

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
MESTRADO EM FISILOGIA**

DIANE SILVEIRA

**EFEITOS DO EXTRATO DE PU ERH (*Camellia sinensis*) NO
METABOLISMO INTERMEDIÁRIO E NA ATIVIDADE DA PARAOXONASE 1
EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

PORTO ALEGRE

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DIANE SILVEIRA

**EFEITOS DO EXTRATO DE PU ERH (*Camellia sinensis*) NO
METABOLISMO INTERMEDIÁRIO E NA ATIVIDADE DA PARAOXONASE 1
EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação de Mestrado submetido ao Programa
de Pós Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul.

Orientadora: Prof.^a Dr^a. Marcia Trapp

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski

PORTO ALEGRE

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram comigo nesta jornada. Principalmente meus amigos, em particular cito o Rafael Perfeito, que sempre me apoiou desde o início da minha graduação e mesmo com os contratempos da vida continua a me apoiar, e minhas amigas que mais me ouviram, mais cuidaram de mim nesse tempo todo, Maiza e Karine.

Agradeço também a minha família, em especial minha mãe, Raquel, que no início do meu mestrado descobriu um câncer, obrigada por me ensinar a lutar. E também a minha dinda, Fabiana, que sempre ouve e compra as minhas ideias malucas.

Agradeço a minha orientadora, Marcia, que sempre me acolheu, me ouviu, me disse que ficaria tudo bem, que acreditou no meu potencial, mesmo nos momentos que eu desacreditei. Muito obrigada, teu carinho e paciência foram fundamentais. Ao meu co-orientador, Luiz, agradeço por todo o auxílio neste trabalho, pelo bom humor diário e também pelos doces deixados no laboratório.

Também aos meus colegas de laboratório (que também estão inclusos nos amigos, mas resolvi reforçar) que sempre ofereceram auxílio na realização dos experimentos e análises, pela companhia que tornou os dias de trabalho mais leves e divertidos.

Agradeço também a Tea Shop, por ter fornecido o chá para o estudo. Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela formação e pelo suporte financeiro.

Agradeço a todos que fizeram este projeto sair do papel. Muito obrigada!

RESUMO

A obesidade é considerada um dos principais fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares (DCV) e dislipidemias. A paraoxonase 1 (PON1) plasmática é uma enzima produzida no fígado e liberada para a circulação junto com a lipoproteínas de alta densidade (HDL). Quanto menor a atividade da PON1, maior o nível de triacilgliceróis (TGC) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e menores as taxas de HDL séricos. O extrato do Pu Erh (*Camellia sinensis* altamente fermentada) tem sido associado com a diminuição dos níveis de TGC e colesterol total em ratos. Contudo, nenhuma investigação tem sido feita quanto à associação do tratamento com extrato de Pu Erh e atividade da PON1 em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do extrato de Pu Erh (*Camellia sinensis*) no perfil bioquímico plasmático, no metabolismo intermediário e na atividade sérica da PON1 em ratos Wistar adultos, machos, alimentados com dieta hiperlipídica por 13 semanas.

Inicialmente a composição do extrato de Pu Erh foi avaliada, assim como a sua capacidade antioxidante. Após, 60 ratos Wistar machos adultos (60 dias) foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos: dieta padrão e água (DPA), dieta padrão e extrato de Pu Erh, dose 1 (1g de chá para 150mL) (DPP1), dieta padrão e extrato de Pu Erh, dose 2 (2g de chá para 150mL de água) (DPP2), dieta hiperlipídica e água (DHA), dieta hiperlipídica e extrato de Pu Erh, dose 1 (DHP1), dieta hiperlipídica e extrato de Pu Erh, dose 2 (DHP2). Foram realizadas semanalmente estimativas de consumo de líquido e ração e medidas do peso dos animais. Nas 4, 8 e 12 semanas, foi realizado teste de tolerância à glicose (TTG) e calculada a área sobre a curva. Ao

final de treze semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados e os experimentos *in vitro* referentes à oxidação de glicose e à lipogênese, no tecido adiposo branco retroperitoneal (TABr) e no tecido hepático, e a glicogênese, no tecido hepático, foram realizados. Parâmetros bioquímicos e a atividade da enzima PON1 foram medidos no soro. As concentrações de glicogênio, lipídios totais e triglicerídeos foram medidas no tecido hepático. A análise do extrato de Pu Erh demonstrou a presença de cafeína, epicatequina e catequina, o que é compatível com o Pu Erh do tipo *Rippend*. Além disso, o extrato apresentou atividade antioxidante. A dieta hiperlipídica causou aumento na concentração sérica de TGC e colesterol total, assim como, no risco aterosclerótico. O tratamento com extrato de Pu Erh reduziu significativamente esses parâmetros. As concentrações de glicose e insulina foram aumentadas pela dieta, mas o chá não causou retorno aos valores controle. A dieta hiperlipídica reduziu a oxidação de glicose e a lipogênese a partir de ^{14}C -glicose no fígado e o chá não reverteu essa alteração. No TABr, a dieta hiperlipídica também reduziu a lipogênese e a oxidação a partir de ^{14}C glicose, mas o chá estimulou a via da lipogênese. Além disso, a dieta causou aumento nas concentrações de bilirrubina direta o que indica alteração no metabolismo dos hepatócitos ou ductos biliares, com possível comprometimento da função hepática. O extrato reduziu esses parâmetros, mostrando efeito protetor hepático nas doses estudadas. O tratamento com extrato de Pu Erh, em doses semelhantes às utilizadas em preparações de chás para humanos, não alterou a atividade da PON1 plasmática. Contudo, apresentou efeito benéfico na dislipidemia induzida por dieta hiperlipídica reduzindo TGC plasmáticos e risco coronário.

ABSTRACT

Obesity is currently considered a key risk factor for chronic non-communicable diseases such as type 2 *diabetes mellitus*, cardiovascular diseases and dyslipidemia. Plasma paraoxonase 1 (PON1) is an enzyme produced in the liver and released into the circulation along with HDL. PON1 activity is associated with dyslipidemias. In this regard, the reduction in PON1 activity causes an increase in the concentrations of triacylglycerols (TGC) and low density lipoproteins (LDL), as well as a decrease in the concentration of high density lipoproteins (HDL). In the search for obesity treatments, Pu Erh extract (highly fermented *Camellia sinensis*) has been associated with decreased TGC and total cholesterol levels in rats. However, no investigation has been done regarding the association of treatment with Pu Erh extract and PON1 activity in animals fed a high-fat diet. Thus, the aim of this work was to evaluate the effects of Pu Erh extract (*C. sinensis*) on the plasma biochemical profile, on the intermediary metabolism and on the serum activity of PON1 in adult male Wistar rats fed a high-fat diet. Initially, the composition and antioxidant capacity of the Pu Erh extract was evaluated. After, 60 adult male Wistar rats (60 days old) were randomly distributed into 6 groups: standard diet and water (SDW), standard diet and Pu Erh extract, dose 1 (1g tea per 150mL of water) (SDP1), standard diet and Pu Erh extract, dose 2 (2g of tea per 150mL of water) (SDP2), high-fat diet and water (HDW), high-fat diet and Pu Erh extract, dose 1 (HDP1), high-fat diet and Pu Erh extract, dose 2 (HDP2). Estimates of liquid and feed intake and animal weight measurements were performed weekly. At 4, 8 and 12 weeks, the glucose tolerance tests (TTG) were performed, and the areas under the curve were calculated. At the end of thirteen weeks of treatment, the animals were euthanized and the in vitro

experiments were conducted. Glucose oxidation and lipogenesis were analyzed in both in retroperitoneal white adipose tissue (TAb) and in liver tissues. Glycogenesis was evaluated only in the liver. Biochemical parameters and PON1 enzyme activity were measured in serum. The concentrations of glycogen, total lipids and TGC were measured in liver. The analysis of Pu Erh extract demonstrated the presence of caffeine, epicatechin and catechin, which is compatible with Rippend-type Pu Erh. In addition, the extract presented antioxidant activity. The high-fat diet caused an increase in the serum concentration of TGC and total cholesterol, as well as in the atherosclerotic risk. Treatment with Pu Erh extract significantly reduced these parameters. Glucose and insulin concentrations were increased with diet, but Pu Erh treatments were not able to reverse them. The high-fat diet reduced glucose oxidation and lipogenesis from ¹⁴C-glucose in the liver, yet tea did not reverse these results. In TAb, the high-fat diet also reduced lipogenesis and oxidation from ¹⁴C glucose, but tea stimulated the lipogenesis pathway. In addition, the diet caused an increase in direct bilirubin, which indicates an alteration in the metabolism of hepatocytes or bile ducts, with possible impairment of liver function. The extract reduced these parameters, showing a protective effect on the liver at the studied doses. Treatment with Pu Erh extract, at similar doses to those used in human tea preparations, did not alter plasma PON1 activity. However, there was a beneficial effect on high fat diet-induced dyslipidemia, reducing plasma TGC and coronary risk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeitos e modulações biológicas de Paraxonase1.....	18
Figura 2. Desenho experimental: descrição dos procedimentos e dos grupos experimentais.....	28
Figura 3. Composição química do extrato de Pu Erh.....	40
Figura 4. Consumo estimado de líquidos.....	42
Figura 5. Consumo estimado da dieta. Consumo de ração.....	45
Figura 6. Consumo estimado da dieta. Consumo de calorias.....	46
Figura 7. Consumo estimado da dieta. Consumo de calorias de lipídios.....	47
Figura 8. Medida do peso corporal (g) durante as treze semanas de tratamento. Ganho de peso (g).....	49
Figura 9. Teste de Tolerância à Glicose (TTG) após jejum de 8 horas em animais com 4 semanas de tratamento.....	52
Figura 10. Teste de Tolerância à Glicose (TTG) após jejum de 8 horas em animais com 8 semanas de tratamento.....	53
Figura 11. Teste de Tolerância à Glicose (TTG) após jejum de 8 horas em animais com 12 semanas de tratamento.....	54
Figura 12. Concentrações séricas de colesterol total e de triglicerídeos.....	56
Figura 13. A. Atividade da paraoxonase 1 (PON1) sérica. B. Relação entre a atividade da PON1 e a concentração de HDL séricas.....	61
Figura 14. Índices teciduais.....	63
Figura 15. Reservas energéticas hepáticas.....	65
Figura 16. Conversão hepática de ¹⁴ C-glicose em CO ₂	67
Figura 17. Conversão de ¹⁴ C-glicose em CO ₂ e em lipídios totais no TABr.....	68
Figura 18. Esquema mostrando os principais efeitos do extrato de Pu Erh.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da dieta hiperlipídica (g/Kg).....	29
Tabela 2. Composição da dieta comercial padrão e hiperlipídica.....	29
Tabela 3. Componentes do extrato aquoso de Pu Erh (<i>Camellia sinensis</i>).....	39
Tabela 4. Parâmetros bioquímicos séricos em 13 semanas de tratamento.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

Apo1 – Apolipoproteína 1

AUC – *Area Under the Curve* (Área Sob a Curva)

BHT - Butil hidroxi tolueno

CT – Colesterol Total

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DCV – Doenças cardiovasculares

DHA – Dieta hiperlipídica + Água

DHP1- Dieta hiperlipídica + extrato de Pu Erh na concentração P1 (6,7mg/mL)

DHP2 - Dieta hiperlipídica + extrato de Pu Erh na concentração P2 (13mg/mL)

DPA – Dieta padrão + Água

DPP1 – Dieta padrão + extrato de Pu Erh na concentração P1 (6,7mg/mL)

DPP2 - Dieta padrão + extrato de Pu Erh na concentração P2 (13mg/mL)

DPPH* - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DM2 - *Diabetes Mellitus* tipo 2

EC- epicatequina

ECG - galato de epicatequina

EGC - epigalocatequina

EGCG - epigalocatequina galato

EPM - Erro padrão da média

ERO- Espécies reativas de oxigênio

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HDL – *High density lipoprotein* (Lipoproteínas de alta densidade)

HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alta performance)

IA- Índice de Adiposidade

IRC – Índice de Risco Coronário

LDL – *Low Density lipoprotein* (Lipoproteínas de baixa densidade)

PON1 – Paraoxonase 1

SUS - Sistema Único de Saúde

TAB - Tecido adiposo branco

TABe – Tecido adiposo branco epididimal

TABr – Tecido adiposo branco retroperitoneal

TABs – Tecido adiposo branco subcutâneo

TAM – Tecido adiposo marrom

TGC – Triacilglicerol

TTG - Teste de Tolerância à Glicose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Obesidade.....	15
1.2 Paraoxonase.....	16
1.3 Extrato de Pu Erh.....	19
1.4 Hipótese.....	21
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Análise do extrato de Pu Erh.....	24
3.1.1 <i>Análise da composição química do extrato de Pu Erh.....</i>	24
3.1.2 <i>Quantificação do conteúdo fenólico total.....</i>	24
3.1.3 <i>Atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH*).....</i>	25
3.2 Preparação do Extrato aquoso de Pu Erh.....	26
3.3 Procedimentos experimentais <i>in vivo</i>	26
3.3.1 <i>Animais.....</i>	26
3.3.2 <i>Grupos experimentais.....</i>	27
3.3.3 <i>Dieta dos animais.....</i>	28
3.3.4 <i>Estimativa do consumo de dieta e de líquido.....</i>	30
3.3.5 <i>Análises do peso dos animais e do ganho de peso.....</i>	30
3.3.6 <i>Teste de Tolerância à Glicose.....</i>	31
3.3.7 <i>Coleta de sangue durante o tratamento.....</i>	31
3.3.8 <i>Eutanásia.....</i>	32
3.4 Procedimentos Experimentais.....	32
3.4.1 <i>Análises Morfométricas.....</i>	33
3.4.2 <i>Análises Bioquímicas Séricas.....</i>	33
3.4.3 <i>Índices de adiposidade e de risco coronário.....</i>	33
3.4.4 <i>Dosagem da PON 1.....</i>	34
3.4.5 <i>Glicogênio hepático.....</i>	34
3.4.6 <i>Triglicerídeos hepáticos.....</i>	34

3.4.7	<i>Lipídios totais hepáticos</i>	35
3.4.8	<i>Incorporação de ¹⁴C-glicose em ¹⁴CO₂ (Glicólise)</i>	35
3.4.9	<i>Incorporação de ¹⁴C-glicose em ¹⁴C-lipídios totais (Lipogênese)</i>	36
3.4.10	<i>Incorporação de ¹⁴C-glicose em ¹⁴C glicogênio (Glicogênese)</i> ..	36
3.5	Estatística.....	37
4.	RESULTADOS.....	38
4.1	Composição do Extrato Aquoso do Pu Erh.....	38
4.2	Consumo estimado de líquido.....	41
4.3	Consumo estimado da dieta.....	43
4.4	Ganho de peso.....	48
4.5	Teste de Tolerância à Glicose (TTG).....	50
4.6	Concentrações séricas de colesterol total e triglicerídeos durante o tratamento.....	55
4.7	Parâmetros bioquímicos séricos.....	57
4.8	Atividade da paraoxonase 1 (PON1) sérica.....	60
4.9	Índices somáticos teciduais.....	62
4.10	Reservas energéticas do tecido hepático.....	64
4.11	Conversão de ¹⁴ C-glicose em ¹⁴ CO ₂ , ¹⁴ C-glicogênio e ¹⁴ C-lipídios totais.....	66
5.	DISCUSSÃO.....	69
6.	CONCLUSÕES.....	84
7.	PERSPECTIVAS	87
8.	REFERÊNCIAS.....	88
	Anexo I.....	98

1.INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2000), a obesidade é caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal que afeta a saúde e causa alteração nas concentrações de lipídios plasmáticos. Trata-se de um problema crescente mundial que leva, em geral, à alta morbimortalidade, bem como, à redução na qualidade de vida (HASLAM e JAMES, 2005). Sua causa é um desequilíbrio energético entre calorias consumidas e gastas. Entretanto, sua etiologia é difícil de identificar, pois se caracteriza como uma doença multifatorial, resultado de uma complexa interação entre fatores comportamentais, genéticos, endócrinos, fisiológicos e psicológicos (ARÇARI et al., 2009). A obesidade é um dos principais fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis como *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), hipertensão arterial sistêmica (HAS), doenças cardiovasculares (DCV), esteatose hepática, dislipidemias, entre outras (KUMAR et al., 2010; MANNING et al., 2014).

Além de causar danos à saúde da população, a obesidade e as dislipidemias têm causado prejuízos econômicos e sociais nos últimos anos. Nos Estados Unidos, por exemplo, o gasto *per capita* com um indivíduo obeso é aproximadamente 42 a 100% maior do que com um indivíduo de peso normal (FINKELSTEIN et al., 2009). No Brasil, estima-se que o Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS) gaste anualmente 3,6 bilhões de reais por ano com o tratamento da obesidade e doenças associadas, sendo que as doenças cardiovasculares são responsáveis por 67% desses custos (BAHIA et al., 2012).

A incidência dessas doenças associadas à obesidade tem despertado a atenção da comunidade científica. O estudo dos mecanismos pelos quais a obesidade induz as disfunções fisiológicas pode ser facilitado com a utilização

de modelos animais em ambiente de pesquisa, especialmente roedores. Estes modelos animais são normalmente utilizados para estudo do papel da dieta, fisiopatologia e etiologia da doença, além de testes farmacológicos, por apresentarem mecanismos promotores de obesidade e de síndrome metabólica semelhantes àqueles presentes em humanos (FUCHS et al., 2018).

As dietas hiperlipídicas e hipercalóricas induzem alterações no perfil bioquímico plasmático em roedores, estando associadas ao desenvolvimento de dislipidemias, à *diabetes melitus* e a alterações no endotélio vascular com a formação de placa aterosclerótica. Dentre os lipídios plasmáticos alterados por dietas hiperlipídicas, destacam-se TGC, colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). Neste contexto, a enzima paraoxonase (PON), que está especificamente associada a lipoproteínas de alta densidade (HDL), hidrolisa peróxidos de lipídeos presentes nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (FAROOQUI e FAROOQUI, 2012; MACKNESS e MACKNESS, 2015; MEYER et al., 2018), prevenindo a formação de placas ateroscleróticas (MEYER et al., 2018; CUNHA, 2012; MACKNESS e MACKNESS, 2015).

1.2 Paraoxonase

A paraoxonase (PON) pertence à família multigene de enzimas composta de três diferentes membros: PON1, PON2 e PON3, que compartilham considerável homologia estrutural com atividades desintoxicantes (CUNHA, 2012). As PONs estão presentes em diferentes locais, como no soro, no sistema nervoso e no fígado (COSTA et al., 1990; FAROOQUI e FAROOQUI, 2012; CUNHA, 2012; MACKNESS e MACKNESS, 2015; COSTA et al., 2005). Os genes das três enzimas encontram-se alinhados no cromossomo 7 (7q21.3-

q22.1), em humanos, e no cromossomo 6, em camundongos (MOYA; MÁÑEZ, 2018). O nome da família (Paraoxonase) vem da habilidade da PON1, a mais estudada das três isoformas, de catalisar a hidrólise e posterior inativação de inseticidas e neurotoxinas, como os paraoxons e outros organofosforados, em produtos não tóxicos (ECKERSON et al., 1983; LA DU, 1996). PON1 foi a primeira paraoxonase a ser identificada, e é a mais estudada. Ela foi descoberta por causa de sua capacidade em hidrolisar organofosforados xenobióticos no soro humano (MACKNESS et al., 1987; COSTA et al., 2005; CUNHA, 2012). PON1 é a principal linha de defesa contra alguns subprodutos de pesticidas produzidos pelo homem (MEYER et al., 2018). Pessoas com baixa atividade de paraoxonase parecem estar mais ameaçadas quando em contato com o *paration* ou pesticidas relacionados (DIEPGEN e MALLINCKRODT, 1986).

A PON1 humana é uma estearase dependente de cálcio com 354 aminoácidos e 43KDa de massa molecular. Esta proteína é produzida no fígado, liberada para a circulação associada à partícula de HDL e é considerada uma enzima promíscua que atua em diferentes substratos (MACKNESS e MECKNESS, 2015; VLACHOS et al., 2006; PRIMO-PARMA et al., 1996). O HDL, por apresentar núcleo hidrofóbico, estabiliza esta enzima e atua como carreador, o que facilita a secreção de PON1 pelo fígado. A PON 1 protege a HDL e a LDL de peroxidação lipídica (JAMES E DEAKIN, 2004; MARTINI et al., 2017).

Várias funções fisiológicas da PON1 são bem conhecidas e descritas para mamíferos (Figura 1) e incluem a proteção contra aterosclerose e ocorrência de doenças inflamatórias (COSTA et al., 2005; MACKNESS e MACKNESS, 2015)

Sua atividade é sensível a diferentes dietas, sendo que a aceleração do estresse oxidativo, induzida pelo aumento de corpos cetônicos, em jejum

prolongado, pode contribuir para a diminuição da atividade de PON1, pela (FAROOQUI e FAROOQUI, 2012).

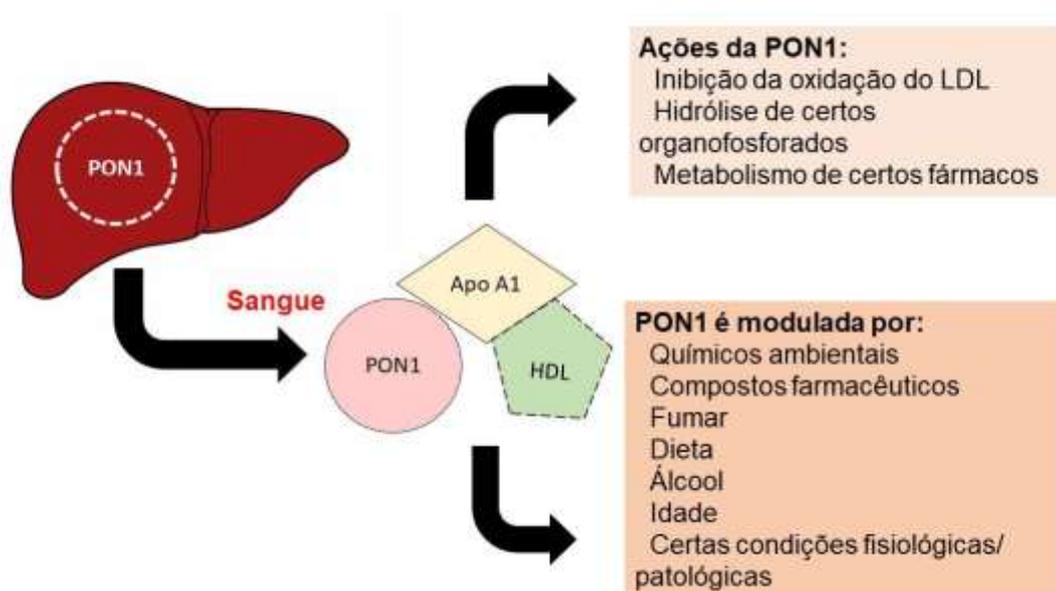


Figura 1. Efeitos e modulações biológicas de Paraxonase1. *Apo A1* – Apolipoproteína do tipo 1. PON1 – paraoxonase 1. *Fonte:* Adaptado de COSTA et al. (2005).

Em condições fisiológicas são formadas baixas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ERO) que são fundamentais para diversas funções, como a sinalização celular, controle da dinâmica mitocondrial, proliferação e diferenciação celulares (MITTLER, 2017; TEIXEIRA, 2018). Contudo, o aumento nas concentrações de ERO pode gerar efeitos danosos. Com a presença de oxigênio, os radicais livres podem causar a peroxidação dos lipídeos de membranas plasmáticas e organelas, sendo que as interações de ERO com lipídeos geram peróxidos e, conseqüentemente, podem desencadear vias fisiológicas ou programadas para morte celular (KUMAR et al., 2010). Para

manter os níveis ideais de espécies reativas de oxigênio, existem substâncias antioxidantes endógenas responsáveis pela manutenção dos níveis fisiológicos destas espécies, que atuam diminuindo ou prevenindo a oxidação de substratos.

As DCVs são a primeira causa de morte no mundo e, no Brasil, a aterosclerose é a principal responsável pela ocorrência dessas doenças (SANTOS et al., 2011). Nas placas ateroscleróticas, em que a peroxidação lipídica está aumentada, a enzima paraoxonase 1 (PON1) atua como um potente antioxidante (STRAKOVSKY et al., 2014).

A PON1 está associada com diversas doenças como Alzheimer, doença renal crônica, comprometimento hepático, *diabetes mellitus* tipo I e II (FRIDMAN et al., 2016), depressão e transtorno bipolar (MOREIRA et al., 2017). Estudos recentes sugerem a associação de dislipidemias com a atividade da PON1 plasmática, sendo que quanto menor a atividade da enzima, maior o nível de TGC e LDL e menores as taxas de HDL séricos (CHERAGHI et al., 2017; FRIDMAN et al., 2016).

