxidantes não-enzimáticas encontrados nas amostras.

Já na medula renal, não foram observadas alterações significativas, como observado na Figura 4, nem no grupo dos diabéticos, nem nos controles.

Nas figuras 5 e 6 podemos constatar que o fígado e o músculo, respectivamente, não apresentaram uma alteração significativa nas defesas antioxidantes não-enzimáticas em nenhum dos grupos.

4. DISCUSSÃO

Ilex paraguariensis é uma planta que contém inúmeras vitaminas e minerais necessários para o sustento da vida, como as vitaminas do complexo B (B1 – tiamina, B2 – riboflavina, e B3 – niacina), vitaminas A, C e E; os minerais potássio, magnésio, cálcio, manganês, ferro, selênio, fósforo e zinco, dentre outros. Além dos polifenóis, a erva-mate ainda contém saponinas e metilxantinas, dentre elas a cafeína, teofilina e teobromina [16,34]. Estudos sugerem que os polifenóis apresentam características

anti-carcinogênicas, anti-aterogênicas, anti-trombóticas, vasodilatadora e analgésica devido ao seu alto poder antioxidante [35].

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 [36], pois pode representar uma grande fonte adicional de polifenóis naturais. O excesso de radicais livres pode estar envolvido com o diabetes e a aterosclerose [20] e alguns estudos acreditam que o ácido clorogênico seja um potente anti-diabético presente na erva-mate, mostrando que esse polifenol é capaz de diminuir a produção de glicose pelo fígado, através de uma inibição dose-dependente da gliconeogênese e da glicogenólise [37]. Herling et al. [38] encontrou resultados semelhantes, quando obteve uma menor produção de glicose hepática, diminuição da glicemia, acompanhados por um aumento do glicogênio hepático e renal através da inibição da enzima glicose-6-fosfatase. Esses polifenóis também foram avaliados sobre parâmetros relacionados ao diabetes no que diz respeito à redução do pico de glicemia no teste de tolerância oral a glicose, provavelmente por atenuar a absorção intestinal de glicose [39]. Algumas pesquisas sugerem que alguns compostos fenólicos presentes na erva-mate são capazes de interagir com SGLT1 (*sodium glucose transporter*), principal cotransportador de glicose no intestino delgado, inibindo o transporte de glicose [17].

A diabetes causa hiperglicemia crônica, a qual é um fator desencadeador de aumento na produção de radicais livres, que são responsáveis pelo agravamento da doença [40]. Lunceford e Gugliucci [8] ainda relataram que o extrato de *Ilex paraguariensis* é rico em polifenóis capazes de inibir a glicosilação não-enzimática das proteínas e a formação dos produtos finais dessa glicação, os AGE's (*advanced glycated end-products*) que também são produzidas em excesso na diabetes.

Nosso estudo mostrou que os órgãos dos ratos diabéticos respondem de forma bem diferente ao tratamento com erva-mate, quando relacionados ao estresse oxidativo e defesas antioxidantes não-enzimáticas. O córtex renal apresentou maior dano em todos os grupos diabéticos, tanto na carbonilação de proteínas, quanto na lipoperoxidação, mas o tratamento com chimarrão nos diabéticos foi capaz de reverter esse dano, quando comparados com animais diabéticos tratados com água. Esses dados nos indicam que provavelmente houve a ação antioxidante esperada pelo tratamento com chimarrão. Na medula, porém, a lipoperoxidação não teve alterações significativas. Já os níveis de carbonilação foram diminuídos significativamente nos ratos diabéticos, evidenciando uma diminuição ainda maior nos tratados com o chá, mostrando aqui o potencial protetor que a medula pode estar apresentando, em função dos danos provocados pela doença e que foi intensificado com pela erva mate.