1.3 Extrato de Pu Erh

Muitas substâncias extraídas de plantas são usadas no intuito de tratar a obesidade ou de prevenir o estabelecimento desta condição. Os efeitos antiobesidade dos chás têm atraído a atenção de pesquisadores, considerando que o chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo (TOKIMITSU, 2004; MOON et al., 2007; CAO et al., 2011). Dentre os diversos chás consumidos no mundo, o extrato do Pu Erh (*Camellia sinensis*, fermentada e envelhecida) tem sido associado com a diminuição dos níveis de TGC e CT em ratos (CAO et al., 2011). Além disso, foi demonstrado o efeito protetor do Pu Erh contra o

desenvolvimento de esteatose hepática em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (CAI et al., 2017).

As infusões produzidas a partir das folhas e brotos da *Camellia sinensis* são consideradas chás. Existem 12 espécies diferentes desta planta (MENG et al., 2018) e a província de Yunnan na China é o principal local onde ela é produzida. Os chás diferem dependendo do processamento das folhas: o chá branco é produzido a partir dos brotos e folhas jovens não fermentados da planta, o chá verde é produzido a partir das folhas não fermentadas, o chá *Oolong* é produzido a partir das folhas parcialmente fermentadas, o chá preto é totalmente fermentado. O chá conhecido como Pu Erh é altamente fermentado e envelhecido. No processo de fermentação, ocorre a oxidação enzimática dos polifenóis do chá levando à formação de teoflavinas e taninos, que são responsáveis por características como a coloração e aroma dos chás (CAO et al., 2011; WAY et al., 2009).

Existem dois tipos de processamento para o extrato ser produzido, gerando o Pu Erh cru (*Raw Pu Erh*) e o Pu Erh amadurecido (*Rippend Pu Erh*). Após a colheita, as folhas passam por um rápido processo chamado de “*Kill Green*”, tornando-se o Pu Erh cru, que é armazenado e envelhecido. Após este processo, as folhas podem ser artificialmente fermentadas por microrganismos, durante o período mínimo de 6 meses, produzindo o chá amadurecido (CAO et al., 2013; ZHANG et al., 2011). Estes dois tipos de chás puros apresentam sabores e cores de infusão diferentes (ZHANG et al., 2011). Em ambas as formas, o Pu Erh sofre oxidação e fermentação, causadas tanto por organismos em crescimento no chá, quanto pela oxidação induzida pelos radicais livres (JENG et al., 2007).

Atualmente, a maior parte dos medicamentos utilizados para o tratamento da obesidade causa inibição do apetite por regular a síntese e secreção de

neurotransmissores no hipotálamo. No entanto, esses agentes têm uma série de limitações, como os efeitos colaterais e alta taxa de recorrência (MANNING et al., 2014). Portanto, encontrar produtos naturais que possam ser utilizados no tratamento da obesidade é uma busca que vem despertando o interesse de pesquisadores no mundo todo.

Alguns estudos demonstraram que o extrato de Pu Erh tem efeitos biológicos, tais como a prevenção do câncer e de doenças cardiovasculares (ZHAO et al., 2011a; ZHAO et al., 2011b), efeitos antiobesogênicos (CAO et al., 2011; KUBOTA et al., 2011), antioxidantes (WOJCIECHOWSKI et al., 2011; WANG et al, 2012), antiviral (PEI et al., 2011) e hipolipidêmico (HUANG e LIN, 2012) e hipoglicemiante (DU et al., 2012). Contudo, nenhuma investigação tem sido feita quanto à associação da obesidade e dislipidemias com a atividade da PON1 em animais tratados com Pu Erh.

1.4 Hipóteses

H0: O tratamento com o extrato de Pu Erh não promove alterações nos lipídios plasmáticos, glicemia, atividade da PON1, metabolismo hepático e do TAB após o tratamento com dieta hiperlipídica.

H1: O tratamento com o extrato de Pu Erh promove alterações nos lipídios plasmáticos, glicemia, atividade da PON1, metabolismo hepático e do TAB após o tratamento com dieta hiperlipídica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do extrato de Pu Erh (*Camellia sinensis*), no perfil bioquímico plasmático, atividade da PON1, no metabolismo hepático e do TAB

em ratos *Wistar* adultos, machos, alimentados com dieta hiperlipídica por 13 semanas.

2.2 Objetivos específicos

1) Determinar a concentração de fenóis totais, cafeína, catequina, epicatequina e a capacidade antioxidante do extrato de Pu Erh.

2) Estimar o consumo de ração, de calorias totais e de calorias de lipídios durante o tratamento.

3) Estimar o consumo de líquidos durante o tratamento.

4) Realizar teste de tolerância à glicose (TTG) nas semanas 4, 8 e 12, durante o período de tratamento dos animais.

5) Realizar medidas morfométricas: peso, índices hepatossomático, somático muscular e lipossomáticos.

6) Determinar as concentrações séricas de TGC, CT, HDL, colesterol não HDL, glicose, proteínas totais, bilirrubina direta, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e insulina.

7) Estimar os índices de adiposidade e de risco coronário.

8) Determinar a atividade arilesterase da enzima PON1 sérica.

9) Determinar as concentrações de glicogênio, TGC e lipídios totais no tecido hepático após o tratamento.

10) Avaliar a incorporação de ^{14}C -glicose em $^{14}\text{CO}_2$ (oxidação da glicose), em ^{14}C -glicogênio (glicogênese) e em ^{14}C -lipídios totais (lipogênese) no tecido hepático após o tratamento.

11) Avaliar a incorporação de ^{14}C -glicose em $^{14}\text{CO}_2$ (oxidação da glicose) e em ^{14}C -lipídios totais (lipogênese) no tecido adiposo branco retroperitoneal após o tratamento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Análises do extrato de Pu Erh

3.1.1 Análise da composição química do extrato de Pu Erh

A presença de epigallocatequina (EGC), epicatequina (EC), epigallocatequina galato (EGCG), galato de epicatequina (ECG) e cafeína nas amostras de extrato de Pu Erh foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) e por análise de espectrometria de massa. As análises foram realizadas na Faculdade de Farmácia da UFRGS em colaboração com o laboratório da Prof.^a Valquíria Linck Bassani.

3.1.2 Quantificação do conteúdo fenólico total

A quantificação de fenóis totais do extrato foi realizada conforme descrito por Siatka e Kasparová (2010), com pequenas modificações (SCHEID et al., 2013). Para isso, inicialmente misturou-se 0,1 mL de solução do extrato (0,001g/mL) a 7,4 mL de água, 0,5 mL do reagente de *Folin-Ciocalteu* (1,3 N) e 2,0 mL de carbonato de sódio (20%). A mistura foi colocada em banho-maria (28 ± 2 °C), onde permaneceu por 1h 30min. Após, a absorvância da solução foi medida a 750 nm. O teor de fenóis totais foi determinado aplicando-se o valor da absorvância do extrato na equação da reta obtida a partir da curva de calibração, construída com diferentes concentrações do padrão fenólico ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg EAG (equivalentes de ácido gálico) por mL de extrato (mg EAG/mL extrato). A análise foi realizada em triplicata.

3.1.3 Atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH^{*})

Este ensaio foi realizado conforme descrito por Siatka e Kasparová (2010), com pequenas modificações, a fim de determinar a atividade de moléculas antioxidantes (SCHEID et al., 2013). O radical DPPH^{*}, de coloração púrpura em comprimento de onda 515 nm, quando reduzido por substâncias antioxidantes tem sua coloração modificada, que pode ser medida espectrofotometricamente pela redução em sua absorvância, neste mesmo comprimento de onda. O procedimento experimental consistiu em adicionar 0,1 mL da solução aquosa do extrato e do antioxidante conhecido (Butil hidroxi tolueno, BHT), ambos em concentrações entre 25-500 µg/mL, a 0,9 mL de solução metanólica de DPPH^{*} (40 mg/mL). Após 30 minutos de reação em temperatura ambiente (22±2 °C), as absorvâncias foram lidas a 515 nm (Espectrofotômetro de UV/Visível Cary® 100, Varian). O experimento foi realizado em triplicata. A inibição percentual da atividade de eliminação de radicais livres de DPPH^{*} foi calculada usando a seguinte equação: % de inibição do DPPH^{*} = [(A0-A1)/A0 × 100], onde A0 é a absorvância do controle da reação (3 mL de metanol e 1 mL de solução de DPPH^{*}, sem amostra do extrato) e A1 é a absorvância na presença do extrato ou padrão. Os dados percentuais de inibição foram plotados em relação à concentração do extrato e o valor de IC50 (inibição de 50% da amostra) foi calculado por análise de regressão linear (KROTH et al., 2020).

3.2 Preparação do Extrato aquoso de Pu Erh

Para a preparação do extrato aquoso foi utilizado Pu Erh Original, comercializado pela empresa Tea Shop® no Brasil. (folhas secas de *Camellia sinensis* que passaram por processos de fermentação e amadurecimento - chá do tipo *Rippend* Pu-Erh, de origem Chinesa). Foi utilizado Pu Erh do mesmo lote em todos os grupos experimentais e durante todo o tratamento (Lote nº 3061).

O extrato aquoso de Pu Erh foi preparado diariamente através de infusão em água filtrada (foi utilizada a mesma água oferecida aos animais tratados com água - grupos DPA e DHA (conforme descrito no item 3.3.2) a 90°C por 3 minutos, em ambiente escuro. O extrato foi oferecido *ad libitum*, em garrafas âmbar para evitar sua oxidação, nas doses de 6,7mg (P1) e 13 mg (P2) de extrato/mL (SOSA, 2017; CHOI et al., 2018; ZHANG et al., 2011). As condições de extração foram planejadas para se obter uma grande semelhança com uma preparação de chá real, conforme sugerido para uso humano (CHOI et al., 2018). O preparo do extrato e a sua administração foram feitos sempre perto do início do ciclo escuro, ofertando o extrato mais fresco no período de maior atividade dos ratos (ROCHA et al., 2021).

3.3 Procedimentos experimentais *in vivo*

3.3.1 Animais

Os ratos foram obtidos do Centro de Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) localizado no Campus do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e mantidos no Biotério Setorial do Instituto de

Ciências Básicas da Saúde (ICBS), da UFRGS. Os animais foram mantidos em ciclos claro/escuro de 12/12h em salas climatizadas ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). O monitoramento dos animais foi realizado diariamente, possibilitando a identificação de alterações relacionadas à saúde e ao conforto dos mesmos. As instalações utilizadas apresentam-se em conformidade com a Lei Arouca nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008) e apresentam credenciamento e acompanhamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). (Projeto aprovado pelo CEUA UFRGS nº38712- Anexo 1)

Os ratos foram armazenados em caixas de polipropileno (340 mm de largura x 410 mm de comprimento x 200 mm de altura), com três ratos por gaiola. Os animais chegaram ao Biotério Setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) com 50 dias. Foi feita a aclimação dos animais por 10 dias, onde foram alimentados com ração para roedores – padrão Nuvilab CR1® (Nutival - Brasil) e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Resolução Normativa nº13, de 20 de setembro de 2013 (BRASIL, 2013), Resolução Normativa nº30, de 02 de fevereiro de 2016 do CONCEA (BRASIL, 2016) e conforme a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008), que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais.

3.3.2 Grupos experimentais

Após o período de aclimação ao Biotério Setorial do ICBS, 60 ratos machos *Wistar* de 60 dias foram divididos em 6 grupos: 1) Dieta padrão + Água (DPA); 2) Dieta padrão + Pu Erh (DPP1) – menor dose de Pu Erh (6,7 mg extrato /mL); 3) Dieta padrão + Pu Erh (DPP2) – maior dose de Pu Erh (13 mg

extrato/mL); 4) Dieta Hiperlipídica + Água (DHA); 5) Dieta Hiperlipídica + Pu Erh (DHP1) – menor dose de Pu Erh (6,7 mg extrato /mL); 6) Dieta Hiperlipídica + Pu Erh (DHP2) – maior dose de Pu Erh (13 mg extrato/mL). Para os grupos que receberam água, foram utilizados 12 animais por grupo e para os grupos que receberam extrato de Pu Erh, foram utilizados 9 animais por grupo. A água e o extrato de Pu Erh foram oferecidos *ad libitum* a todos os grupos durante 13 semanas (Figura 2).

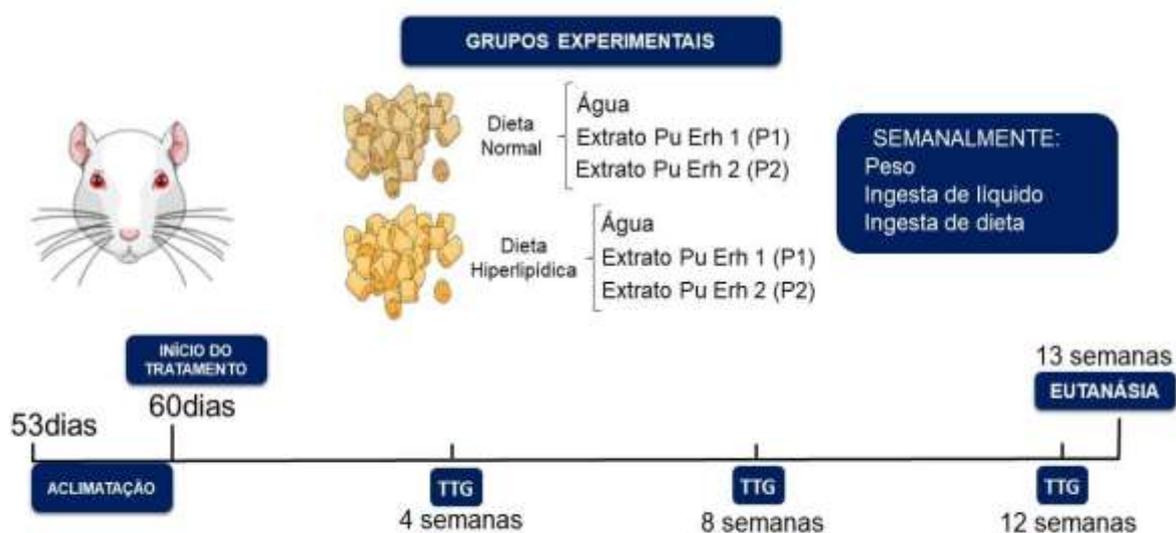


Figura 2. Desenho experimental: descrição dos procedimentos e dos grupos experimentais; TTG = teste de tolerância à glicose P1 = extrato de Pu Erh na concentração de 6,7mg/mL; P2 = extrato de Pu Erh na concentração de 13mg/mL.

3.3.3 Dieta dos animais

A composição das dietas hiperlipídica e controle estão descritas nas Tabelas 1 e 2. A dieta padrão para roedores utilizada foi Nuvilab ®. A dieta hiperlipídica foi produzida artesanalmente no laboratório, utilizando os

componentes descritos nas Tabelas 1 e 2 (VON DENTZ, 2018; VOGT et al., 2021). As dietas foram oferecidas *ad libitum*, por 13 semanas, após o período de aclimatação.

Tabela 1 Composição da dieta hiperlipídica (g/Kg)

Ingredientes	g/Kg
Ração Nuvilab®	375
Banha	200
Manteiga	50
Margarina hidrogenada	100
Sais	4
Carboximetil celulose	10
Caseína	75
Amido milho	25
Açúcar refinado	175

Tabela 2 Composição da dieta comercial padrão e hiperlipídica

Nutrientes	Comercial Nuvilab®		Hiperlipídica	
	g/100g	cal/100g	g/100g	cal/100g
Proteína	11,75	47,00	8,18	32,72
Carboidrato	64,98	259,92	49,09	196,36
Lipídios	4,48	40,39	31,07	279,63
Umidade	11,34	-	8,19	-
Cinzas	7,46	-	3,47	-
cal/100g	347,24		508,71	

3.3.4 Estimativa do consumo de dieta e de líquido

O consumo de dieta foi estimado semanalmente. Uma vez por semana a ração era pesada e, então, oferecida aos animais, sendo colocada sobre a grade nas caixas de polipropileno. Após 24 horas, a ração que sobrou sobre a grade da caixa foi pesada novamente, gerando o consumo em gramas por caixa. A quantidade de ração em gramas foi dividida pelo número de ratos de cada caixa. Desta forma o consumo de ração em gramas foi estimado para cada animal (CECCONELLO et al., 2014; KUO et al., 2004; HOU et al., 2009). A partir dos dados de consumo em gramas foram estimados o consumo de calorias totais e o consumo de calorias de lipídios consumidos, utilizando os dados da Tabela 2.

O consumo de líquidos foi também estimado semanalmente. Uma vez por semana, o volume de água ou extrato de Pu Erh era medido e as garrafas contendo água ou extrato de Pu Erh eram oferecidas aos animais, sendo colocadas nas caixas de polipropileno. Após 24 horas, o volume de líquido era medido novamente para estimar a quantidade de líquido consumido por caixa. A quantidade de líquido em mL foi dividida pelo número de ratos de cada caixa. Desta forma, o consumo de líquido foi estimado para cada animal. Cabe salientar que essa medida é uma estimativa de consumo, pois pequenas quantidades de alimento ou de líquido podem eventualmente cair dentro da caixa. Sendo que sempre foi verificado dentro da caixa se havia presença de restos de alimento ou líquido.

3.3.5 Análises do peso dos animais e do ganho de peso

Os animais foram pesados semanalmente para o acompanhamento do ganho de peso. A pesagem era realizada sempre pela manhã. Os animais foram

pesados antes da eutanásia para avaliação do peso no final do tratamento. A diferença entre o peso inicial (antes do início do tratamento) e o peso final (medido antes da eutanásia) foi utilizada para calcular o ganho de peso durante o tratamento (CECCONELLO et al., 2014; VON DENZ, 2018).

3.3.6 Teste de Tolerância à Glicose

O teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado em 4, 8 e 12 semanas de tratamento. Para a realização dos testes, os animais foram submetidos ao jejum por 8 horas. Após este tempo, foi realizada punção caudal e foi mensurada a glicemia, utilizando glicosímetro (*On-Call® Plus II*, Laboratórios Acon). Este foi considerado o tempo zero do TTG. Após, foi administrado, por gavagem, uma solução de glicose a 50%, na dose de 1g/kg de peso, e mensurado a glicemia nos tempos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos (MOODLEY et al., 2015; VOGT et al., 2021). A partir do TTG foi calculada a área sob a curva (AUC, *Area Under the Curve*) para cada grupo experimental em cada tempo de tratamento (4, 8 e 12 semanas)

Durante o procedimento de gavagem da solução de glicose houve um erro no procedimento experimental, o que causou morte de alguns animais. Em consequência disso, o número de animais por grupo é diferente.

3.3.7 Coleta de sangue durante o tratamento

Dois dias após a realização dos procedimentos para o TTG, o sangue dos animais foi coletado através de punção caudal (nesta coleta os animais estavam alimentados). O sangue coletado permaneceu a temperatura ambiente por 30 minutos, e foi posteriormente centrifugado para isolamento do soro (420xg por 10 min.). O soro foi armazenado em tubos de polipropileno a -80°C até sua

utilização. Foram dosados CT e TGC utilizando kits colorimétricos comerciais (LabTest®, Diagnóstica, Brasil), seguindo o protocolo do fabricante. Nesta coleta, os animais estavam alimentados.

3.3.8 Eutanásia

Os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecidos. É importante salientar que foram realizadas dosagens bioquímicas que podem ser alteradas pela utilização de anestésicos. Qualquer fármaco utilizado como anestésico poderia causar alteração na homeostase metabólica. Esta forma de eutanásia é utilizada por pesquisadores da área de metabolismo de diversos países e aceita pelas revistas internacionais indexadas e de alto impacto (BROWN et al., 2005; SAHA et al., 2005). Os procedimentos de eutanásia foram realizados conforme o guia de eutanásia da *Guide to the Care and Use of Experimental Animals from the Canadian Council on Animal Care* (1993).

3.4 Procedimentos Experimentais

Após 13 semanas de tratamento, os animais foram pesados, guilhotinados e, imediatamente após a decapitação, o sangue, e os tecidos adiposos brancos retroperitoneal (TABr), subcutâneo (TABs), epididimal (TABe), o tecido adiposo marrom interescapular (TAM), os músculos sóleo e gastrocnêmio e o fígado foram excisados, pesados, colocados em tubos apropriados e congelados em nitrogênio líquido ou utilizados imediatamente nos procedimentos experimentais de incorporação de U¹⁴C-glicose em ¹⁴CO₂. Os tecidos foram conservados a -80°C até sua utilização.

3.4.1 Análises Morfométricas

Os índices somáticos foram calculados dividindo o peso de cada tecido fresco pelo peso do animal no dia da eutanásia [peso do tecido (g)/peso do animal (g)]. Foram calculados os índices lipossomáticos do TABr, TABs, epididimal TABe e TAM. Além disso, foram calculados o índice hepatossomático e os índices somáticos dos músculos gastrocnêmios e sóleos (foram utilizados no cálculo os músculos das patas direita e esquerda juntos) (SILVEIRA, 2018; ROCHA et al., 2021).

3.4.2 Análises Bioquímicas Séricas

O sangue foi coletado em tubos com ativador de coagulação (BD, Vacutainer®), centrifugado a 420xg por 10 minutos para a separação do soro. As amostras de soro foram divididas e congeladas a -80°C até sua utilização. As concentrações séricas de glicose, TGC, CT, HDL, bilirrubina direta, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram quantificados por kits comerciais (LabTest®, Diagnóstica, Brasil) para análises em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK), seguindo o protocolo do fabricante. A concentração de insulina foi calculada por Enzimaimunoensaio Automatizado - Elisa (Kit Diagnóstico: IBL *International- Tecan* (Hamburg/Germany)).

3.4.3 Índices de adiposidade e de risco coronário

O índice de adiposidade (IA) foi calculado segundo Crege et al., (2016) da seguinte forma: $IA = [(colesterol\ total - HDL) / HDL]$, sendo os valores de colesterol total e HDL utilizados no cálculo estavam expressos em mg/dL. O índice de risco coronário (IRC) foi calculado segundo Adeneye et al., (2010) da seguinte forma: $IRC = TGC\ (mg/dL) / HDL\ (mg/dL)$.

3.4.4 Dosagem da PON 1

A atividade da PON1 sérica foi medida pela taxa de formação de fenol (CHERAGUI et al., 2017). As amostras foram diluídas de seis a dez vezes em 20 mmol/L de tampão tris base e adicionados ao reagente de trabalho. As alterações na absorbância a 270nm foram registradas durante 60s. A atividade da PON1 foi expressa em U/mL, com base na absortividade molar do fenol a 270nm

3.4.5 Glicogênio hepático

A extração de glicogênio foi realizada de acordo com o método de Van Handel (VAN HANDEL, 1965). Fatias de fígado foram digeridas com KOH 30% a 100°C e o glicogênio foi precipitado em solução alcoólica, lavado em água destilada e convertido à glicose por exposição a HCl 4M a 100°C. O conteúdo de glicose após a hidrólise ácida foi determinado pelo método da glicose oxidase (Glicose PAP. *Liquiform* - Kit Labtest) e medido em placas de 96 poços, utilizando espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK), com comprimento de

onda de 505nm. Utilizou-se glicogênio de fígado de coelho como padrão. Os resultados foram expressos como mg% de glicogênio.

3.4.6 Triacilgliceróis hepáticos

Para a determinação da concentração de TGC no fígado, amostras do tecido foram homogeneizadas em salina 0,9% na proporção 1:10 e a concentração foi estimada por meio de kit enzimático comercial (LabTest®, Diagnóstica, Brasil), seguindo protocolo do fabricante. A leitura espectrofotométrica foi realizada em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK). A quantidade de triglicerídeos no fígado foi expressa em mg de triglicerídeos por 100g de tecido (mg% de triglicerídeos).

3.4.7 Lipídios totais hepáticos

Os lipídios totais foram isolados pelo método de Folch (FOLCH, 1956). O tecido hepático foi pesado e homogeneizado com clorofórmio: metanol (2:1). Ao homogeneizado foi adicionada água e centrifugado a 500 x *g* por 10 min. A fase aquosa foi retirada e este procedimento foi repetido por duas vezes. Após, a fração contendo os lipídios foi colocada em tubos previamente pesados e deixada a temperatura ambiente para evaporar por 48h. O conteúdo foi pesado e a quantidade de lipídios avaliada por gravimetria.

3.4.8 Incorporação de ¹⁴C-glicose em ¹⁴CO₂ (Glicólise)

Os tecidos hepático e TABr foram coletados imediatamente após a decapitação e lavados em solução fisiológica gelada. Em seguida, foram

transferidos para tubos com meio de incubação contendo 0,10 μCi de D-U- ^{14}C -glicose e 5 mM de glicose, além de um poço para captação de CO_2 com papel 3 MM-Whatman. A fase gasosa foi substituída com carbogênio ($\text{O}_2:\text{CO}_2$, 95:5% v/v), os tubos foram fechados e vedados. Após incubação a 37°C por uma hora, a reação de oxidação foi interrompida injetando-se TCA 50% no meio de incubação, através da tampa de borracha, e NaOH nos poços de captação do CO_2 . A reação de captação do $^{14}\text{CO}_2$ ocorreu *overnight* e a determinação da formação de $^{14}\text{CO}_2$ foi feita de acordo com Torres et al., (2001). O conteúdo de CO_2 foi medido em contador LKB-Wallac com 95% de eficiência. Os resultados estão expressos como μmol de ^{14}C -glicose incorporada em $^{14}\text{CO}_2$ por grama de tecido por hora (BUENO et al., 1994).

3.4.9 Incorporação de ^{14}C -glicose em ^{14}C -lipídios totais (Lipogênese)

Após o ensaio de conversão de glicose a CO_2 , os tecidos foram destinados para a avaliação da produção de lipídios a partir de glicose marcada, sendo que a massa de tecido destinada para este fim foi novamente verificada por pesagem. Os tecidos foram homogeneizados em solução de clorofórmio-metanol (2:1) (FOLCH et al., 1957). Após, foi adicionada solução salina (NaCl 0,9%) e os tubos centrifugados por 10 min a 2000 *rpm*. A fração de clorofórmio foi coletada para leitura. Este processo foi repetido 3 vezes e procedeu-se a contagem da radioatividade no contador LKB-Wallac com 95% de eficiência. A lipogênese a partir de glicose está expressa como μmol de ^{14}C -glicose convertido em ^{14}C lipídeos por grama de tecido por hora.

3.4.10 Incorporação de ¹⁴C-glicose em ¹⁴C glicogênio (Glicogênese)

As amostras de fígado que passaram pelo protocolo de oxidação foram transferidas para tubos de vidro contendo 1 mL de KOH 30% e, então, fervidas em banho de água quente a 100°C durante 1 hora. Após foram adicionados aos tubos 1 mL de etanol 96° e 50 µL de Na₂SO₄ 35% para a precipitação do glicogênio. As amostras foram então centrifugadas a 1500g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão em 0,2 mL de água destilada. A solução foi transferida para outros frascos contendo 2,5 mL de líquido de cintilação e a radioatividade foi mensurada utilizando um contador de cintilação líquida (LKB-Wallac, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). A quantidade de glicogênio produzido a partir de glicose é expressa em nmol de ¹⁴C de glicose incorporada a ¹⁴C-glicogênio por g de tecido, por hora (WRENDENBERG et al., 2006).

3.5 Estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância de duas vias (*Two Way ANOVA*) seguida pelo teste de Tuckey. Os dados não paramétricos foram avaliados por Kruskal-Wallis seguido pelo *post hoc* Dunn. Para análise dos consumos das dietas e dos líquidos foram utilizadas análises de medidas repetidas (Anova de duas vias seguido do teste de Tuckey ou teste de Friedman, seguido pelo teste de Dunn). A significância aceita foi de $p < 0,05$ e os testes foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism, versão 8.0. Os dados

estão representados por meio de tabelas e gráficos. Para os dados paramétricos, foi utilizada a média \pm erro padrão da média (EPM), e para os dados não-paramétricos, a mediana e o intervalo interquartil (5-95%). As análises das áreas sob as curvas foram realizadas segundo Gagnong e Peterson (1998).

4. RESULTADOS

4.1 Composição do Extrato Aquoso do Pu Erh

Por meio das análises realizadas, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) e espectrometria de massa, foram identificados, no extrato de Pu Erh (*Camellia sinensis*), cafeína, epicatequina e catequina (Tabela 3 e Figura 3). Epigallocatequina galato, galocatequina galato e epicatequina galato não foram identificadas no extrato por análise de espectrometria de massa (Figura 3). A concentração de fenóis totais foi de 29,94 mg EGA/g de extrato (Tabela 3), sendo os principais fenóis a epicatequina e a catequina (Figura 3). A capacidade antioxidante do extrato de Pu Erh foi avaliada por meio da atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH^{*}) e foi 6 vezes mais potente que a atividade do padrão BHT. Além disso, o extrato fresco apresentou atividade antioxidante 9 vezes maior comparado ao extrato 24h após sua preparação (Tabela 3).

Tabela 3. Componentes do extrato aquoso de Pu Erh (*Camellia sinensis*).

Componentes	Pu Erh 1	Pu Erh 2	Padrão de Antioxidante (BHT)
Cafeína	46,08 µg/mL	62,41 µg/mL	-
Epicatequina	3,16 µg/mL	6,2 µg/mL	-
EGCG	ND	ND	-
GCG	ND	ND	-
ECG	ND	ND	-
Fenóis totais	29,94 ± 1,081	-	-
DPPH* (extrato fresco)	5,00	-	30,00
DPPH* (extrato 24h)	45,00	-	-

As unidades são expressas como: µg/mL (cafeína e epicatequina); mg EGA (equivalentes de ácido gálico)/mL extrato (Fenóis totais), µg/mL (DPPH*); DPPH* (extrato 24h) = extrato avaliado 24h após ser feito. ND = não detectado. Valores de fenóis totais são expressos pela média ± EPM (n=3). Butil hidroxi tolueno, BHT, EGCG, epigalocatequina galato; GCG, galocatequina-galato; ECG epicatequina galato; P1 = extrato de Pu Erh na concentração de 6,7mg/mL; P2 = extrato de Pu Erh na concentração de 13mg/mL.

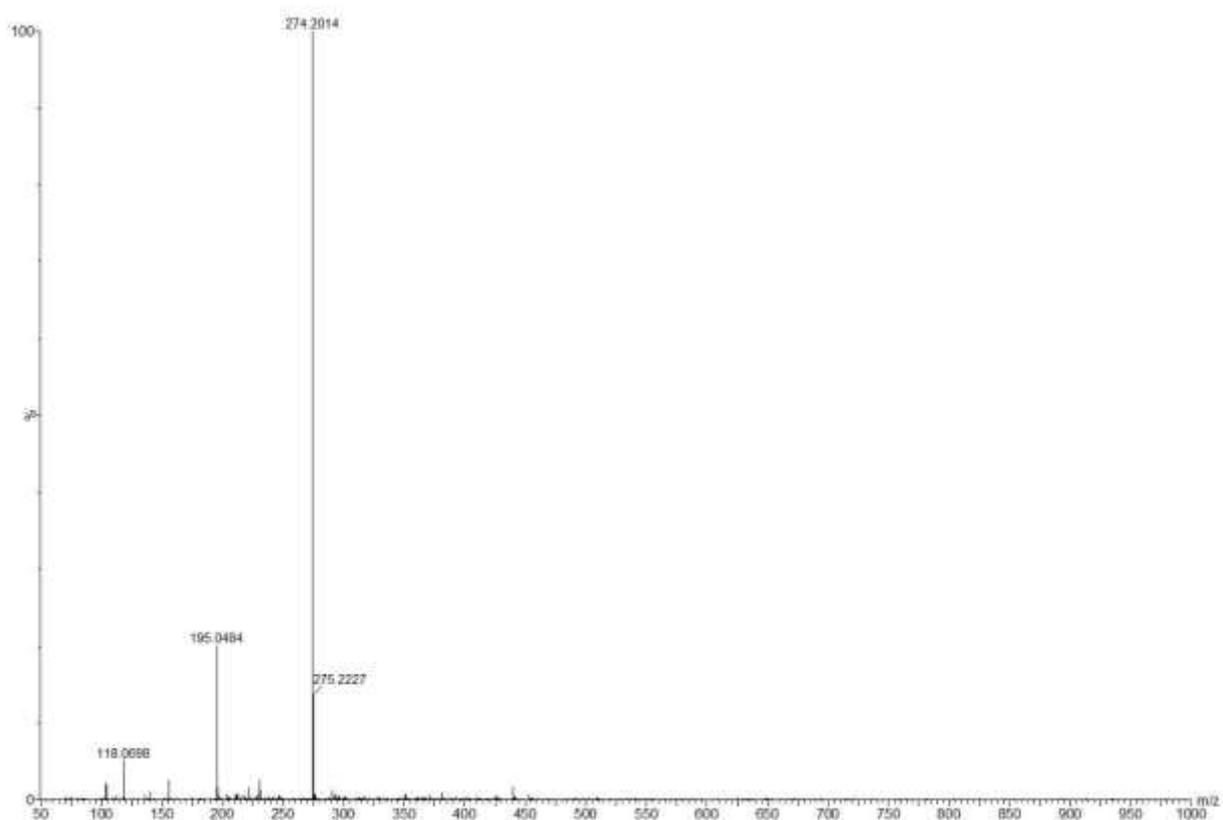


Figura 3. Composição química do extrato de Pu Erh. O $[M-H] + m/z$ (relação massa carga) 195 é a massa molecular da cafeína; E o $[M-H] + m/z$ 274 representa a epicatequina e a catequina. Análise realizada por espectrometria de massa.

4.2 Consumo estimado de líquido

Foi avaliado semanalmente o consumo de líquido (Figura 4A).

Animais alimentados com dieta padrão e tratados com extrato de Pu Erh nas duas concentrações estudadas consumiram o mesmo volume de líquido que os animais tratados com água. Da mesma forma, nos animais tratados com dieta hiperlipídica, o tratamento com extrato de Pu Erh não alterou a ingestão de líquido (Figura 4B). O consumo estimado de líquido foi menor quando os animais foram tratados com dieta hiperlipídica e água em relação aos animais alimentados com dieta padrão (4B). Contudo, nos animais tratados com extrato de Pu Erh a dieta hiperlipídica não alterou o consumo de líquidos (Figura 4B).

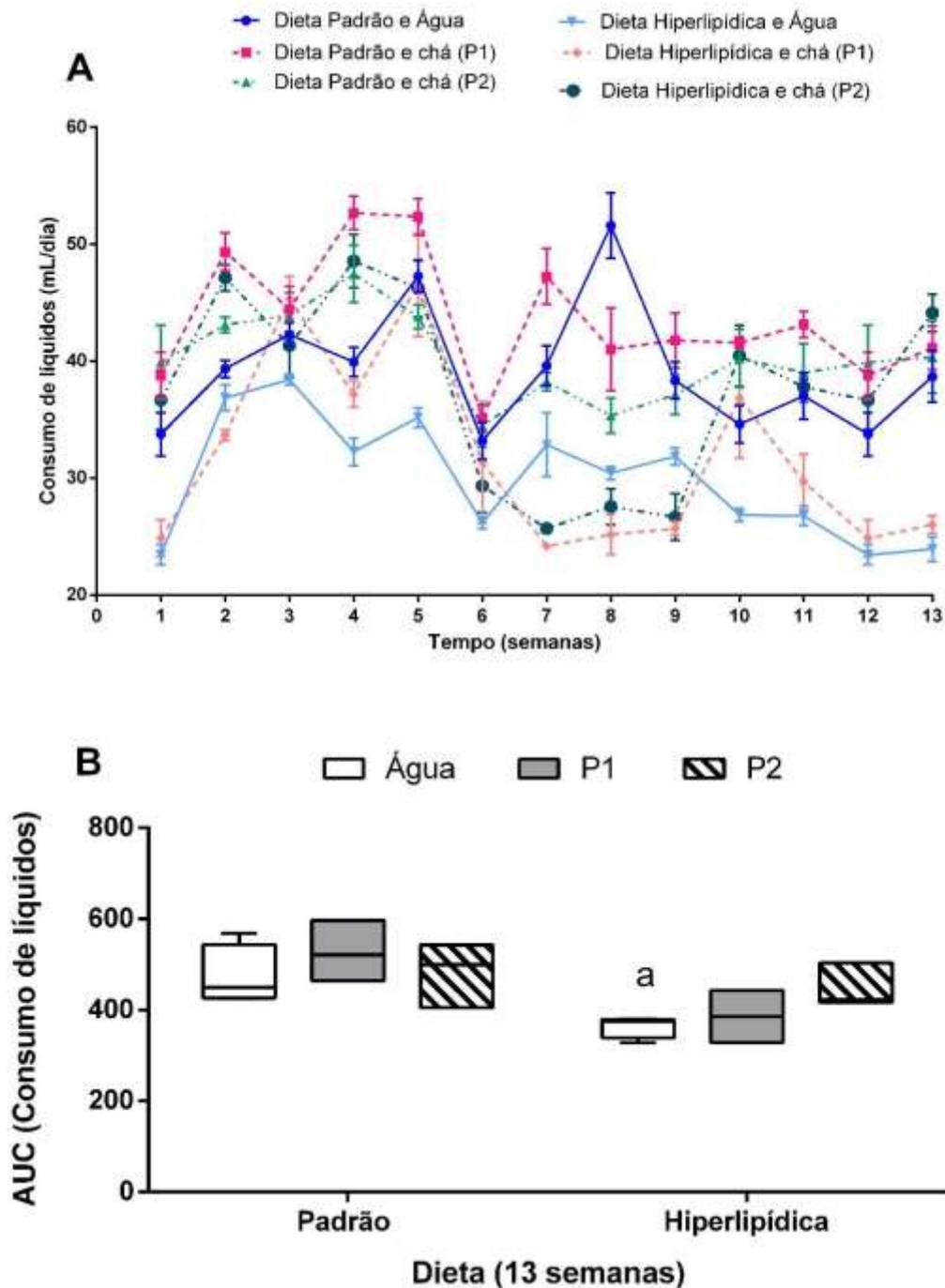


Figura 4. Consumo estimado de líquidos. Consumo de água ou extrato de Pu Erh (mL/dia/animal). **A.** Consumo estimado durante as 13 semanas de tratamento; **B.** AUC (área sob curva) do consumo de líquidos nos diferentes grupos experimentais ao longo do período experimental. Dados são apresentados como média \pm EPM. $n = 6$ a 12 animais por grupo. ^a diferença significativa ($p < 0,05$) entre dieta hiperlipídica e dieta padrão. Foram utilizados extratos de Pu Erh na concentração de 6,7mg/mL (P1) e de 13mg/mL. (P2). Dados do consumo de ração foram analisados pelo teste de Friedman, seguido de Dunn. Dados da área sobre a curva foram avaliados por ANOVA de duas vias, seguido de Tukey.

4.3 Consumo estimado da dieta

O consumo de ração (g/dia) não variou nas primeiras cinco semanas nos animais tratados com dieta padrão e água (DPA) ou com a menor dose do extrato de Pu Erh (DPP1) (Figura 5A). Nestes grupos, nas semanas 6 e 7 houve uma redução no consumo em relação às semanas anteriores ($p < 0,01$). Foi observado aumento de consumo na semana 12 (DPA) e na semana 13 (DPP1) em relação à semana 6 ($p < 0,05$). No grupo DPP2, o consumo de ração durante as 13 semanas variou menos em relação aos outros grupos tratados com dieta padrão, sendo observado aumento ($p < 0,05$) no consumo nas semanas 2 e 3 em relação às semanas 4, 6, 10 e 12 (Figura 5A). O consumo da ração não variou nas primeiras cinco semanas nos animais tratados com dieta hiperlipídica (Figura 5A). Contudo, na semana 7 houve uma redução significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos (DHA, DHP1 e DHP2). Também foi observado aumento do consumo nas semanas 12 e 13 em relação às semanas anteriores em DHA e DHP2 e em relação às semanas 7 e 8 no grupo DHP1 (Figura 5A).

Em relação ao consumo energético (calorias/dia), para os animais alimentados com dieta padrão, o consumo se manteve constante nas primeiras cinco semanas nos animais dos grupos DPA e DPP1 e houve uma redução no consumo de calorias na semana 6. Nestes grupos, após a semana 7, o consumo de calorias se estabilizou até o final do tratamento (Figura 6A). Nos animais do grupo DPP2, houve aumento de consumo energético nas semanas 2 e 3. Após este período, o consumo retornou aos valores da primeira semana e se manteve estável até o final do tratamento (Figura 6A).

A quantidade de calorias ingerida, referente apenas aos lipídios consumidos, foi reduzida na semana 6, nos animais que ingeriram dieta padrão e se manteve constante até o final do tratamento (Figura 7A). Nos animais que ingeriram dieta hiperlipídica, o consumo de calorias de lipídios consumidos diminuiu na semana 7 e voltou aos valores do início do tratamento na semana 8, se mantendo constantes até o final do tratamento.

Os animais que receberam dieta hiperlipídica durante as 13 semanas de tratamento ingeriram menor quantidade de ração (g/dia) (Figuras 5A e B) e apresentaram menor ($p<0,05$) consumo calórico (Figura 6A e B) quando comparados aos animais que receberam dieta padrão. Contudo, a quantidade de calorias ingerida, referente aos lipídios consumidos foi significativamente maior ($p<0,05$) nos animais que receberam dieta hiperlipídica quando comparados com os animais que receberam dieta padrão (Figura 7A e B). O tratamento com extrato de Pu Erh não alterou os consumos de ração, calórico total ou de calorias provenientes de lipídios da dieta em nenhuma das doses testadas neste trabalho.

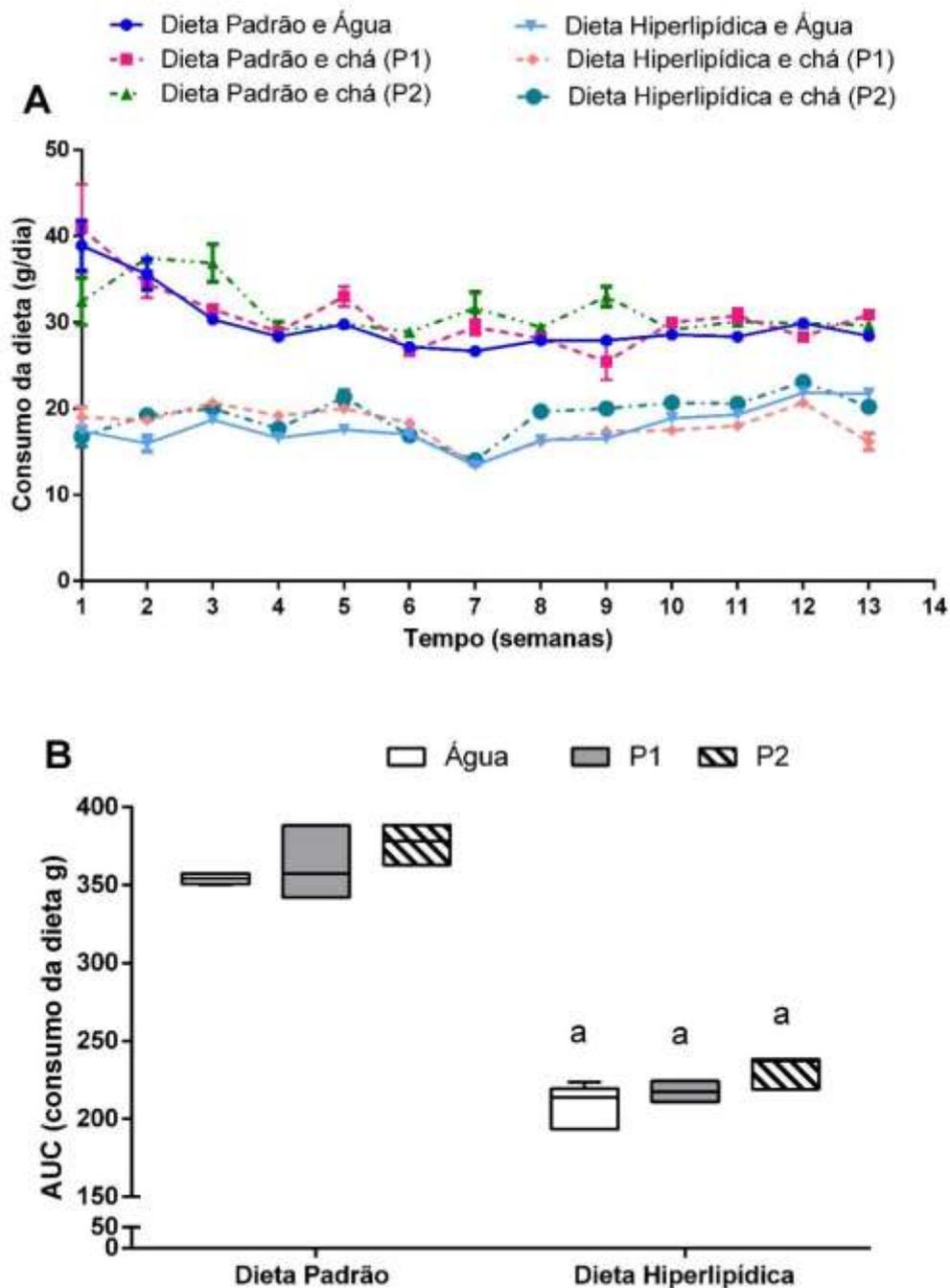


Figura 5. Consumo estimado da dieta. A. Consumo de ração (gramas/dia/animal); B. AUC (Área sob a curva). Resultados são apresentados como média \pm EPM. $n = 6$ a 12 animais por grupo.

^a diferença significativa ($p < 0,05$) entre dieta hiperlipídica e dieta padrão. Foram utilizados extratos de Pu Erh na concentração de 6,7mg/mL (P1) e de 13mg/mL. (P2). Dados do consumo de ração foram analisados pelo teste de Friedman, seguido de Dunn. Dados da área sobre a curva foram avaliados pelo teste Kruskal Wallis, seguido de Dunn.

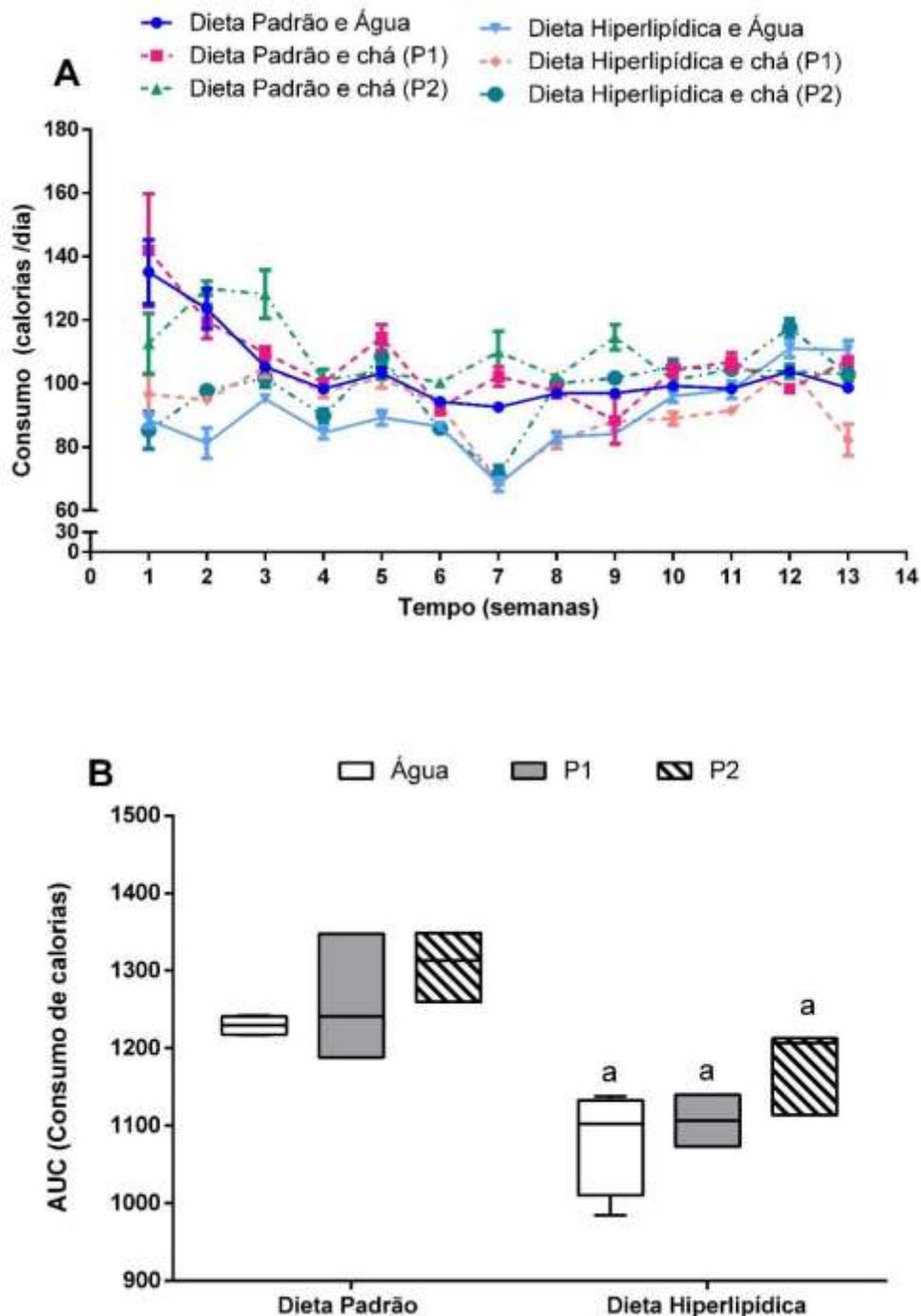


Figura 6. Consumo de calorias. A. Consumo de energia (Calorias/dia/ animal); B. Área sobre a curva (Area Under the Curve, AUC); dados são apresentados como média \pm EPM. $n = 6$ a 12 animais por grupo.^a diferença significativa ($p < 0,05$) entre dieta hiperlipídica e dieta padrão. Foram utilizados extratos de Pu Erh na concentração de 6,7mg/mL (P1) e de 13mg/mL. (P2). Dados do consumo de ração foram analisados pelo teste de Friedman, seguido de Dunn. Dados da área sobre a curva foram avaliados teste Kruskal Wallis, seguido de Dunn.