O rim se apresenta como um caso bem particular. Esse órgão possui duas regiões bem distintas, córtex e medula, e cada parte realiza funções específicas. A medula, formada pelas alças de Henle e ductos coletores, participa de maneira importante na concentração de urina, já o córtex, formado pelos glomérulos, é responsável pelo primeiro passo da filtração e ainda tem um importante papel na gliconeogênese no jejum prolongado. E foi justamente por isso que realizamos as avaliações com estas estruturas separadamente. Entretanto a diabetes causa diversas alterações nos rins, além da hiperglicemia crônica, a glicosúria perda do excesso de glicose pela urina, nefropatia diabética caracterizada pela gloméruloesclerose e a produção de corpos cetônicos que igualmente são eliminados pelo rim. De alguma forma provavelmente essas alterações poderiam interferir nas diferentes características oxidativas encontradas no córtex e medula, por isto se

obteve diferentes resultados nos danos causados à proteínas (carbonilas) e lipídios (TBARS) nos ratos diabéticos.

O fígado de animais diabéticos apresentou um aumento no conteúdo de lipídios oxidados, provavelmente devido ao excesso de proteínas glicadas e às AGEs geradas pela doença, e o tratamento com chimarrão não foi capaz de reverter esse dano. Quando avaliados os parâmetros de carbonilação, observou-se um aumento no dano a proteínas em diabéticos e um dano ainda maior quando tratados com chimarrão, indicando aqui uma aparente inversão do que se esperava, quanto ao papel protetor do mate. Podemos então hipotetizar que o fígado, sendo bastante deteriorado durante a diabetes, produz uma quantidade muito grande de EROs e de enzimas antioxidantes para tentar combatê-los, mas nesses casos, como o dano provavelmente é excessivo, os compostos presentes no chimarrão acabam tendo um potencial pró-oxidante e piorando os efeitos dos radicais no órgão.

O músculo não apresentou diferença estatística para danos à proteína, nas carbonilas, nem à lipídios, no TBARS. A maior parte da eliminação de glicose mediado pela insulina ocorre no músculo esquelético e o aumento da quantidade de lipídios intramocelular tem sido associada à resistência à insulina e ligadas à diminuição da atividade de fosforilação oxidativa mitocondrial. Estudos [41] mostram redução da atividade das enzimas oxidativas no músculo de diabetes tipo 2, independentes do tipo de fibra muscular, com mitocôndrias danificadas. Os músculos esqueléticos são muito afetados pela diabetes, já que acelera muito o processo oxidativo, na tentativa de gerar glicose, ocasionando um aumento considerável de espécies reativas. Acreditamos que um dos motivos para essas diferenças encontradas entre os diferentes tecidos, seja devido ao tempo de tratamento, a dose de erva mate administrada e ao número de animais.

Quando analisamos o potencial das defesas antioxidantes, somente o córtex renal apresentou um aumento significativo nos ratos diabéticos, tratados com chá e água, indicando que não é, portanto, o chá o responsável pelo aumento dessas enzimas antioxidantes. Provavelmente seja uma resposta antioxidante do organismo aos danos causados implicitamente pela diabetes. Corroborando com nossos dados, estudos anteriores de nosso laboratório [26], demonstraram que a diabetes já é suficiente para aumentar o conteúdo de glutathione, um potente antioxidante não-enzimático e que, portanto, o chimarrão não é capaz de aumentar esse potencial extrinsecamente.

No fígado não foi encontrado um aumento nas defesas antioxidantes não-enzimáticas, explicado, talvez, porque se observou um considerável aumento nos danos à proteína e lipídios.

O músculo não apresentou nenhuma alteração no conteúdo de defesas antioxidantes não-enzimáticas totais. Como também não foi encontrada nenhuma alteração nos parâmetros analisados, é possível sugerir que a falta de diferenças tenha ocorrido devido ao tempo de tratamento, ou às doses administradas, ou ainda ao tamanho da unidade amostral. Como o músculo sofre um processo de proteólise em animais diabéticos, este poderia ser um dos motivos de não ser observado alterações significativas no estresse oxidativo.

Em função dos resultados obtidos nesse trabalho é importante que seja feita a avaliação de outros parâmetros de avaliação de estresse oxidativo para que se possa ter uma idéia mais precisa do efeito do tratamento com erva mate em animais diabéticos.