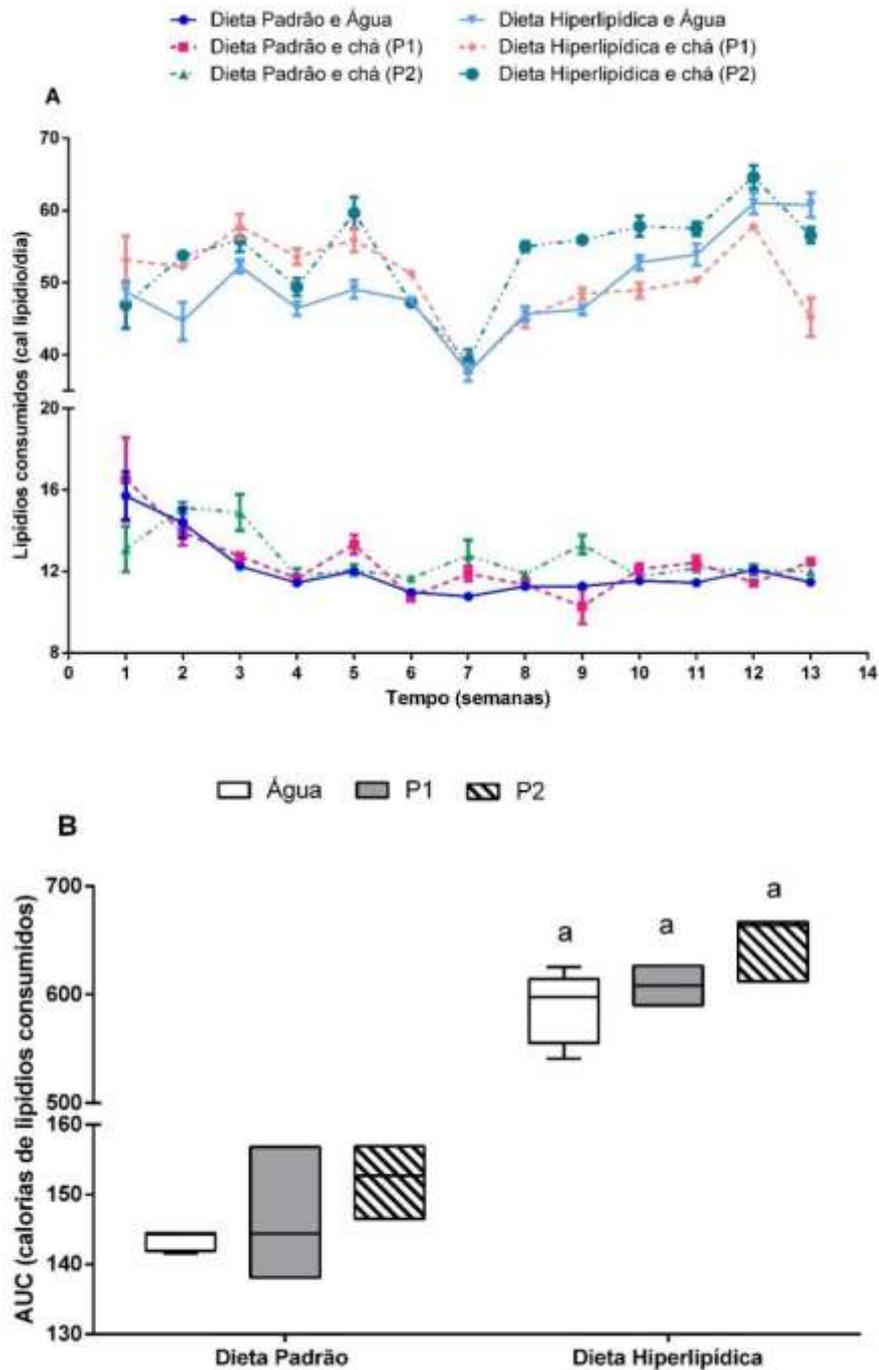


Figura 7. Consumo de lipídios(calorias). A. Consumo de energia (Calorias de lipídio/dia/ animal). B Área sobre a curva (AUC); dados são apresentados como média \pm EPM. $n = 6$ a 12 animais por grupo. ^a diferença significativa ($p < 0,05$) entre dieta hiperlipídica e dieta padrão. Foram utilizados extratos de Pu Erh na concentração de 6,7mg/mL (P1) e de 13mg/mL. (P2). Dados do consumo de ração foram analisados pelo teste de Friedman, seguido de Dunn. Dados da área sobre a curva foram avaliados por ANOVA de duas vias, seguido de Tukey.

4.4 Ganho de peso

Durante o tratamento de 13 semanas todos os animais aumentaram de peso. O peso não diferiu entre os grupos DPA, DPP1 e DPP2. Da mesma forma, o peso não diferiu entre DHA, DHP1 e DHP2. Nos grupos DPA, DPP1 e DPP2 os animais aumentaram significativamente de peso a partir da primeira semana, em relação ao tempo zero (antes de iniciar o tratamento) até o final do tratamento. No grupo DHA, os animais aumentaram significativamente de peso a partir da segunda semana (Figura 7A).

O ganho de peso após treze semanas de tratamento (peso na 13^a semana– peso inicial) foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos animais que receberam dieta hiperlipídica em relação aos animais que receberam dieta padrão (Figura 7B). O tratamento com extrato de Pu Erh não alterou o ganho de peso dos animais em nenhuma das dietas estudadas.

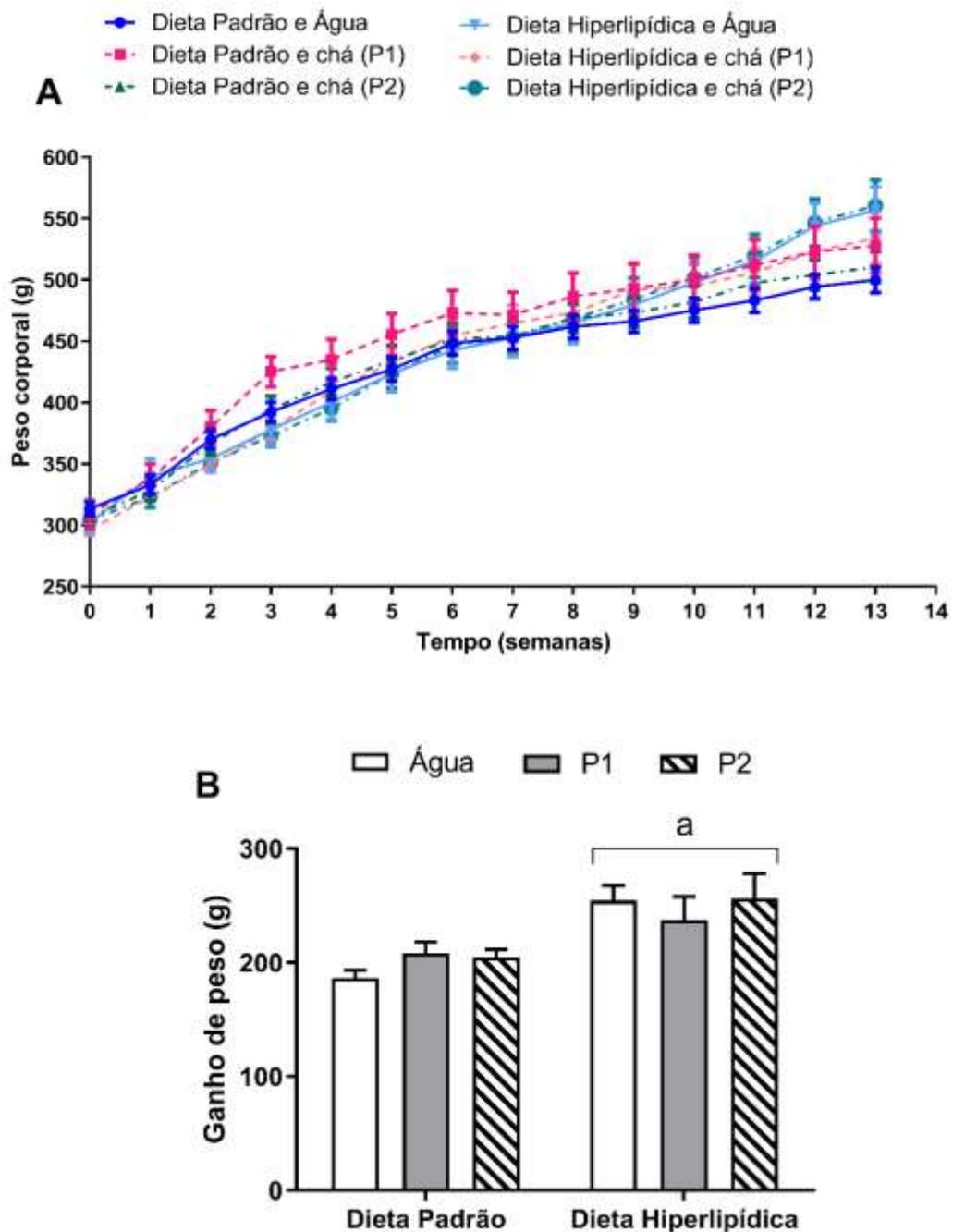


Figura 8. A. Medida do peso corporal (g) durante as treze semanas de tratamento. B. Ganho de peso (g) [peso (após 13 semanas de tratamento) – peso inicial (semana zero)]. Dados são apresentados como média \pm EPM. $n=6$ a 12 animais por grupo. ^a $p<0,05$ diferença significativa entre as dietas padrão e hiperlipídica. Foram utilizados extratos de Pu Erh nas concentrações de 6,7 mg/mL (P1) e de 13 mg/mL (P2). Análise de medidas repetidas ANOVA seguido de Tukey (A); Two-way ANOVA, seguido de Tukey (B).

4.5 Teste de Tolerância à Glicose (TTG)

Os resultados do TTG estão representados nas figuras 9A (4 semanas), 10A (8 semanas) e 11A (12 semanas). Após quatro semanas de tratamento, no grupo que ingeriu dieta padrão, a glicemia (jejum de 8h) dos animais tratados com extrato de Pu Erh na maior concentração (P2) estava menor ($p < 0,05$) em relação aos animais tratados com água e com extrato de Pu Erh na menor concentração (P1) (Figura 9B). Os animais tratados com dieta hiperlipídica apresentaram valores de glicemia maiores do que os animais tratados com dieta padrão [$F(1, 48) = 18,15, p < 0,0001$] (Figura 9B). Além disso, o teste de tolerância à glicose (Figura 9C) demonstrou que, nos animais tratados com dieta hiperlipídica, o retorno aos valores iniciais da glicemia foi mais lento em relação aos animais que ingeriram dieta padrão. A área sob a curva dos valores de glicose durante o teste (Figura 9C) foi maior nos animais tratados com dieta hiperlipídica [$F(1, 48) = 104,1, p < 0,0001$].

Após oito semanas de tratamento, os animais tratados com dieta hiperlipídica apresentaram valores de glicemia maiores do que os animais tratados com dieta padrão [$F(1, 48) = 40,34, p < 0,0001$] (Figura 10B). Da mesma forma, o teste de tolerância à glicose (Figura 10C) demonstrou que animais tratados com dieta hiperlipídica apresentaram retorno aos valores iniciais da glicemia mais lento em relação aos animais que ingeriram dieta padrão e maior área sob curva [$F(1,48) = 22,2, p < 0,0001$] (Figura 10C).

Após doze semanas de tratamento, os animais tratados com dieta hiperlipídica apresentaram valores de glicemia maiores do que os animais tratados com dieta padrão [$F(1,40) = 13,37, p = 0,0007$] (Figura 11B). Da mesma forma, o teste de tolerância à glicose (Figura 11C) demonstrou que animais

tratados com dieta hiperlipídica apresentaram retorno aos valores iniciais da glicemia mais lento em relação aos animais que ingeriram dieta padrão e maior área sob curva maior [$F(1,40)=40,75$, $p<0001$] (Figura 11C).

O tratamento com extrato de Pu Erh nas doses P1 e P2 não alterou o desempenho dos animais no teste de tolerância à glicose ($p>0,05$) em nenhum dos tempos de tratamento (4, 8 e 12 semanas – figuras 9, 10 e 11, respectivamente) e em nenhuma das dietas.

4 Semanas

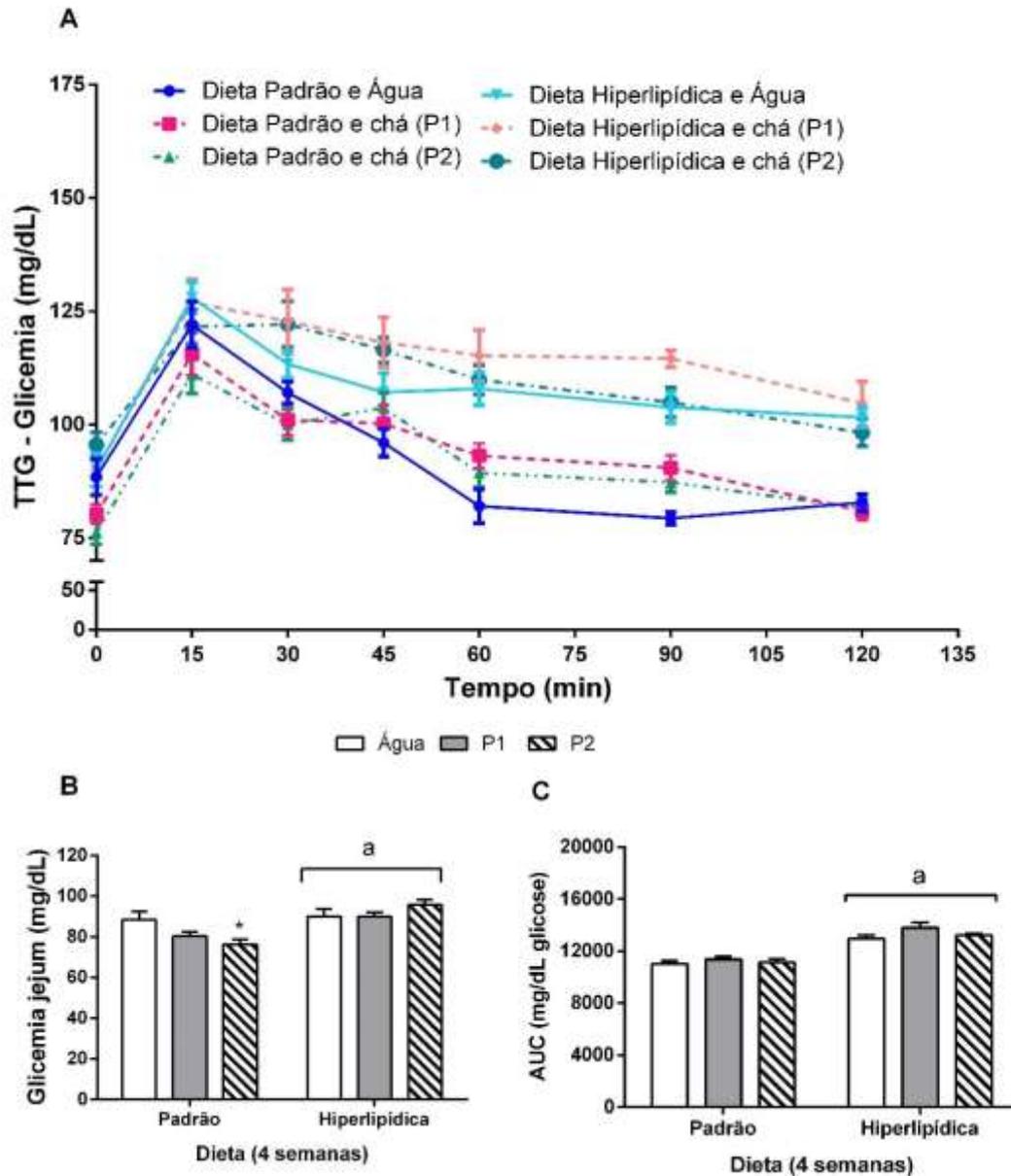


Figura 9. Teste de Tolerância à Glicose (TTG) após jejum de 8 horas em animais com 4 semanas de tratamento. A. Glicemia (mg/dL) nos tempos zero (antes da gavagem de solução de glicose 1g Glicose/kg), 15, 30, 45, 60, 90, 120 minutos após a gavagem. **B.** Glicemia em Jejum de 8 horas (tempo 0). **C.** Área sob a curva da glicemia (mg/dL) durante o TTG. Dados são representados como média \pm erro padrão da média. $n = 9$ animais por grupo. ^a diferença significativa em relação à dieta padrão [F (1,48) =104,1; $p=0,0001$; * $p<0,05$ diferença significativa entre os grupos DPA e DPP2. Foram utilizados extratos de Pu Erh na concentração de 6,7mg/mL (P1) e de 13mg/mL (P2).

8 Semanas

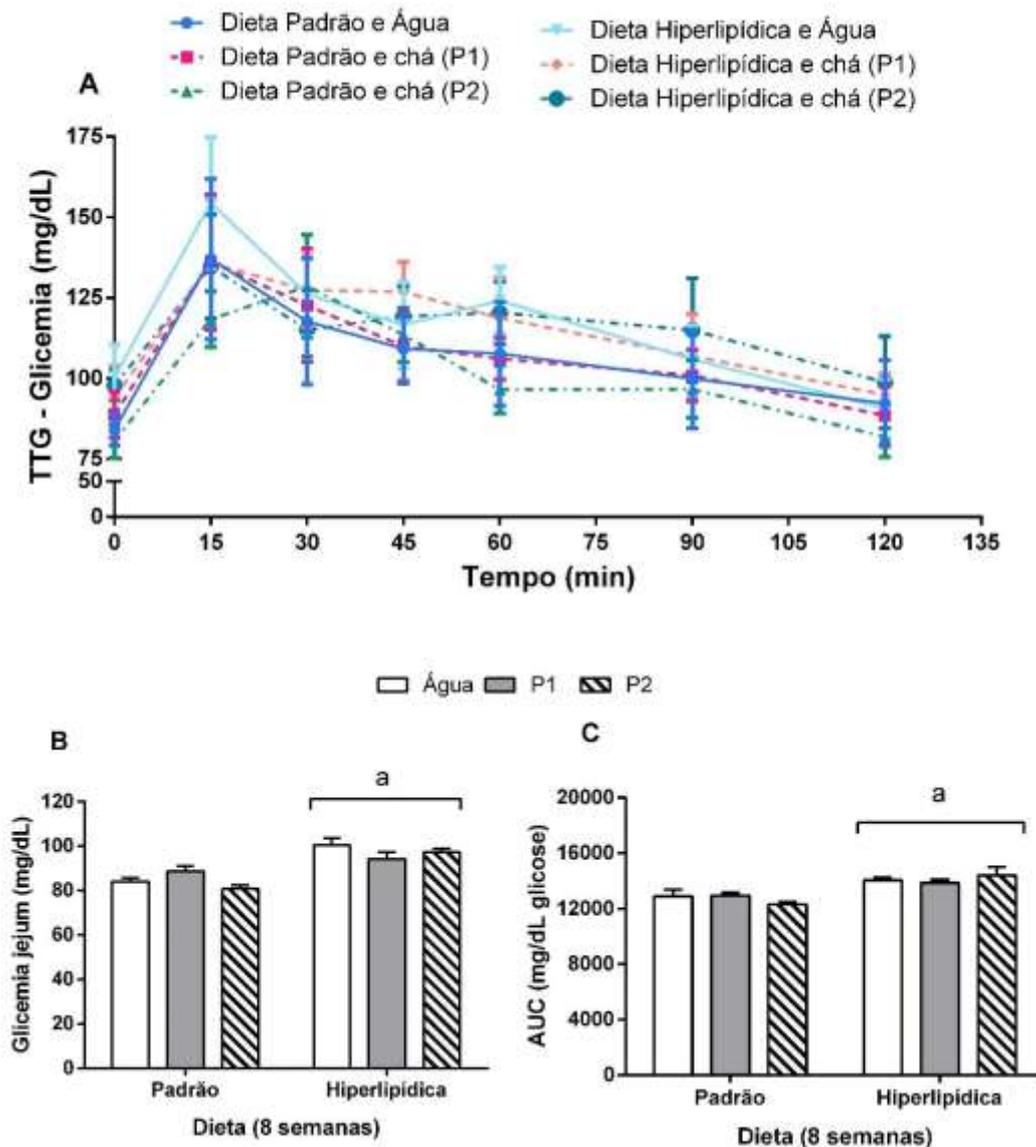


Figura 10. Teste de Tolerância à Glicose (TTG) após jejum de 8 horas em animais com 8 semanas de tratamento. A. Glicemia (mg/dL) nos tempos zero (antes da gavagem de solução de glicose 1g/kg), 15, 30, 45, 60, 90, 120 minutos após a gavagem. **B.** Glicemia em jejum de 8 horas (tempo 0). **C.** Área sob a curva (AUC) da glicemia durante o TTG. Dados são representados como média \pm erro padrão da média. $n = 9$ animais por grupo. Foram utilizados extratos de Pu Erh na concentração de 6,7mg/mL (P1) e de 13mg/mL (P2). ^a diferença significativa em relação à dieta padrão ($p < 0,05$).

12 Semanas

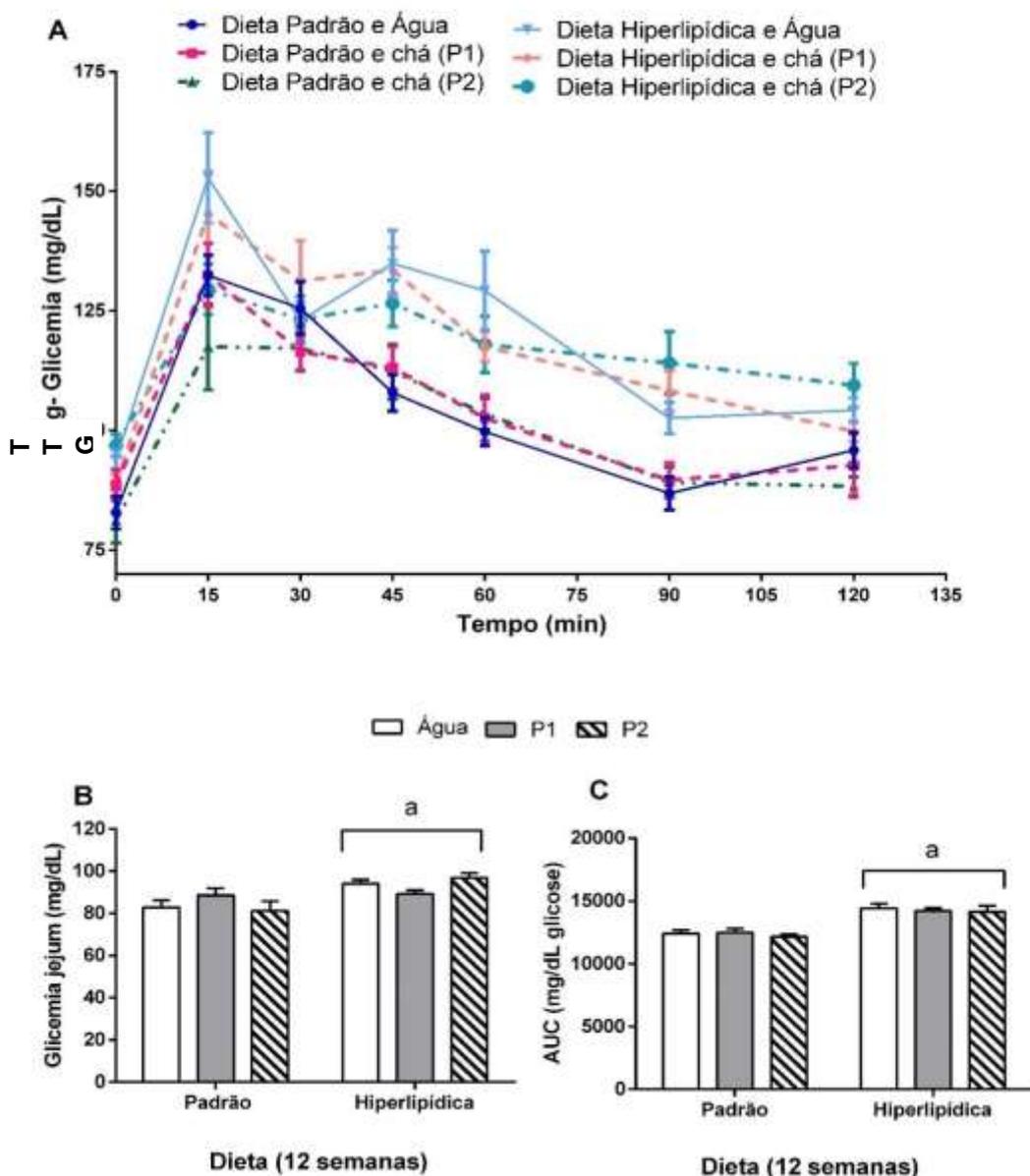


Figura 11. Teste de Tolerância à Glicose (TTG) após jejum de 8 horas em animais com 12 semanas de tratamento. A. Glicemia (mg/dL) nos tempos zero (antes da gavagem de solução de glicose - 1g glicose/kg), 15, 30, 45, 60, 90, 120 minutos após a gavagem. **B.** Glicemia em Jejum de 8 horas (tempo 0). **C.** Área sob a curva da glicemia durante o TTG. Dados são representados como média \pm erro padrão da média. $n = 6-9$ animais por grupo. P1 é a concentração do extrato de 6,7mg/mL e P2 é a concentração do extrato de 13mg/mL. ^a diferença significativa em relação à dieta padrão $p < 0,05$; * diferença significativa em relação à dieta padrão $p < 0,05$.

4.6 Concentrações séricas de colesterol total e triacilglicerol nas 4, 8 e 13 semanas de tratamento

A concentração sérica de CT aumentou significativamente ($p < 0,05$) no grupo DHA em relação ao grupo DPA nas 4, 8 e 13 semanas de tratamento (Figuras 12 A, B e C, respectivamente). O tratamento com extrato de Pu Erh, nas doses P1 e P2, reverteu significativamente ($P < 0,05$) este aumento apenas nas 8 semanas (Figura 12B). A concentração sérica de TGC aumentou significativamente ($p < 0,05$) no grupo DHA em relação aos grupos que ingeriram dieta padrão (DPA, DPP1 e DPP2) nas 4, 8 e 13 semanas de tratamento (Figuras 12 D, E e F, respectivamente). O tratamento com extrato de Pu Erh, nas doses P1 e P2, reverteu este aumento ($p < 0,05$) nas 8 e 13 semanas de tratamento (Figura 12 E e F, respectivamente), e na dose P1, na semana 4 (Figura 12A).

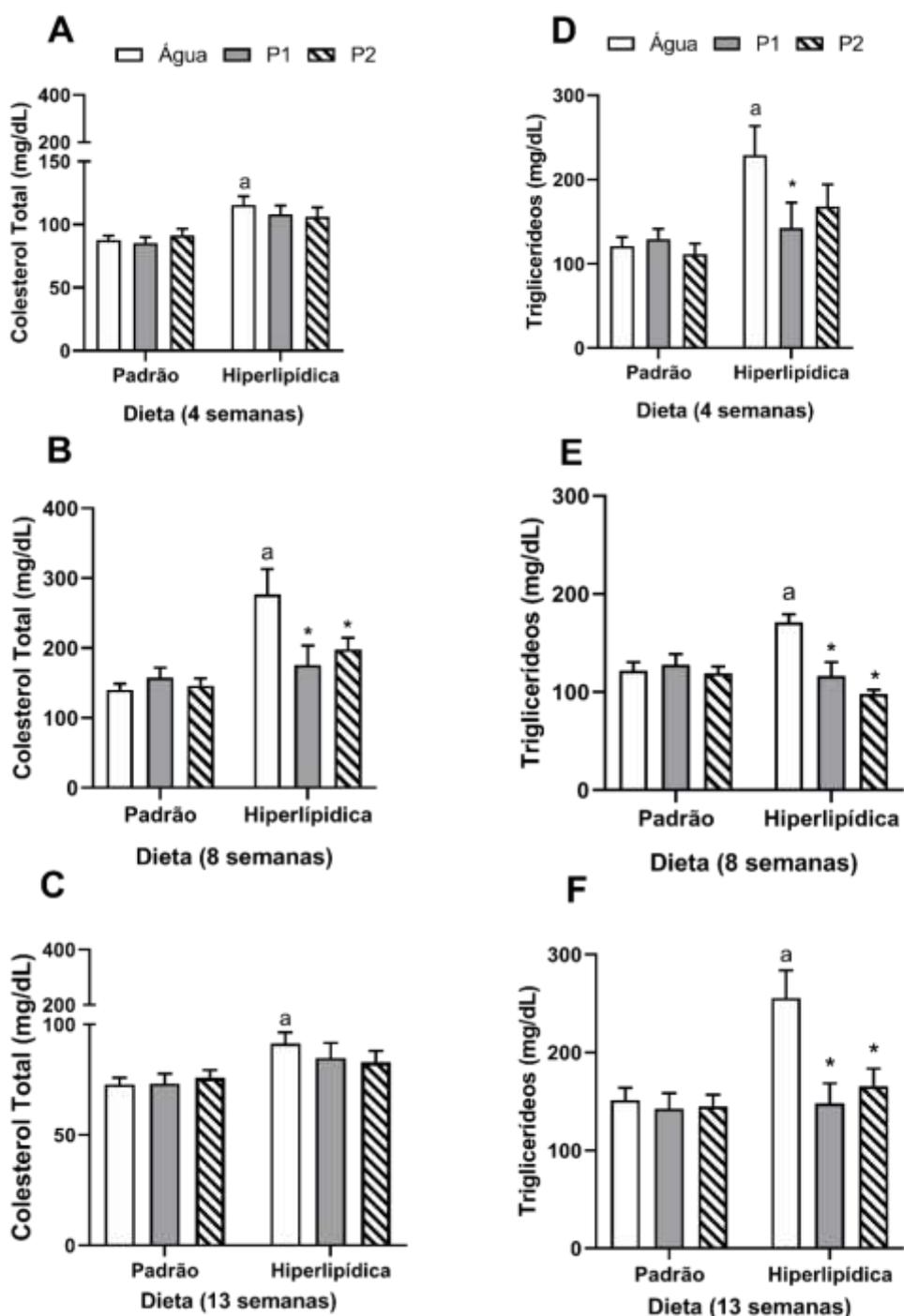


Figura 12. Concentrações séricas de colesterol total (A-C) e de triglicerídeos (E-F). A, D. 4 semanas de tratamento; B, E. 8 semanas de tratamento; C, F. 13 semanas de tratamento. Dados são representados como média \pm erro padrão da média. $n = 6-9$ animais por grupo (CT) e 6-11 animais por grupo (TGC). P1 é a concentração do extrato de 6,7mg/mL e P2 é a concentração do extrato de 13mg/mL. ^a diferença significativa em relação à dieta padrão $p < 0,05$; * diferença significativa em relação ao grupo DHA $p < 0,05$.

4.7 Parâmetros bioquímicos séricos após eutanásia (13 semanas)

O tratamento com a dieta hiperlipídica causou aumento ($p < 0,05$) nos níveis séricos de glicose e HDL nos grupos DHA, DHP1 e DHP2 em relação aos grupos tratados com dieta padrão (Tabela 4). O tratamento com extrato de Pu Erh na dose P1 diminuiu a glicemia no grupo DPP1 em relação ao DPA ($p < 0,05$). Diferentemente, o tratamento com extrato não alterou as concentrações de HDL séricos (Tabela 4).

As concentrações séricas de CT, TGC, bilirrubina direta (BD) aumentaram ($p < 0,05$) nos animais tratados com DHA comparado aos animais alimentados com dieta padrão (DPA, DPP1, DPP2). O tratamento com o extrato de Pu Erh nas doses P1 e P2 reverteu o aumento nas concentrações de TGC e BD nos animais que ingeriram dieta hiperlipídica ($p < 0,05$) (Tabela 4). Além disso, o tratamento com extrato na dose P1 diminuiu ($p < 0,05$) a concentração das proteínas totais nos animais tratados com dieta hiperlipídica (Tabela 4).

A dieta hiperlipídica e/ou o tratamento com o extrato não alteraram as concentrações séricas das enzimas ALT e AST e do colesterol não HDL (Tabela 4). A concentração de insulina no soro foi maior nos animais tratados com dieta hiperlipídica comparado aos tratados com dieta padrão [$F(1,34)=8,1, p = 0,0076$], contudo, o tratamento com extrato de Pu Erh não alterou as concentrações de insulina em nenhuma das dietas estudadas (Tabela 4).

O índice aterogênico (IA) diminuiu aproximadamente 24% nos grupos DHA e DHP1 em relação aos respectivos grupos alimentados com dieta padrão e 47% no grupo DHP2 em relação ao DPP2 ($p < 0,05$) (Tabela 4). O índice de risco coronário (IRC) mostrou-se significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo DHA em relação aos grupos alimentados com dieta padrão (DPA, DPP1 e DPP2). O

tratamento com extrato de Pu Erh reverteu este aumento do IRC nos grupos DHP1 e DHP2, os quais apresentaram valores de IRC iguais aos dos animais tratados com dieta padrão (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos séricos em 13 semanas de tratamento.

Parâmetros Bioquímicos	n	DIETA PADRÃO			DIETA HIPERLIPIDICA		
		Água (A)	Pu Erh P1	Pu Erh P2	Água (A)	Pu Erh P1	Pu Erh P2
Glicose	6-12	114,1±3,68	88,61±3,24*	103,4±7,31	133±4,97 ^a	123,1±5,72 ^a	132,4±5,28 ^a
Insulina	6-7	2,88±0,15	2,92±0,20	2,97±0,21	3,2±0,26 ^a	3,47±0,32 ^a	3,67±0,21 ^a
Colesterol Total	6-9	72,76±3,19	73,33±4,36	75,94±3,45	91,4±5,02 ^a	84,79±6,77	83,05±4,97
HDL	6-12	26,5±1,57	23,54±2,15	26,62±2,0	41,05±1,35 ^a	37,17±1,88 ^a	43,49±2,92 ^a
Colesterol Não-HDL	6-12	46,27 (37,62/56,32)	49,78 (43,09/59,58)	49,95 (45,01/59,61)	46,01 (40,0/50,73)	47,62 (27,29/63,07)	39,56 (27,35/53,58)
Triglicerídeos	6-11	151,3±12,64	142,60±15,85	144,8±11,97	255,6±28,32 ^a	148,0±20,49*	165,2±18,30*
Bilirrubina Direta	6-12	0,33±0,04	0,44±0,04	0,41±0,02	2,40±0,21 ^a	1,36±0,28 ^{a*}	1,68±0,25 ^{a*}
ALT	6-12	44,91±1,51	59,67±2,73	57,13±2,14	45,64±2,10	46,17±3,24	45,78±2,54
AST	6-12	214,5 (186/233,8)	259,0 (216/296)	216,0 (197,5/238,5)	163,0 (152/174)	151,5 (147/181,3)	167,0 (147/173,5)
IRC	6-12	2,07±0,14	1,92±0,16	1,88±0,23	6,31±0,79 ^a	4,17±0,80*	3,93±0,43*
IA	6-12	1,73 (1,572/1,881)	2,00 (1,614/2,172)	1,67 (1,417/2,111)	1,20(1,105/1,348)	1,14 (0,9445/2,054)	1,01 (0,7538/1,266)

Os dados são expressos como média ± EPM (glicose, insulina, colesterol total, HDL, triglicerídeos, bilirrubina, proteínas totais, ALT, IRC) ou mediana e intervalo interquartil-25%/75% (colesterol não-HDL e AST). Glicose, Colesterol Total, Triglicerídeos, HDL, Colesterol Não HDL e Bilirrubina Direta foram expressos em mg/dL; Insulina foi expressa em µIU/mL; ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) foram expressas em U/L. IA, Índice de Adiposidade= [(colesterol total -HDL) /HDL]; IRC, Índice de risco coronário =Triglicerídeos (mg/dL) / HDL (mg/dL). P1 é a concentração do extrato de 6,7mg/mL e P2 é a concentração do extrato de 13mg/mL. A= água; DP= dieta padrão; DH= dieta hiperlipídica. ^a diferença significativa em relação à dieta padrão p<0,05; * diferença significativa em relação ao grupo da respectiva dieta tratado com água p<0,05.

4.8 Atividade da paraoxonase 1 (PON1) sérica

A atividade sérica da enzima paraoxonase 1 (PON1) não foi alterada nem pela dieta nem pelo tratamento com extrato de Pu Erh (Figura 13A). Contudo, a relação entre a atividade da PON1 e a concentração de HDL ([atividade PON1 U/dL]/ concentração de HDL (mg/dL) diminuiu ($p < 0,05$) quando os animais foram tratados com dieta hiperlipídica (Figura 13B). O extrato não causou modificação nem na atividade da enzima nem em sua relação com a concentração de HDL sérico (Figura 13A e B).

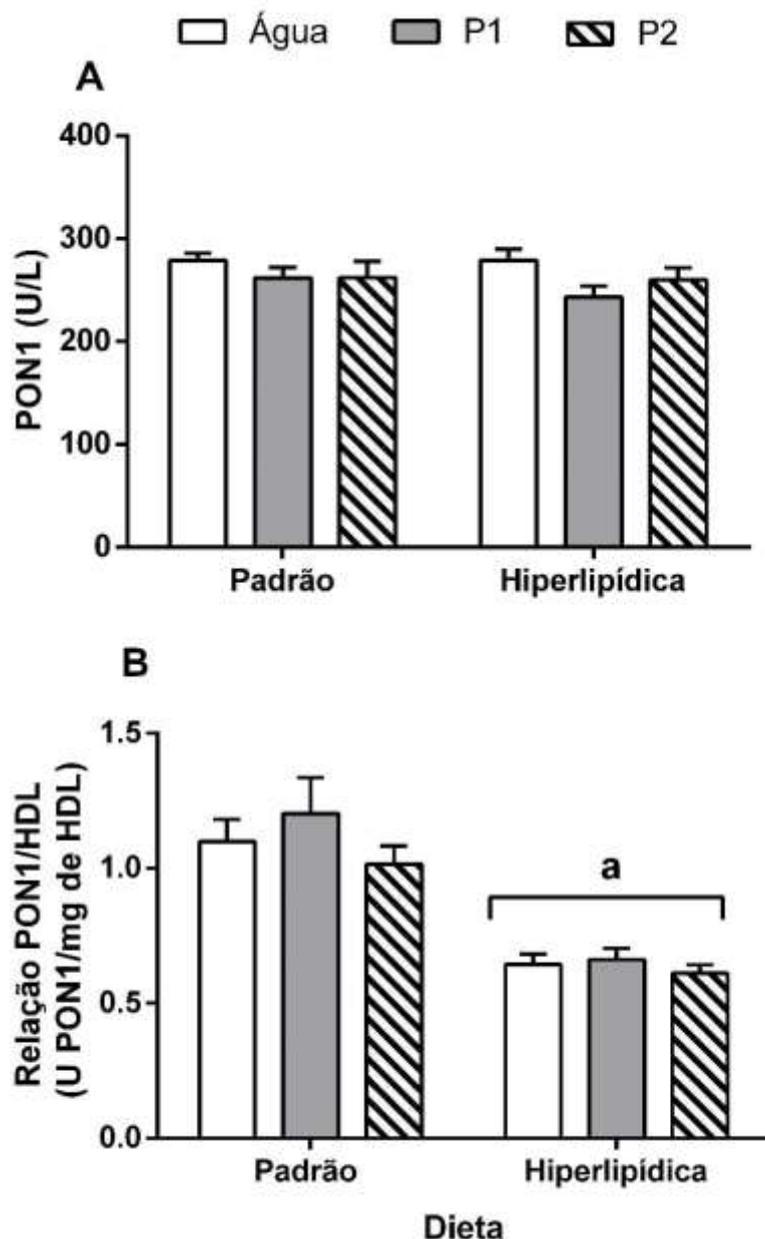


Figura 13. A. Atividade da paraoxonase 1 (PON1) sérica. B. Relação entre a atividade da PON1 e a concentração de HDL séricas. A atividade da PON1 está expressa em U/L. A relação entre PON1 e HDL está expressa em unidades de PON1/mg de HDL. Dados são representados como média \pm EPM. $n=6-12$ animais por grupo. P1 é a concentração do extrato de 6,7mg/mL e P2 é a concentração do extrato de 13mg/mL. ^a diferença significativa em relação à dieta padrão $p < 0,05$.

4.9 Índices somáticos teciduais

O índice lipossomático do tecido adiposo branco subcutâneo (TABs) (Figura 14A) aumentou mais de 1000 vezes ($p < 0,0001$) nos animais alimentados com dieta hiperlipídica com relação aos animais tratados com dieta padrão. O tratamento com extrato de Pu Erh nas doses P1 e P2 reduziu o índice lipossomático deste tecido apenas nos animais tratados com dieta padrão.

O índice lipossomático do tecido adiposo branco retroperitoneal (TABr) (Figura 14B) aumentou duas vezes ($p < 0,05$) nos animais tratados com dieta hiperlipídica em relação aos animais alimentados com dieta padrão. O tratamento com extrato nas doses P1 e P2 também reduziu o índice lipossomático apenas nos animais tratados com dieta padrão.

O índice lipossomático do tecido adiposo branco epididimal (TABe) (Figura 14C) aumentou três vezes ($p < 0,05$) nos animais tratados com dieta hiperlipídica em relação ao tratamento com dieta padrão. O tratamento com extrato na dose P2 diminuiu o índice lipossomático nos animais tratados com dieta padrão.

No tecido adiposo marrom (TAM) (Figura 14D), a dieta hiperlipídica aumentou ($p < 0,05$) o índice lipossomático e o tratamento com extrato nas doses P1 e P2 diminuiu ($p < 0,05$) este índice. Além disso, o índice hepatossomático não foi alterado nem pela dieta nem pelo tratamento com extrato (Figura 14E).

O índice somático dos músculos sóleos (Figura 14F) foi reduzido nos grupos DHA e DHP2 em relação aos respectivos grupos tratados com dieta padrão. O índice somático dos músculos gastrocnêmios (Figura 14G) foi reduzido ($p < 0,05$) nos animais tratados com dieta hiperlipídica em relação aos tratados com dieta padrão ($p < 0,05$).

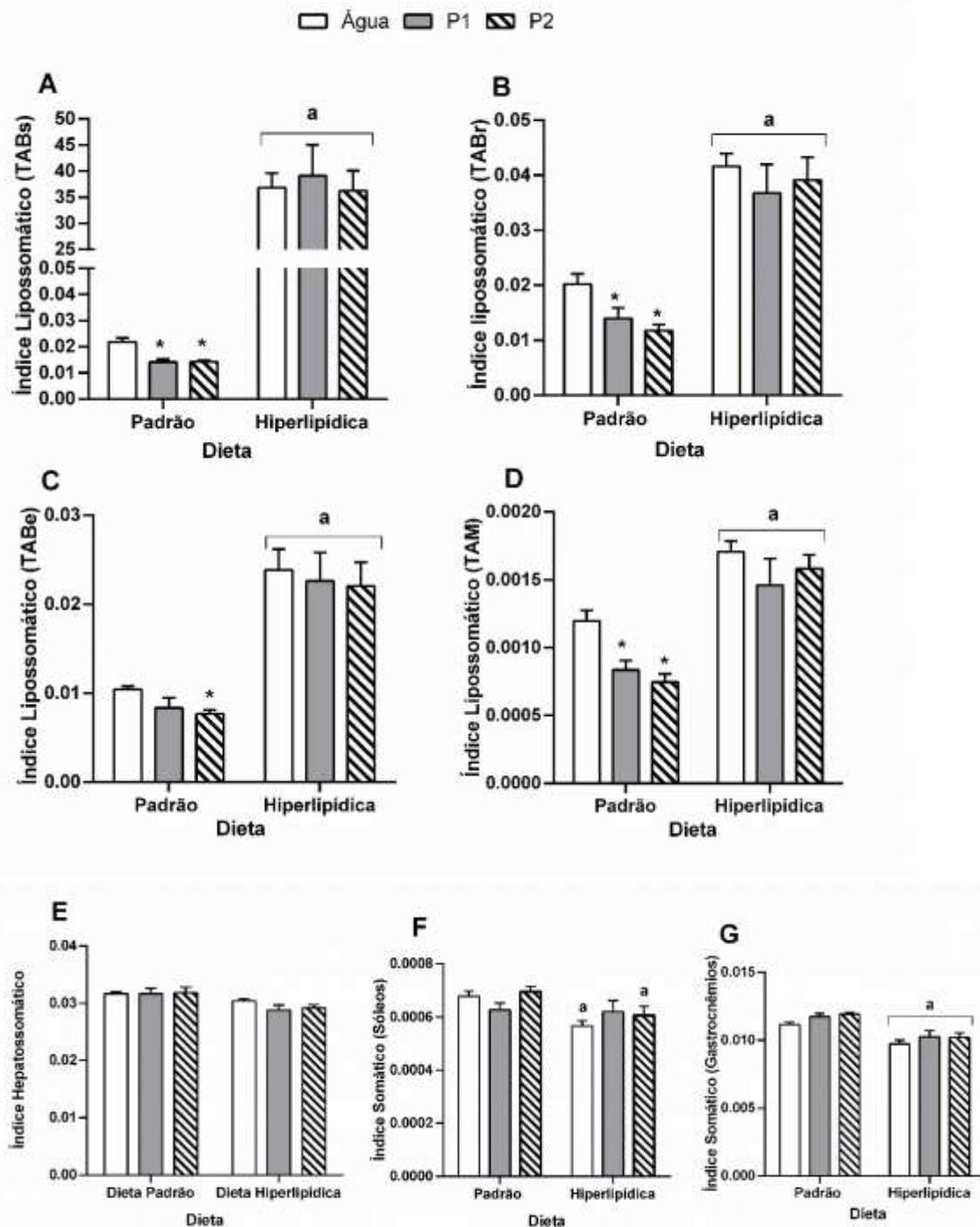


Figura 14. Índices teciduais. Índices lipossomáticos do tecido adiposo branco (TAB), subcutâneo (TABs) (A), retroperitoneal (TABr) (B) e epididimal (TABe) (C); Índice lipossomático do tecido adiposo marrom interescapular (TAM) (D). Índice hepatossomático (E). Índice tecidual dos músculos sóleos (F); Índice tecidual dos músculos gastrocnêmios (G). Dados são representados como média \pm EPM. Os índices foram calculados dividindo o peso do tecido (g) pelo peso do animal (g). $n= 6-12$ animais por grupo. P1 é a concentração do extrato de 6,7mg/mL e P2 é a concentração do extrato de 13mg/mL. ^adiferença significativa em relação à dieta padrão $p<0,05$; * diferença significativa em relação ao grupo da respectiva dieta tratado com água $p<0,05$.

4.10 Reservas energéticas do tecido hepático

A concentração hepática de glicogênio não foi alterada nem pela dieta nem pelo tratamento com extrato de Pu Erh (Figura 15A). Contudo, a dieta hiperlipídica causou aumento ($p < 0,05$) nas concentrações de lipídios totais e triglicerídeos do tecido hepático, enquanto o tratamento com extrato não alterou estes parâmetros (Figuras 15 B e C, respectivamente).