5. CONCLUSÃO

Concluimos, com o presente estudo, que realmente os tecidos dos ratos diabéticos se comportam de diferentes maneiras, quando tratados com o chá de *Ilex paraguariensis*, no que se refere aos parâmetros oxidativos estudados. O chá que parece ser benéfico em alguns momentos, revertendo alguns casos de danos oxidativos somente em alguns tecidos, e produzindo danos consideráveis em outros momentos. Diante de tais resultados acreditamos que o uso do chimarrão deve ser feito com parcimônia particularmente em diabéticos. Entretanto estudos posteriores com outros indicadores de estresse oxidativo e/ou sistemas protetores devem ser realizados para elucidar mais alguns aspectos do perfil oxidativo dos tecidos estudados em função de que em um primeiro momento parecem contraditórios.

6. REFERÊNCIAS

- [1] GNOATTO, S.C.B.; BASSANI, V.L. Influência do método de extração no teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. St.-Hil., aquifoliaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 304-307, 2007
- [2] SCHUBERT, A *et al.* Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. ST. – HIL (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1233-1236, 2006
- [3] 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
- [4] 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
- [5] STAGG, G.V.; MILLIN, D.J. The nutritional and therapeutic value of tea – a review. **J Sci Food Agri**, v.26, p.1439-1459, 1975.

- [6] 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
- [7] SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DAVILA, V.; de BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochem Bioph Res Co**, v.269, p. 357– 60, 2000.
- [8] LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v.76, p.419–27, 2005
- [9] FILIP, R. *et al.* Phenolic compound in Seven American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 774-778, 2001
- [10] HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **J Food Sci**, v.72, n.9, p.138-151, 2007
- [11] GEORGE, A.J. Central nervous system stimulants. **Best Pract Res Cl En**, v.14, n.1, p.79-88, 2000.
- [12] KALOW, W.; TANG, B. The use of caffeine for enzymatic assays: A critical appraisal. **Clin Pharmacol Ther**, v.53, n.3, p.503-514, 1993
- [13] GRAHAM, T.E.; RUSH, J.W.; VAN SOEREN, M.H. Caffeine and exercise: metabolism and performance. **Can J Appl Physiol**, v.19, n.2, p.111-138, 1994.
- [14] YAMADA, Y.; NAKAZATO, Y.; OHGA, A. The mode of action of caffeine on catecholamine release from perfused adrenal glands of cat. **Br J Pharmacol**, v.98, n.2, p.351- 356, 1989.
- [15] SPRIET, L.S. Caffeine and performance. **Int J Sports Nutr**, v.5, n.1(suppl), p.S84-99, 1995.
- [16] BASTOS, D. H. M. *et al.* Yerba maté: Pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, p. v. 1, n.1, 37 - 46, 2007
- [17] OLIVEIRA, D.M.; FREITAS, H.S.; SOUZA, M.F.F.; ARÇARI, D.P.; RIBEIRO, M.L.; CARVALHO, P.O.; BASTOS, D.H.M. Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) Aqueous Extract Decreases Intestinal SGLT1 Gene Expression but Does Not Affect Other Biochemical Parameters in Alloxan-Diabetic Wistar Rats. **J Agric Food Chem**, v. 56 n. 22, p. 10527–10532, 2008.
- [18] RESENDE, M. D. V. *et al.* **Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela EMBRAPA**: Resultados da avaliação genética de populações, progênes, indivíduos e clones. Colombo-PR: Embrapa Florestas (Circular Técnica), v. 43, p. 1 - 67, 2000.
- [19] GIULIAN, Raquel. **Estudo da composição elementar da erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Física. 2005.

- [20] 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
- [21] HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, G. C. M. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- [22] ARAGANO, M. *et al.* DHEA administration prevents the oxidative damage induced by acute hyperglycemia in rats. **J Endocrinal**, v. 155, n.2, p. 233-240, 1997.
- [23] MATHERS, J. *et al.* Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. **Biochem Soc Symp**, n. 71, p. 157 – 176, 2004
- [24] LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 419 - 427, 2005
- [25] PICKUP, J.; WILLIAMS, G. Textbook of Diabetes. 2 ed. Blackwell Science, 1998. 164p.
- [26] JAHN, M.P.; JACOB, M.H.; JANNER, D.R.; GOMES L.F.; PERSCH, K.; RIBEIRO, M.F.M.; KUCHARSKI, L.C. Efeito da DHEA sobre a ingestão de alimento e sobre o metabolismo muscular na **diabetes**. XXVIII Semana Científica do HCPA, 2008
- [27] TAKEUCHI, K. *et al.* Introduction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats. **Digestive Diseases and Sciences**, n. 39 v. 3, 1994.
- [28] PACKER, L. *et al.* **Antioxidants in diabetes management**. Ed. Marcel Dekker, New York, 2000.
- [29] 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.
- [30] JAHN, Matheus Parmegiani. **Efeito osmótico da colina e da glicina betaína no rim de ratos diabéticos**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia. Porto Alegre, 2004
- [31] H.H. Draper and M. Hadley, Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, *Methods Enzymol* **186** (1990), pp. 421–431
- [32] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent and A.G. Lenz *et al.*, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol* **186** (1990), pp. 464–478
- [33] E. Lissi, M. Salim-Hanna, C. Pascual and M.D. del Castillo, Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements, *Free Radic Biol Med* **18** (1995), pp. 153–158

- [34] 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.
- [35] 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
- [36] SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clinical Nutrition.**, v. 24, n. 3, p. 360-366, 2005.
- [37] HEMMERLE, H. et al. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphatase translocase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 137 - 145, 1997
- [38] HERLING, A. W. et al. Alterations of carbohydrate and lipid intermediary metabolism during inhibition of glucose-6-phosphatase in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 386, n. 1, p. 75 - 82, 1999.
- [39] BASSOLI, B. K. et al. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. **Cell Biochemistry and Function**, v. 23, n. 6, p. 320 - 328, 2008.
- [40] BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v.40, n.4, p.405-412, 1991.
- [41] RABOL, R. et al. Mitochondrial oxidative function and type 2 diabetes. **Appl Physiol Nutr Metab**. V. 31, P. 675-83, 2006.

7. TABELAS

Resultado da análise quantitativa de polifenóis em extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*.

Tabela 1 - Resultado da análise quantitativa de polifenóis

	Ácido neoclorogênico	Ácido clorogênico	Ácido criptocloro	Rutina	TOTAL
Média (mg/mL)	1,36 ± 0,49	0,78 ± 1,08	0,57 ± 6,33	0,32 ± 4,71	5,55 ± 1,52

Os dados são expressos como média ± DPM.

Resultado da análise quantitativa de metilxantinas em extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*.

Tabela 2 - Resultado da análise quantitativa das metilxantinas

	Teobromina	Cafeína	TOTAL
Média (µg/mL)	13,79 ± 2,79	72,69 ± 5,96	86,48 ± 5,45

Os dados são expressos como média ± DPM.

8. LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1.

Avaliação dos níveis de TBARS no rim e córtex renal, fígado e músculo de animais controle e diabéticos tratados com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. Dados estão expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferentes do controle. Diferenças foram determinadas por ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey, $P < 0,05$. (n=5 para cada grupo).

Figura 2.

Avaliação dos níveis de carbolinas no rim e córtex renal, fígado e músculo de animais controle e diabéticos tratados com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. Dados estão expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferentes do controle. Diferenças foram determinadas por ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey, $P < 0,05$. (n=5 para cada grupo)

Figura 3.

Potencial não-enzimático de córtex renal de animais controle e diabéticos tratados com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. (A) TRAP e (B)TAR. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferentes do controle. Diferenças foram determinadas por ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey, $P < 0,05$. (n=5 para cada grupo)

Figura 4.

Potencial não-enzimático de medula renal de animais controle e diabéticos tratados com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. (A) TRAP e (B)TAR. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferentes do controle. Diferenças foram determinadas por ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey, $P < 0,05$. (n=5 para cada grupo)

Figura 5.

Potencial não-enzimático de fígado de animais controle e diabéticos tratados com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. (A) TRAP e (B)TAR. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferentes do controle. Diferenças foram determinadas por ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey $P < 0,05$. (n=5 para cada grupo)

Figura 6.