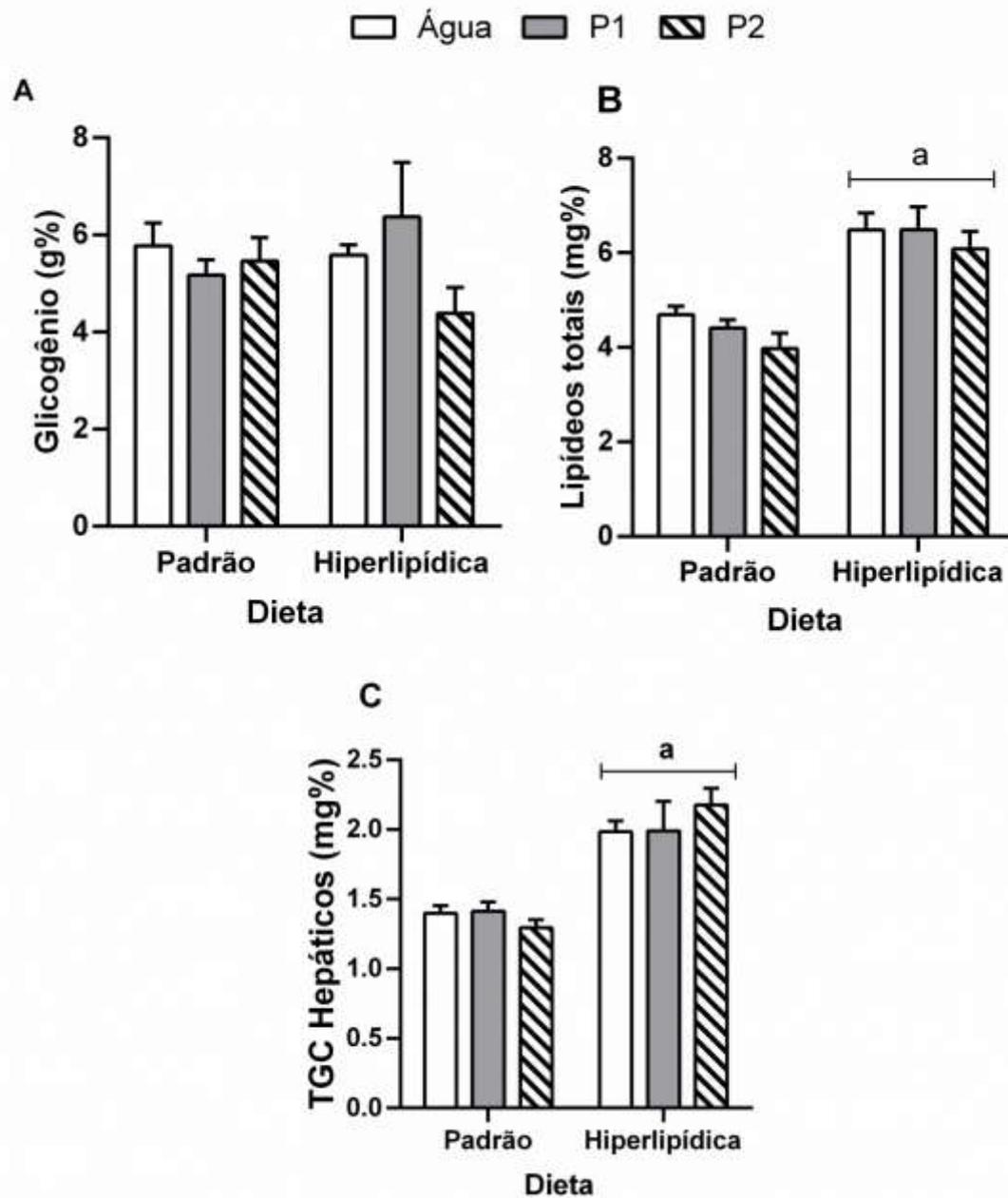


Figura 15. Reservas energéticas hepáticas. Concentração hepática de glicogênio (g%) (A), lipídeos totais (mg%) (B) e triglicerídeos (mg%) (C). $n=5-12$ animais por grupo. Dados são representados como média \pm erro padrão da média. P1 é a concentração do extrato de 6,7mg/mL e P2 é a concentração do extrato de 13mg/mL. ^a diferença significativa em relação a dieta padrão $p<0,05$.

4.11 Conversão de ^{14}C -glicose em $^{14}\text{CO}_2$, ^{14}C -glicogênio e ^{14}C -lipídios totais

No fígado, a conversão de ^{14}C -glicose em $^{14}\text{CO}_2$ (oxidação da glicose) foi reduzida ($p < 0,05$) nos animais tratados com dieta hiperlipídica em relação aos tratados com dieta padrão. Contudo, o tratamento com extrato não alterou significativamente a oxidação de glicose em nenhuma das dietas (Figura 16A). Da mesma forma, a conversão de ^{14}C -glicose em ^{14}C -glicogênio também foi reduzida ($p < 0,05$) nos animais tratados com dieta hiperlipídica em relação aos tratados com dieta padrão e o tratamento com extrato não alterou significativamente a glicogênese (Figura 16B). A conversão de ^{14}C -glicose em ^{14}C -lipídios totais foi reduzida pelo tratamento com extrato ($p < 0,05$) nos animais tratados com dieta padrão. A dieta hiperlipídica em todos os grupos estudados (DHA, DHP1, DHP2) reduziu ($p < 0,05$) a lipogênese em relação ao grupo DPA. Contudo, o tratamento com extrato de Pu Erh não alterou ($p > 0,05$) a lipogênese nos animais tratados com dieta hiperlipídica. (Figura 16C).

No tecido adiposo branco retroperitoneal, o tratamento com extrato P2 aumentou a conversão de ^{14}C -glicose em $^{14}\text{CO}_2$ (oxidação da glicose) ($p < 0,05$) nos animais tratados com dieta padrão (Figura 17A). A dieta hiperlipídica causou redução na oxidação da glicose ($p < 0,05$) e o tratamento com extrato P1 estimulou ($p > 0,05$) a oxidação (Figura 17 A). O tratamento com extrato na concentração P2 estimulou a lipogênese nos animais tratados com dieta padrão (Figura 17B). A dieta hiperlipídica causou redução na lipogênese ($p < 0,05$) e o tratamento com extrato de Pu Erh não reverteu esta alteração (Figura 17B).

FÍGADO

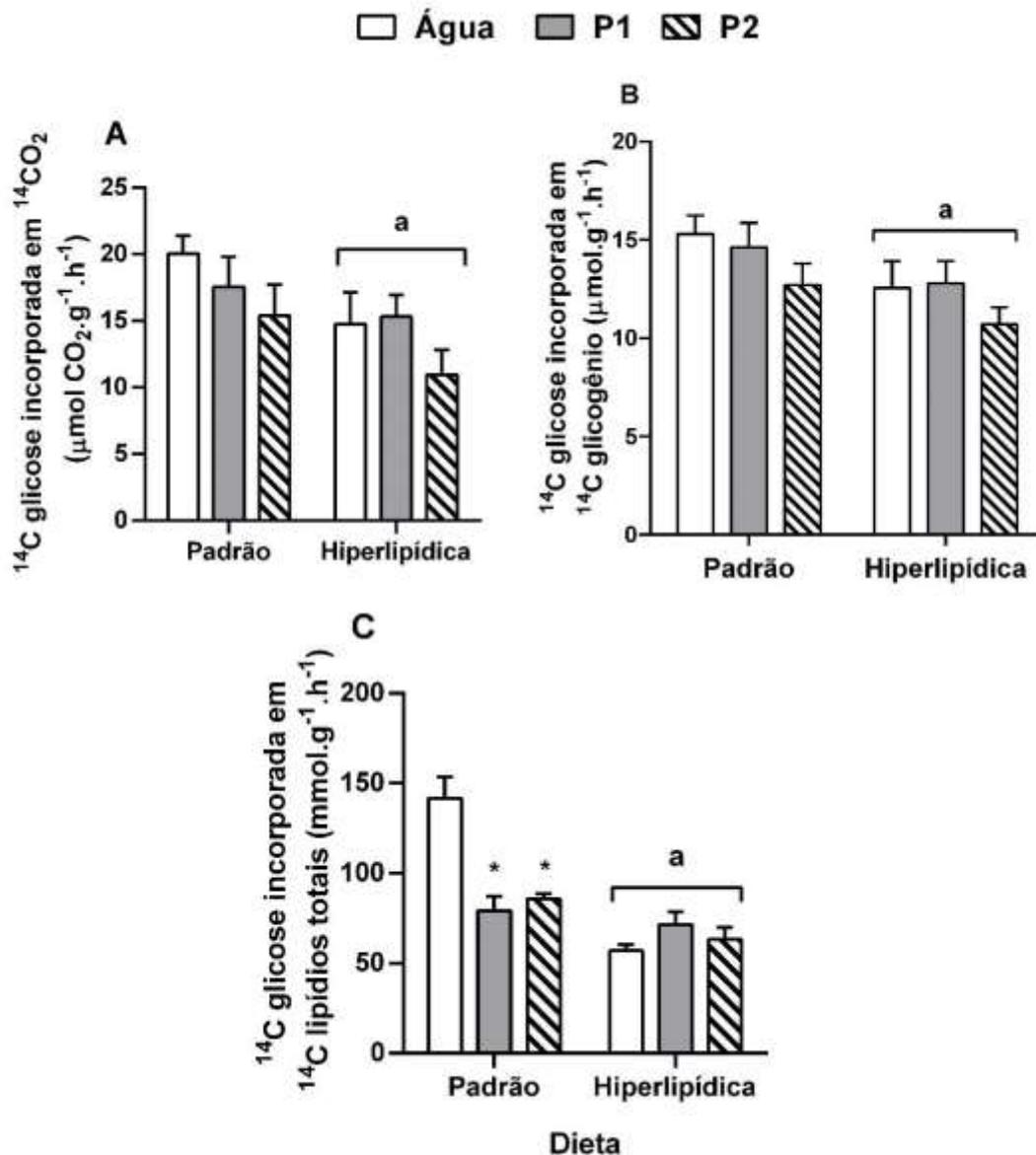


Figura 16. Conversão hepática de ^{14}C -glicose em CO_2 ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) **(A)**, em glicogênio ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) **(B)** e em lipídios totais ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) **(C)**. $n=6-8$ animais por grupo. Dados são representados como média \pm EPM. P1 é a concentração do extrato de 6,7mg/mL e P2 é a concentração do extrato de 13mg/mL. ^a

diferença significativa em relação à dieta padrão $p < 0,05$; * diferença significativa em relação ao respectivo grupo tratado com água $p < 0,05$.

TECIDO ADIPOSEO BRANCO RETROPERITONEAL

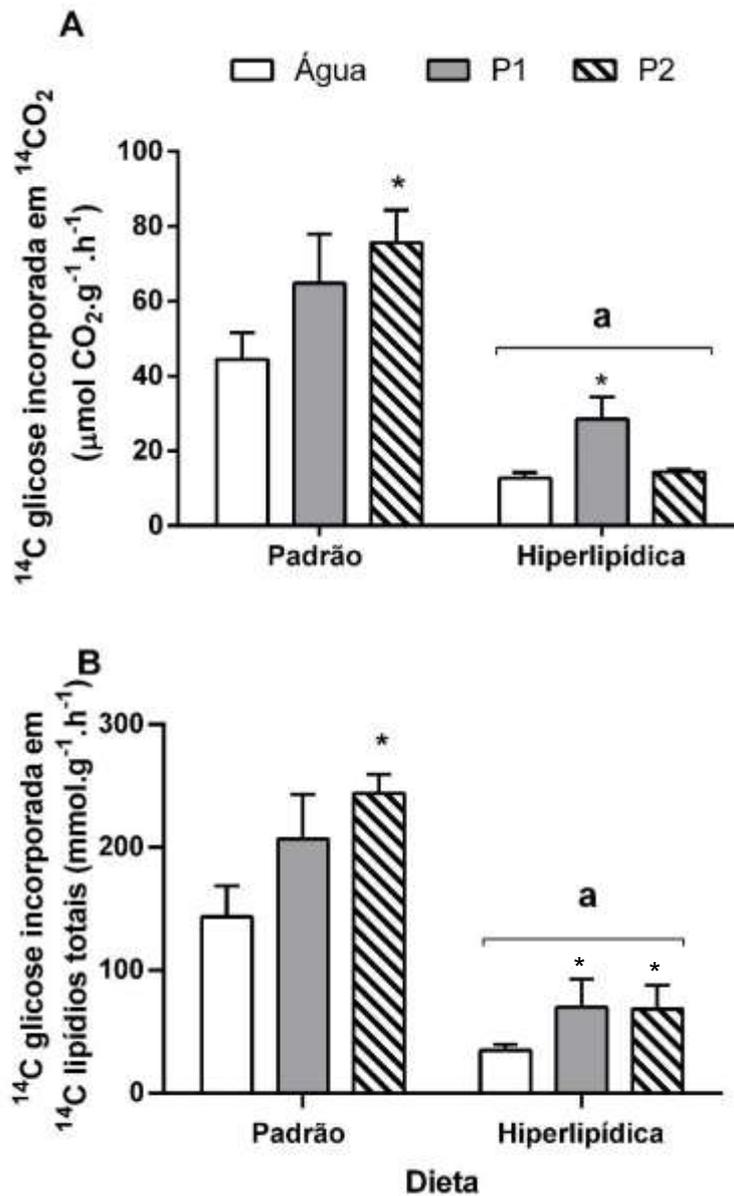


Figura 17. Conversão de ^{14}C -glicose em CO_2 ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) **(A)** e em lipídios totais ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) **(B)**, no tecido adiposo branco retroperitoneal (TABr). $n=6-8$ animais por grupo. Dados são representados como média \pm EPM. P1 é a concentração do extrato de 6,7mg/mL e P2 é a concentração do extrato de 13mg/mL. ^a diferença significativa em relação à dieta padrão; * diferença significativa em relação ao respectivo grupo tratado com água $p<0,05$.

5. DISCUSSÃO

O extrato aquoso de Pu Erh é uma bebida muito popular na Ásia e tem sido utilizado por muitos anos pelos chineses como uma bebida medicinal no tratamento de várias doenças (JENSEN et al., 2016). Atualmente, o seu consumo vem aumentando ao redor do mundo, assim como o interesse de pesquisadores em investigar seus componentes e ações metabólicas. Pu Erh é um tipo de chá fermentado que incorpora metabólitos de microrganismos durante o processo de fermentação, o que permite que seja estocado por longos períodos (dez anos ou mais) (YANG et al., 2014). O processo de fermentação é o que diferencia este chá derivado da *Camellia sinensis* de outros derivados, como o chá verde, o oolong e o chá preto.

Há uma variedade de chás Pu Erh produzidos usando diferentes processos de fermentação e / ou folhas de chá coletadas em diferentes locais de plantação. Os componentes fitoquímicos podem variar muito entre os diferentes produtos / lotes de chá Pu Erh (HUANG et al., 2019). Neste trabalho, utilizamos extrato aquoso de Pu Erh de mesmo lote em todos os experimentos a fim de minimizar essas variações. A composição do extrato utilizado foi avaliada e está de acordo com a composição do extrato de *Rippend* Pu Erh descrito na literatura, com a presença de catequina, epicatequina e cafeína. Além disso, a não detecção de epigallocatequina galato, galocatequina galato e epicatequina galato no extrato analisado está de acordo com as baixas concentrações destes compostos no extrato de Pu Erh descritas em trabalhos anteriores (SHIMAMURA et al., 2013; SOSA, 2017; CHOI et al., 2018; ZHANG et al., 2011).

Vários parâmetros metodológicos, como a concentração, o tempo e a temperatura de preparo do extrato, o período de tratamento, e a forma de amadurecimento do Pu Erh podem gerar diferentes respostas fisiológicas

(KUBOTA et al., 2011; CHOI et al., 2018; LIN et al., 2018), o que pode explicar as divergências na resposta ao extrato de Pu Erh observadas neste trabalho em relação aos dados da literatura. Além da grande variedade de chás Pu Erh comercializados, existe uma grande diversidade de protocolos na literatura científica para a preparação de extratos aquosos de *Camellia sinensis*, como por exemplo: a preparação do extrato por infusão de folhas secas com água fervente e posterior liofilização (CAO et al., 2011); a suplementação das folhas de Pu Erh na ração dos animais (KUO et al., 2004; HUANG et al., 2012;); a fervura do extrato a 100°C e posterior congelamento até sua utilização (CHOI et al., 2018). Alguns trabalhos foram realizados com oferecimento do extrato *ad libitum* (SANO et al., 1986; KUO et al., 2004) e outros através de gavagem (WANG et al., 2013; LIN et al., 2018). Este estudo seguiu protocolos de preparo do extrato já utilizados na literatura (CHOI et al., 2018; HUANG et al., 2019). Optamos por preparar o extrato diariamente (infusão por 3 minutos a 90°C) em doses (P1= 6,7mg/mL e P2= 13mg/mL) que fossem geralmente utilizadas no preparo, a fim de obter um extrato o mais similar possível ao chá que geralmente é preparado para humanos (HUANG et al., 2019).

Interessantemente, o oferecimento de extrato fresco diariamente no final da tarde aos animais mostrou-se eficaz para manter as propriedades fitoquímicas do extrato, visto que capacidade antioxidante total no extrato de Pu Erh diminuiu nove vezes, vinte e quatro horas após o extrato ser preparado e deixado à temperatura ambiente em recipientes âmbar. Outros estudos realizados em nosso grupo de pesquisa com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (ROCHA et al., 2021; GOMES, 2012) utilizaram protocolo experimental semelhante ao deste trabalho, oferecendo o extrato de Pu Erh fresco diariamente no final da tarde. Este procedimento garante que, no período de maior atividade dos animais, eles

tenham acesso ao extrato fresco. Esse procedimento é indicado para futuras investigações, preconizando o oferecimento de um extrato em que sejam mantidas as propriedades de seus compostos ativos.

Quanto ao consumo de ração e extrato, foi realizada a estimativa de consumo por caixa durante vinte a quatro horas, uma vez por semana. Os resultados da estimativa de consumo devem ser observados com cautela, visto que esta medida é suscetível a alterações, dependendo do manuseio das caixas durante a limpeza e manutenção das mesmas. Como exemplo, a forma como as mamadeiras são posicionadas nas caixas pode ocasionar a perda de líquido e alteração da medida. O consumo de líquido se manteve semelhante ao longo das treze semanas de tratamento entre os três grupos de animais que ingeriram dieta padrão. Contudo, para os animais tratados com dieta hiperlipídica e água, o consumo hídrico foi menor comparado aos que ingeriram dieta padrão (Figura 3B). O consumo de líquidos dos animais tratados com extrato de Pu Erh não diferiu entre os animais tratados com ração hiperlipídica.

Entre os substratos para oxidação, os lipídios produzem duas vezes mais quantidade de água na oxidação, quando comparados aos carboidratos por grama de substrato (ADOLPH, 1964). Jenni-Eiermann e Jenni, (2012) estimaram que a produção de água total é de 1,1g por g de lipídio e de 0,82 g por g de proteína, sendo a lipólise mais eficiente do que a proteólise na produção de água metabólica. Segundo Rutkowska et al., (2016) o balanço de água de pássaros em jejum sem acesso à água parece ser mantido pelo catabolismo de gordura, que gerou seis vezes mais água metabólica em comparação com as aves que tiveram acesso à água. Os autores propõem que a gordura pode servir como fonte primária para a produção de água metabólica. A oxidação da glicose estava reduzida após tratamento com dieta hiperlipídica tanto no fígado quanto no TABr.

Provavelmente, o maior aporte de lipídios da dieta causou aumento de sua oxidação. Desta forma, podemos inferir que o maior aporte de lipídios na dieta gerou maior produção de água metabólica, ocasionando redução de consumo hídrico.

Quanto ao consumo de ração, trabalhos prévios utilizaram consumo de ração estimado para verificar o consumo calórico em ratos, considerando as limitações da técnica (CECCONELLO et al., 2014; KUO et al., 2004; HOU et al., 2009). Os animais tratados com dieta hiperlipídica mostraram menor consumo de calorias do que os animais tratados com dieta padrão. Contudo, a ingestão de calorias de lipídios foi maior nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, evidenciando que esta dieta alterou o tipo de substrato energético ingerido.

O extrato de Pu Erh nas duas doses estudadas (P1 e P2) não causou mudanças nos consumos estimados de ração, calórico ou de lipídios, tanto para os animais que ingeriram dieta padrão, quanto para os aqueles submetidos à dieta hiperlipídica. Desta forma, podemos inferir que o tratamento com extrato de Pu Erh nas doses P1 e P2 não causou efeitos anorexígenos. Além disso, o ganho de peso não foi alterado pelo tratamento dos ratos com chá. Os dados da literatura são controversos quanto ao ganho de peso e sua associação com a ingestão de Pu Erh em roedores e humanos. Fang et al., (2015) não identificaram mudança no consumo de ração em camundongos tratados com extrato de Pu Erh ou cafeína por 4 semanas. Por outro lado, mesmo não causando mudança na ingestão de calorias, o tratamento com extrato de Pu Erh e com ácido gálico reduziu o ganho de peso em camundongos e a atividade da enzima lipase pancreática, após 12 semanas de tratamento, sugerindo que o chá causa redução na absorção dos lipídios ingeridos (OI et al., 2012). Em homens adultos hiperlipidêmicos, o tratamento por vinte semanas com extrato de Pu Erh causou redução do peso

corporal e do índice de massa corporal (JENSEN et al., 2016). De forma contrária, o tratamento com cápsulas de Pu Erh, por 3 meses, não alterou significativamente o peso e o índice de massa corporal de homens com síndrome metabólica (YANG et al., 2014). A diversificação nos protocolos de tratamento dos animais e humanos contribuiu para esta variabilidade nas respostas metabólicas.

A dieta hiperlipídica causou aumento de ganho de peso após 13 semanas de tratamento, o que é compatível com quadro de obesidade que tem base etiológica no balanço energético positivo, que promove ganho excessivo de massa adiposa corporal (PEREIRA et al., 2018). Além disso, a dieta hiperlipídica causou aumento de todos os índices lipossomáticos do tecido adiposo branco (TAB) e do tecido adiposo marrom (TAM). O aumento nas reservas de energia do TAB já era esperado, visto que o excesso de calorias ingeridas na dieta é armazenado no tecido adiposo branco (CURI et al., 2002). O tratamento com extrato de Pu Erh reduziu os índices somáticos no TAB e no TAM nos animais que ingeriram dieta padrão, mas não nos animais que ingeriram dieta hiperlipídica. Em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, por 16 semanas, o extrato de Pu Erh reduziu o ganho de peso e o índice lipossomático do tecido adiposo subcutâneo (CAI et al., 2017). Cao et al., (2011) descreveram o efeito antiobesidade do chá que reduziu o ganho de peso e a concentração plasmática de TGC, CT e LDL. Novamente, essas diferenças observadas podem ser associadas com o modelo experimental e a forma de administração do chá.

Neste trabalho, os animais que ingeriram dieta hiperlipídica ganharam mais peso e aumentaram os índices lipossomáticos em relação aos animais que ingeriram dieta padrão. Os adipócitos maduros sintetizam primariamente leptina que pode atuar como um regulador hormonal da massa de tecido adiposo. Gomes (2012) descreveu que animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram

níveis significativamente maiores de leptina, quando comparados aos animais que receberam dieta controle. Desta forma, a redução do consumo de ração observada neste trabalho pode estar relacionada com o controle da ingestão alimentar e o efeito anorexígeno da leptina sobre o hipotálamo. Contudo, futuras investigações são necessárias para confirmar esta hipótese.

A associação de obesidade com resistência à insulina é conhecida, e a dieta hiperlipídica, neste estudo, causou alterações na glicemia e no teste de tolerância à glicose o que está de acordo com trabalho prévio realizado com ratos *Wistar* (VOGT et al., 2021). Após jejum de oito horas nas 4, 8 e 12 semanas de tratamento, a dieta hiperlipídica causou aumento na glicemia e na AUC do teste de tolerância à glicose. Além disso, após 13 semanas de tratamento, a glicemia e os níveis de insulina séricos estavam aumentados quando comparados aos animais tratados com dieta padrão, demonstrando que a dieta utilizada, neste estudo, foi efetiva em desenvolver alteração no metabolismo de carboidratos e resistência à insulina.

O tratamento com extrato de Pu Erh (nas doses P1 ou P2) não alterou o desempenho dos animais no teste de tolerância à glicose nos tempos de tratamento estudados (4, 8 e 12 semanas), nem na concentração de insulina sérica após treze semanas de tratamento. A glicemia, após jejum de 8h, foi reduzida nos animais alimentados com dieta padrão e tratados por 4 semanas com extrato na maior dose (P2). Contudo, nos outros tempos de tratamento (8 e 12 semanas) esse efeito não foi observado. Estudos realizados com camundongos demonstraram que o extrato de Pu Erh melhorou o resultado dos animais no teste de tolerância à glicose, melhorando a sensibilidade à insulina em animais tratados com dieta hiperlipídica (LI et al., 2014; HUANG et al., 2019); e reduziu a glicemia em animais diabéticos (ZHOU et al., 2009; DU et al., 2012).

Yamashita et al., (2012) não observaram mudança na AUC referente ao teste de tolerância à glicose em camundongos tratados por 7 dias com extrato de Pu Erh. Contudo, evidenciaram alteração da sinalização da insulina no músculo esquelético, com aumento na expressão proteica do receptor à insulina, de PI3K, de Akt, de AMPKp e de GLUT4 no músculo esquelético. Além disso, o *Rippend* Pu Erh apresentou um efeito melhor do que o *Raw* Pu Erh no controle da glicose sanguínea pós-prandial em camundongos com diabetes melitus tipo 2 (DING et al., 2019). Adicionalmente, os polissacarídeos do chá Pu Erh promoveram a diferenciação dos adipócitos e a captação de glicose, imitando as propriedades do PPAR γ e do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), melhorando a resistência à insulina e diminuindo a glicemia (LIN et al., 2018; MENG et al., 2019). Além disso, Du et al., (2012) descreveram que o extrato de Pu Erh reduziu a atividade das enzimas sacarase, maltase e amilase, promovendo menor absorção de carboidratos e melhora na glicemia pós-prandial, sugerindo um efeito benéfico no tratamento do diabetes melitus tipo II em camundongos.