Potencial não-enzimático de músculo de animais controle e diabéticos tratados com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. (A) TRAP e (B)TAR. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. *Diferentes do controle. Diferenças foram determinadas por ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey, $P < 0,05$. (n=5 para cada grupo).

9. FIGURAS

FIGURA 1

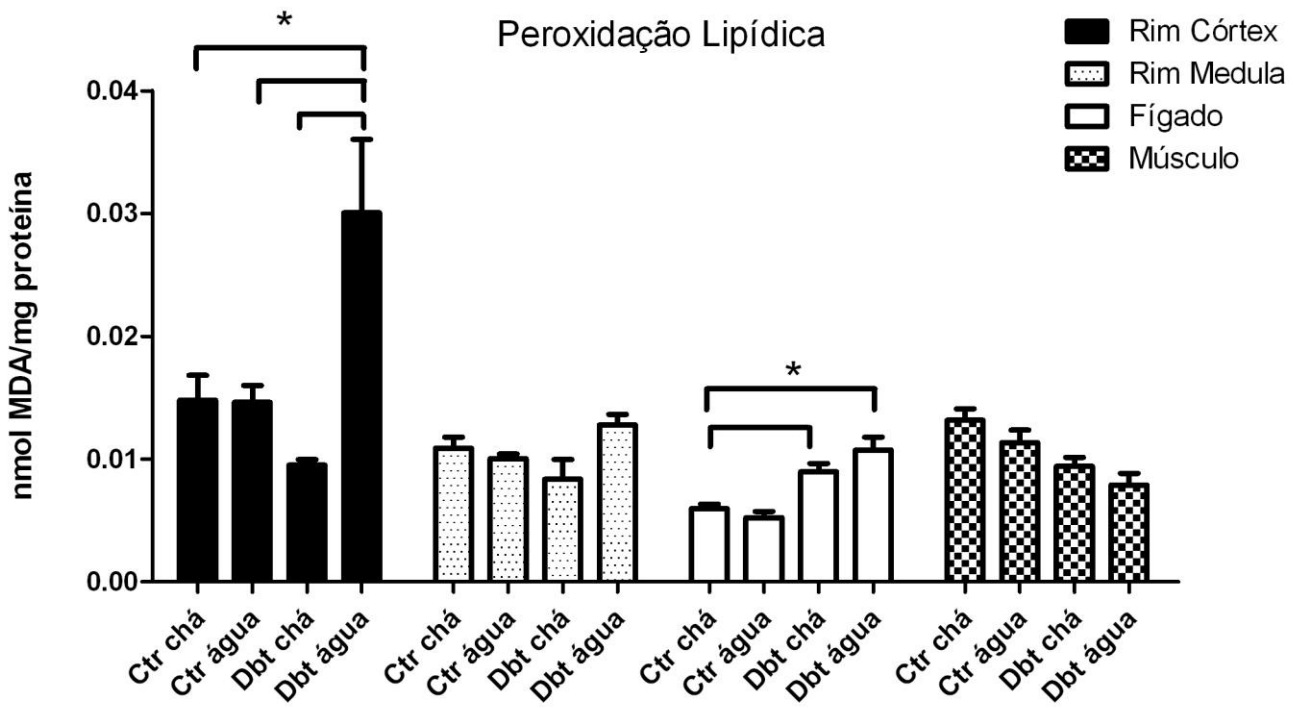


FIGURA 2

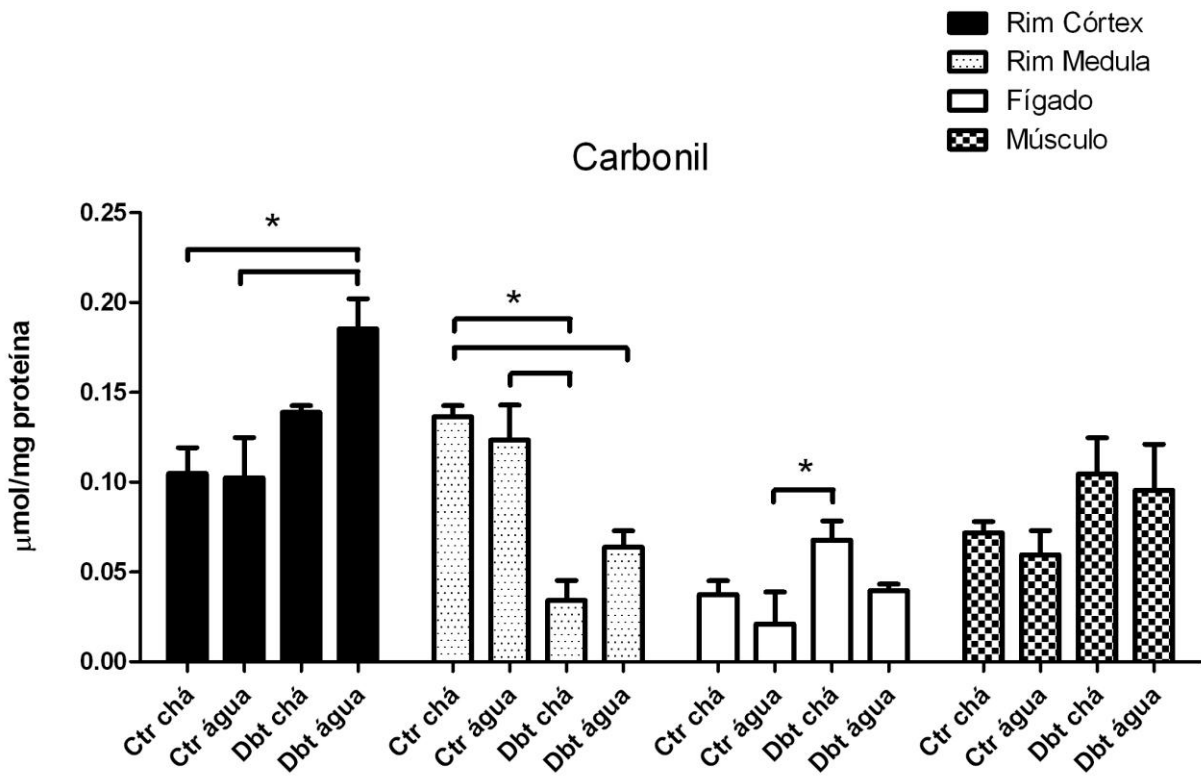
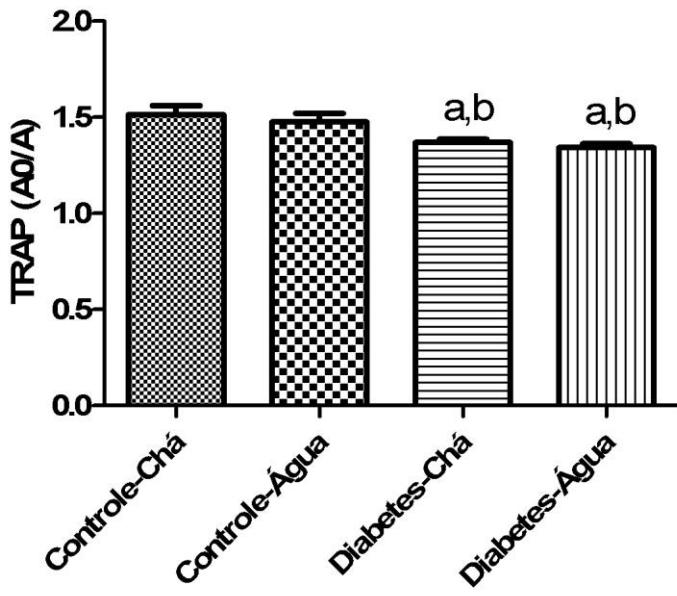


FIGURA 3

A)



B)

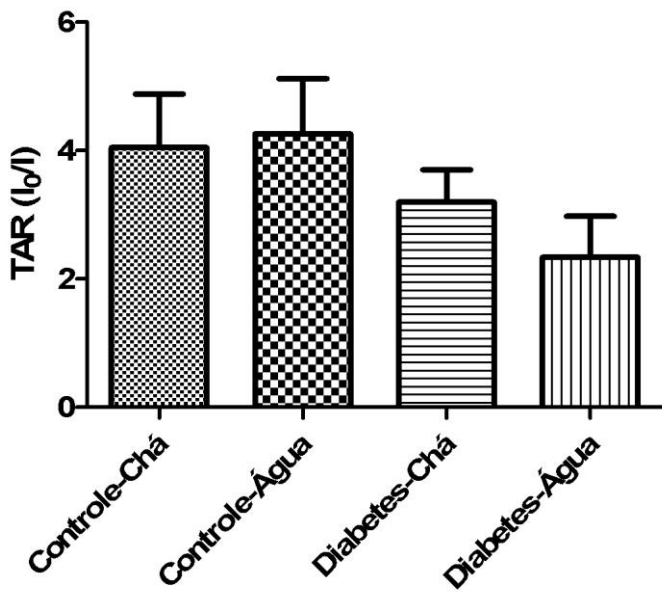
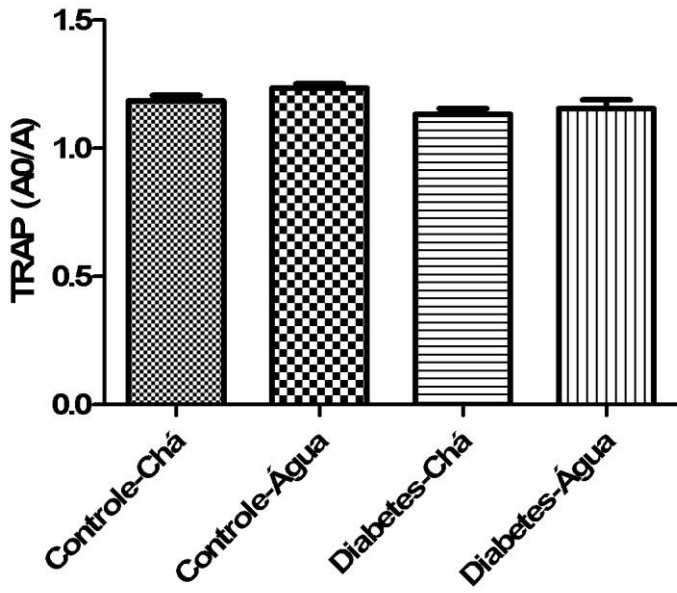


FIGURA 4

A)



B)

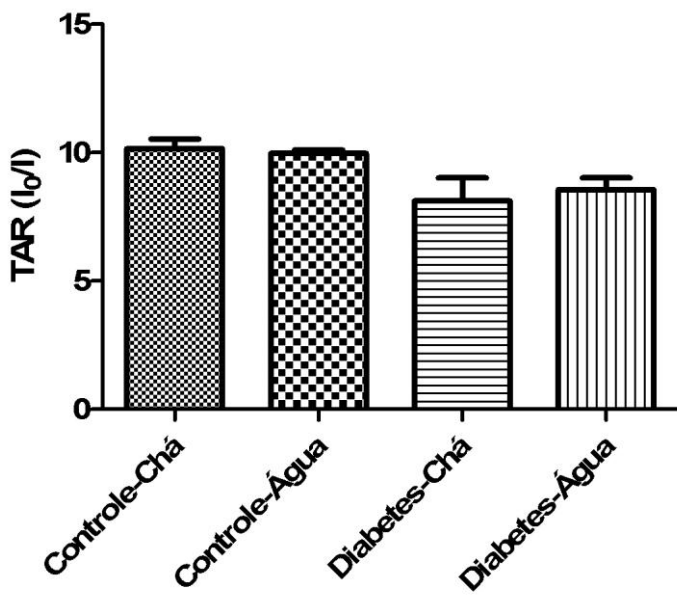
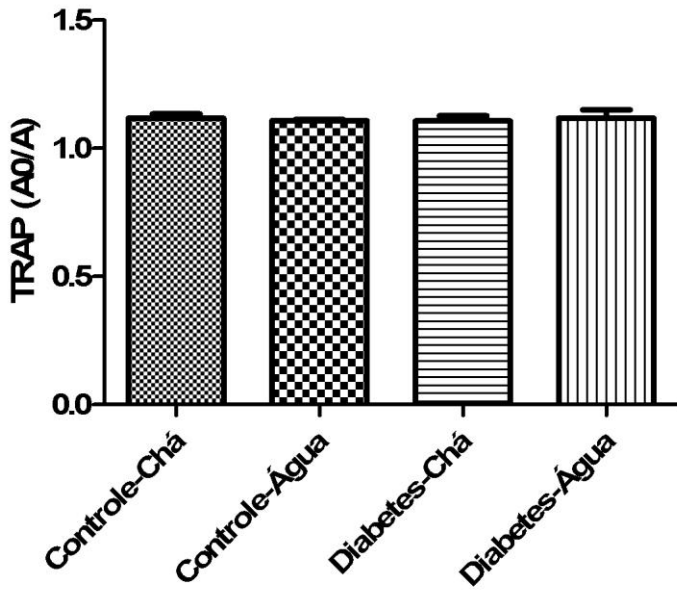


FIGURA 5

A)



B)

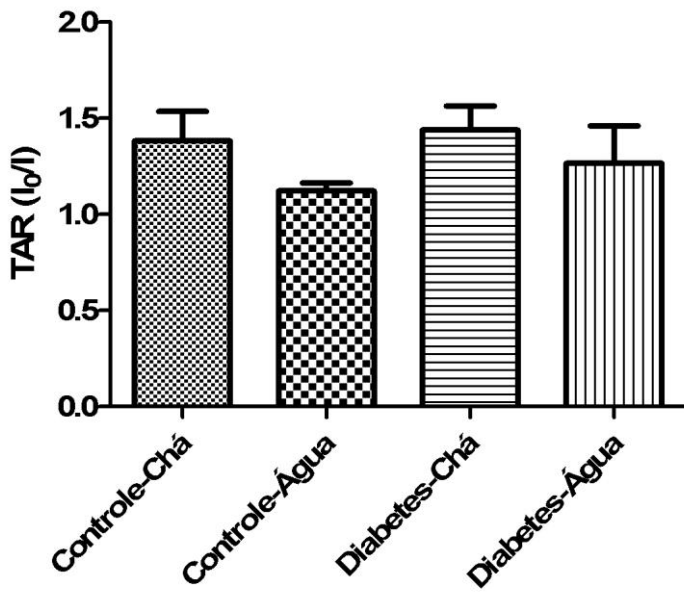
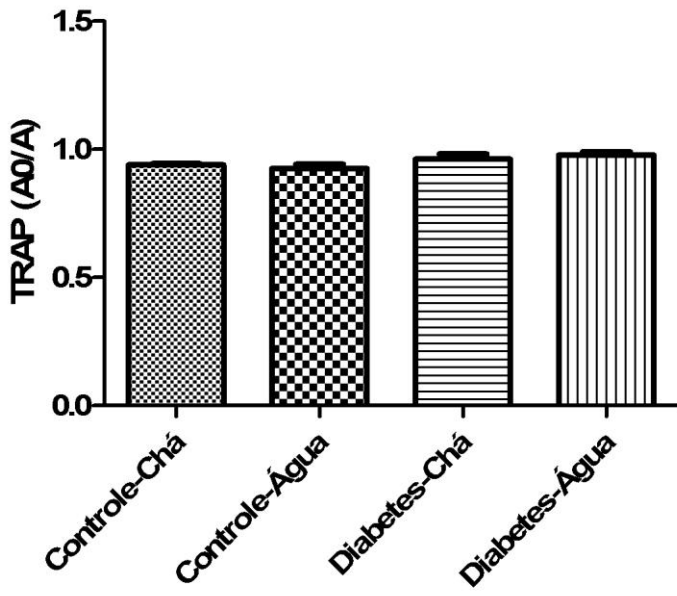


FIGURA 6

A)



B)