Poucos trabalhos, entretanto, investigaram os efeitos do extrato de Pu Erh em ratos (HSU, 2009; CAO et al., 2010; 2011; HUANG e LIN, 2012; DU et al., 2012). Huang e Lin (2012) após tratarem ratos *Wistar* por 12 semanas com ração suplementada com folhas de Pu Erh, encontraram diminuição na insulina sérica, sem modificar a glicemia. Além disso, o tratamento com Pu Erh, antes dos animais serem induzidos ao diabetes, diminuiu os níveis de glicose e insulina no plasma. Contudo, o tratamento iniciado após a doença estar estabelecida não causou mudança na glicemia (HSU et al., 2009).

Os dados da literatura sobre os efeitos da ingestão de Pu Erh sobre a glicemia em humanos são escassos. A ingestão de Pu Erh não alterou a glicemia em humanos com sobrepeso ou hiperlipidêmicos (KUBOTA et al., 2011; JENSEN

et al., 2016). O tempo de tratamento e a concentração do extrato são os fatores que determinam a eficácia do Pu Erh em reduzir a glicemia, sendo que doses baixas não foram eficientes em regular a glicose sanguínea (LIN et al., 2018). Nesse trabalho, procuramos seguir um protocolo em que a concentração do extrato utilizada foi a mais semelhante que àquela indicada nas preparações de chá para humanos (CHOI et al., 2018; HUANG et al., 2019), e identificamos que estas doses não alteraram a sensibilidade à insulina após 13 semanas de tratamento. Segundo Lin et al., (2018), três fatores podem contribuir para as diferenças observadas na literatura nos efeitos do Pu Erh sobre a glicemia e sensibilidade à insulina: 1) diferentes métodos de extração do Pu Erh e doses, 2) tempo de tratamento e forma de administração utilizadas (como por exemplo, extrato oferecido na água de beber *ad libitum* ou por gavagem; ou ainda, ração suplementada com folhas de Pu Erh) e 3) diversidade nos modelos animais utilizados (camundongos normais ou geneticamente diabéticos, ratos *Sprague Dawley* e ratos *Wistar*, por exemplo). Camundongos têm o dobro da taxa metabólica comparados aos ratos (camundongo de 15g=1,80 LO₂. Kg⁻¹. h⁻¹; rato de 290g= 0,87 LO₂. Kg⁻¹. h⁻¹, Schmidt- Nielsen, 2002). A taxa metabólica dos ratos fica menos distante da taxa metabólica humana (homem adulto de 70kg= 0,21 LO₂. Kg⁻¹. h⁻¹) do que a dos camundongos, o que confere uma vantagem ao uso deste modelo para investigações pré-clínicas envolvendo estudo do metabolismo intermediário. Contudo, a maior parte dos trabalhos que investigam a ação do Pu Erh sobre a glicemia são realizadas em camundongos, sendo encontrados poucos estudos utilizando ratos como modelos experimentais (LIN et al., 2018). Esta diferença no modelo animal utilizado pode ser uma das causas dos resultados controversos acerca da resposta aos testes de tolerância à glicose e à sensibilidade à insulina observada na literatura. Desta forma, outros estudos ainda são necessários para esclarecer os efeitos da ingestão de Pu Erh e seus

componentes sobre a glicemia e a sensibilidade à insulina em humanos e roedores.

Dentro dos componentes do extrato de Pu Erh investigados, identificamos a presença de cafeína no extrato utilizado e este composto é um importante agente envolvido nas alterações na glicemia (FANG et al., 2015). O tratamento de camundongos com Pu Erh ou cafeína reduziu a glicemia e o Pu Erh descafeinado perdeu esse efeito, indicando que a cafeína é um componente do chá com grande potencial para ser o causador de alterações da glicemia (FANG et al., 2015). A concentração de cafeína medida no extrato de Pu Erh, no presente estudo, foi dez vezes menor do que a utilizada pelos referidos autores, essa é uma possível causa de não observarmos efeitos redutores do chá sobre a glicemia e a sensibilidade à insulina, após 13 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica.

A concentração de glicose e de insulina séricas foi aumentada pela dieta hiperlipídica, o que está de acordo com quadro de resistência à insulina induzido pela dieta. A resistência à insulina nos tecidos periféricos insulino-dependentes, como músculo e tecido adiposo, provoca diminuição da metabolização da glicose nestes tecidos. Além disso, essa resistência estimula a lipólise, por meio da inibição da atividade da lipase sensível a hormônio, o que aumenta a disponibilidade de substratos energéticos nestes tecidos. Este processo aumenta a liberação de ácidos graxos e glicerol para o tecido adiposo (CURI et al., 2002). Os níveis aumentados de TGC, observados no tratamento com dieta hiperlipídica, são condizentes com o quadro de resistência à insulina descrito previamente.

A despeito de não ter causado alterações na glicemia, o tratamento com chá nas doses P1 e P2 foi capaz de reduzir a concentração de triglicerídeos e colesterol séricos nos animais tratados com dieta hiperlipídica. A dieta hiperlipídica causou aumento das concentrações plasmáticas de triglicerídeos e

de colesterol total a partir das 4 semanas e essa alteração foi mantida até o final do tratamento (13 semanas). O tratamento com extrato de Pu Erh nas doses P1 e P2 reverteu esta alteração, reduzindo as concentrações plasmáticas de triglicerídeos (nas 4, 8 e 13 semanas) e de colesterol (em 8 semanas) aos níveis observados nos animais que ingeriram dieta padrão. Este resultado está de acordo com a literatura, sendo que um dos principais efeitos do Pu Erh e do chá verde em roedores é a melhora na dislipidemia ocasionada por dietas hiperlipídica ou hipercalórica (KUO et al., 2004; CAO et al., 2011; JENSEN et al., 2016; LIN et al., 2018; HUANG e LIN, 2012).

Quanto aos mecanismos envolvidos com esses efeitos do Pu Erh sobre os lipídios plasmáticos, Oi et al., (2011) demonstraram em experimentos *in vitro* que o extrato de Pu Erh diminuiu a atividade da enzima lipase pancreática, o que pode estar relacionado com a diminuição de lipídios plasmáticos. Posteriormente, Shimamura et al., (2013), também em experimentos *in vitro*, demonstraram que o extrato de Pu Erh, na concentração de 10mg/mL, foi capaz de reduzir em 50% a atividade da lipase pancreática, e que doses mais baixas de 2,5 e 5 mg/mL não alteraram a atividade dessa enzima. A concentração dos extratos que utilizamos (P1= 6,7mg/mL e P2= 13mg/mL) estavam muito abaixo destas doses, e ainda foram diluídas nos líquidos gastrointestinais após ingeridas. Desta forma, provavelmente, a diminuição na concentração de TGC observada não ocorreu em decorrência de menor absorção de lipídios da dieta, contudo, a medida da lipase pancreática é necessária para confirmar esta hipótese. O tratamento com Pu Erh reduziu os níveis de triglicerídeos e colesterol plasmático, leptina e insulina em ratos dislipidêmicos tratados com dieta rica em frutose (HUANG e LIN, 2012). Essa alteração ocorreu em parte pela supressão da enzima ácido graxo sintase hepática e pela ativação do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc).

Recentemente, foi proposto por Wu et al., (2019) que o conteúdo de *theabrowning* (catequina polimerizada) do extrato de Pu Erh eleva o nível de AMPc que, por sua vez, ativa as proteínas cinase A (PKA) e cinase ativada por AMP (AMPK) e outras vias de sinalização. Esta sequência de ativação acelera o metabolismo, assim como a utilização de carboidratos e lipídios pelos tecidos, melhorando, assim, a doença metabólica induzida por dieta. Kuo et al., (2004) descreveram que o tratamento de ratos por 30 semanas com ração suplementada com Pu Erh reduziu TGC e o colesterol. Após 15 semanas de tratamento, somente TGC foi reduzido. Além disso, o HDL aumentou nas 15 semanas, mas o chá apresentou efeito sobre a concentração dessa lipoproteína somente em 30 semanas. Em humanos com sobrepeso, tratados com Pu Erh por 20 semanas, a concentração de colesterol também não foi alterada (JENSEN et al., 2016). Neste trabalho, observamos que o extrato de Pu Erh causou uma redução 10% na concentração de colesterol; contudo, essa diferença não foi significativa em 13 semanas de tratamento. Desta forma, podemos inferir que alterações nas concentrações de HDL e LDL, induzidas pelo Pu Erh nas concentrações P1 e P2, serão observadas com tratamentos mais prolongados.

Neste estudo, o ganho de peso aumentou nos animais que ingeriram dieta hiperlipídica; contudo, o extrato de Pu Erh, nas doses P1 e P2, não reverteu este efeito da dieta. Os efeitos do extrato de Pu Erh sobre o ganho de peso em roedores ainda são controversos na literatura, sendo que alguns trabalhos demonstraram ação redutora de ganho de peso (SHIMAMURA et al., 2013; CAI et al., 2017; CAO et al., 2011; HUANG e LIN, 2012; DU et al., 2012; GAO et al., 2017; HUANG et al., 2019) e outros não (WU et al., 2019; SUN et al., 2019). Todos os trabalhos que identificaram ganho de peso utilizaram altas doses de Pu Erh (acima de 200mg/kg de peso/dia). Em humanos, o tratamento com Pu Erh, por 20

semanas, reduziu o índice de massa corporal (JENSEN et al., 2016). Contudo, em pacientes com síndrome metabólica, não houve alteração no peso corporal após 3 meses de tratamento (YANG et al., 2014). Novamente, a dose utilizada e a forma de preparação do extrato podem gerar estas diferenças nas respostas metabólicas nos diferentes modelos de estudo.

Embora o ganho de peso corporal não tenha sido alterado, os índices lipossomáticos foram reduzidos pelo Pu Erh nas duas doses quando os animais ingeriram dieta padrão. Contudo, quando os animais foram submetidos à dieta hiperlipídica, esse efeito não foi observado. A suplementação de camundongos com extrato de Pu Erh reduziu o ganho de peso corporal e o acúmulo de gordura corporal (SHIMAMURA et al., 2013). Quanto aos mecanismos envolvidos nesta redução, os autores sugerem que esses efeitos sejam mediados pela diminuição da expressão de SREBP-1c (proteína de ligação ao elemento regulador de esteroides) e FAS (ácido graxo sintase) no tecido adiposo e fígado de camundongos. Ding et al. (2015), estudando os efeitos da introdução de extrato de Pu Erh no meio de cultura de *C elegans*, identificaram que o chá causou redução no estoque de lipídios e na síntese de TGC em animais tratados com dieta hiperlipídica. Estes efeitos foram mediados pela redução na expressão de fatores de transcrição homólogos ao SREBP-1c e de enzimas-chave na biossíntese de lipídios.

Neste trabalho, a oxidação da glicose e a lipogênese do TABr, ambas avaliadas *in vitro*, foram reduzidas pela dieta hiperlipídica (Figura 17 A e B). No tecido adiposo, a insulina é o principal regulador da captação de glicose que pode, então, ser oxidada ou ser direcionada para a síntese de TGC (LIN e SUN, 2009). A insulina estimula a lipogênese e inibe a lipólise neste tecido. Desta forma, a diminuição da oxidação da glicose e da lipogênese induzidas pela dieta

hiperlipídica confirma o quadro de resistência à insulina o qual pode ser observado a partir dos resultados do teste de tolerância à glicose. O tratamento com chá aumentou a oxidação da glicose e a lipogênese no TABr, mesmo não tendo alterado a concentração de insulina sérica, indicando que os componentes do chá podem atuar, no tecido adiposo, por vias de sinalização diferente daquelas utilizadas pela insulina. Ding et al., (2015) sugeriram que os mecanismos envolvidos na redução dos estoques de gordura pelo Pu Erh em *C. elegans* podem ser independentes da inibição da via de sinalização da insulina (PI3K-Akt e AMPK), verificando que mesmo animais que não expressavam receptores para insulina ou a proteína AKT continuaram apresentando efeitos redutores do estoque de gordura estimulados pelo extrato de Pu Erh.

O tecido hepático é um alvo de investigação em relação à obesidade, pois o acúmulo ectópico de gordura pode alterar as funções hepáticas, situação conhecida como esteatose hepática. Além disso, o fígado é um órgão-chave no metabolismo intermediário (GOMES, 2012). Enzimas como ALT e AST não estavam alteradas, nem pela dieta, nem pelo uso de extrato (Tabela 4), demonstrando que não houve comprometimento das funções hepáticas. Contudo, a dieta aumentou a bilirrubina direta e o tratamento com chá reduziu os níveis. O aumento de bilirrubina pode indicar dano celular nos hepatócitos, nos ductos ou canais biliares, indicando que o chá foi protetor contra esse efeito da dieta.

O fígado de animais tratados com dieta hiperlipídica apresentou maiores concentrações de TGC e lipídios totais (Figura 15 B e C). Provavelmente, o aumento das concentrações de lipídios totais e TGC, observado no fígado, foi decorrente da utilização dos lipídios como substrato energético, tendo em vista o seu maior aporte na dieta hiperlipídica. Ocorreu redução da lipogênese a partir de ¹⁴C-glicose no fígado e no TABr após tratamento com dieta hiperlipídica, indicando

que o aumento das reservas lipídicas observado neste tecido foi originado preferencialmente pelos lipídios da dieta e não por glicose. Nos grupos tratados com extrato de Pu Erh e dieta hiperlipídica (DHP1 e DHP2) houve redução na concentração de TGC plasmáticos. Essa redução pode ter ocorrido em função do aumento da massa de tecido adiposo branco e da estimulação da lipogênese. O tratamento com extrato não alterou a lipogênese no fígado, mas aumentou no TABr. O aumento desta reserva no TAB pode proteger o fígado contra a formação de depósitos ectópicos de gordura, prevenindo a esteatose hepática

O extrato de Pu Erh inibiu a lipogênese de novo a partir do precursor ^{14}C glicose em animais alimentados com dieta padrão. Contudo, em animais tratados com dieta hiperlipídica e chá este efeito não foi observado. 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). Desta forma, a dieta hiperlipídica induz redução da lipogênese e o chá perde a capacidade de reduzir a lipogênese de novo, pois esta via já está reduzida pelo grande aporte de lipídios que chegam ao fígado.

O aumento de peso corporal e das reservas lipídicas nos tecidos adiposos e fígado, assim como a hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia são fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e doenças coronárias cardíacas (HUANG E LIN., 2012). No nosso estudo, o uso do extrato de Pu Erh nas duas doses testadas reduziu o índice de risco coronário e esses dados corroboram com os de Hou et al., (2009) e Deng et al., (2015) que demonstraram atividade antiaterosclerótica do chá.

A hipótese de que o tratamento com extrato de Pu Erh aumentaria a atividade da enzima PON1 não foi confirmada, pois nem o tratamento com extrato nem a dieta hiperlipídica alteraram a atividade arilesterase desta enzima neste

estudo. Portanto, a redução no índice de risco coronário observada provavelmente está relacionada com alterações no metabolismo lipídico tecidual e não com a atividade arilesterase da PON1. A atividade da enzima PON1 está associada com a concentração de HDL plasmática. Neste estudo, a concentração de HDL estava aumentada em animais que ingeriram dieta hiperlipídica e a relação PON1/HDL estava reduzida nestes animais; o que pode indicar que a expressão gênica e proteica desta enzima esteja reduzida no fígado de animais tratados com dieta hiperlipídica. Além disso, esta enzima pode interagir com muitos substratos; por isso, não podemos descartar a hipótese de que uma alteração na atividade lactonase possa ter ocorrido após os tratamentos. Desta forma, investigações futuras sobre o efeito da dieta ou do extrato sobre atividade lactonase desta enzima e sua expressão gênica no tecido hepático serão necessárias para responder estas questões.

6. CONCLUSÕES

A figura 18 mostra um esquema dos principais efeitos do extrato de Pu Erh nos tratamentos com dieta padrão ou dieta hiperlipídica. Nos animais alimentados com dieta padrão (Figura 18A), o tratamento com extrato de Pu Erh nas doses P1 e P2 reduz a lipogênese de *novo* no fígado, mas aumenta a oxidação e a lipogênese no TABr. Estes resultados, mostrando aumento das reservas de lipídio no TABr e diminuição no fígado, indicam que o chá reduziu a probabilidade de formação ectópica de gordura, o que é um efeito que protege o tecido hepático contra o desenvolvimento de esteatose. Além disso, o tratamento com chá

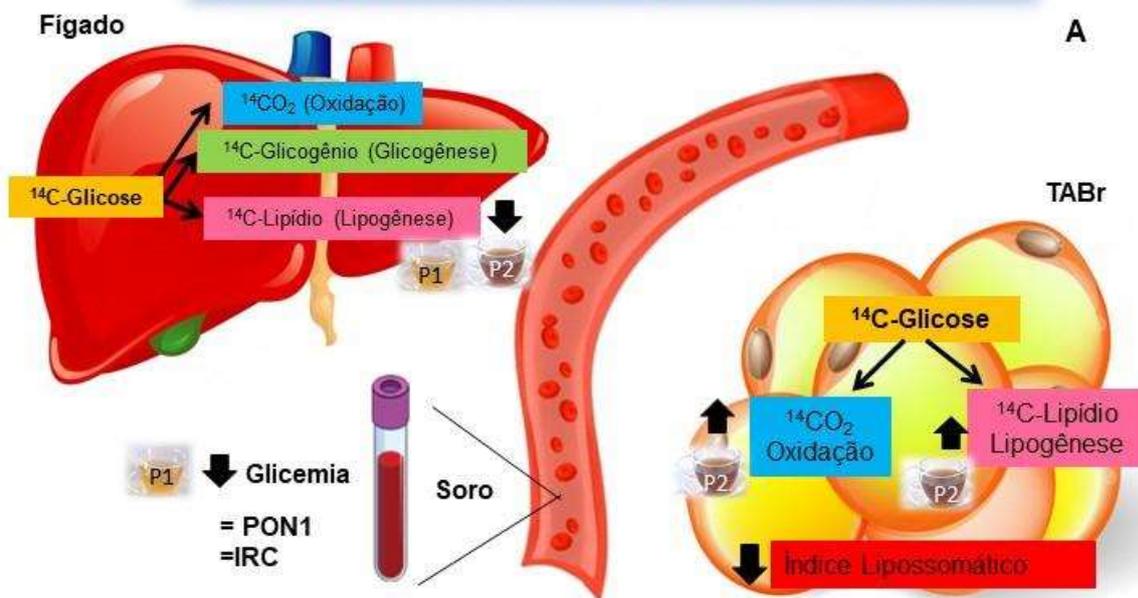
diminuiu a massa de tecido adiposo no TABr provavelmente por modificação na lipogênese a partir de lipídios da dieta.

A dieta causou aumento de bilirrubina direta e de proteínas totais, o que indica alteração no metabolismo dos hepatócitos, com possível comprometimento da função hepática. O extrato reduziu esses parâmetros, mostrando efeito protetor hepático nas doses estudadas.

A atividade protetora da PON1 contra aterosclerose não foi alterada pelo chá, contudo, o IRC foi reduzido pelo efeito do chá sobre o metabolismo hepático e no tecido adiposo. Quando os animais foram tratados com dieta hiperlipídica (Figura 18B), diminuiu a utilização de glicose como substrato energético no fígado. Entretanto, as concentrações de TGC e lipídios totais foram aumentadas neste tecido. Além disso, no TABr o chá na dose P1 aumentou a oxidação de glicose e nas doses P1 e P2 aumentou a lipogênese de novo, o que pode ter gerado a redução nos níveis de TGC plasmático.

Este trabalho abriu novas perspectivas de investigação do efeito do extrato de Pu Erh, usando ratos Wistar como modelo biológico no nosso laboratório (Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada – LaMEC). Os resultados encontrados reforçaram a necessidade de que mais estudos são necessários, utilizando protocolos de preparação do chá semelhantes aos usados para humanos, para que os efeitos do Pu Erh encontrados em estudos pré-clínicos possam ser aplicados a humanos.

EFEITOS DO EXTRATO DE PU ERH - DIETA PADRÃO



EFEITOS DO EXTRATO DE PU ERH - DIETA HIPERLIPÍDICA

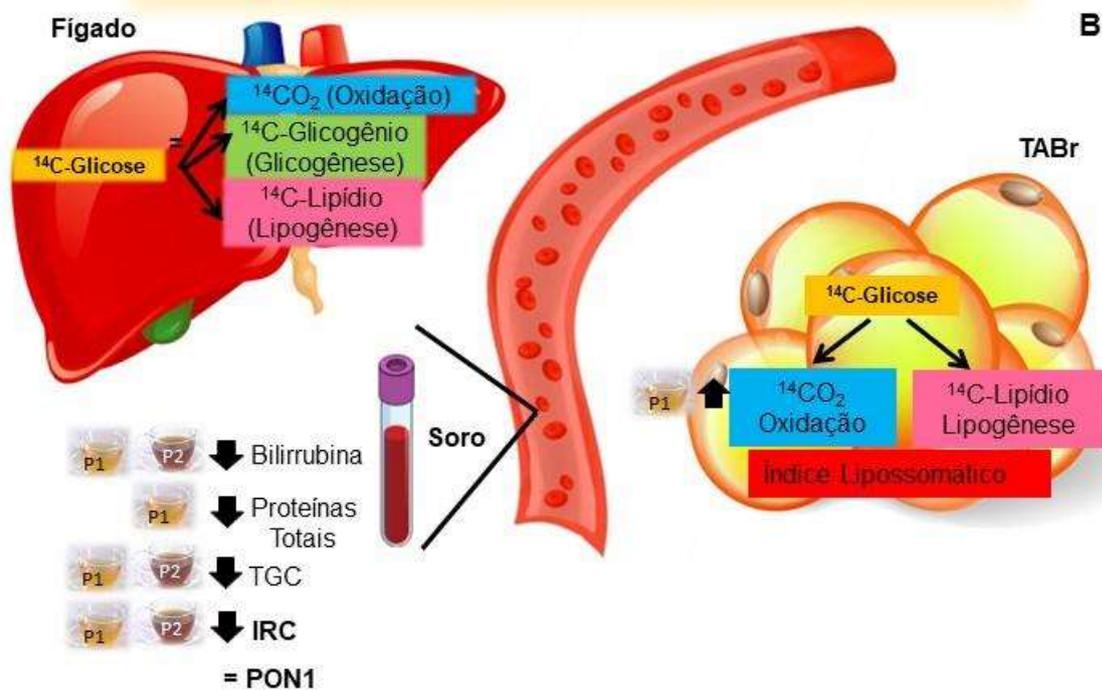


Figura 18. Esquema mostrando os principais efeitos do extrato de Pu Erh. A) animais tratados com dieta padrão, B) Animais tratados com dieta hiperlipídica. TABr=tecido adiposo branco retroperitoneal; TGC=triglicerídeo; P1= extrato de Pu Erh na concentração de 6,7mg/mL; P2 é= extrato de Pu Erh na concentração de 13mg/mL; PON1=paraoxonase 1; IRC= índice de risco coronário.

7. PERSPECTIVAS

A partir deste trabalho, estabelecemos um novo modelo de investigação no nosso laboratório (laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparados) dos efeitos do Pu Erh sobre o metabolismo em ratos. O estabelecimento de um modelo é importante tendo em vista que existem diferentes protocolos de tratamento descritos na literatura e a forma de tratamento, tipo de chá utilizado, dose, forma de administração podem afetar a resposta metabólica em modelos animais.

Este trabalho abriu novas perspectivas de investigação quanto aos efeitos do extrato de Pu Erh sobre o metabolismo em ratos. A partir dos resultados obtidos neste trabalho pretendemos:

Investigar os possíveis efeitos do chá na expressão gênica da enzima PON1 no fígado;

Investigar a atividade lactonase da enzima PON1 no tecido hepático e se o chá altera esta atividade;

Verificar se a lipólise é alterada pelo chá nos tecidos hepático e TABr após dieta hiperlipídica;

Investigar se o extrato causa alterações no estresse oxidativo no fígado e no tecido adiposo;

Realizar análise histológica para verificar acúmulo de lipídio no tecido hepático, assim como o tamanho dos adipócitos nas reservas de lipídios corporais;

8.REFERENCIAS

ADENEYE, A. A.; ADEYEMI, O.O.; AGBAJE, E.O.; BANJO, A.A.F. Evaluation of the toxicity and reversibility profile of the aqueous seed extract of *Hunteria umbellata* (K.Schum) Hallier F. in rodents. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 350-369, 2010.

ADOLPH, Edward F. Desert Animals: physiological problems of heat and water. knut schmidt-nielsen. **Physiological Zoology**, [S.L.], v. 37, n. 3, p. 338-339, 1964.

ARÇARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W., DOS SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A., FUNCK, A.; PEDRAZZOLI, J. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, v. 17, n.12, p. 2127-2133, 2009.

BAHIA, L.; COUTINHO, E.S.F.; BARUFALDI, L.A; ABREU, T.A.M.; DE SOUZA, C.P.R.; ARAUJO, D.V. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 12, p.440-447, 2012.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>. Acesso em 22 nov. 2017.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 30, de 2 de fevereiro de 2016. Brasília, 2016. Disponível em: <https://ww2.icb.usp.br/icb/wp-content/uploads/bioterio_etica/RESOLUCAO_NOR_30.pdf> Acesso em: 20 nov. 2017.

_____. Resolução Normativa CONCEA nº 13, de 20.09.2013. Brasília, 2013. BUEGE, JA; AUST, SD. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.** v. 52: 302-9,1978.

BROWN, E.T.; UMINO, Y.; LOI, T.; SOLESSIO, E.; BARLOW, R. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. **Visual Neuroscience**, Cambridge, v. 22, n. 05, p. 615-618, 2005.

BUENO, D.R.S.; AZZOLIN, I.R.; PERRY, M.L.S. Ontogenetic study of glucose and lactate utilisation by rat cerebellum slices. **Medical Science Research**, [S. l.], v. 22, n. 9, p. 631–632, 1994.

CAI, X.; FANG, C.; HAYASHI, S.; HAO, S.; ZHAO, M.; TSUTSUI, H.; NISHIGUCHI, S.; SHENG, J. Pu-erh tea extract ameliorates high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis and insulin resistance by modulating hepatic IL-6/STAT3 signaling in mice. **Journal of Gastroenterology**, [S.L.], v. 51, n. 8, p. 819-829, 2016.

CAI, X.; HAYASHI, S.; FANG, C.; HAO, S.; WANG, X.; NISHIGUCHI, S.; TSUTSUI, H.; SHENG, J. Pu'erh tea extract-mediated protection against hepatosteatosis and insulin resistance in mice with diet-induced obesity is associated with the induction of lipogenesis in visceral adipose tissue. **Journal of Gastroenterology**, [S.L.], v. 52, n. 12, p. 1240-1251, 2017.

- CAO, Z.H.; GU, D.H.; LIN, Q.Y.; XU, Z.Q.; HUANG, Q.C.; RAO, H.; LIU, E.W.; JIA, J.J.; GE, C.R. Effect of Pu-erh Tea on Body Fat and Lipid Profiles in Rats with Diet-induced Obesity. **Phytother. Res.**, v. 25, p. 234–238, 2011.
- CAO, Z.H.; YANG, H.; HE, Z.L.; LUO, C.; XU, Z.Q., GU, D.H. JIA, J.J.; GE, C.R.; LIN, Q.Y. Effects of Aqueous Extracts of Raw Pu-erh Tea and Ripened Pu-Erh Tea on Proliferation and Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. **Phytother. Res.**, v.27, p. 1193–1199, 2013.
- CECCONELLO, A.L.; TRAPP, M.; HOEFEL, A.L.; MARQUES, C.V.; ARBO, B.D.; OSTERKAMP, G.; KUCHARSKI, L.C.R.; RIBEIRO, M.F.M. Sex-related differences in the effects of high-fat diets on DHEA-treated rats. **Endocrine**, [S.L.], v. 48, n. 3, p. 985-994, 2014.
- CHERAGHI, M.; AHMADVAND, H.; MALEKI, A.; BAZVAND, S.; HASSANZADEH, F. Paraoxonase 1 Activity, Lipid Profile, and Atherogenic Indexes Status in Coronary Heart Disease. **Biochemistry & Molecular Biology**, [s.l.], v. 1, n. 6, p. 1-7, 2017.
- CHOI, S.H; KIM, I.D.; DHUNGANA, S.K.; KIM, D.G. Comparison of Quality Characteristic and Antioxidant Potential of Cultivated Pu-erh and Gushu Pu-erh Tea Extracts at Two Temperatures. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 1155-1161, 2018.
- COSTA, L. G. Serum Paraoxonase and Its Influence on Paraoxon and Chlorpyrifos-oxon Toxicity in Rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.103, p.66-76, 1990.
- COSTA, L. G.; VITALONE, A.; COLE, T.B.; FURLONG, C.E. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. **Biochemical Pharmacology**, v.69, p.541-550, 2005.
- CREGE, D.R.X.O; MIOTTO, A.M.; BORGHI, F.; WOLF-NUNES, V.; KASSISSE, D.M.G. Cardiometabolic Alterations in Wistar Rats on a Six-Week Hyperlipidic, Hypercholesterolemic Diet. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, [S.L.], v. 29, n. 6, p. 362-369, 2016.
- CUNHA, J. Estudo da atividade e polimorfismos da paraoxonase-1 em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo-1 (HIV-1) tratados com inibidores de protease. Tese (Doutorado) – Faculdade de medicina, PPG de Alergias e Imunopatologias, USP, São Paulo, 2012.
- CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. 580p.
- 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.
- DIEPGEN, T.L.; MALLINCKRODT, M. G. Interethnic Differences in the Detoxification of Organophosphates: The Human Serum Paraoxonase Polymorphism. **Toxicology**, v.9, p.154-158, 1986.

DING, Y.; ZOU, X.; JIANG, X.; WU, J.; ZHANG, Y.; CHEN, D.; LIANG, B. Pu-Erh Tea Down-Regulates Sterol Regulatory Element-Binding Protein and Stearyl-CoA Desaturase to Reduce Fat Storage in *Caenorhaditis elegans*. **Plos One.**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 1-15, 2015.

DING, Q.; ZHENG, W.; ZHANG, B.; CHEN, X.; ZHANG, J.; PANG, X.; ZHANG, Y.; JIA, D.; PEI, S.; DONG, Y. Comparison of hypoglycemic effects of ripened pu-erh tea and raw pu-erh tea in streptozotocin-induced diabetic rats. **Rsc Advances.**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 2967-2977, 2019.

DU, W; PENG S-M; LIU Z; SHI, L; TAN, L-F; ZOU X-Q. Hypoglycemic Effect of the Water Extract of Pu-erh Tea. **J. Agric. Food Chem.**, v.60, 10126–10132. 2012.

ECKERSON, H. W.; WYTE, C. M.; LADU, B. N. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, p. 1126-1138, 1983.

FANG, C-Y.; WANG, X-J.; HUANG, Y-W.; HAO, S-M.; SHENG, J. Caffeine is responsible for the bloodglucose-lowering effects of green tea and Puer tea extracts in BALB/c mice. **Chinese Journal of Natural Medicines**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 595-601, 2015.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. **Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: molecular aspects of cell signaling**. Nova Jersey, 2012.

FINKELSTEIN, E. A.; TROGDON, J.G.; COHEN, J.W; DIETZ, W. Annual Medical Spending Attributable to Obesity: Payer-And Service-Specific Estimates. **Health Affairs**, v. 28, n. 5, p. 822–831, 2009.

FOLCH, J.; LEES, M. STANLEY, G. H. S. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n.1, p. 497–509,1956.

FRIDMAN, O.; GARIGLIO, L.; RIVIERA, S.; PORCILEC, R.; FUCHS, A.A.; POTENZON, M. Paraoxonase 1 gene polymorphisms and enzyme activities in coronary artery disease and its relationship to serum lipids and glycemia. **Archivos de Cardiología de México**, México, v. 86, n. 4, p. 350-357, 2016.

FUCHS, T.; LOUREIRO, M.P.; MACEDO, L.E.; NOCCA, D.; NEDELCO, M.; COSTA-CASAGRANDE, T.A. Modelos animais na síndrome metabólica. Animal models in metabolic syndrome. **Rev Col Bras Cir.**, v.45, n.5, p. 1-10, 2018.

GAGNON, R., PETERSON, J. Estimation of confidence intervals for area under the curve from destructively obtained pharmacokinetic data. **J. Pharmacokinet. Biopharm.**, v. 26, p. 87–102, 1998.

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.

GAO, X; XIE, Q.; KONG, P.; LIU, L.; SUN, S.; XIONG, B.; HUANG, B.; YAN, L.; SHENG, J.; XIANG, H. Polyphenol- and Caffeine-Rich Postfermented Pu-erh Tea Improves Diet-Induced Metabolic Syndrome by Remodeling Intestinal Homeostasis in Mice. **Infection and Immunity**, [S.L.], v. 86, n. 1, p. 1-16, 2018.

GOMES, L.F. EFEITO DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) SOBRE O METABOLISMO DE RATOS TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Básicas: Fisiologia Humana, UFRGS, Porto Alegre, 2012.

HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. T. Obesity. **Lancet**, 366 (9492), 1197-1209. 2005.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Obesity and Oxidative Stress. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.365-367. 2003.

HOU, Y; SHAO, W.; XIAO, R.; XU, K.; MA, Z.; JOHNSTONE, B. H.; DU, Y. Pu-erh tea aqueous extracts lower atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model. **Experimental Gerontology**, [S.L.], v. 44, n. 6-7, p. 434-439, 2009.

HUANG, H. C.; LIN, J. K. Pu-erh tea, green tea, and black tea suppresses hyperlipidemia, hyperleptinemia and fatty acid synthase through activating AMPK in rats fed a high-fructose diet. **Food Funct.**, v.3, 170–177. 2012.

HUANG, F.; WANG, S.; ZHAO, A.; ZHENG, X.; ZHANG, Y.; LEI, S.; GE, K.; QU, C.; ZHAO, Q.; YAN, C. Pu-erh Tea Regulates Fatty Acid Metabolism in Mice Under High-Fat Diet. **Frontiers in Pharmacology**, [S.L.], v. 10, p. 1-10, 2019.

JAMES, R. W.; DEAKIN, S.P. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. **Free Radical Biology and Medicine**, [S.L.], v. 37, n. 12, p. 1986-1994, 2004.

JENG, K-C.; CHEN, C-S.; FANG, Y-P.; HOU, R.C.W.; CHEN, Y-S. Effect of Microbial Fermentation on Content of Statin, GABA, and Polyphenols in Pu-Erh Tea. **J. Agric. Food Chem.**, 55, 8787–879, 2007.

JENNI-EIERMANN, S.; JENNI, L. Fasting in Birds: general patterns and the special case of endurance flight. **Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation**, [S.L.], p. 171-192, 2012.

JENSEN, G.; BEAMAN, J.; HE, Y.; GUO, J.; SUN, H. Reduction of body fat and improved lipid profile associated with daily consumption of a Pu erh tea extract in a hyperlipidemic population: a randomized placebo-controlled trial. **Clinical Interventions in Aging**, [S.L.], p. 367, 2016.

KONTA T; BYKLEBLEBICI, O. Paraoxonase: A New Biochemical Marker of Oxidant-Antioxidant Status in Atherosclerosis. Oxidative stress - molecular mechanisms and biological effects. cap. p.145-154, 2012.

KROTH, A.; SANTOS, M.C.Q; SILVA, T.C.B.; SILVEIRA, E.M.S; TRAPP, M; BEZZERRA, R.M.N.; SIMABUCO, F.; NIERO, R.; PARTATA, W.A. Aqueous extract from *Luehea divaricata* Mart. Leaves reduces nociception in rats with neuropathic pain. **Journal of Ethnopharmacology**. [S.L.], v. 256, p. 112761, 2020.

KUBOTA, K.; SUMI, S.; TOJO, H.; SUMI-INOUE, Y.; I-CHIN, H.; OI, Y.; FUJITA, H.; URATA, H. Improvements of mean body mass index and body weight in preobese and overweight Japanese adults with black Chinese tea (pu-erh) water extract. **Nutr. Res.**, v. 31, 421–428. 2011.

KUMAR, V. et al. Robbins & Contran. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2010.

KUO, K-L.; WENG, M-S.; CHIANG, C-T.; TSAI, Y-J; LIN-SHIAU, S-Y; LIN, J-K. Comparative Studies on the Hypolipidemic and Growth Suppressive Effects of Oolong, Black, Pu-erh, and Green Tea Leaves in Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], v. 53, n. 2, p. 480-489, 2004.

LA DU, B. N. Structural and functional diversity of paraoxonases. **Nature Medicine**, New York, v. 2, n. 11, p.1186-1187, 1996.

LIN, H-C.; LEE, C-T.; YEN, Y-Y.; CHU, C-L.; HSIEH, Y-P.; YANG, C-S.; LAN, S-J. Systematic review and meta-analysis of anti-hyperglycemic effects of Pu-erh tea. **International Journal of Food Science & Technology**, [S.L.], v. 54, n. 2, p. 516-525, 2018.

LIN, Y.; SUN, Z. Current views on type 2 diabetes. **Journal of Endocrinology**, [S.L.], v. 204, n. 1, p. 1-11, 2009.

MACKNESS, M. I.; THOMPSON, H.M.; HARDY, A.R.; WALKER, C.H. Distinction between 'A'-esterases and arylesterases. **Biochem. J.**, v.245, p.293-296, 1987.

MACKNESS, M.; MACKNESS, B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. **Gene**, Amsterdam, v. 567, n. 1, p.12-21, 2015.

MANNING, S.; PUCCI, A.; FINER, N.; Pharmacotherapy for obesity: novel agents and paradigms, **Ther. Adv. Chronic Dis.**, v. 5, p. 135–148, 2014.

MARTINI, D.; BO', C.; PORRINI, M.; CIAPPELLANO, S.; RISO, P. Role of polyphenols and polyphenol-rich foods in the modulation of PON1 activity and expression. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [S.L.], v. 48, p. 1-8, 2017.

MENG, X-H.; LI, N.; ZHU H-T.; WANG, D.; YANG, C-R.; ZHANG, Y-J. Plant Resources, Chemical Constituents and Bioactivities of Tea Plants from the Genus *Camellia* Section *Thea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], v. 67, n. 19, p. 5318-5349. 2018

MEYER, W. K.; JAMISON, J.; RICHTER, R.; WOODS, S. E.; PARTHA, R.; KOWALCZYK, A.; KRONK, C.; CHIKINA, M.; BONDE, R. K.; CROCKER, D. E. Ancient convergent losses of Paraoxonase 1 yield potential risks for modern marine mammals. **Science**, [S.L.], v. 361, n. 6402, p. 591-594, 2018.

MITTLER, Ron. ROS Are Good. *Trends In Plant Science*, SI, v. 22, n. 1, p. 11-19, set. 2016 [dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002) MOYA, Carlos; MÁÑEZ, Salvador. Paraoxonases: Metabolic role and pharmacological projection. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [S.L.], v. 391, n. 4, p. 349-359, 2018.

MOODLEY, Kogi; JOSEPH, Kimane; NAIDOO, Yougasphree; ISLAM, Shahidul; MACKRAJ, Irene. Antioxidant, antidiabetic and hypolipidemic effects of *Tulbaghia violacea* Harv. (wild garlic) rhizome methanolic extract in a diabetic rat model. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-1, 417, 2015.

MOON HS, LEE HG, CHOI YJ *et al.* Proposed metabolism of (-)-epigallocatechin3-gallate for anti-obesity. **Chem. Biol. Interact.**, 167: 85–98, 2007.

MOREIRA E G, CORREIA DG, BONIFÁCIO K L, MORAES, JB, CAVICCHIOLI, FL, NUNES, CS, NUNES, SOV, VARGAS, HO, BARBOSA, DS; MAES. M. Lowered PON1 activities are strongly associated with depression and bipolar disorder, recurrence of (hypo) mania and depression, increased disability and lowered quality of life. **The World Journal of Biological Psychiatry**, Estados Unidos, p.1-13, 2017.

Oi, Yasuyuki; HOU, I-Ching; FUJITA, Hiroyuki; YAZAWA, Kazunaga. Antiobesity Effects of Chinese Black Tea (Pu-erh Tea) Extract and Gallic Acid. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 475-481, 2011.

PEI, S.; ZHANG, Y.; XU, H.; CHEN, X.; CHEN, S. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by pu-erh tea extracts. **J. Agric. Food Chem.**, 59, 9927–9934, 2011.

PEREIRA, Juliana Lopes; SOUZA, Priscilla Cristovam Sampaio e; SHINZATO, Vivian Izumi; SASSO, Sandramara; SANTO, Bruna Larissa Spontoni do Espírito; SANTANA, Lidiani Figueiredo; RESTEL, Tamy Ingrid; FREITAS, Karine de Cássia. Ganho de peso e alterações metabólicas em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. **Ciência & Saúde**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 51, 2018.

PRIMO-PARMO, S.L.; SORENSON, R.C.; TEIBER, J.; LADU, B.N. The Human Serum Paraoxonase/Arylesterase Gene (PON1) Is One Member of a Multigene Family. **Genomics**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 498-507, 1996.

ROCHA, D.S.; MODEL, J.F.A.; VON DENTZ, M.; MASCHIO, J.; OHLWEILER, R.; LIMA, M.V.; SOUZA, S.K.; SARAPIO, E.; VOGT, E.L.; WASZCZUK, M. Adipose tissue of female Wistar rats respond to *Ilex paraguariensis* treatment after ovariectomy surgery. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 238-248, 2021.

OTHWELL, 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.

RUTKOWSKA, J.; SADOWSKA, E.T.; CICHO, M.; BAUCHINGER, U. Increased fat catabolism sustains water balance during fasting in zebra finches. **Journal of Experimental Biology**, [S.L.], v. 219, n. 17, p. 2623-2628, 2016.

SAHA, J.K.; XIA, J.; GRONDIM, J.M.; ENGLE, S.K.; JAKUBOWSKI, J.A. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. **Experimental Biology and Medicine**. v. 230, n. 10, p. 777-784, 2005.

SANO, M.; TAKENAKA, Y.; KOJIMA, R.; SAITO, S-I.; TOMITA, I.; KATOU, M.; SHIBUYA, S. Effects of Pu-Erh tea on lipid metabolism in rats. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 221-228, 1986.

SANTOS, M.C.B.; Vieira, J.A.M.; César, B.; Novaes, M.R.C.G. Hábitos e perfil socioeconômico do paciente aterosclerótico no Brasil. **Com. Ciências Saúde**, Brasília, v. 3, n. 22, p. 247-256, 2011.

SCHEID, T.; DAL BOSCO, L.; GUEDES, R.P.; PAVANATO, M.A.; BELLÓ-KLEIN, A.; PARTATA, W. A. Sciatic Nerve Transection Modulates Oxidative Parameters in Spinal and Supraspinal Regions. **Neurochemical Research**, [S.L.], v. 38, n. 5, p. 935-942, 2013.

SHIMAMURA, Y.; YODA, M.; SAKAKIBARA, H.; MATSUNAGA, K.; MASUDA, S. Pu-erh Tea Suppresses Diet-Induced Body Fat Accumulation in C57BL/6J Mice by Down-Regulating SREBP-1c and Related Molecules. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [S.L.], v. 77, n. 7, p. 1455-1460, 2013.

SIATKA, T.; KAŁPAROVÁ, M. Seasonal Variation in Total Phenolic and Flavonoid Contents and DPPH Scavenging Activity of *Bellis perennis* L. Flowers. **Molecules**, [S.L.], v. 15, n. 12, p. 9450-9461, 2010.

SILVEIRA, D. ESTUDO DA ATIVIDADE DA PON 1 E PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO EM RATOS (*Rattus norvegicus*) NEONATOS E ADULTOS, MACHOS E FÊMEAS. 2018. 65 f. TCC (Graduação) - Curso de Enfermagem, UFRGS, Porto Alegre, 2018.

SOSA, P.M. EFEITOS DOS CHÁS VERDE E VERMELHO PROVENIENTES DA CAMELLIA SINENSIS SOBRE O DANO MOTOR E OXIDATIVO ESTRIATAL EM UM MODELO DE HEMORRAGIA INTRACEREBRAL EM RATOS. 2017. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS, Porto Alegre, 2017.

STRAKOVSKY, R.S.; ZHANG, X; ZHOU, D; XIANG-PAN, Y. The regulation of hepatic Pon1 by a maternal high-fat diet is gender specific and may occur through promoter histone modifications in neonatal rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 25, n. 2, p. 170-176, 2014.

TOKIMITSU I. Effects of tea catechins on lipid metabolism and body fat accumulation. **Biofactors**, v. 2, p. 141-143, 2004.

TORRES, I.L.S.; GAMARO, G.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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 111-116, 2001.

VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amount soft tissue. **Analytical Biochemistry**, v. 11, p. 256-265, 1965.

VON DENTZ, M. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO DE PYCNOPORUS SANGUINEUS SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO DE RATOS SUBMETIDOS AOS MODELOS DE DIABETES E DISLIPIDÊMIA. 2018. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS, Porto Alegre, 2018.

VLACHOS, G.D. BARTZELIOTOU, A; SCHULPIS, K.H.; PARTSINEVELOS, G.; LAZAROPOULOU, C.; PAPADIMA, C.; PAPASTAMATAKI, M.; ANTSAKLIS, A.; PAPASSOTIRIOU, J. Maternal-neonatal serum paraoxonase 1 activity in relation to the mode of delivery. **Clinical Biochemistry**, New York, v. 39, n. 9, p. 923-928, 2006.

VOGT, E.L.; VON DENTZ, M.C.; ROCHA, D.S.; MODEL, J.F.A.; KOWALEWSKI, L.S.; SOUZA, S.K.; GIRELLI, V.O.; BITTENCOURT, P.I.H; FRIEDMAN, R.; KRAUSE, M. Metabolic and Molecular Subacute Effects of a Single Moderate-Intensity Exercise Bout, Performed in the Fasted State, in Obese Male Rats. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S.L.], v. 18, n. 14, p. 7543, 2021.

WRENDENBERG, A.; FREYER, C.; SANDSTROM, M.E.; KATZ, A.; WIBOM, R. WESTERBLEED, H. LARSSON, N-G. Respiratory chain dysfunction in skeletal muscle does not cause insulin resistance. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 350, n. 1, p. 202-207, 2006.

WANG, D.; LUO, X.; ZHONG, Y.; YANG, W.; XU, M.; LIU, Y.; MENG, J.; YAO, P.; YAN, H.; LIU, L. Pu-erh black tea extract supplementation attenuates the oxidative DNA damage and oxidative stress in *Sprague-Dawley* rats with renal dysfunction induced by subchronic 3-methyl-2-quinoxalin benzenevinylketo-1,4-dioxide exposure. **Food Chem. Toxicol.**, 50, 147–154, 2012.

WAY, T-D.; LIN, H-Y.; KUO, D-H.; TSAI, S-J.; SHIEH, J-C.; WU, J-C.; LEE, M-R; LIN, J-K. Pu-erh tea attenuates hyperlipogenesis and induces hepatoma cells growth arrest through activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human. HepG2 Cells. **J. Agric. Food Chem.**, 57: 5257–5264, 2009.

WOJCIECHOWSKI, D.; SROKA, Z.; GAMIAN, A. Investigation of antiradical potential of different kinds of teas and extracts from these teas using antiradical activity units (TAU). **Postepy. Hig. Med. Dosw.**, v. 65, p. 796–803, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (Org.). **Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic**. Switzerland: World Health Organization. 2000.

YANG, T-Y.; CHOU, J.I.; UENG, K-C.; CHOU, M-Y.; YANG, J-J.; LIN-SHIAU, S-J.; HU, M-E.; LIN, J-K. Weight Reduction Effect of Pu erh Tea in Male Patients with Metabolic Syndrome. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 28, n. 7, p. 1096-1101, 2014.

ZHANG, L.; LI, N.; MA, Z-Z.; TU, P-F. Comparison of the chemical constituents of aged pu-erh tea, ripened pu-erh tea, and other teas using HPLC-DAD-ESI-MSn. **J Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 8754–8760, 2011.

ZHANG, L.; LI, N.; MA, Z-Z; TU, P-F. Comparison of the Chemical Constituents of Aged Pu-erh Tea, Ripened Pu-erh Tea, and Other Teas Using HPLC-DAD-ESI-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], v. 59, n. 16, p. 8754-8760, 2011.

ZHAO, L.; JIA, S.; TANG, W.; SHENG, J.; LUO, Y. Pu-erh tea inhibits tumor cell growth by down-regulating mutant p53. Int. **J. Mol. Sci.**, v.12, p. 7581–7593, 2011a.

ZHAO, H.; ZHANG, M.; ZHAO, L.; GE, Y. K.; SHENG, J.; SHI, W. Changes of constituents and activity to apoptosis and cell cycle during fermentation of tea. Int. **J. Mol. Sci.**, v.12, p.1862–1875, 2011b.

Anexo 1

Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa da UFRGS



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 38712

Título: EFEITOS DO EXTRATO DE PU ERH (CAMELIA SINENSIS) NA ATIVIDADE DA PON1 E NO METABOLISMO LÍPIDICO EM RATOS WISTAR ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLÍPIDICA

Vigência: 30/05/2020 a 01/08/2022

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARCIA TRAPP - coordenador desde 30/05/2020

LUIZ CARLOS RIOS KUCHARSKI - pesquisador desde 30/05/2020

DIANE PEREIRA SILVEIRA - Aluno de Mestrado desde 30/05/2020

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 72 ratos Wistar, machos, com 50 dias de idade provenientes do CREAL/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 6 de Maio de 2020

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética