

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

Ariana Aparecida Ferreira Pereira

**Chá mate (*Ilex paraguariensis*) melhora a defesa
antioxidante e diminui o dano oxidativo em fêmeas Wistar
senis**

**ARAÇATUBA
2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

Ariana Aparecida Ferreira Pereira

**Chá mate (*Ilex paraguariensis*) melhora a defesa
antioxidante e diminui o dano oxidativo em fêmeas Wistar
senis**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune

Coorientadora: Profa. Dra. Adriane Belló-Klein

ARAÇATUBA

2013

Catálogo na Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P436c Pereira, Ariana Aparecida Ferreira.
Chá mate (*Ilex paraguariensis*) melhora a defesa antioxidante e diminui o dano oxidativo em fêmeas Wistar senis / Ariana Aparecida Ferreira Pereira. - Araçatuba, 2013
102 f.: il.; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune
Coorientadora: Profa. Adriane Belló-Klein

1. *Ilex paraguariensis* 2. Antioxidantes 3. Envelhecimento
4. Estresse oxidativo 5. Ratos I. T.

CDD 612

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 20.05.1988, Pereira Barreto - SP.

Filiação: Silvana Aparecida Ferreira Pereira
Adair Marques Pereira

2006/2009: Curso de Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Três Lagoas/ UFMS - Três Lagoas - MS.

2011/2013: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia - SBFIs - na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvana e Adair, por me darem a vida e me ensinarem a vivê-la com dignidade, por iluminarem meu caminho com afeto e dedicação para que o trilhasse sem medo e com esperança, por se doarem inteiramente e renunciarem aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, pelo apoio e compreensão durante estes dois anos e meio e por estarem sempre ao meu lado me motivando a seguir em frente. Amo imensamente vocês, serei eternamente grata por tudo que fizeram por mim.

À minha irmã Arielle por todo amor, carinho, paciência, por sempre estar ao meu lado nos momentos bons e difíceis, seu apoio foi essencial para que continuasse trilhando meu caminho.

Aos meus demais familiares, minha avó Luiza (*in memoriam*), minha tia Adriana (*in memoriam*), minha avó Cida, meu avô José, José Humberto, Ana Luiza, minha prima Vanessa, Ítalo, Pedro e demais tios, tias e primos por incessantemente me apoiarem e por estarem sempre ao meu lado me motivando a seguir em frente.

Obrigada a todos por acreditarem em mim e proporcionarem grandes alegrias em minha vida. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho, por me dar forças para seguir em frente quando tudo parecia perdido e me mostrar que com fé, esperança e determinação podemos alcançar nossos objetivos.

A minha orientadora, professora Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, por toda dedicação, paciência, incentivo, amizade e por me orientar não só para a realização deste trabalho, mas também para que eu possa me tornar uma boa profissional. Obrigada pela confiança depositada em mim e por todos os momentos de ensinamento e aprendizagem que me fizeram concluir este trabalho.

A professora Adriane Belló-Klein pela coorientação, por acreditar em nosso trabalho, por nos receber em seu laboratório, pelo apoio e sugestões que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

A professora Suzana Llesuy por ser extremamente amável, gentil e por todas as suas contribuições valiosas para a realização deste estudo.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica- FOA/UNESP, Keny, Vanessa, Guilherme, Matheus, Camila, Estéfani pelo apoio, longos dias de trabalho, dedicação, carinho e acima de tudo amizade. Obrigada por tudo, principalmente pelos momentos alegres que passamos juntos.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular- UFRGS, Alex, Carmem, Cristina, Ângela, Tânia, Rafaela, Rafael Fernandes e Rafael Colombo por me receber gentilmente e ajudar na realização dos experimentos.

Aos professores da banca examinadora, Prof. Fábio Erminio Mingatto e Prof. Edson Luiz da Silva pela disposição, presença nesta comissão examinadora e contribuições para este trabalho.

Aos colegas e amigos do departamento de Ciências Básicas- FOA/UNESP, Rita, Lígia, Ângela, Taís, Max, Maria Sara, Simone, Murilo, Jéssica, Renato, Camila, Leandro, Monique, Samuel, Noelle, Wagner, Dalise, Thamine, Antônio, Caril, Daniel e demais colegas pelos momentos agradáveis e apoio.

Aos amigos que fizeram parte do departamento de Ciências Básicas- FOA/UNESP, Aline, Talita, Fabiano, Bruna, Ariane, Luís César, Natália, Rafael, Vilma, Mariana Lima, Daiani, Carla, Natália Manrique, Juliana, Daisy e Felipe pelos momentos alegres e incentivo.

Ao Prof. Wagner Villegas e Cláudia Quintino Rocha do Laboratório de Fitoquímica- UNESP/Araraquara pela realização das análises cromatográficas.

Aos professores do departamento de Ciências Básicas- FOA/UNESP, Rita Cássia Menegatti Dornelles, Dóris Hissako Sumida, Sandra Helena Penha de Oliveira, João César Bedran de Castro, João Carlos Callera, Cristina Antoniali, Wilson Garcia e Mário Jefferson Quirino Louzada pela contribuição no meu aprendizado e trabalho.

Ao Prof. Edilson Ervolino e a Profa. Alaíde do departamento de Histologia- FOA/UNESP - por cederem espaço no biotério e laboratório para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem e seu grupo de pesquisa do departamento de Odontopediatria- FOA/UNESP - por nos receberem e fornecerem espaço e equipamento para realização dos experimentos.

Aos funcionários da biblioteca da FOA, Ana Cláudia, Ana Paula, Maria Cláudia, Luís e Denise pela colaboração.

A todos os funcionários da FOA/UNESP, Arnaldo, Camilo, João, Alan, Eliseide, André, Wilson, Grisalda, Gym, Mauro, Maurício, Pedro, Sandra, Lourdes

(aposentou recentemente) e Alexandrina, dentre outros, pela disposição ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

As amigas, Ângela, Taís, Aline, Simone Potje, Keny, Mariana Lima, Juliana Batista, Juliana Cristina, Karina, Daniela, Vanessa, Thaís, Annelise, Adrieli, Talita, Simone Camargo, Lilian, Bruna Biffe, pelo incentivo, carinho, força e por sempre trazerem palavras de inspiração. Em especial às minhas amigas Rita de Cássia pelo carinho, palavras de incentivo e lealdade, e Lígia por fazer parte desta caminhada desde o início, por me incentivar, ajudar, por sua paciência nos momentos difíceis e por sua amizade sincera. *“Durante toda minha vida muitas pessoas passaram por mim, dia após dia. Mas somente algumas dessas pessoas ficarão para sempre em minha memória”*.

A UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”) pela oportunidade da realização deste curso de pós-graduação.

A Cristiane, Lilian, Diogo e Valéria, da secretaria de pós-graduação da FOA/UNESP, por sempre nos auxiliar e socorrer na entrega de documentos, relatórios, pareceres.

A Diretora da FOA/UNESP, Profa. Ana Maria Pires Soubhia e ao Vice-Diretor Prof. Wilson Roberto Poi pelo apoio.

Ao apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado.

A FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP) e a Pró-Reitoria de pós-graduação da UNESP (PROPG-UNESP) pelo incentivo.

Durante esses dois anos e meio só tenho a agradecer a todos que fizeram parte desta caminhada e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento,

serviram para crescimento pessoal. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

“O conhecimento exige uma presença curiosa do sujeito em face do mundo. Requer uma ação transformadora sobre a realidade. Demanda uma busca constante. Implica em invenção e em reinvenção.”

Paulo Freire

PEREIRA, A. A. F. **Chá mate (*Ilex paraguariensis*) melhora a defesa antioxidante e diminui o dano oxidativo em fêmeas Wistar senis**. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

RESUMO

O envelhecimento em fêmeas é caracterizado por declínio progressivo nas funções bioquímicas e fisiológicas de vários tecidos e órgãos, que resulta em menor produção de estrógeno, diminuição da defesa antioxidante e aumento do estresse oxidativo. Ervas com poder antioxidante que possam minimizar os efeitos do estresse oxidativo na senilidade vem sendo estudadas e o *Ilex paraguariensis* (chá mate), consumido em alguns países da América do Sul na forma de chá, apresenta elevada capacidade antioxidante *in vivo*, além de aumentar a expressão de enzimas antioxidantes. Este trabalho analisou o efeito da administração de chá mate por 8 semanas, na defesa antioxidante e dano oxidativo de ratas jovens e senis. Fêmeas Wistar de 4 e 17 meses de idade foram distribuídas nos grupos: Senis (S), Senis tratadas com chá mate (SCM), Jovens (J) e Jovens tratadas com chá mate (JCM). Os grupos SCM e JCM receberam diariamente chá mate na dose de 20 mg/kg de massa corpórea, por oito semanas. Foram avaliadas a capacidade antioxidante no plasma, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no hemolisado e homogenato do fígado. O chá mate aumentou a capacidade antioxidante no plasma, diminuiu TBARS e elevou a atividade das enzimas antioxidantes no hemolisado e homogenato do fígado, porém as respostas ao tratamento foram influenciadas pela idade.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*. Antioxidantes. Envelhecimento. Estresse oxidativo. Ratos.

PEREIRA, A. A. F. **Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves the antioxidant defense and reduces oxidative damage in senile female Wistar rats.** 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

ABSTRACT

Aging process in females is characterized by a progressive decline in biochemical and physiological functions of various tissues and organs, resulting in decreased production of estrogen, decreased antioxidant defense and increased oxidative stress. Herbs with antioxidant properties that can minimize the effects of oxidative stress in aging have been studied and *Ilex paraguariensis* (mate tea), consumed in some countries of South America in the form of tea has high antioxidant capacity *in vivo*, in addition to increasing the expression of antioxidant enzymes. This study examined the effect of administration of mate tea for 8 weeks in antioxidant defense and oxidative damage in young and senile rats. Female rats (4 and 17 months of age) were allocated into groups: Senile (S), Senile treated with mate tea (SCM), Young (J) and Young treated with mate tea (JCM). SCM and JCM received daily mate tea (20 mg / kg body mass) for eight weeks. We evaluated the antioxidant capacity of plasma (FRAP), the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in liver homogenate and hemolysate. Mate tea increased the plasma FRAP, decreased TBARS and increased the antioxidant enzyme activity, both in hemolysate and liver homogenate, but responses to treatment were influenced by age.

Keywords: *Ilex paraguariensis*. Antioxidants. Aging. Oxidative stress. Rats.

ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$ = oxigênio singlete

ALT = alanina aminotransferase

AST = aspartato aminotransferase

CAT = catalase

CM = chá mate

Cu-Zn-SOD = superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

E_2 = estrógeno

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EO = estresse oxidativo

EROs = espécies reativas de oxigênio

Fe^{2+} = íon ferroso

Fe^{3+} = íon férrico

FRAP = *Ferric Reducing Antioxidant Power*

GPx = glutaciona peroxidase

GPx1 = glutaciona peroxidase do tipo 1

GPx2 = glutaciona peroxidase do tipo 2

GPx3 = glutaciona peroxidase do tipo 3

GPx4 = glutaciona peroxidase do tipo 4

GPx5 = glutaciona peroxidase do tipo 5

GSH = glutaciona reduzida

GSSG = glutaciona oxidada

H = hidrogênio

H_2O_2 = peróxido de hidrogênio

HCl = ácido clorídrico

K_m = coeficiente de Michaelis-Menten

L^\cdot = radical lipídico

LDL = lipoproteína de baixa densidade

LOO^\cdot = radical peroxila

LOOH = lipoperóxido

m.c. = massa corpórea

MDA = malonaldeído

MgSO₄ = sulfato de magnésio

Mn-SOD = superóxido dismutase dependente de magnésio

MS = espectroscopia de massa

MSn = espectroscopia de massa em múltiplos estágios

N₂ = nitrogênio gasoso

Na₂CO₃ = carbonato de sódio

NaCl = cloreto de sódio

NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida

O₂ = oxigênio molecular

O₂⁻ = ânion superóxido

OH[•] = radical hidroxila

SOD = superóxido dismutase

SOD1 = superóxido dismutase do tipo 1

SOD2 = superóxido dismutase do tipo 2

SOD3 = superóxido dismutase do tipo 3

TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e mecanismos antioxidantes nos sistemas biológicos. (Adaptado de KUMAR et al., 2005). 20
- Figura 2 - Reação de Fenton (A) e Reação de Haber-Weiss (B). (Adaptado de CHEN; SCHOPFER, 1999). 21
- Figura 3 - Etapas da peroxidação lipídica, reação em cadeia. (adaptado de BHATTACHARJEE, 2012). 23
- Figura 4 - Espectroscopia de massa do chá mate (A). Derivados cafeoilquínicos identificados no mate: ácido cis 3-o-cafeoilquínico (3-CQA), ácido 5-O-p-cumaroil quínico (5-p-CoQA), ácido 3-o-feruloilquínico (CeQA), ácido 4-o-cafeoil-5-o-p-cumaroil quínico (4C,5 pCoQA) e ácido 4,5-di-o-cafeoilquínico (cis, 4,5-diCQA) (B). 40
- Figura 5 - Massa corpórea inicial (A) e final (B) dos animais jovens e senis. Dados expressos em gramas (Média±erro padrão), n= 10 por grupo. Teste de Tukey, $^{\&}p<0,05$ quando comparado com J. 41
- Figura 6 - Efeito do chá mate na capacidade antioxidante plasmática dos animais jovens e senis. Dados expressos em mmol/L (Média±erro padrão), n= 10 por grupo. Teste de Tukey, $^*p<0,05$ quando comparado com J; $^{\#}p<0,05$ quando comparado com S. 43
- Figura 7 - Efeito do chá mate nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos eritrócitos (A) e fígado (B) de animais jovens e senis. Dados expressos em nmol/mg proteína (Média±erro padrão), n= 10 por grupo. Teste de Tukey, $^{\&}p<0,05$

quando comparado com J; * $p < 0,05$ quando comparado com J;
$p < 0,05$ quando comparado com S.

44

Figura 8 - Efeito do chá mate na atividade de SOD nos eritrócitos (A) e fígado (B) de animais jovens e senis. Dados expressos em U/min/mg proteína (Média±erro padrão), n= 10 por grupo. Teste de Tukey, & $p < 0,05$ quando comparado com J; * $p < 0,05$ quando comparado com J; # $p < 0,05$ quando comparado com S.

45

Figura 9 - Efeito do chá mate na atividade de GPx nos eritrócitos (A) e fígado (B) de animais jovens e senis. Dados expressos em mmol de GSH consumida/min/mg proteína (Média±erro padrão), n= 10 por grupo. Teste de Tukey, & $p < 0,05$ quando comparado com J; * $p < 0,05$ quando comparado com J; # $p < 0,05$ quando comparado com S.

46

Figura 10 - Efeito do chá mate na atividade de CAT nos eritrócitos (A) e no fígado (B) de animais jovens e senis. Dados expressos em nmol de H₂O₂ consumido/min/mg proteína (Média±erro padrão), n= 10 por grupo. Teste de Tukey, & $p < 0,05$ quando comparado com J; * $p < 0,05$ quando comparado com J; # $p < 0,05$ quando comparado com S.

47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de estrógeno, determinação das atividades de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), e ácido úrico no plasma dos animais senis e jovens. Valores expressos como Média \pm erro padrão, n=10 por grupo. Nos dados de concentração de estrógeno foi aplicado o teste de Dunnett e nos dados de AST, ALT e ácido úrico o teste de Tukey, $p < 0,05$ quando comparado com J.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 OBJETIVOS | 29 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 31 |
| 3.1 OBTENÇÃO DO CHÁ MATE | 32 |
| 3.2 ANÁLISES DO CHÁ MATE | 32 |
| 3.2.1 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE MASSA (MS) | 32 |
| 3.2.2 TOTAL DE POLIFENÓIS | 33 |
| 3.2.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL – MÉTODO FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>) | 33 |
| 3.3 ANIMAIS | 33 |
| 3.3.1 CICLO ESTRAL | 34 |
| 3.3.2 TRATAMENTO DOS ANIMAIS | 34 |
| 3.4 PREPARO DO HOMOGENATO DE FÍGADO | 35 |
| 3.5 PREPARO DO HEMOLISADO | 35 |
| 3.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PLASMÁTICA | 35 |
| 3.7 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO | 36 |

| | |
|---|----|
| 3.8 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) | 36 |
| 3.9 CATALASE (CAT) | 36 |
| 3.10 GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx) | 37 |
| 3.11 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST) E ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) | 37 |
| 3.12 ÁCIDO ÚRICO | 37 |
| 3.13 CONCENTRAÇÃO DE ESTRÓGENO | 37 |
| 3.14 PROTEÍNAS TOTAIS | 38 |
| 3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 38 |
| 4 RESULTADOS | 39 |
| 5 DISCUSSÃO | 48 |
| 6 CONCLUSÕES | 55 |
| REFERÊNCIAS | 57 |
| ANEXOS | 72 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo complexo e multifatorial caracterizado por declínio progressivo nas funções bioquímicas e fisiológicas de vários tecidos e órgãos de um indivíduo. As causas deste declínio estão pouco elucidadas, mas há relatos de que o aumento do estresse oxidativo, distúrbios no metabolismo energético e alterações primárias no sistema imune desempenhem um papel importante (PROLLA; MATTSON, 2001).

O estresse oxidativo (EO) é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção e a eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que resulta em alterações moleculares induzidas por reações oxidativas em biomoléculas como proteínas, carboidratos e lipídeos (UTTARA *et al.*, 2009).

As EROs são altamente reativas e geradas durante reações de auto-oxidação, nas reações catalisadas por enzimas como NADPH oxidases e também nas mitocôndrias, durante o transporte de elétrons através dos componentes da cadeia respiratória, o que faz com que essas espécies ocorram naturalmente nos sistemas biológicos, principalmente como subprodutos do metabolismo aeróbico (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). As principais EROs são: o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o oxigênio singlete (1O_2) (Figura 1) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

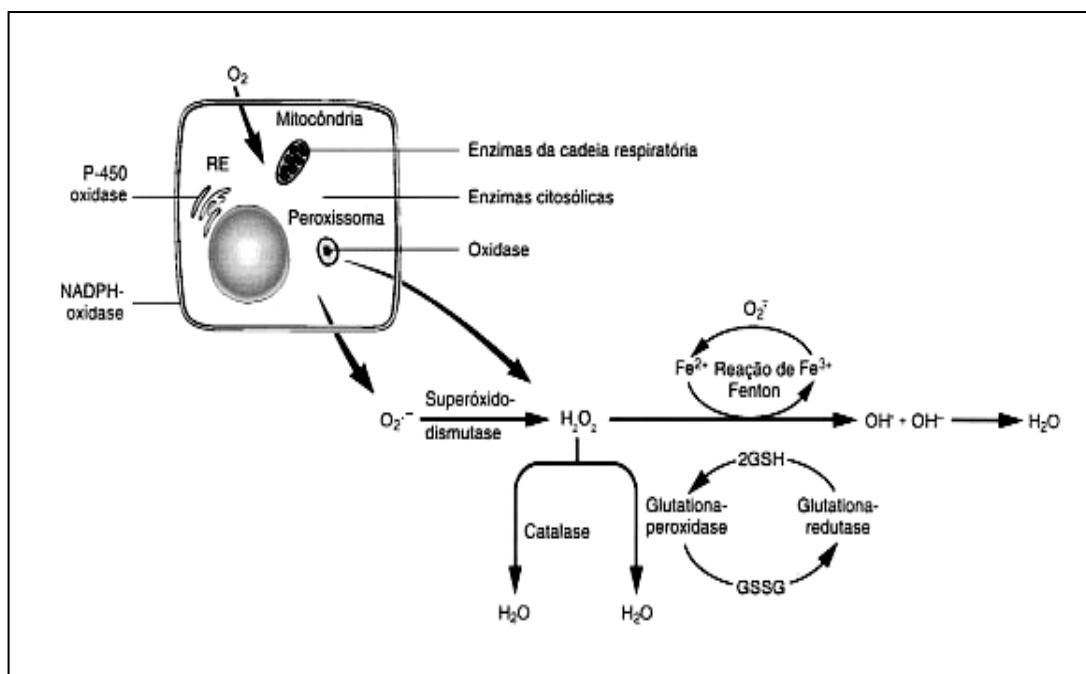


Figura 1 - Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e mecanismos antioxidantes nos sistemas biológicos. (Adaptado de KUMAR *et al.*, 2005).

O ânion superóxido apresenta um elétron desemparelhado, o que o torna altamente reativo. O $O_2^{\cdot-}$ é produzido a partir do oxigênio (O_2) nos complexos I e III durante a respiração mitocondrial; e também pode ser produzido por reações catalisadas pela NADPH oxidase e xantina oxidase. A superóxido dismutase catalisa a conversão do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (VILANUEVA; KROSS, 2012). O ânion superóxido pode ser gerado na Reação de Fenton, iniciada pela oxidação de Fe^{2+} , que resulta na formação de outras espécies reativas. Nessa reação o $O_2^{\cdot-}$ formado reage com íons hidrogênio, resultando em H_2O_2 , que reage com o Fe^{2+} , produzindo OH^{\cdot} (Figura 2A). O $O_2^{\cdot-}$ pode também doar elétron para Fe^{3+} , gerando Fe^{2+} e O_2 , como também reagir com H_2O_2 , levando à formação de OH^{\cdot} (Reação de Haber-Weiss), como pode observado na Figura 2B (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Em meio aquoso o $O_2^{\cdot-}$ sofre dismutação produzindo uma molécula de H_2O_2 e uma molécula de O_2 . Pode ainda reagir com o radical OH^{\cdot} produzindo 1O_2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

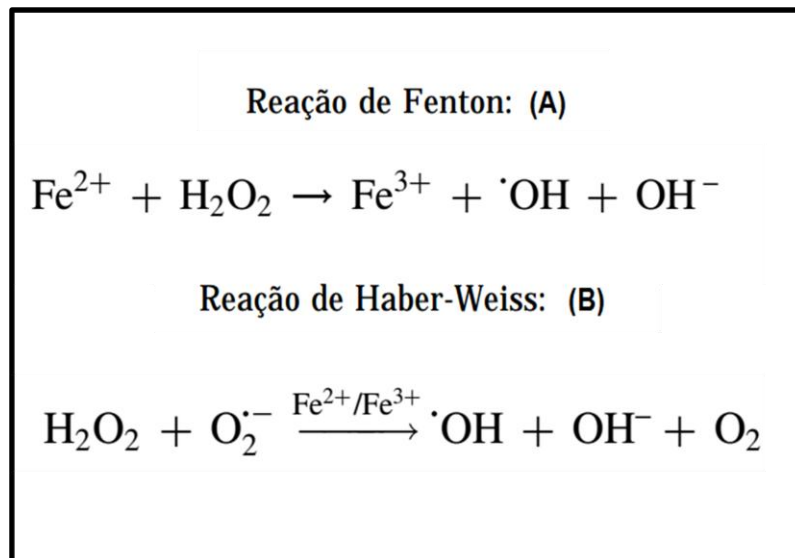


Figura 2 - Reação de Fenton (A) e Reação de Haber-Weiss (B).
(Adaptado de CHEN; SCHOPFER, 1999).

O H_2O_2 é um intermediário formado pela dismutação de $O_2^{\cdot-}$, espontânea ou catalisada pela superóxido dismutase (Figura 1), por ação de xantina oxidases e diversas outras peroxidases e também na Reação de Fenton (Figura 2A). Quando comparado às demais EROs é um fraco agente oxidante, porém com elevado potencial lesivo, que resulta da facilidade em atravessar membranas biológicas, difundindo a partir da mitocôndria para outros compartimentos celulares. Reage com

tióis, sais de ferro e cobre reduzidos, com proteínas hemínicas e peroxidases, dando início ao processo de peroxidação lipídica. Em presença de metal de transição origina OH^{\bullet} (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O radical OH^{\bullet} é a mais reativa e mais lesiva das EROs. Pode promover dano oxidativo ao DNA, lipídeos e proteínas diversas. Esse radical é considerado a principal espécie iniciadora do processo de peroxidação lipídica, que está relacionado ao envelhecimento, ao surgimento do câncer e ao aumento da toxicidade de xenobióticos. É o radical mais deletério ao organismo, seu sequestro por antioxidantes é dificultado por sua meia vida muito curta. O OH^{\bullet} pode facilmente ser sequestrado *in vitro* por inúmeras moléculas, devido a sua alta reatividade; no entanto, para que os resultados *in vitro* se reproduzam *in vivo*, é necessário ministrar alta concentração de antioxidante para que este alcance o local onde o radical OH^{\bullet} está presente em concentração suficiente para suprimi-lo. Existem duas maneiras de controlar os efeitos do radical OH^{\bullet} reparar as modificações causadas por ele ou inibir sua formação (SHAN *et al.*, 1990).

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é o estado eletronicamente excitado do oxigênio, formado principalmente por transferência de energia a partir de moléculas excitadas por luz, como porfirinas, clorofila e riboflavina, para o O_2 . Assim como OH^{\bullet} , essa espécie reage com um grande número de biomoléculas, incluindo-se lipídeos da membrana, podendo iniciar o processo de peroxidação, em regiões próximas aos sítios de produção (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Segundo a teoria de Harman (1956, 2006) a produção de EROs e o estresse oxidativo aumentam com a idade, resultando em maior dano oxidativo (AMES *et al.*, 1993; GOTO *et al.*, 2001). A maioria dos componentes celulares é suscetível à ação das EROs, porém as membranas, por serem ricas em ácidos graxos insaturados, são muito sensíveis a essas espécies. Em decorrência da ação das EROs, as membranas celulares sofrem alterações estruturais e funcionais (MELLO FILHO *et al.*, 1984), com conseqüente perda da seletividade de troca iônica e rompimentos, que permitem o extravasamento do conteúdo de organelas. O ataque das EROs aos lipídeos de membranas resulta na peroxidação, com formação de produtos citotóxicos como o malonaldeído (MDA) (HERSHKO, 1989).

A peroxidação lipídica compreende uma cadeia de reações oxidativas envolvendo ácidos graxos insaturados, que resulta em modificações amplificadas. O processo, que pode ser dividido em três etapas, envolve a iniciação, que ocorre no momento da retirada de um hidrogênio de um grupo metileno, por meio de agente oxidante produzindo um radical lipídico (L^\cdot) (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2000). Esse por sua vez, após um rearranjo forma um dieno conjugado, produzindo o radical peroxila (LOO^\cdot). A segunda etapa, conhecida por propagação, é iniciada pela reação de LOO^\cdot com ácidos graxos poli-insaturados formando o lipoperóxido ($LOOH$). Este por sua vez reage com metais de transição formando o radical alcoxil e novamente com o LOO^\cdot reiniciando o processo. A última etapa é a terminação, na qual 2 radicais lipídicos reagem entre si ou com compostos fenólicos, ou podem ainda se decompor em isoprostanos, alcanos e aldeídos. O MDA é exemplo de produto da peroxidação lipídica, frequentemente utilizado para estimar o dano oxidativo através de reação com ácido tiobarbitúrico, técnica laboratorial conhecida como TBARS (Figura 3) (PANDEY; RIZVI, 2010).

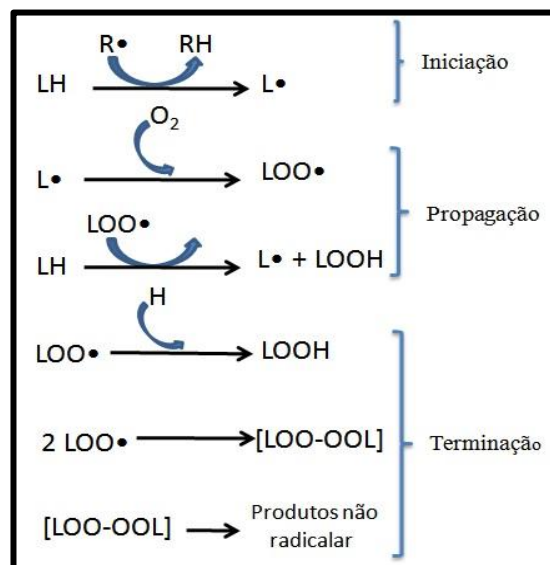


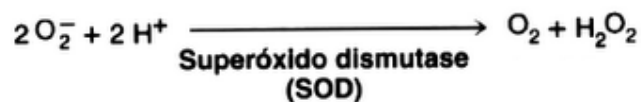
Figura 3- Etapas da peroxidação lipídica, reação em cadeia. (Adaptado de BHATTACHARJEE, 2012).

Em condições de normalidade, as EROs são mantidas em concentrações fisiológicas pelo sistema de defesa antioxidante. Este sistema é composto principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutiona peroxidase (GPx) e pelos antioxidantes não enzimáticos que incluem

glutationa reduzida, bilirrubina, creatinina, ácido úrico, vitamina C e vitamina E (RAMESH et al., 2012). Os antioxidantes são substâncias que, presentes em baixas concentrações quando comparadas aos substratos oxidáveis, neutralizam a oxidação desses substratos de maneira efetiva, impedindo a sua formação e interrompendo a cadeia de reações (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000)

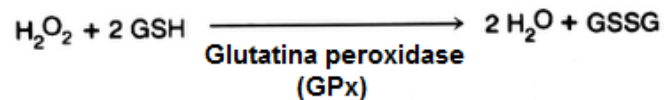
O sistema antioxidante enzimático constitui a primeira defesa endógena contra EROs, impedindo sua formação ou sequestrando-as, para que estas não possam interagir com alvos celulares (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001). Através das ações das enzimas antioxidantes, as células tentam manter baixas as quantidades de $O_2^{\cdot-}$ e de H_2O_2 , evitando assim a formação do radical OH^{\cdot} , altamente reativo e deletério (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

A SOD é uma família de enzimas encontradas em diferentes compartimentos das células, que requerem diferentes íons metálicos como grupamentos prostéticos. A SOD1 (Cu-Zn-SOD) está presente no citoplasma e no espaço intermembranas das mitocôndrias. A SOD2 (Mn-SOD) requer manganês e exerce sua ação catalítica na matriz mitocondrial. A isoenzima 3 (SOD3) também requer cobre e zinco como SOD1, mas atua no espaço extracelular. Essa família de enzimas tem papel fundamental na defesa antioxidante do organismo, promovendo a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 (SERRA *et al.*, 2003).

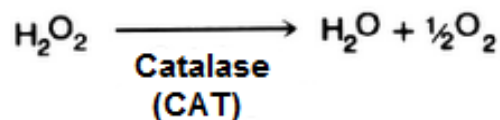


A GPx é uma família de enzimas antioxidantes dependentes de selênio, que catalisam a redução do H_2O_2 livre a água, e também de hidroperóxidos lipídicos aos seus alcoóis correspondentes, às custas da conversão da glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG). A família da GPx inclui, pelo menos, cinco enzimas codificadas pelos genes dos mamíferos: GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 e GPx5. Estas isoformas da GPx estão presentes em diferentes locais da célula e existem como formas citoplasmática, mitocondrial e extracelular. A GPx possui elevada atividade na mitocôndria de fígado, rins e coração, e baixa atividade na mitocôndria de cérebro e músculo esquelético. Alguns trabalhos também sugerem que a GPx pode estar presente nos núcleos (MUSE *et al.*, 1994) atuando na prevenção de danos

causados ao DNA pelas EROs (MARTINS, 2007). A GPx4 está associada à membrana celular (UTSUNOMIYA *et al.*, 1991) e reduz os lipoperóxidos em reação semelhante à catalisada pela GPx1 (BRIGELIUS-FLOHE *et al.*, 1994) e, portanto, é importante na proteção contra a peroxidação lipídica. Ao contrário da CAT, a K_m da GPx para o H_2O_2 é bastante baixa, sugerindo que essa enzima atua em menores concentrações de H_2O_2 .



A CAT é uma hemoproteína citoplasmática, universal, identificada no peroxissomo de células hepáticas e renais, organela responsável pela detoxificação celular, pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa e fonte de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete. Em alguns tipos celulares é encontrada nos microperoxissomos, nas células cardíacas e nas mitocôndrias (ROJKIND *et al.*, 2002). Esta enzima catalisa a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 .



O sistema antioxidante não enzimático é constituído por substâncias de baixo peso molecular, endógenas como GSH e ácido úrico, bem como por antioxidantes que podem ser adquiridos através da dieta, como as vitaminas E e C, e compostos fenólicos presentes em elevadas quantidades em alguns vegetais (RATNAM *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (BRAVO, 1998). Nos vegetais podem estar livres ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998). Um elevado número de polifenóis de ocorrência natural em frutas, vegetais, chás obtidos de algumas espécies vegetais e vinhos é conhecido, assim como a ação antioxidante desses compostos (DREOSTI, 2000; MANACH *et al.*, 2004).

Compostos fenólicos podem ser divididos em 2 grandes grupos: flavonoides e ácidos fenólicos. Os flavonoides e seus derivados são formados pela combinação de

derivados sintetizados a partir de fenilalanina e ácido acético (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Os ácidos fenólicos e seus derivados apresentam um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxila na molécula, que conferem a capacidade de neutralizar as EROs (MANACH *et al.*, 2004).

Os ácidos fenólicos podem existir como estruturas simples ou em formas mais complexas, resultantes da ligação com outros compostos da mesma classe, ou ainda conjugados com diferentes compostos, dentre eles o ácido cafeico, originando ácido clorogênico, que se apresenta em diferentes formas isoméricas (SOARES, 2002).

O ácido clorogênico modula a expressão gênica das enzimas antioxidantes (BRACESCO *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2012), neutraliza EROs, podendo agir nas fases de iniciação e propagação do processo oxidativo (MONTEIRO; TRUGO, 2005), previne a oxidação de LDL, evitando o surgimento de diversas doenças, dentre as quais o câncer e doenças cardiovasculares (VINSON; DABBAGH, 1998).

Na década de 1990 foram publicados os primeiros trabalhos que demonstraram a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do chá mate (CM) (CAMPOS *et al.*, 1996; GUGLIUCCI; STAHL, 1995; GUGLIUCCI, 1996). Mais recentemente, foi demonstrado que o CM apresenta capacidade antioxidante *in vitro* superior à do chá verde, obtido de *Camellia sinensis* (BASTOS *et al.*, 2007). Outros estudos identificaram no CM capacidade antioxidante equivalente ou superior as das vitaminas C e E, consideradas padrões para essa propriedade (CHANDRA; MEJIA, 2004; GUGLIUCCI; MENINI, 2002; SCHINELLA *et al.*, 2000; VINSON; DABBAGH, 1998).

O CM é uma bebida altamente consumida em países da América do Sul como Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, e está cada vez mais se difundindo mundialmente, principalmente nos Estados Unidos (HECK; MEJLA, 2007). O chá é preparado através da infusão das folhas secas de *Ilex paraguariensis*, planta da família Aquifoliaceae (SMALL; CATLING, 2001; GRIGIONI *et al.*, 2004). O CM também é comercializado em sachês individuais, na forma solúvel ou como extrato obtido das folhas, amplamente empregado na fabricação de bebidas gaseificadas e sucos (KUMMER *et al.*, 2005; MACCARI JUNIOR, 2005).

O chá mate apresenta como componentes a água, taninos, minerais, vitaminas, carotenoides, ácido cafeico, dentre outros. Os principais bioativos do CM são os compostos fenólicos, saponinas e metilxantinas (HECK; MEJLA, 2007).

A elevada capacidade antioxidante identificada no CM vem sendo atribuída ao ácido clorogênico e seus derivados, que incluem ésteres de ácido trans-cinâmico e ácido quínico (HECK; MEJLA, 2007).

O interesse no uso do chá mate para a promoção da saúde é relativamente recente. Inibição da glicação, que resulta em acúmulo de proteínas e lipídeos modificados, ação hipocolesterolêmica, efeito vasodilatador, redução da progressão da aterosclerose e atividade antioxidante são alguns dos efeitos já demonstrados na literatura (BOAVENTURA *et al.*, 2012; LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005; MOSIMANN *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2008; STEIN *et al.*, 2005;).

O processo de envelhecimento envolve uma série de mudanças metabólicas, algumas das quais de origem endócrina. Nas fêmeas, alterações na produção de estrógeno (E₂), diminuição da defesa antioxidante e aumento do EO fazem parte dessas mudanças (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012). Há relatos de que a atividade e a capacidade antioxidantes de sistemas celulares são diminuídas com a senilidade, levando à perda gradual de pró-oxidantes/antioxidantes e aos danos oxidativos (KUMAR *et al.*, 2011; WEI; LEE, 2002). O estrógeno tem ação antioxidante, pois contém um anel fenólico capaz de doar hidrogênio para EROs, neutralizando-as ou transformando-as em espécies menos reativas (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012). Além disso, o estrógeno aumenta a expressão gênica das enzimas antioxidantes e diminui a expressão das enzimas pró-oxidantes como as NADPH oxidases. Sendo assim, o aumento do EO observado em fêmeas senis parece resultar, ao menos em parte, da diminuição do estrógeno (NIKI; NAKANO, 1990).

A expectativa de vida vem aumentando em muitos países. No Brasil, o último levantamento, feito em 2013, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), registrou aumento em três meses e 22 dias na expectativa de vida das pessoas. Atualmente, a expectativa de vida do brasileiro é de 74 anos. Na busca por maior qualidade de vida na senilidade, estudos utilizando antioxidantes naturais, como forma de prevenção ou mesmo para reverter alterações resultantes do maior

estresse oxidativo vêm sendo realizados. O chá mate, com sua elevada ação antioxidante, vêm sendo investigado para esse fim, porém a grande maioria dos relatos utiliza machos senis. Além disso, investigações acerca de possíveis diferenças de resposta ao tratamento com essa erva em função da idade não estão disponíveis.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento a longo prazo com chá mate em ratas Wistar com 6 e 19 meses de idade.

2.2 Objetivos específicos

- a. Avaliar a capacidade antioxidante plasmática das fêmeas jovens e senis, após o tratamento com CM na dose de 20 mg/kg de m.c., por 8 semanas;
- b. Determinar as alterações lipídicas em eritrócitos e fígado dos animais jovens e senis, tratados ou não com CM;
- c. Verificar se o tratamento com CM modifica as atividades das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT em eritrócitos e fígado de fêmeas jovens e senis.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do chá mate

Para todo o experimento foi utilizado o mesmo lote de Chá Mate Solúvel (Leão Jr., Curitiba-PR, Brasil), preparado a partir das folhas tostadas de *Ilex paraguariensis*, que foi obtido em supermercado local. O chá foi preparado diluindo-se o pó em água deionizada (GUGLIUCCI *et al.*, 2009). A relação pó/água (m/v) variou em função das determinações laboratoriais realizadas.

3.2 Análises do CM

3.2.1 Caracterização por espectroscopia de massa (MS)

O chá mate foi analisado no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS₂, MS₃, MS_n) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MS_n), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -4 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 280°C, gás de arraste (N₂) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi *m/z* 150-1500, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MS_n realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 20 e 30% da energia total do instrumento. O software Xcalibur (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

3.2.2 Total de Polifenóis

Foi estimado através do método de Folin-Ciocalteu, como descrito por Taga *et al.* (1984). Para as determinações, 20µL do chá mate foram adicionados a uma solução de Na₂CO₃ 2% (m/v). Após 2 minutos, juntou-se reagente de Folin diluído 1:1 (v/v). Depois de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, a absorvância foi lida em 750 nm, em espectrofotômetro Hitachi U-1100. A concentração total de polifenóis foi determinada com o auxílio de curva padrão de ácido gálico.

3.2.3 Capacidade antioxidante total - Método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Foi avaliada como descrito por Benzie e Strain (1996), através de metodologia baseada na capacidade de redução do complexo férrico tripiridiltriazina (Fe³⁺-TPTZ) a forma Fe²⁺ por agentes redutores, em meio ácido. Alíquota de 18 µL de amostra foi adicionada ao meio de reação (reagente FRAP) contendo tampão acetato 300 mmol/L (pH 3,6), TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine) 10 mmol/L em HCl 40 mmol/L e FeCl₃.6H₂O 20 mmol/L (10:1:1, respectivamente). A absorvância foi estimada em 595 nm, em leitora Power Wave 340-Biotek, e os resultados expressos em mmol/g chá mate, utilizando-se curva padrão de sulfato ferroso.

3.3 Animais

Foram utilizadas fêmeas de *Rattus norvegicus albinus* Wistar de quatro e 17 meses de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP, Araçatuba). Os animais foram mantidos em gaiolas (quatro/gaiola), em Biotério com temperatura de 21±3°C, ciclo de claro/escuro de 12 horas e umidade relativa do ar entre 60±5%. Água e ração comercial padrão (Labina Purina, Brasil) foram disponibilizadas à vontade, durante todo o período de tratamento e também durante a adaptação ao biotério (sete dias). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética

no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP (Processo 00517-2012).

3.3.1 Ciclo estral

A determinação do ciclo estral em animais é importante para estudos da função neuroendócrina e pode ser monitorado facilmente e de maneira não invasiva, observando-se as mudanças diárias na citologia vaginal. O ciclo estral foi acompanhado durante os 15 dias que antecederam o início do tratamento, 15 dias durante o período de tratamento e nos 15 dias que precederam a morte dos animais. Todas as manhãs, entre 8h00 e 10h00, a secreção vaginal das ratas era coletada com pipeta de plástico contendo 10 μ L de NaCl 0,9%, inserida no orifício vaginal com cuidado para não estimular a cérvix uterina. O material aspirado era transferido para lâmina e analisado através de microscopia de luz, sem a necessidade do uso de lamínula. Foram utilizadas nos experimentos apenas ratas jovens com ciclo estral regular e ratas senis acíclicas.

3.3.2 Tratamento dos animais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n=10 por grupo): Senis (S), Senis tratadas com chá mate (SCM), Jovens (J) e Jovens tratadas com chá mate (JCM). Os grupos JCM e SCM receberam diariamente, através de sonda orogástrica, chá mate (20 mg/kg de m.c.) na temperatura ambiente, durante 8 semanas. O preparo do chá (descrito no item 3.1) foi realizado imediatamente antes da administração. Os grupos S e J receberam tratamento semelhante, porém com água deionizada. Ao término das 8 semanas as fêmeas em jejum por 10-12 horas foram anestesiadas (Pentobarbital Sódico 3% m/v, dose 30 mg/kg de m.c.) para a realização da punção cardíaca seguida de perfusão com NaCl 0,9% (m/v), que resultou na morte. Imediatamente após a perfusão, o fígado foi coletado, pesado em balança de precisão, transferido para nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

3.4 Preparo do homogenato de fígado

O fígado foi estudado em função do envelhecimento relacionar-se de maneira direta com o dano oxidativo nesse órgão (KUMAR *et al.*, 2011). No momento das análises, o tecido foi homogeneizado em tampão Tris-HCl (100 mmol/L) contendo EDTA (50 mmol/L), pH 7,0. O homogenato foi centrifugado a 1,000 x g por 10 min a 4°C. Para tanto foi utilizado um Potter modelo TE-099 da Tcnal, com rotação de 2600 rpm por 40 segundos. O sobrenadante foi utilizado para as determinações das atividades das enzimas antioxidantes, proteínas totais e TBARS.

3.5 Preparo do hemolisado

Após punção cardíaca, o sangue foi transferido para tubos heparinizados e centrifugado a 1,000 x g por 15 min, na temperatura de 4°C. O plasma obtido foi armazenado a -80°C. As hemácias foram lavadas 3 vezes com solução fisiológica (1:1 v/v) e posteriormente misturadas com solução contendo 4 mmol/L de MgSO₄ e 1 mmol/L de ácido acético (1:100 solução/hemácias, v/v). O hemolisado permaneceu armazenado em freezer (-80°C) até o momento das quantificações de proteínas, TBARS e atividades enzimáticas. Os eritrócitos foram utilizados por serem o tipo celular de maior disponibilidade e apresentarem elevado dano oxidativo lipídico (PANDEY; RIZVI, 2010).

3.6 Capacidade antioxidante plasmática - Método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Foi determinada como descrito no item 2.1.3, utilizando-se 15µL de amostra. A absorvância foi lida em 595 nm, em leitora Power Wave 340-Biotek, e os resultados expressos em mmol/L.

3.7 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A concentração de TBARS foi avaliada (BUEGE; AUST, 1978) em hemolisado e homogenato do fígado. O método consiste em adicionar ácido tricloroacético 10% (m/v) à amostra, para promover acidificação e precipitação das proteínas. Após centrifugação (1,000 x g, 3 min) o sobrenadante é coletado e recebe ácido tiobarbitúrico 0,67% (m/v). Após incubação por 15 minutos a 100°C resfria-se a reação e a absorvância foi medida em 535 nm, espectrofotômetro Hitachi U-1100. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar apropriado ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.8 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade de SOD foi quantificada no homogenato hepático e eritrócitos pelo método de Marklund e Marklund (1974), baseado na inibição da reação do ânion superóxido com pirogalol. O superóxido é gerado por auto-oxidação do pirogalol em meio básico e a SOD compete por este radical com o sistema de detecção. A oxidação do pirogalol foi determinada espectrofotometricamente em 420 nm, utilizando-se 20 μL de amostra. O meio de reação continha tampão Tris 50 mmol/L (pH 8,2) e 24 mmol/L de pirogalol. A quantidade de enzima necessária para promover 50% de inibição da auto-oxidação do pirogalol é considerada como uma unidade de atividade enzimática. Os resultados foram expressos em unidades de SOD/min/mg proteína.

3.9 Catalase (CAT)

Como descrito por Boveris e Chance (1973), com base no consumo do substrato H_2O_2 , a atividade da CAT foi avaliada em homogenato e hemolisado. Alíquota de 10 μL de amostra foi adicionada ao meio de reação contendo 50 mmol/L de tampão fosfato de potássio (pH 7,4) e 0,3 mol/L do substrato. A absorvância foi lida em 240 nm, espectrofotômetro Hitachi U-1100, e os resultados expressos em nmol de H_2O_2 consumido/min/mg proteína.

3.10 Glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da GPx, expressa em mmol GSH consumido/min/mg proteína, foi determinada em homogenato de fígado e hemolisado acompanhando-se a oxidação de NADPH em 340 nm, espectrofotômetro Hitachi U-1100. Para a determinação 50 µL de amostra foi adicionado ao meio de reação contendo 0,17 mmol/L de glutathione reduzida, 0,2 U/mL de glutathione reductase e 0,5 mmol/L de hidróperóxido de terc-butil e 5 mmol/L de NADPH (FLOHÉ; GUNZLER, 1984).

3.11 Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)

Para assegurar que a exposição ao CM na dose de 20 mg/kg de m.c. por tempo prolongado não promoveu alterações hepáticas, foram determinadas as transaminases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). As unidades plasmáticas de AST e ALT foram verificadas espectrofotometricamente através da oxidação da coenzima NADH. Kits comerciais Labtest Diagnóstica SA, MG, Brasil (Refs. 108 e 109) foram utilizados. Os resultados foram expressos em U/L.

3.12 Ácido Úrico

Foi avaliado utilizando-se kit da marca Labtest (Ref. 63), baseado no método enzimático de Trinder, seguindo-se as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em mg/dL.

3.13 Concentração de Estrógeno

Foi determinada no plasma através de radioimunoensaio, utilizando Kit comercial MP Biomedicals LLC (Diagnostics Divisions, New York, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.14 Proteínas totais

Foram quantificadas no homogenato e hemolisado através do método de Lowry *et al.* (1951) utilizando-se albumina bovina 0,1% (m/v) como padrão. As absorvâncias foram determinadas em 660 nm, em leitora Power Wave 340-Biotek, e os resultados expressos em mg/mL.

3.15 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism (versão 5.0). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, analisados quanto à distribuição e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey para estabelecer a comparação entre os grupos (J e S; J e JCM; S e SCM). Para a comparação da concentração plasmática de estrógeno foi utilizado o teste de Dunnett, sendo os demais valores comparados ao grupo J. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

O método de Folin-Ciocalteu foi escolhido para quantificar o total de polifenóis, demonstrando que havia 113,37 mg/g no produto utilizado.

Para identificar os polifenóis presentes em maiores quantidade no chá mate foi realizada espectroscopia de massa. Realizou-se uma varredura completa do espectro (Figura 4A), seguida de experimentos de múltiplos estágios. Foram identificados o ácido cis 3-o-cafeoil quínico (3-CQA), também denominado de ácido clorogênico, que é considerado o principal antioxidante do chá mate (CARDOZO JUNIOR *et al.*, 2007; CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990); ácido 5-o-p-cumaroil quínico (5-p-CoQA), ácido 3-o-feruloilquínico (CeQA), ácido 4-o-cafeoil-5-o-p-cumaroil quínico (4C,5 pCoQA) e ácido 4,5-di-o-cafeoilquínico (cis, 4,5-diCQA) (Figura 4B).

A capacidade antioxidante total, determinada pelo método de FRAP, foi estimada em 534,67 mmol/L. Os resultados das análises demonstraram a presença dos principais antioxidantes identificados no CM e ainda que a capacidade antioxidante foi preservada no processo de industrialização, confirmando a possibilidade do uso do chá mate solúvel como fonte de antioxidantes.

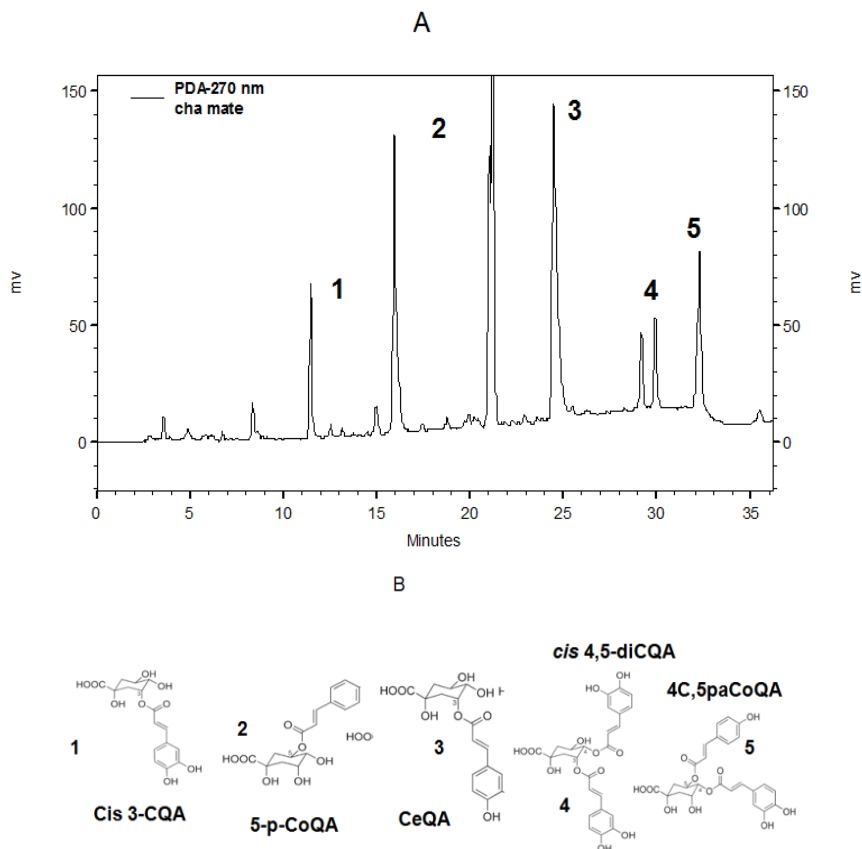


Figura 4 - Espectroscopia de massa do chá mate (A). Derivados cafeoilquínicos identificados no chá mate: ácido cis 3-o-cafeoil quínico (3-CQA), ácido 5-o-p-cumaroil quínico (5-p-CoQA), ácido 3-o-feruloilquínico (CeQA), ácido 4-o-cafeoil-5-o-p-cumaroil quínico (4C,5 pCoQA) e ácido 4,5-di-o-cafeoilquínico (cis, 4,5-diCQA) (B).

O acompanhamento da massa corpórea (m.c.) dos animais, expressa em gramas, não apontou diferenças entre os valores iniciais e finais nos grupos JCM (inicial: $283,9 \pm 6,7$; final: $275,6 \pm 5,1$), J (inicial: $288,0 \pm 7,1$; final: $296,2 \pm 2,8$), SCM (inicial: $352,9 \pm 5,2$; final: $344,4 \pm 7,6$) e S (inicial: $352,1 \pm 6,5$; final: $341,5 \pm 7,3$), como pode ser observado na Figura 5. Também não foram constatadas diferenças quando comparados entre si os grupos de animais jovens (J x JCM) e os de animais senis (S x SCM), tanto no início como ao final do tratamento. Os valores de m.c. dos grupos S e SCM mostraram-se maiores que os dos grupos J e JCM, no início e ao final do experimento (Figura 5 A e B, respectivamente). Essa variação no parâmetro pode ser atribuída à diferença de idade entre os animais. Em relação aos consumos diários de água e ração não foram observadas diferenças significativas ao longo do experimento (dados não apresentados).

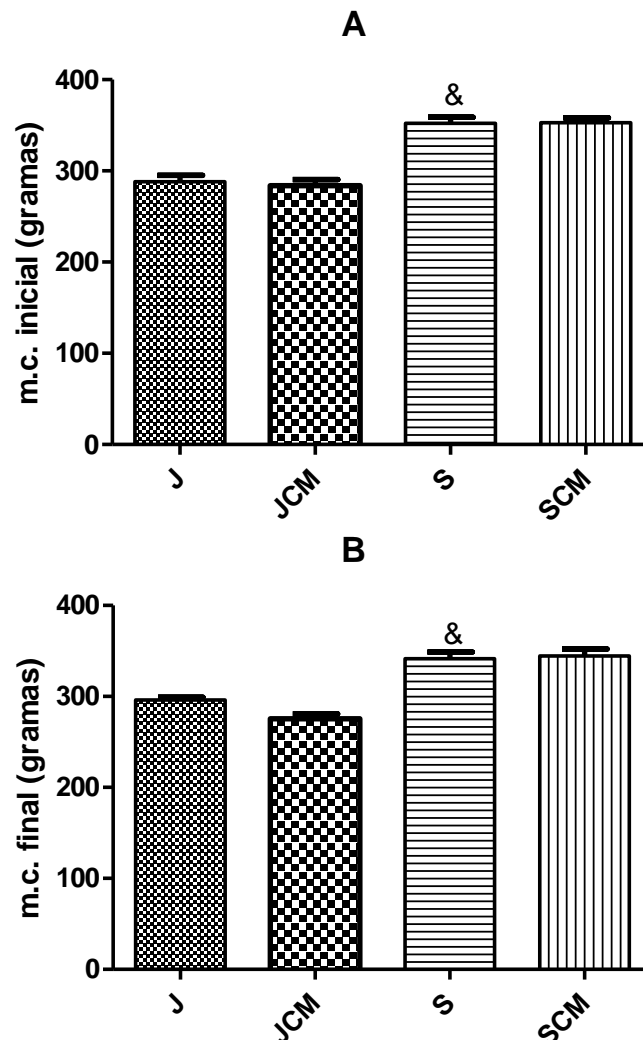


Figura 5 - Massa corpórea inicial (A) e final (B) dos animais jovens e senis. Dados expressos em gramas (Média \pm erro padrão), n= 10 por grupo. Teste de Tukey, $^{\&}$ p<0,05 quando comparado com J.

As avaliações de ciclo estral, realizada 15 dias antes de iniciar o tratamento com chá mate, 15 dias durante o tratamento e 15 dias antes da morte dos animais, indicaram que a maioria das ratas senis permaneceu por mais tempo na fase diestro, enquanto que as jovens apresentaram ritmicidade no ciclo. O tratamento não promoveu alterações nesse padrão, independentemente da idade dos animais.

As concentrações plasmáticas de estrógeno sofrem variações em função do ciclo estral. A última análise do esfregaço vaginal foi realizada na véspera do experimento, para não provocar estresse nos animais, demonstrando que 66,6% das ratas senis estavam em diestro e 33,3% em metaestro, e 46,1% das jovens apresentavam-se em estro e 38,4% em pró-estro. Tomou-se como referencial no momento das comparações o grupo das ratas jovens, intactas, com ciclo estral regular. Como esperado, o estrógeno mostrou-se menor nas ratas senis em relação às jovens. Não foram observadas outras diferenças significativas, mesmo após o tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração plasmática de estrógeno, atividades de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), e ácido úrico no plasma dos animais jovens e senis.

| Parâmetros | Grupos | | | |
|--------------------------|------------|------------|-----------------------------|-------------|
| | J | JCM | S | SCM |
| Estrógeno (pg/mL) | 540,7±83,2 | 254,3±93,8 | 176,6±21,1 ^{&} | 341,5±125,3 |
| AST (U/L) | 308,6±73,2 | 303,6±32,2 | 438,0±80,2 | 387,0±56,8 |
| ALT (U/L) | 565,2±91,2 | 536,6±38,5 | 497,8±27,3 | 461,0±64,1 |
| AU (mg/dL) | 2,69±0,21 | 2,55±0,10 | 4,3±0,21 ^{&} | 3,53±0,28 |

Valores expressos como Média±erro padrão, n=10 por grupo. Nos dados de concentração de estrógeno foi aplicado o teste de Dunnett e nos dados de AST, ALT e AU o teste de Tukey, [&]p<0,05 quando comparado com J.

As atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram avaliadas nos plasmas dos animais jovens e senis, não sendo constata diferença significativa. O tratamento com mate tostado por 8 semanas não alterou AST e ALT nas fêmeas de 6 ou de 19 meses (Tabela 1).

Ao determinar a quantidade de ácido úrico plasmático verificou-se aumento nos animais senis, quando comparados aos jovens. A administração de CM não alterou esse parâmetro nos grupos JCM e SCM (Tabela 1).

A capacidade antioxidante plasmática (mmol/L), determinada pelo método FRAP, não foi influenciada pelo envelhecimento, uma vez que não observamos diferença estatística entre os grupos S ($2,6\pm 0,09$) e J ($2,3\pm 0,09$). O tratamento com chá mate aumentou 54,02% a capacidade antioxidante plasmática nos animais senis (SCM: $4,02\pm 0,1$) e 21,73% nos jovens (JCM: $2,8\pm 0,08$) (Figura 6).

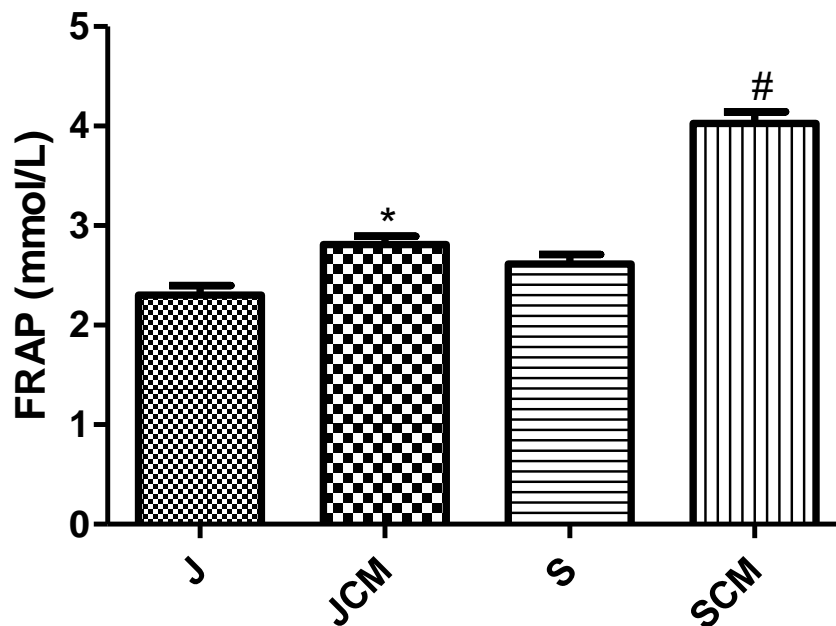


Figura 6 - Efeito do chá mate na capacidade antioxidante plasmática dos animais jovens e senis. Dados expressos em mmol/L (Média±erro padrão), n=10 por grupo. Teste de Tukey, *p<0,05 quando comparado com J; #p<0,05 quando comparado com S.

O dano oxidativo nos lipídeos foi estimado através do método que determina a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), expressa em nmol/mg proteína. Nos eritrócitos esse parâmetro foi 34% maior nos animais senis (S: $68,2 \pm 4,6$) quando comparado aos jovens (J: $50,9 \pm 4,2$). A administração de chá mate diminuiu significativamente o dano lipídico nos eritrócitos dos animais senis (78,5%) e também nos jovens (71,5%) (Figura 7A). No fígado verificamos que não houve diferença de TBARS entre os grupos S ($175,2 \pm 7,5$) e J ($191,2 \pm 11,1$) e ainda que a administração de CM por 8 semanas diminuiu esse parâmetro em 17,4% nos animais senis (SCM: $144,7 \pm 2,49$) e 31,5% nos jovens (JCM: $130,9 \pm 5,89$) (Figura 7B).

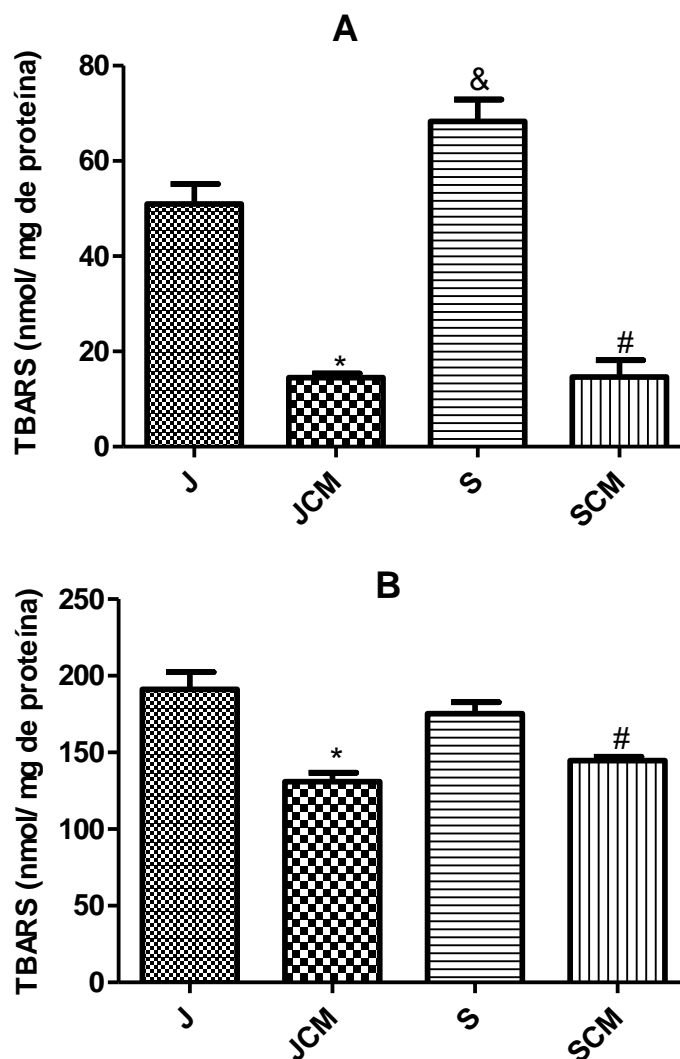


Figura 7 - Efeito do chá mate nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos eritrócitos (A) e fígado (B) de animais jovens e senis. Dados expressos em nmol/mg proteína (Média±erro padrão), n=10 por grupo. Teste de Tukey, &p<0,05 quando comparado com J; *p<0,05 quando comparado com J; #p<0,05 quando comparado com S.

As atividades das enzimas antioxidantes foram avaliadas nos eritrócitos e no homogenato de fígado das fêmeas jovens e senis, tratadas ou não com chá mate. A atividade da SOD nos eritrócitos (U/min/mg proteína) mostrou-se 3,5 vezes menor no grupo S ($0,1\pm 0,01$) quando comparado ao J ($0,4\pm 0,06$). O tratamento com chá mate aumentou (7 vezes) a atividade dessa enzima de forma ligeiramente acentuada nas fêmeas de 19 meses (SCM: $0,8\pm 0,1$) em relação às de 6 meses ($2,3\pm 0,1$) em que esse aumento foi de 5,6 vezes, como pode ser constatado na Figura 8A.

No homogenato de fígado a influencia do envelhecimento na SOD foi contrária à observada no hemolisado, tendo sido constatado aumento (1,3 vezes) quando comparados os dados de S ($2,09\pm 0,08$) e J ($1,59\pm 0,15$). O CM elevou SOD em SCM ($2,653\pm 0,12$) e JCM ($2,35\pm 0,10$), porém de forma menos acentuada do que observado no hemolisado (Figura 8B).

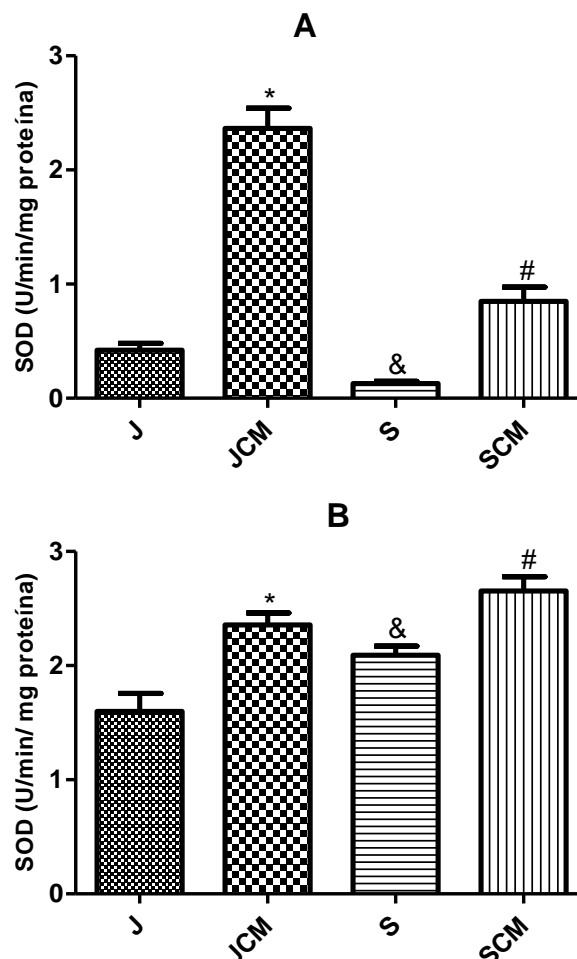


Figura 8 - Efeito do chá mate na atividade de SOD nos eritrócitos (A) e fígado (B) de animais jovens e senis. Dados expressos em U/min/mg proteína (Média±erro padrão), n=10 por grupo. Teste de Tukey, &p<0,05 quando comparado com J; *p<0,05 quando comparado com J; #p<0,05 quando comparado com S.

A atividade de GPx nos eritrócitos, expressa em mmol de GSH consumido/min/mg proteína, mostrou-se diminuída 3,4 vezes nas ratas senis (S: $64,1 \pm 11,8$) em comparação às jovens (J: $215,5 \pm 10,05$). A administração de chá mate aumentou, de forma acentuada, a atividade da GPx no grupo SCM ($888,3 \pm 131,8$) em relação ao grupo S, porém quando comparados JCM ($64,02 \pm 8,9$) com J observou-se diminuição de 3,3 vezes (Figura 9A).

Ao determinar a atividade de GPx no tecido hepático verificou-se que nas ratas senis (S: $26,2 \pm 3,9$) houve diminuição de 4,3 vezes em relação às jovens (J: $112,7 \pm 9,03$). Quando avaliados os grupos que ingeriram o chá, o aumento de GPx foi de 2,1 vezes no grupo SCM ($56,6 \pm 6,4$) e 1,4 vezes no grupo JCM ($165,6 \pm 11,09$), indicando que a capacidade de responder ao tratamento é influenciada pela idade (Figura 9B).

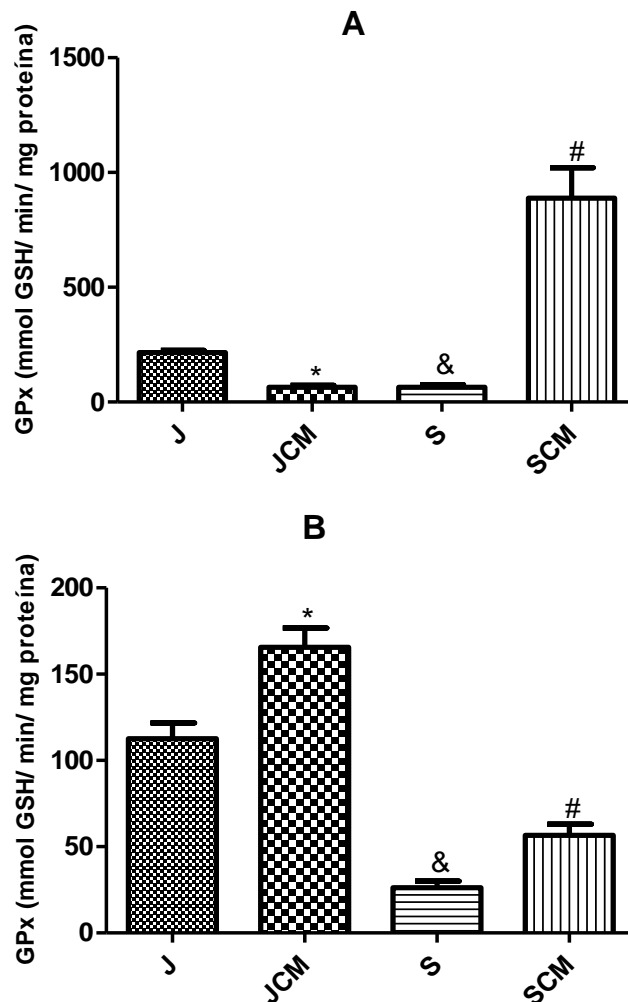


Figura 9 - Efeito do chá mate na atividade de GPx nos eritrócitos (A) e fígado (B) de animais jovens e senis. Dados expressos em mmol de GSH consumida/min/mg proteína (Média±erro padrão, n=10 por grupo. Teste de Tukey, [&]p<0,05 quando comparado com J; *p<0,05 quando comparado com J; #p<0,05 quando comparado com S.

O envelhecimento influenciou de forma inversa a atividade de CAT, expressa em nmol de H_2O_2 consumido/min/mg proteína, quando estudados eritrócitos e tecido hepático (Figura 10 A e B, respectivamente). Nos eritrócitos, a atividade da CAT mostrou-se diminuída em 4,3 vezes nas ratas senis (S: $0,4\pm 0,1$) quando comparadas às jovens (J: $2,4\pm 0,3$), enquanto que aumento (2,3 vezes) foi observado no fígado (S: $0,07\pm 0,008$; J: $0,03\pm 0,004$). A resposta ao tratamento com chá mate divergiu em função da idade e do tecido. No hemolisado CAT foi maior em 1,7 vezes em JCM ($4,4\pm 0,7$) do que em J ($2,4\pm 0,3$), porém nas fêmeas de 19 meses não foi observada diferença significativa (SCM: $0,4\pm 0,1$; S: $0,4\pm 0,1$) (Figura 10A). No fígado as atividades de CAT nos grupos SCM ($0,1\pm 0,005$) e JCM ($0,06\pm 0,006$) foram aumentadas em 1,4 e 1,7 vezes quando relacionadas aos grupos S e J, respectivamente (Figura 10B).

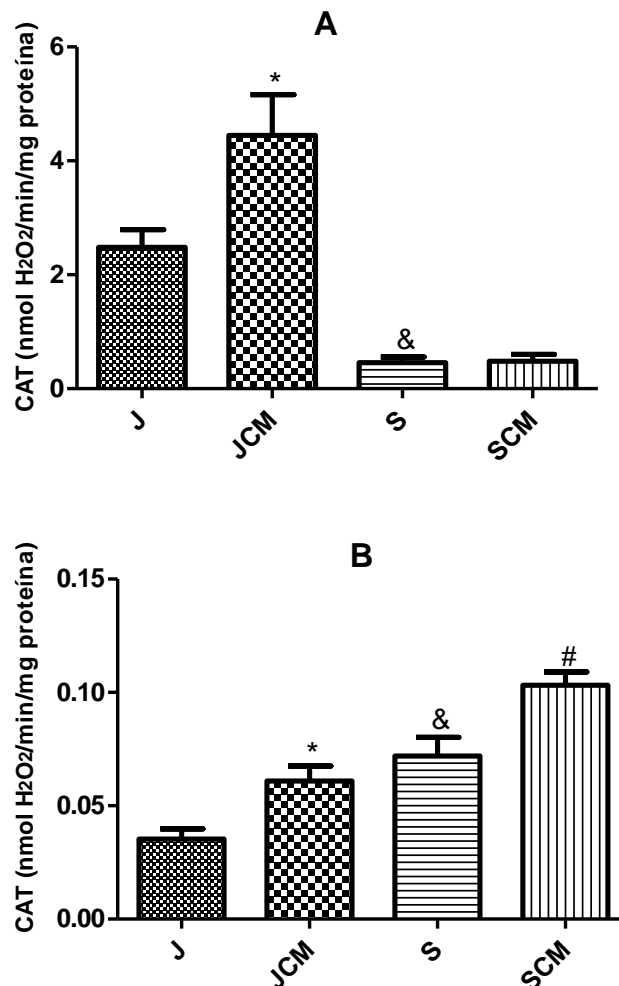


Figura 10 - Efeito do chá mate na atividade de CAT nos eritrócitos (A) e no fígado (B) de animais jovens e senis. Dados expressos em nmol de H_2O_2 consumido/min/mg proteína (Média±erro padrão), n=10 por grupo. Teste de Tukey, &p<0,05 quando comparado com J; *p<0,05 quando comparado com J; #p<0,05 quando comparado com S.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, para o tratamento dos animais foi utilizado chá mate na forma solúvel, de marca conhecida no mercado brasileiro, obtido em supermercado local. Um único lote foi empregado em todo o tratamento para excluir qualquer variação nas características do produto. Estudos revelam que o chá obtido da infusão das folhas de *Ilex paraguariensis* é considerado uma das bebidas mais ricas em antioxidantes consumidas em vários países da América do Sul, apresentando ação antioxidante 70% superior à do chá verde (BIXBY *et al.*, 2005). Essa ação antioxidante é atribuída aos polifenóis (FILIP *et al.*, 2000).

A análise do chá mate utilizado neste trabalho demonstrou a presença de 113,37 mg de polifenóis em cada grama de pó. Dados da literatura demonstram que cerca de 3% do peso seco da folha seca ou de 1 a 10% (m/v) do extrato aquoso do *I. paraguariensis* são constituídos por polifenóis (BASTOS *et al.*, 2005; CARINI *et al.*, 1998; FILIP *et al.*, 2001; HECK; MEJLA, 2007). O valor obtido neste trabalho foi 23% superior ao descrito para folhas secas, diferença que poderia ser atribuída à forma de processamento, uma vez que a forma de CM utilizada é preparada a partir de um extrato do chá, conforme informações obtidas no site do fabricante. Além desse fator, variações relacionadas à forma de cultivo da erva, como tipo de solo, temperatura e umidade também podem estar associadas (BRACESCO *et al.*, 2011).

A capacidade do chá mate em neutralizar EROs é atribuída aos polifenóis derivados do ácido cafeico (OLTHOF *et al.*, 2001). No preparo administrado aos animais foram identificados derivados já descritos na literatura, dentre eles o ácido cis 3-o-cafeoil quínico (3-CQA) ou ácido clorogênico. Esse polifenol neutraliza EROs, além de modular a expressão de enzimas antioxidantes (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; JAISWAL *et al.*, 2010; OLTHOF *et al.*, 2001).

Segundo Harman (1956, 2006), o estresse oxidativo aumenta com o envelhecimento, processo que em mulheres vem acompanhado de alterações hormonais e no ciclo ovulatório, que caracterizam a pré-menopausa, fase que antecede a menopausa. Após a menopausa detecta-se maior estresse oxidativo (CHAKRABORTY; GORE, 2004). Em fêmeas de outros mamíferos o envelhecimento vem acompanhado de um período de grandes oscilações das concentrações

hormonais e alterações do ciclo estral, período denominado de pré-estropausa (BAIRD *et al.*, 1975).

Em fêmeas de roedores o ciclo estral tem duração média de quatro a cinco dias e se divide em: pró-estro, estro, metaestro e diestro. A análise do esfregaço vaginal permite avaliar de forma indireta, porém precisa, a atividade ovariana que muda abruptamente devido às flutuações do estrógeno (VICTORINO *et al.*, 2013). Nossos resultados indicaram que as ratas senis permaneciam por mais tempo em diestro e as jovens em estro ou pró-estro. As menores concentrações estrogênicas nas ratas senis, amplamente descritos na literatura (MOORTHY *et al.*, 2005), foram confirmados neste trabalho através da dosagem hormonal. A ausência de diferenças no estrógeno plasmático e no padrão de ciclo estral entre os grupos tratados e seus controles indica que a exposição prolongada ao chá mate não interferiu nesses parâmetros.

A capacidade antioxidante plasmática é um marcador primário do estresse oxidativo no envelhecimento e de doenças associadas à senilidade, como diabetes e doenças cardiovasculares (PANDEY; RIZVI, 2010). Existem diversos métodos para avaliar esse parâmetro, porém FRAP é utilizado rotineiramente por ser rápido e altamente reprodutivo (ALVES *et al.*, 2010). Diminuição na capacidade de neutralizar EROs tem sido associada ao envelhecimento (VICTORINO *et al.*, 2013), porém em mulheres naturalmente menopausadas foi descrito aumento desse parâmetro, justificado por maior produção de antioxidantes de baixo peso molecular não enzimático, em compensação à redução estrogênica (VICTORINO *et al.*, 2013). Neste trabalho a ausência da diminuição da capacidade antioxidante plasmática nas fêmeas senis poderia ser um indicativo de um início desse processo adaptativo. Sabe-se que o ácido úrico representa 60% da capacidade antioxidante plasmática, quando determinada pelo método FRAP (BOAVENTURA *et al.*, 2012). A maior concentração de ácido úrico nas ratas senis explicaria a ausência de redução na capacidade antioxidante plasmática nestes animais.

O tratamento dos animais jovens elevou a capacidade antioxidante plasmática corroborando achados em humanos (BOAVENTURA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2008). Efeito mais acentuado foi constatado nas fêmeas senis e poderia ser atribuído à diminuição da capacidade hepática em conjugar polifenóis, para produzir

compostos mais hidrossolúveis, que possam ser excretados na urina (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007). Essa alteração hepática poderia ser resultante de um estado pró-oxidativo no envelhecimento (JAYAKUMAR *et al.*, 2007; SENTHIL KUMARAN *et al.*, 2008). Essa possibilidade não foi confirmada, uma vez que não foi constatada maior oxidação lipídica no fígado do grupo senil em relação ao jovem. A ausência de danos hepáticos foi confirmada através da avaliação de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase. Nenhuma alteração em ALT ou AST foi observada após o tratamento dos animais jovens ou senis, um indicativo de inexistência de lesões hepáticas induzidas pela ingestão do chá mate pelo período de 8 semanas.

A ação das EROs sobre lipídeos de membrana resulta em degradação oxidativa, que gera produtos citotóxicos, dentre os quais MDA. Maior quantidade de MDA em eritrócitos humanos está relacionada com a diminuição da capacidade antioxidante no plasma durante o envelhecimento (PANDEY; RIZVI, 2010). Porém nossos resultados indicaram que nas fêmeas senis o aumento de MDA não poderia ser associado a esse fator. O método FRAP estima a totalidade de antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular, como glutathione reduzida (GSH), ácido úrico, vitamina C, bilirrubina dentre outros (GANDRA *et al.*, 2004). Além dessas moléculas, nas fêmeas o estrógeno contribui para a neutralização das espécies reativas de oxigênio (ZHU *et al.*, 2013), o que poderia explicar o maior dano oxidativo observado nos eritrócitos de animais senis, com menores concentrações de estrógeno.

A capacidade do chá mate em diminuir danos oxidativos teciduais não está associada apenas à capacidade de neutralizar EROs, mas também à melhora na defesa antioxidante enzimática (BOAVENTURA *et al.*, 2012), promovida pelo aumento da expressão gênica das enzimas SOD, CAT e GPx (MATSUMOTO *et al.*, 2009) e da enzima antioxidante paraxonase-2 (FERNANDES *et al.*, 2012).

Corroborando a literatura (AYDIN *et al.*, 2010; INAL *et al.*, 2001; JAYAKUMAR *et al.*, 2007; KUMARAN *et al.*, 2009; POSADAS *et al.*, 2009; RAMESH *et al.*, 2012; SENTHIL KUMARAN *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2008;) nossos resultados indicam que o envelhecimento diminui a atividade de SOD, CAT e GPX nos eritrócitos.

A SOD compreende uma família de enzimas que catalisa a transformação do radical superóxido, espécie química que danifica membranas e outras estruturas biológicas, para H₂O₂, que pode ser posteriormente degradado pela CAT ou GPx

(PEREZ-CAMPO *et al.*, 1998; VALKO *et al.*, 2007). A diminuição de SOD observada nas hemácias das fêmeas senis pode ser associada ao acúmulo de produtos de dano oxidativo (JAYAKUMAR *et al.*, 2007), atribuído em parte à diminuição do estrógeno (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012). A exposição contínua ao ânion superóxido também pode diminuir atividade de SOD, uma vez que a enzima de origem endógena é inibida irreversivelmente por elevadas quantidades de seu produto de reação (ANDERSEN *et al.*, 1997). No fígado, onde não foi constatado maior dano oxidativo em resposta ao envelhecimento, foi observada maior atividade de SOD na senilidade.

As enzimas GPx e CAT desempenham papel importante na degradação de H_2O_2 produzido pela SOD. GPx neutraliza o H_2O_2 removendo dois átomos de H de duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH), resultando em duas moléculas de H_2O e uma de glutathiona oxidada (GSSG) (PANDEY; RIZVI, 2010). A CAT promove a decomposição direta do H_2O_2 a O_2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A influência do envelhecimento na atividade da CAT ainda não está bem elucidada. Há relatos de aumento da atividade enzimática em resposta à senilidade, em eritrócitos de ratos e humanos (GIANNI *et al.*, 2004; INAL *et al.*, 2001; RIZVI; MAURYA, 2007). Porém em roedores também tem sido demonstrado que, com o avançar da idade, a atividade enzimática diminui (TOKUNAGA *et al.*, 1998), como constatado neste trabalho. A ação da CAT parece ser mais efetiva em concentrações mais elevadas de H_2O_2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Com a diminuição da atividade de SOD a formação de H_2O_2 foi reduzida, o que poderia explicar a menor atividade de CAT observada nos animais senis. Os danos oxidativos nos lipídios poderiam ocorrer em função de um aumento na produção de radical hidroxila, a partir da reação de $O_2^{\cdot-}$ com ferro (WALLING, 1975).

No tecido hepático, uma possível maior formação de H_2O_2 em função do aumento da atividade de SOD poderia explicar a elevação da CAT nas fêmeas senis (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), bem como a ausência de maior dano oxidativo. Os dados da literatura remetem a diminuição na atividade dessa enzima com o envelhecimento no tecido hepático de ratos machos, porém associada à menor atividade de SOD (JAYAKUMAR *et al.*, 2007; POSADAS *et al.*, 2009; RAMESH *et al.*, 2012).

O envelhecimento está associado à menor atividade de GPx no tecido hepático, como comprovado por Ramesh *et al.* (2012) que trabalharam com machos senis de 24 meses. Nas fêmeas senis a menor atividade enzimática constatada em fígado e eritrócitos pode ser atribuída à diminuição na concentração do estrógeno (MASSAFRA *et al.*, 2000; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

O uso de antioxidantes tem se mostrado efetivo em reduzir as alterações associadas ao estresse oxidativo no envelhecimento. Segundo Halliwell (1994, 2012) determinar a quantidade ideal a ser ingerida é o maior desafio da atualidade. A ação de *Ilex paraguariensis* na diminuição do estresse não está associada apenas a ação antioxidante dos bioativos presentes nessa erva, mas também ao aumento da defesa antioxidante enzimática.

Doses diárias de 0,5 g/kg por período de 15 dias aumentaram a atividade de SOD, CAT e GPx nos eritrócitos e hipotálamo de ratos (SCOLARO *et al.*, 2012). A administração de 5 g/dia de chá mate a mulheres saudáveis por uma semana aumentou a expressão das enzimas antioxidantes nos leucócitos do sangue periférico (MATSUMOTO *et al.*, 2009). Dose de 1,0 g/kg administrada a camundongos por 60 dias elevou a expressão gênica de SOD, CAT e GPx, de forma mais efetiva que doses de 2,0 g/kg (ARÇARI *et al.*, 2009). Infusões preparadas nas concentrações de 10 a 40 mg/mL e oferecidas à vontade para hamsters por 8 semanas aumentou a expressão de SOD e GPx. Maior expressão dessas enzimas foi observada nos animais que tiveram acesso a infusão com menor concentração de mate tostado (GAO *et al.*, 2013).

Em nossos experimentos a dose utilizada para o tratamento dos animais (20 mg/kg de m.c) foi inferior àquelas utilizadas em outros trabalhos, mas mostrou-se efetiva em aumentar as atividades de SOD e CAT, nos eritrócitos e no fígado, e aumentar GPx, no fígado, dos animais jovens e senis, apesar da diminuição na concentração plasmática de estrógeno. Porém uma resposta diferente ao tratamento foi observada na atividade de GPx nos eritrócitos. Enquanto nos animais senis a administração de *Ilex paraguariensis* permitiu uma melhora da atividade GPx, nos animais jovens foi constatada diminuição. Essa menor atividade de GPx após a exposição ao chá mate parece ter sido compensada pela grande elevação na CAT,

o que impediu a existência de maior dano oxidativo nos lipídeos, porém os mecanismos envolvidos nesse processo precisam ser elucidados.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O tratamento com chá mate por 8 semanas não promoveu dano hepático e não alterou o padrão de ciclo estral, nas idades estudadas.

A ingestão de CM, dose de 20 mg/kg de m.c., reduz o dano oxidativo em eritrócitos e fígado, através do aumento da capacidade antioxidante plasmática e da atividade das principais enzimas antioxidantes.

A resposta ao tratamento com CM foi diferente nos tecidos estudados, eritrócitos e fígado, independente das idades dos animais.

Os efeitos do chá mate sobre a defesa antioxidante enzimática e dano lipídico são influenciados pela idade.

Investigações acerca do menor tempo necessário para alcançar os resultados benéficos, bem como a ação em outros tecidos já estão sendo conduzidas, na busca de uma melhor compreensão da ação protetora do CM contra o aumento do estresse oxidativo associado ao envelhecimento em fêmeas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR R. M. Methods for determination of antioxidant activity in vitro organic substrates. **New Chem.**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, Oct. 2010.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, Sep. 1993.
- ANDERSEN, H.R.; NIELSEN, Y.B.; NIELSEN, F.; GRANDJEAN, P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. **Clin. Chem.**, v. 43, n. 4, p. 562-568, Apr. 1997.
- ARÇARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A.; FUNCK, A.; PEDRAZZOLI, J.; SOUZA, M. F.; SAAD, M. J.; BASTOS, D. H.; GAMBERO, A.; CARVALHO, O. P.; RIBEIRO, M. L. Antiobesity effects of Yerba Mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, v. 17, n. 12, p. 2127-2133, Dec. 2009.
- AYDIN, A. F.; KUCUKGERGIN, C.; OZDEMIRLER-ERATA, G.; KOCAK-TOKER, N.; UYSAL M. The effect of carnosine treatment on prooxidant-antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats. **Biogerontology**, v. 11, n. 1, p. 103-109, Feb. 2010.
- BAIRD, D.T.; BAKER, T.G.; MCNATTY, K. P.; NEAL P. Relationship between the secretion of the corpus luteum and the length of the follicular phase of the ovarian cycle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 45, n. 3, p. 611-619, Dec. 1975.
- BASTOS, D. H. M.; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y. S.; SOARES, R. A. M.; TORRES, E. A. F. S. The chlorogenic acid and caffeine content of yerba mate beverages. **Acta. Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 91-95, Dec. 2005.

BASTOS, D. H.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A.; CUNHA, I. B., CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 423-432, Mar. 2007.

BHATTACHARJEE, S. The language of reactive oxygen species signaling in plants. **J. Bot.**, v. 2012, 2012.

BENZIE, I. F.; STRAIN J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. **Anal. Biochem.**, v. 239, p. 70-76, Jul. 1996.

BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sci.**, v. 77, n. 3, p. 345-358, Jun. 2005.

BOAVENTURA, B. C.; DI PIETRO, P. F.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G. A.; MORAIS, E. C.; ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; SILVA, E. L. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 657-664, Jun. 2012.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.**, v. 134, n. 3, p. 707-716, Jul. 1973.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERA, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **J. Ethnopharmacol.**, v. 136, n. 3, p. 378-384, Jul. 2011.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, v. 56, n. 11, p. 317-333, Nov. 1998.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; AUMANN, K. D.; BLOCKER, H.; GROSS, G.; KIESS, M.; KLOPPEL, K. D.; MAIORINO, M.; ROVERI, A.; SCHUCKELT, R.; USANI, F. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 10, p. 7342–7348, Mar. 1994.

BUEGE, J. A.; AUST S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 52, p. 302-310, 1978.

CAMPOS, A. M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E. A. The total reactive antioxidant (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguariensis* extracts and red wine. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 7, n. 1, p. 43-49, 1996.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; FERRARESE FILHO, O.; CARDOZO FILHO, L.; FERRARESE, M. L. L.; DONADUZZI, C. M.; STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds contents in mate (*Ilex paraguariensis*) progenies grown in Brazil. **J. Food Comp. Anal.**, v. 20, n. 7, p. 1-10, Nov. 2007.

CARINI, M.; FACINO, R. M.; ALDINI, G.; CALLONI, M.; COLOMBO L. Characterization of phenolic antioxidants from mate (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid. Commun. Mass Spectrom.**, v. 12, n. 22, p. 1813-1819, 1998.

CHAKRABORTY, T. R.; GORE, A.C. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. **Exp. Biol. Med.**, v. 229, n. 10, p. 977-987, Nov. 2004.

CHANDRA, S.; DE MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 11, p. 3583-3589, Jun. 2004.

CHEN, S. X.; SCHOPFER, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase. **Eur. J. Biochem.**, v. 260, n. 3, p. 726-735, Mar. 1999.

CLIFFORD, M.N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J.R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents on mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chem.**, v. 35, n. 1, p. 13-21, 1990.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 854, p. 435-442, Nov. 1998.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULIO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann. Ist. Super. Sanità**, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acad.**, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jun. 2004.

DREOSTI, I. E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutrition**, v. 16, n. 7-8, p. 692-694, Jul. /Aug. 2000.

FERNANDES, E. S.; MACHADO, M. O.; BECKER, A. M.; ANDRADE, F.; MARASCHIN, M.; SILVA, E. L. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: In vitro and in vivo studies. **Nutrition**, v. 28, n. 11-12, p. 1157-1164, Nov. /Dec. 2012.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. **Rev. Assoc. Med.Bras.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, Mar. 1997.

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

FILIP R.; LÓPEZ P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex species*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774-778, Nov. 2001.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 114-121, 1984.

GANDRA, P. G.; ALVES, A. A.; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T. Electrochemical determination of antioxidant capacity for physical exercise evaluation. **New Chem.**, v. 27, n. 6, p. 980-985, Nov. /Dec. 2004.

GAO, H.; LIU, Z.; QU, X.; ZHAO, Y. Effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on vascular endothelial function and liver lipoprotein receptor gene expression in hyperlipidemic rats. **Fitoterapia**, v. 84, p. 264–272, Jan. 2013.

GIANNI, P.; JAN, K. J.; DOUGLAS, M. J.; STUART, P. M.; TARNOPOLSKY, M. A. Oxidative stress and mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. **Exp. Gerontol.**, v. 39, n. 9, p. 1391-1400, Sep. 2004.

GOTO, S.; TAKAHASHI, R.; KUMIYAMA, A. A.; RADAK, Z.; HAYASHI, T.; TAKENOUCHI, M.; ABE, R. Implications of protein degradation in aging. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 928, p. 54–64, Apr. 2001.

GRIGIONI, G.; CARDUZA, F.; IRURUETA, M.; PENSEL, N. Flavour characteristics of *Ilex paraguariensis* infusion, a typical Argentine product, assessed by sensory evaluation and electronic nose. **J. Sci. Food Agric.**, v. 84, n. 5, p. 427-432, Apr. 2004.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A.J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 35, n. 1, p. 47-56, Jan. 1995.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 224, n. 2, p. 338-344, Jul. 1996.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureoides*. **Life Sci.**, v. 71, n. 6, p. 693-705, Jun. 2002.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D.H.; SCHULZE, J.; SOUZA, M.F. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v. 80, n. 6, p. 339-344, Sep. 2009.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721-724, Sep. 1994.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr. Rev.**, v. 70, n. 5, p. 257-265, May 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford Univ. Press. Inc., 2000. 851p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford Univ. Press. Inc., 2007. p. 187-267.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J. Gerontol.**, v. 11, n. 3, p. 298-300, Jul. 1956.

HARMAN, D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1067, p. 10-21, May 2006.

HECK, C. I.; DE MEJLA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **J. Food Sci.**, v. 72, n. 9, p. 138-151, Nov. 2007.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin. Hematol.**, v. 26, n. 4, p. 277-285, Oct. 1989.

INAL, M. E.; KANBAK, G.; SUNAL E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. **Clin. Chim. Acta.**, v. 305, n. 1-2, p. 75-80, Mar. 2001.

JAISWAL, R.; SOVDAT, T.; VIVAN, F.; KUHNERT, N. Profiling and characterization by LC-MS(n) of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in mate (*Ilex paraguariensis*). **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 9, p. 5471-5484, May 2010.

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. **Exp. Gerontol.**, v. 42, n. 3, p. 183-191, Mar. 2007.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **ROBBINS & COTRAN. Patologia: bases patológicas das doenças.** 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1504 p.

KUMAR, P.; KALE, R. K.; BAQUER, N.Z. Estradiol modulates membrane-linked ATPases, antioxidant enzymes, membrane fluidity, lipid peroxidation, and lipofuscin in aged rat liver. **J. Aging Res.**, v. 2011, n. 9, p. 580245, 2011.

KUMARAN, V.S.; ARULMATHI, K.; KALAISELVI, P. Senescence mediated redox imbalance in cardiac tissue: antioxidant rejuvenating potential of green tea extract. **Nutrition**, v. 25, n. 7-8, p. 847-854, Aug. 2009.

KUMMER, C. I.; MOURA, M. S. G.; ALMEIDA, R. M. **Erva mate**. Disponível em: <<http://www.projetos.unijui.edu.br/matematica/modelagem/erva-mate>>. Acesso em: 27 set. 2013.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951.

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 419-427, Jul. 2005.

MACCARI JUNIOR, A. **Análise do pré-processamento da erva mate para chimarrão**. 2005. 199 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, n. 5, p. 727-747, May 2004.

MARKLUND, S.; MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion in radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur. J. Biochem.**, v. 47, n. 3, p. 469-474, Sep. 1974.

MARTINS, M. M. R. **Influência da atividade física e do ambiente sobre os níveis de glutatona peroxidase e perfil lipídico em grupo da terceira idade**. 2007. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, 2007.

MASSAFRA, C.; GIOIA, D.; FELICE, C. D.; PICCIOLINI, E.; de LEO, V.; BONIFAZI, M.; BERNABEI, A. Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. **J. Endocrinol.**, v. 167, n. 3, p. 447-452, Dec. 2000.

MATSUMOTO, R. L.; BASTOS, D. H.; MENDONÇA, S.; NUNES, V. S.; BARTCHEWSKY, W.; RIBEIRO, M. L.; OLIVEIRA C. P. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and total antioxidant status in healthy young women. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n. 5, p. 1775-1780, Mar. 2009.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intra-cellular iron. **Biochem. J.**, v. 218, n. 1, p. 273-275, Feb. 1984.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Quím. Nova**, v. 28, n.4, p. 637-641, 2005.

MOORTHY, K.; SHARMA, D.; BASI, R S. F.; BAQUER, N. Z. Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferases in naturally menopausal rats. **Exp. Gerontol.**, v. 40, n. 4, p. 295-302, Apr. 2005.

MOSIMANN, A. L.; WILHELM-FILHO, D.; SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Biofactors**, v. 26, n. 1, p. 59-70, 2006.

MUSE, K. E.; OBERLEY, T. D.; SEMPFF, J. M.; OBERLEY, L. W. Immunolocalization of antioxidant enzymes in adult hamster kidney. **Histochem. J.**, v. 26, n. 9, p. 734-753, Sep. 1994.

NIKI, E.; NAKANO, M. Estrogens as antioxidants. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 330-333, 1990.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **J. Nutr.**, v. 131, n. 1, p. 66-71, Jan. 2001.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 3, n. 1, p. 2-12, Jan. /Feb. 2010.

PEREZ-CAMPO, R.; LÓPEZ-TORRES, M.; CADENAS, S.; ROJAS, C.; BARJA G. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. **J. Comp. Physiol. B.**, v. 168, n. 3, p. 149-158, Apr. 1998.

POSADAS, S. J.; CAZ, V.; LARGO, C.; DE LA GANDARA, B.; MATALLANAS, B.; REGLERO, G.; MIGUEL, E. Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats. **Exp. Gerontol.**, v. 44, n. 6-7, p. 383-389, Jul. 2009.

PROLLA, T. A.; MATTSON, M. P. Molecular mechanisms of brain aging and neurodegenerative disorders: lessons from dietary restriction. **Trends Neurosci.**, v. 24, n. 11, p. 21-31, Nov. 2001.

RAMESH, T.; KIM, S. W.; SUNG J. H.; HWANG, S. Y., SOHN, S. H.; YOO, S. K.; KIM, S. K. Effect of fermented Panax ginseng extract (GINST) on oxidative stress and antioxidant activities in major organs of aged rats. **Exp. Gerontol.**, v. 47, n. 1, p. 77-84, Jan. 2012.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; KUMAR, M.N. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **J. Control. Release**, v. 113, n. 3, p. 189-207, Jul. 2006.

RIZVI, S. I.; MAURYA P.K. Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans. **Mol. Biotechnol.**, v. 37, n. 1, p. 58-61, Sep. 2007.

ROJKIND, M.; DOMÍNGUEZ-ROSALES, J. A.; NIETO, N.; GREENWEL, P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 59, n. 11, p. 1872-1891, Nov. 2002.

ROVER JUNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím. Nova**, v. 24, n.1, p. 112-119, Jan. /Feb. 2001.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M. A.; ZACARÍAS-FLORES, M.; ARRONTE-ROSALES, A.; CORREA-MUÑOZ, E.; MENDOZA-NÚÑEZ, V.M. Menopause as risk factor for oxidative stress. **Menopause**, v. 19, n. 3, p. 361-367, Mar. 2012.

SCHINELLA, G. R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P. M.; TOURNIER, H. A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 269, n. 2, p. 357-360, Mar. 2000.

SCOLARO, B.; LIMA D. D.; CRUZ, J. G. P.; DAL MAGRO, D. D. Mate tea prevents oxidative stress in the blood and hippocampus of rats with acute or chronic ethanol administration. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2012, p. 314758, 2012.

SENTHIL KUMARAN, V.; ARULMATHI, K.; SRIVIDHYA, R.; KALAISELVI, P. Repletion of antioxidant status by EGCG and retardation of oxidative damage induced macromolecular anomalies in aged rats. **Exp. Gerontol.**, v. 43, n. 3, p. 176-183, Mar. 2008.

SERRA, V.; VON ZGINICKI, T.; LORENZ, M.; SARETZKI, G. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 9, p. 6824-6830, Feb. 2003.

SHAN, X. Q.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol. Ther.**, v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990.

SILVA, E. L.; NEIVA, T. J. C.; SHIRAI, M.; TERAQ, J.; ABDALLA, D. S. P. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Res. Int.**, v.41, n.10, p.973-979, Dec. 2008.

SMALL, E.; CATLING, P. M. Blossoming treasures of biodiversity: 3. Mate (*Ilex paraguariensis*) - better than Viagra, marijuana, and coffee? **Biodiversity**, v. 2, n. 4, p. 26-27, 2001.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

STEIN, F. L. P.; SCHMIDT, B.; FURLONG, E. B.; SOUZA-SOARES, L. A.; SOARES, M. C.; VAZ, M.R.; MUCCILLO, A. L. B. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high cholesterol diets. **Biol. Res. Nurs.**, v. 7, n. 2, p. 146-156, Oct. 2005.

TAGA, M. S.; MILLER, E. E.; PRATT, D. E. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 61, n. 5, p. 928-931, May 1984.

TOKUNAGA, K.; KANNO, K.; OCHI, M.; NISHIMIYA, T.; SHISHINO, K.; MURASE, M.; MAKINO, H.; TOKUI, S. Lipid peroxide and antioxidants in the elderly. **Rinsho Byori.**, v. 46, n. 8, p. 783-789, Aug. 1998.

UTSUNOMIYA, H.; KOMATSU, N.; YOSHIMURA, S.; TSUTSUMI, Y.; WATANABE, K. Exact ultra-structural localization of glutathione peroxidase in normal rat hepatocytes: Advantages of microwave fixation. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 39, n. 9, p. 1167-1174, Sep. 1991.

UTTARA, B.; SINGH, A. V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr. Neuropharmacol.**, v. 7, n. 1, p. 65-74, Mar. 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 39, n. 1, p. 44-84, Aug. 2007.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFOTO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, v. 30, n.5, p. 1323-1338, Out. 2007.

VICTORINO, V. J.; PANIS, C.; CAMPOS, F. C.; CAYRES, R. C.; COLADO-SIMÃO, A. N.; OLIVEIRA, S. R.; HERRERA, A. C.; CECCHINI, A. L.; CECCHINI R. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women. **Age**, v. 35, n. 4, p. 1411-1421, Aug. 2013.

VILLANUEVA, C.; KROSS, R. D. Antioxidant-induced stress. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, n. 2, p. 2091-2109, Feb. 2012.

VINSON, J. A.; DABBAGH, M. A. Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. **Nutr. Res.**, v. 18, n. 6, p. 1067-1075, Jun. 1998.

WALLING, C. Fenton's reagent revisited. **Acc. Chem. Res.**, v. 8, n. 4, p. 125-131, Apr. 1975.

WEI, Y. H.; LEE, H.C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. **Exp. Biol. Med.**, v. 227, n. 9, p. 671-682, Oct. 2002.

WU, J. L.; WU, Q. P.; YANG, X. F.; WEI, M. K.; ZHANG, J. M.; HUANG, Q.; ZHOU, X. Y. L-malate reverses oxidative stress and antioxidative defenses in liver and heart of aged rats. **Physiol. Res.**, v. 57, n. 2, p. 261-268, Feb. 2008.

ZHU, X.; TANG, Z.; CONG, B.; DU, J.; WANG, C.; WANG, L.; NI, X.; LU, J. Estrogens increase cystathionine- γ -lyase expression and decrease inflammation and oxidative stress in the myocardium of ovariectomized rats. **Menopause**, v. 20, n. 10, p. 1084-1091, Oct. 2013.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A - Aprovação Comitê de Ética Local.

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Efeito do chá mate (*Ilex paraguariensis*) nos marcadores do estresse oxidativo em ratas velhas" sob responsabilidade da Pesquisadora ANA CLÁUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE e colaboração de Adriana Aparecida Ferreira Pereira, Adriane Belló Klein, Susana Francisca Llesuy e Rita Cássia Menegati Dornelles está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 00517-2012.

CERTIFICATE

We certify that the research "Effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on markers of oxidative stress in old rats", process number 00517-2012, under responsibility of ANA CLÁUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE and with collaboration of Adriana Aparecida Ferreira Pereira, Adriane Belló Klein, Susana Francisca Llesuy and Rita Cássia Menegati Dornelles agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.


Prof. Dr. Edison Ervolino
CEUA Vice-Coordenador

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária - Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-1440 Fax (18) 3636-1403 E-mail: fabianocadioli@fzva.unesp.br

Anexo B - Artigo submetido para a revista científica *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Title: Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves the antioxidant defense and reduces oxidative damage in senile female Wistar rats.

Authors' names:

Ariana Aparecida Ferreira Pereira^a, Matheus da Silva Brasilino^b, Vanessa Francisquini Gonçalves^c, Cláudia Quintino Rocha^d, Rita Cássia Menegati Dornelles^e, Adriane Belló-Klein^f, Suzana Francisca Llesuy^g, Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune^{e*}

Institutional mailing addresses:

^aGraduate Studies Program in Physiological Sciences, Brazilian Physiological Society – Univ Estadual Paulista (UNESP), SP, Brazil

^bAraçatuba Dental School, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brazil

^cUniv Paulista (UNIP), Araçatuba, SP, Brazil

^dDepartment of Organic Chemistry, Chemical Institute, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP, Brazil

^eDepartment of Basic Sciences, Araçatuba Dental School, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brazil

^fDepartment of Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^gSchool of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

*Corresponding author:

Ariana Aparecida Ferreira Pereira

Department of Basic Sciences

Araçatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista - UNESP

Rodovia Marechal Rondon, km 527, CEP 16018-805

Araçatuba, SP, Brazil

E-mail: ariana-ferreira@hotmail.com

Abstract

Aging process in females is characterized by a progressive decline in biochemical and physiological functions of various tissues and organs, and involves a series of endocrinological changes. Estrogen production becomes erratic, antioxidant protection is lost and oxidative stress is assumed to increase. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) is widely consumed in southern Latin American countries, and presents antioxidant activity attributed to polyphenols. This study investigated the effect of long term treatment with mate tea in senile female rats. Wistar rats 4 and 17 months of age were divided into 4 groups: Senile (S), Senile treated with Mate Tea (SMT), Young (Y) and Young treated with Mate Tea (YMT). SMT and YMT groups received daily mate tea (20mg/kg BW) for 8 weeks. Plasma FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and the activities of antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase were evaluated in the blood and liver of rats. Mate tea treatments enhanced plasma FRAP, decreased TBARS and improved antioxidant enzyme activities in erythrocytes and liver of senile rats. Long term treatment with mate-tea improved oxidant defense and reduced oxidative damage associated with aging in females.

Keywords: Mate Tea, Oxidative Damage, Defense Antioxidant, Aging, Oxidative Stress.

1. Introduction

Aging is a complex and multifactorial process characterized by a progressive decline in biochemical and physiological functions of various tissues and organs in an individual. The causes of this decline are still unclear but it has been proposed that increased oxidative stress, disturbance in energy metabolism and a primary deregulation of the immune system play an important role [1].

Oxidative stress (EO) is characterized by the imbalance between the production and elimination of reactive oxygen species (ROS) that results in molecular injuries induced by oxidative reactions with protein, carbohydrates and lipids [2]. According to the free radicals theory of aging, oxidative stress increases with age [3, 4] resulting an increase in oxidative damage to biomolecules [5, 6]. In recent years, oxidative stress has been implicated in a wide variety of degenerative processes and diseases related to aging, such as cancer, atherosclerosis, heart attacks, strokes, chronic and acute inflammatory problems, and central nervous system disorders such as Parkinson's disease and Alzheimer's dementia [7].

Under normal conditions, ROS are kept at optimal physiological levels by antioxidant defense systems. This system is composed of the major antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and the biological antioxidants that include reduced glutathione, bilirubin, creatinine, uric acid, vitamin C and vitamin E [8].

The aging process in females involves a series of endocrinological changes. Estrogen production becomes erratic and antioxidant protection is lost, and EO is assumed to increase [9]. Estrogen molecule has a phenolic ring in the A position that scavenges free radicals and prevents oxidative damage [10]. In addition, estrogen increases the gene expression of antioxidant enzymes and decreases pro-oxidant enzyme expression (NADPH Oxidase) [11].

Yerba Mate tea (Mate) is a herbal tea beverage widely consumed in southern Latin American countries (Brazil, Argentina, Paraguay and Uruguay), which is gaining rapid

penetration into world markets, including the United States [12]. The tea is prepared by the infusion of dry leaves of *Ilex paraguariensis*, a plant of the Aquifoliaceae family [13, 14]. Mate is also marketed in individual tea bags and lyophilized form.

Mate tea presents a nutraceutical profile, acting as hypocholesterolemic, hepatoprotector [15], central nervous system stimulant [16] and is used in the management of obesity [17, 18, 19]. In addition to these effects, mate also is an antioxidant [20, 21]. The antioxidant activity of yerba mate can be attributed to various polyphenols, mainly caffeoyl derivatives such chlorogenic acids, a family of esters formed between certain trans cinnamic acids and quinic acid [12]. Chlorogenic acids are free radicals and metal scavengers, and have been shown to modulate gene expression of antioxidant enzymes [22].

Reports that have demonstrated the ability of antioxidant nutrients to revert or prevent changes associated with oxidative damage in aging are important, as they indicate alternative nutrients for enhancing the quality of life. Furthermore, it is fundamental to investigate whether the effects of mate consumption are influenced by age, to ensure that it is safe to use the product. Therefore, in this study, the effects of long term treatment with mate tea were evaluated in female Wistar rats aged 19 and 6 months. Oxidative lipid damage (TBARS) and the activities of antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx were estimated in the erythrocytes and liver. Erythrocytes were used because they are the most easily available cell type and suffer higher oxidative lipid damage due to aging [23]. In addition, the liver was studied because oxidative hepatic damage increases with aging [24] and may be partially prevented by antioxidants [25].

2. Methods and Materials

2.1. Analysis of mate tea

2.1.1. Mass Spectrometry of mate tea. The mate tea was analyzed by electrospray ionization (ESI) and multistage fragmentation held in an interface-type ion-trap (IT). The negative mode

was chosen. For generation and analysis of first-order mass spectra (MS) and for the remaining experiments in multiple stages (MSn), the subsequent parameters were followed: capillary voltage of -4 V, spray voltage of -5 kV, capillary temperature 280°C, carrier gas (N₂) flow 60 (random units). The track acquisition was m/z 150-1500, with two or more events performed simultaneously. The first event was a full scan spectrum of masses to collect data on ions in the range m/z established. The remaining events were MSn experiments conducted from data for the first scan pre-selected precursor ions with collision energy between 20 and 30% of the total energy of the instrument. The Xcalibur (Thermo Scientific ®) software was used for collection and processing of spectral data.

2.1.2. Total polyphenol content. Were estimated using the method of Folin-Ciocalteu, as described in Taga et al. (1984) [26]. This method consists in adding 20µL of tea mate to a solution of Na₂CO₃ 2% (w/v) and, after 2 minutes, added Folin 1:1 (v/v). After incubating for 30 minutes, absorbance was determined at 750 nm. The total concentration of polyphenols was expressed in polyphenol mg/g mate tea, using a standard curve of gallic acid.

2.1.3. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Total antioxidant capacity was assessed according to Benzie and Strain (1996) [27]. This method is based on reducing the ferric complex tripiridil triazine (Fe³⁺-TPTZ) to form Fe²⁺ in acidic medium. The absorbance was estimated at 595 nm and the results are expressed in mmol/L, using a standard curve of ferrous sulfate.

2.2. Animals. Female Wistar rats aged 4 and 17 months, obtained from the central bioterium of University Estadual Paulista – Unesp (Araçatuba, São Paulo, Brazil) were used in the experiments. The environment was controlled by light (12 h light/dark cycle starting at 7:00 am), temperature (23±3 °C) and relative humidity (60±5%). Animals had free access to water and standard rat chow (Labina Purina, Brazil). The acclimation period was of 1 week. All

procedures were approved by the local institutional Animal Care and Use Committee (Protocol Number: 00517-2012).

2.3. Estrous cycle. The estrous cycle was accompanied for 15 days before the treatment started, 15 days during the treatment period and 15 days before the sacrifice. Every morning between 8:00 and 10:00 a.m. each animal cage was carried to the experimental room. Vaginal secretion was collected with a plastic pipette filled with 10 μ L of normal saline (NaCl 0.9% - w/v) by inserting the tip into the rat's vagina, but not deeply. Vaginal fluid was placed on glass slides for analysis under a light microscope [28]. We only used young female rats with regular estrous cycles and senile permanent diestrus.

2.4. Mate Tea Preparation. Mate tea used in this study was from the same batch and was obtained from Leão Jr., Curitiba, PR, Brazil. Daily tea was dissolved in 80°C water (American Dietetic Association protocols) and cooled to room temperature before being administered to the animals.

2.5. Experimental Design. The animals were randomly divided in four groups (n=10 per group): Senile (S), Senile treated with Mate Tea (SMT), Young (Y) and Young treated with Mate Tea (YMT). The SMT and YMT groups received, by gavage, daily mate tea (20mg/kg BW) for eight consecutive weeks. The S and Y groups were treatment similarly, but with water. At the end of the experiment, the animals fasted for 12 hours were anesthetized using sodium pentobarbital (30mg/kg BW) and euthanized by abdominal aorta puncture. The liver and blood were collected.

2.6. Preparation of Liver Tissue. The liver was removed immediately after death of the animal, wrapped, transferred to N₂ and then to -80°C where it remained stored. Before analysis tissue was homogenized in Tris-HCl buffer (100 mmol / L), EDTA (50 mmol / L), pH = 7.0. The homogenate was centrifuged at 1.000 x g, 10 min, 4°C, and the supernatant used for biochemical analysis.

2.7. Blood collection. Blood was collected and transferred to heparinized tubes for erythrocyte separation. Blood samples were centrifuged at 1.000 x g for 15 minutes at 4°C, and plasma was removed by aspiration and frozen at -80°C until analysis. Erythrocytes were washed three times with saline solution (NaCl 0.9% w/v) and centrifuged at 1.000 x g for 3 minutes at room temperature. Lysates were prepared adding a solution containing 4 mmol/L MgSO₄ at 1 mmol/L acetic acid (1:100 solution/erythrocytes, v/v) and frozen at -80°C.

2.8. Plasma FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). The FRAP was evaluated by the method described in item 2.1.3 [27], using 15 microliters of plasma. The absorbance was estimated at 595 nm and the results are expressed in mmol/L, using a standard curve of ferrous sulfate.

2.9. Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS). The thiobarbituric acid reactive substances were determined as described by Bueg and Aut (1978) [29]. This method consists of adding 10% trichloroacetic acid (w/v) in the sample to promote the precipitation of proteins and to acidify the medium. This mixture was then centrifuged (3 min, 1.000 x g). Thiobarbituric acid (0.67% w/v) was added to the reaction medium after extraction of free protein. The sample was placed in a water bath (100°C, 15 min). Absorbance was read at 535 nm and the results were expressed as nmol/mg protein. The molar absorption coefficient used was 1.56 x10⁵ M⁻¹ cm⁻¹.

2.10. Superoxide Dismutase Activity Assay (SOD). SOD was estimated by the method of Marklund (1974) [30], based on the inhibition of the reaction of superoxide anion with pyrogallol. The superoxide is generated by auto oxidation of pyrogallol in basic medium and the SOD present in the sample competes for this radical with the detection system. The oxidation of pyrogallol was detected in spectrophotometer at 420 nm. The amount of enzyme required to achieve 50% inhibition of auto oxidation of pyrogallol is considered as one unit of enzymatic activity. Results were expressed in units/min/mg of protein.

2.11. Catalase Activity Assay (CAT). CAT activity was determined as described in Boveris and Chance (1973) [31], based on the consumption of the substrate hydrogen peroxide in the reaction medium containing potassium phosphate buffer 50 mmol/L, pH 7.4 and 0.3 mol/L H₂O₂. Sample (10 µL) was added in the reaction medium and absorbance was measured at 240 nm. Results were expressed in nmols of H₂O₂ consumed/min/mg protein.

2.12. Glutathione Peroxidase Activity Assay (GPx). GPx activity, expressed as mmol of GSH consumed/min/mg of protein, was measured by following NADPH oxidation at 340 nm in a reaction medium containing 0.17 mmol/L reduced glutathione, 0.2 U/mL glutathione reductase, 0.5 mmol/L tert-butyl hydroperoxide, as described by Flohé and Gunzler (1984) [32].

2.13. Determination of aspartate aminotransferase (GOT) and alanine aminotransferase (GPT). Plasma total GOT and GPT levels were measured using a Labtest kit (Labtest Diadgnóstica SA, MG, Brazil). GOT and GPT levels were expressed as IU/mL of plasma.

2.14. Plasma estrogen concentration. Was determined by radioimmunoassay using a MP Biomedicals kit (Diagnostics Divisions, New York, USA). The results were expressed in pg/mL and intergroup comparisons were carried out by Dunnett's test.

2.15. Protein Determination. Protein was measured by the method of Lowry et al. (1951) [33] with bovine serum albumin used as standard. The absorbance was determined at 660nm. The results were expressed in mg/mL.

2.16. Statistical Analysis. The statistical analysis was performed using Graph Pad Prism (version 5.0) statistical program. The data are expressed as the mean±standard error. Intergroup comparisons were carried out by one-way ANOVA test and Tukey's post-test, considering $p < 0.05$ as significant.

3. Results

The Folin-Ciocalteu assay was used to measure total polyphenols in the mate tea, demonstrating that there are 113.37 mg/g of mate lyophilized. The mass spectroscopy profile (Figure 1A) revealed the presence of caffeoylquinic derivatives as 3-CQA (cis 3-o-caffeoylquinic acid) - chlorogenic acid, which is considered to be the highest antioxidant of mate tea [34, 35]; 5-p-CoQA (5-o-p-cumaroylquinic acid); CeQA acid (3-o-feruloylquinic); 4C,5 pCoQA acid (4-o-caffeoyl-5-o-p- cumaroylquinic acid) and cis 4,5-diCQA (4,5-di-o-caffeoylquinic acid) (Figure 1B). The antioxidant capacity of mate lyophilized was demonstrated by FRAP assay (534.67 mmol/L). These results ensured that mate lyophilized may be used as a source of antioxidants.

No variation was observed in the average values of plasma aspartate transaminase (GOT) and alanine transaminase (GPT), showing that long term treatment didn't affect hepatic function (Table 1). Feed and water intake didn't change with the treatment (data not shown). Body weight not changed during the experiment in any groups (data not shown).

The following of the estrous cycle of rats, carried out for period of 15 days before the beginning of the treatment, during and before euthanasia, demonstrated that the majority of senile rats stayed longer in diestrus and the younger rats showed estrous cycle rhythm. The treatment didn't induce changes in the cycle patterns, regardless of age of animals.

In order to prevent stress exposure to animals, the last cycle estrous analysis was performed on the eve of the experiment and indicated that the senile rats were in diestrus, an indicator of low plasma estrogen concentration. The young rats were in estrus or pro-estrus, indicating higher concentration of this hormone.

The average plasma estrogen concentration in senile rats was lower when compared to the one of the young. The mate treatment didn't alter the plasma hormone level, regardless of age (Table 1).

Aging didn't affect the plasma antioxidant capacity, determined by chemical FRAP assay. The treatment increased ($p < 0.05$) FRAP in both groups (YMT and SMT). The response to treatment was influenced by age, since the increase was 41.9% higher in senile rats than young female (Figure 2).

We studied the effects of mate tea administration on Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS). TBARS measure malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation caused mainly by hydroxyl free radicals. Lipid peroxidation in erythrocytes was increased by 34% ($p < 0.05$) due to aging. Figure 3A shows that mate tea administration significantly decreased oxidative damage in young animals (71.5%) and senile (78.5%) in erythrocytes of rats. When we analyzed the liver, no difference was observed in TBARS when compared Y with S. Mate tea administration for 8 weeks also decreased TBARS levels in young animals (31.5%) and senile (17.4%) in the liver of rats (Figure 3B).

Aging and mate tea administration influenced antioxidant defense enzymes in different ways. The activities of SOD, CAT and GPx in erythrocytes were reduced with aging. The largest decrease was observed in CAT activity (5.4-fold). In young animals, treatment with mate tea increased the activity of SOD (5.6-fold) and CAT (1.7-fold), but there was no increase in GPx activity. Where as in senile animals, mate tea increased the activity of SOD (6.6-fold) and GPx (13.8-fold), without changing CAT activity (Figure 4).

The liver antioxidant defense was modified due to senility. GPx activity was shown to be decreased (76.7%) when Group Y was compared with Group S, while there was increased SOD (30.7%) and CAT (50.8%) activity in the senile group. After mate treatment the SOD activity in young and senile animals was 47.5% and 26.9% higher than the no treatment groups, respectively. In young animals, treatment with mate tea increased the CAT (41.9%) and GPX (46.9%) activity, and this increase was also observed in senile animals when CAT (30.3%) and GPX (115.9%) activity was estimated (Figure 5).

4. Discussion

The tea infusion obtained from the leaves of *Ilex paraguariensis* is considered one of the most antioxidant-rich beverages consumed in several countries in South America. Studies have revealed that this drink has 70% more antioxidant activity when compared with green tea [36].

About 3% of a dry weight sheet or 1 to 10% (w / v) aqueous extract of *Ilex paraguariensis* consists of polyphenols [12, 37, 38, 39], to which the antioxidant activity of this drink is attributed [20]. The analysis of mate tea used in this study demonstrated the presence of 113.37 mg of polyphenols in each gram of lyophilized product, a value 23% higher than that reported in dry leaves [12]. This difference can be attributed to processing method, or differences that may be associated with system of herb cultivation [22].

The capacity of mate tea to neutralize ROS is attributed to Caffeoylquinic derivatives [40]. In the preparation administered to the animals, the following derivatives were identified: cis 3-o-caffeoylquinic acid (3-CQA), 5-o-p-cumaroylquinic acid (5-p-CoQA), 3-o-feruloylquinic acid (CeQA), 4-o-caffeoyl-5-o-p-cumaroylquinic acid (4C,5 pCoQA) and 4,5-di-o-caffeoylquinic acid (cis, 4,5-diCQA). Chlorogenic acids (3-CQA) have been extensively studied due to their free radical and metal scavenging capacity, and ability to modulate the gene expression of antioxidant enzymes [34, 40, 41].

ROS are produced by aerobic cells as byproducts of metabolism and are in balance with the antioxidant system. Oxidative stress occurs when this balance is disrupted by environmental or physiological changes, which overwhelm the biological system. Consequently there is greater damage to DNA, proteins and lipids [23]. According Harman (1956 and 2006) [3, 4] oxidative stress increases with age.

Aging is described as a progressive decline in the biochemical and physiological functions of the organism and is associated with a greater predisposition to degenerative diseases, diabetes, cardiovascular disease and cancer. Although the mechanisms involved

in the aging process have not been fully elucidated, there is evidence that increased oxidative damage caused by ROS could be a main determinant in this process [42].

In women, aging is accompanied by closure of the ovulatory and menstrual cycles and reduction in plasma estrogen, leading to menopause, after which increased oxidative stress is detected [43]. In females of other mammalian species, aging is accompanied by a period of large fluctuations in hormone concentrations and consequent changes in the estrous cycle [44].

In female rodents, the estrous cycle lasts an average of four to five days and is divided into: proestrus, estrus, metaestrus and diestrus. Analysis of the vaginal smear allows the indirect, but necessary evaluation of ovarian activity that abruptly changes due to fluctuations in estrogen [45]. The results of the present study indicate that senile rats remained in diestrus, and younger rats in estrus or proestrus, for a longer period. The lower estrogen levels in senile rats, widely described in the literature [46], were confirmed in this study, by hormone level testing. The absence of differences in plasma estrogen and estrous cycle pattern between the treated groups and their controls indicates that prolonged exposure to the mate tea did not affect these parameters.

Plasma antioxidant capacity is a primary marker of oxidative stress in aging and age-related diseases, such as diabetes and cardiovascular disease [23]. There are several methods to assess this parameter, however FRAP is routinely used because it is fast and highly reproducible [47]. Reduced capacity to neutralize ROS has been linked to aging [45], but in naturally menopausal women, increase in this parameter has been described, justified by the increased production of non-enzymatic low molecular weight antioxidants, to compensate the reduction in estrogen [45]. In this study, the absence of reduction of FRAP in senile females could be indicative of the onset of this adaptive process, and should be investigated further.

Treatment of young animals increased plasma antioxidant capacity, corroborating the findings of studies in humans [48, 49]. The most pronounced effect was observed in senile females, and could be attributed to the decreased ability of the liver to conjugate polyphenols that can be excreted in urine [50]. This change in the liver could be due to a pro-oxidative state in aging [51, 52]. This possibility has not been confirmed, because no higher lipid oxidation was noted in the liver of the senile group in comparison with the young. The absence of liver damage was confirmed by evaluating the aspartate aminotransferase and alanine aminoatransferase levels. No change in GOT and GPT was observed after treatment of young and senile animals, indicative of the absence of liver damage induced by ingestion of mate tea for a period of 8 weeks.

The action of ROS on membrane lipid peroxidation results in the incorporation of molecular oxygen into a polyunsaturated fatty acid, leading to oxidative degradation that starts the chain reactions that generate different cytotoxins, such as MDA. As a result, changes occur in the structure and permeability of the membrane, leading to loss of ion exchange selectivity, and release of the contents of organelles [53].

A larger amount of MDA in human erythrocytes is associated with a decrease in FRAP during aging [23]. However, the results of the present study indicated that the increase in MDA in senile females could not be associated with this factor. The FRAP method estimates the totality of non-enzymatic low molecular weight antioxidants, such as reduced glutathione (GSH), uric acid, vitamin C, bilirubin and other ROS [54]. In females, in addition to these molecules estrogen contributes to the neutralization of reactive oxygen species [55], which could explain the increased oxidative damage observed in the erythrocytes of senile animals in diestrus.

The capacity of mate tea in reducing oxidative damage is not only associated with ability to neutralize ROS, but also improves the antioxidant defense enzymes [49], promoted by increased gene expression of SOD, CAT and GPx [56].

Corroborating the literature [8, 51, 52, 57, 58, 59, 60, 61] the results of the present indicate that aging reduced the activity of SOD, CAT and GPX in erythrocytes.

SOD comprises a family of enzymes that catalyze the conversion of superoxide, a chemical species that damages cell membranes and other biological structures, to H_2O_2 , which can be further degraded by CAT or GPx [62, 63]. The reduction of SOD observed in the erythrocytes of senile females may be associated with an accumulation of oxidative damage products [51], partly attributable to reduced estrogen [9]. Continuous exposure to superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), can also reduce SOD activity, because the endogenous enzyme is irreversibly inhibited by high amounts of its reaction product [64]. In the liver, where no greater oxidative damage was found in response to aging, higher SOD activity was shown in senility.

GPx and CAT enzymes play an important role in the degradation of H_2O_2 produced by SOD. GPx neutralizes H_2O_2 removing two H atoms from two molecules of reduced glutathione (GSH), resulting in two H_2O molecules and oxidized glutathione (GSSG) [23]. The CAT promotes the direct decomposition of H_2O_2 to O_2 [65].

The influence of age on CAT has not yet been elucidated. There are reports of increased enzyme activity in response to senility in rat and human erythrocytes [57, 66, 67]. But in rodents, it has also been shown that the enzyme activity decreases with advancing age [68], as found in this study. CAT activity appears to be more effective at higher concentrations of H_2O_2 [65]. With the reduction in SOD activity the formation of H_2O_2 was decreased, which could explain the lower CAT activity observed in senile animals. The oxidative lipid damage could occur due to an increased production of hydroxyl radicals via the Fenton reaction [69], from $O_2^{\cdot-}$.

In liver tissue, a possible increased H_2O_2 formation due to the increase in SOD activity could explain the elevation of CAT in senile females [65], as well as the absence of higher oxidative damage. Data in the literature relate the reduction in the activity of this

enzyme to aging in the liver tissue of male rats, but associated with lower SOD activity [8, 51, 60].

Aging is associated with reduced activity of GPx in the liver, as shown by Ramesh et. al. (2012) [8] who worked with senile male rats aged 24 months. In senile females the lower enzyme activity observed in the liver and erythrocytes can be attributed to the reduction in estrogen [9, 70].

The use of antioxidants has been shown to be effective in reducing the changes associated with oxidative stress in aging. According to Halliwell (1994, 2012) [71, 72] determining the optimal amount to be ingested is the greatest challenge at present. The action of *Ilex paraguariensis* in reducing stress is not only associated with the antioxidant action of bioactive compounds present in this herb, but also to increased antioxidant defense enzymes. Doses of 0.5 g / kg daily for 15 days increase the activity of SOD, CAT and GPx in the erythrocytes and hypothalamus of rats [73]. The administration of 5 g / day mate tea in healthy women for a week increased the expression of antioxidant enzymes in the blood [56]. A dose of 1.0 g / day administered to mice for 60 days increased the gene expression of SOD, CAT and GPx, more effective than doses of 2.0 g / day [74]. Infusions prepared at concentrations of 10 to 40 mg / mL and offered to hamsters for 8 weeks increased the expression of SOD and GPx. Increased expression of these enzymes was observed in the animals that had access to lower concentrations of mate infusion [75].

In the experiments in this study, the dosage used to treat the animals (20mg/kg BW) was lower than those used in other studies, but proved to be effective in increasing the activities of SOD and CAT in the erythrocytes and liver of young and senile animals, despite the reduction in plasma estrogen. However, a different response to treatment was observed in GPx. While the administration of *Ilex paraguariensis* in senile animals allowed an improvement in GPx activity, in young animals a reduction was found. This lower GPx activity after exposure to mate tea appears to have been offset by the large increase in CAT, which

prevented the occurrence of greater oxidative lipid damage, but the mechanisms involved in this process need to be elucidated.

It was concluded that the intake of low-dose mate tea for 8 weeks, improved antioxidant defense and reduced oxidative damage associated with aging in the erythrocytes and liver of rats. Investigations into the shortest time necessary to achieve beneficial results, as well as action in other tissues are already underway.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. Dr. Wagner Villegas of Department of Organic Chemistry, Chemical Institute, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP, Brazil, for carrying out the chromatographic analysis, Foundation for the Development of UNESP (Fundunesp) and Dean of Research (PROPE) Univ Estadual Paulista (UNESP) for financial support.

References

- [1] T. A. Prolla and M. P. Mattson, "Molecular mechanisms of brain aging and neurodegenerative disorders: lessons from dietary restriction", *Trends Neurosci*, vol. 24, pp. 21-31, 2001.
- [2] B. Uttara, A. V. Singh, P. Zamboni, and R. T. Mahajan, "Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options," *Current Neuropharmacology*, vol. 7, pp. 65-74, 2009.
- [3] D. Harman, "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry", *J Gerontol*, vol. 11, pp. 298-300, 1956.
- [4] D. Harman, "Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span", *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1067, pp. 10-21, 2006.
- [5] B. N. Ames, M. K. Shigenaga and T. M. Hagen, "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging", *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, vol. 90, pp. 7915-7922, 1993.

- [6] S. Goto, R. Takahashi, A. A. Kumiyama, Z. Radak, T. Hayashi, M. Takenouchi and R. Abe, "Implications of protein degradation in aging", *Ann N Y Acad Sci*, vol. 928, pp. 54–64, 2001.
- [7] B. Poljsak and I. Milisav, "The neglected significance of 'Antioxidative Stress'", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2012, pp. 12, 2012.
- [8] T. Ramesh, S. W. Kim, J. H. Sung, S. Y. Hwang, S. H. Sohn, S. K. Yoo and S. K. Kim, "Effect of fermented Panax ginseng extract (GINST) on oxidative stress and antioxidant activities in major organs of aged rats", *Exp Gerontol*, vol. 47, pp. 77-84, 2012.
- [9] M. A. Sánchez-Rodríguez, M. Zacarías-Flores, A. Arronte-Rosales, E. Correa-Muñoz and V.M. Mendoza-Núñez, "Menopause as risk factor for oxidative stress", *Menopause*, vol. 19, pp. 361-7, 2012.
- [10] M. T. R. Subbiah, "Mechanisms of cardioprotection by estrogens", *Proc Soc Expert Biol Med*, vol. 217, pp. 23-29, 1998.
- [11] E. Niki and M. Nakano, "Estrogens as antioxidants", *Methods Enzymol*, vol. 186, pp. 330-3, 1990.
- [12] C. I. Heck and E.G. de Mejla, "Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations", *J Food Sci*, vol. 72, pp. 138-151, 2007.
- [13] E. Small and P. M. Catling, "Blossoming treasures of biodiversity: 3. Mate (*Ilex paraguariensis*)-better than Viagra, marijuana, and coffee?", *Biodiversity*, vol. 2, pp. 26-7, 2001.
- [14] G. Grigioni, F. Carduza, M. Irurueta and N. Pensel, "Flavour characteristics of *Ilex paraguariensis* infusion, a typical Argentine product, assessed by sensory evaluation and electronic nose", *J Sci Food Agric*, vol. 84, pp. 427-32, 2004.
- [15] R. Filip and G. E. Ferraro, "Researching on new species of "Mate": *Ilex brevicuspis*: phy-tochemical and pharmacology study", *Eur J Nutr*, vol. 42, pp. 50-4, 2003.
- [16] A. Gonzalez, F. Ferreira, A. Vazquez, P. Moyna and E. A. Paz, "Biological screening of Uruguay a medicinal-plants", *J Ethnopharmacol*, vol. 39, pp. 217-20, 1993.
- [17] T. Andersen and J. Fogh, "Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients", *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, vol. 14, pp. 243-250, 2001.
- [18] M. H. Pittler and E. Ernst, "Dietary supplements for body-weight reduction: a systematic review", *Am J Clin Nutr*, vol. 79, pp. 529-36, 2004.
- [19] T. Opala, P. Rzymiski, I. Pischel, M. Wilczak and J. Wozniak, "Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body

composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects - a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial", *Eur J Med Res*, vol. 11, pp. 343-50, 2006.

[20] R. Filip, S. B. Lotito, G. Ferraro and C.G. Fraga, "Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species", *Nutr Res*, vol. 20, pp. 1437-46, 2000.

[21] T. J. VandeJagt, R. Ghattas, D. J. VanderJagt, M. Crossey and R. H. Glew, "Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico", *Life Sci*, vol. 70, pp. 1035-1040, 2002.

[22] N. Bracesco, A. G. Sanchez, V. Contreras, T. Menini, and A. Gugliucci, "Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 136, pp. 378-384, 2011.

[23] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans", *Oxid Med Cell Longev*, vol. 3, pp. 2-12, 2010.

[24] P. Kumar, R. K. Kale and N. Z. Baquer, "Estradiol modulates membrane-linked ATPases, antioxidant enzymes, membrane fluidity, lipid peroxidation, and lipofuscin in aged rat liver", *J Aging Res*, vol. 2011, pp. 8, 2011.

[25] F. Cand and J. Verdeti, "Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats", *Free Radic Biol Med*, vol. 7, pp. 59-63, 1989.

[26] M. S. Taga, E. E. Miller and D. E. Pratt, "Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants", *J Am Oil Chem Soc*, vol. 61, pp. 928-931, 1894.

[27] I. F. Benzie and J. J. Strain, "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay", *Anal Biochem*, vol. 239, pp. 70-6, 1996.

[28] J. LeFevre and M.K. McClintock, "Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior", *Biol Reprod*, vol. 38, pp. 780-9, 1988.

[29] J. A. Bueg and S. D. Aust, "Microsomal lipid peroxidation", *Methods Enzymol*, vol. 52, pp. 302-9, 1978.

[30] S. Marklund and G. Marklund, "Involvement of the superoxide anion in radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase", *Eur J Biochem*, vol. 47, pp. 469-474, 1974.

[31] A. Boveris and B. Chance, "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen", *Biochem J*, vol. 134, pp. 707-716, 1973.

[32] L. Flohé and W. A. Gunzler, "Assay of glutathione peroxidase", *Methods Enzymol*, vol. 105, pp. 121-14, 1984.

- [33] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *J Biol Chem*, vol. 193, pp. 265-275, 1951.
- [34] M. N. Clifford and J. R. Ramirez-Martinez, "Chlorogenic acids and purine alkaloids contents on mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage", *Food Chem*, vol. 35, pp. 13-21, 1990.
- [35] E. L. Cardozo Junior, O. Ferrarese Filho, L. Cardozo Filho, M. L. L. Ferrarese, C. M. Donaduzzi and J. A. Sturion, "Methylxanthines and phenolic compounds contents in mate (*Ilex paraguariensis*) progenies grown in Brazil", *J Food Compost Anal*, vol. 20, pp. 1-10, 2007.
- [36] M. Bixby, L. Spieler, T. Menini and A. Gugliucci, "Ilex paraguariensis extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity", *Life Science*, vol. 77, pp. 345-358, 2005.
- [37] M. Carini, R. M. Facino, G. Aldini, M. Calloni and L. Colombo, "Characterization of phenolic antioxidants from maté (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry", *Rapid Communication and Mass Spectrometry*, vol. 12, pp. 1813-1819, 1998.
- [38] R. Filip, P. López, G. Giberti, J. Coussio and G. Ferraro, "Phenolic compounds in seven South American *Ilex species*", *Fitoterapia*, vol. 72, pp. 774-778, 2001.
- [39] D. H. M. Bastos, A. C. Fornari and Y. S. Queiroz, "The chlorogenic acid and caffeine content of yerba mate beverages", *Acta Farm Bonaerense*, vol. 24, pp. 91-95, 2005.
- [40] M. R. Olthof, P. C. H. Hollman and M. B. Katan, "Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans", *Journal of Nutrition*, vol. 131, pp. 66-71, 2001.
- [41] R. Jaiswal, T. Sovdat, F. Vivan and N. Kuhnert, "Profiling and characterization by LC-MS(n) of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in mate (*Ilex paraguariensis*)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, pp. 5471-84, 2010.
- [42] W. Droge, "Free radicals in the physiological control of cell function", *Physiol Rev*, vol. 82, pp. 47-95, 2002.
- [43] T. R. Chakraborty and A.C. Gore, "Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function", *Exp Biol Med*, vol. 229, pp. 977-87, 2004.
- [44] D.T. Baird, T.G. Baker, K. P. McNatty and P. Neal, "Relationship between the secretion of the corpus luteum and the length of the follicular phase of the ovarian cycle", *J Reprod Fertil*, vol. 45, pp. 611-9, 1975.

- [45] V. J. Victorino, C. Panis, F. C. Campos, R. C. Cayres, A. N. Colado-Simão, S. R. Oliveira, A. C. Herrera, A. L. Cecchini and R. Cecchini, "Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women", *Age*, 2013.
- [46] K. Moorthy, D. Sharma, S. F. Basir and N. Z. Baquer, "Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferases in naturally menopausal rats", *Exp Gerontol*, vol. 40, pp. 295-302, 2005.
- [47] C. Q. Alves, J. M. David, J. P. David, M. V. Bahia and R. M. Aguiar, "Methods for determination of antioxidant activity in vitro organic substrates", *New Chemical*, vol. 33, pp. 2202-2210, 2010.
- [48] E. L. Silva, T. J. C. Neiva, M. Shirai, J. Terao and D. S. P. Abdalla, "Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation", *Food Res Inter*, vol. 41, pp. 973-979, 2008.
- [49] B. C. Boaventura, P. F. Di Pietro, A. Stefanuto, G. A. Klein, E. C. de Moraes, F. de Andrade, E. Wazlawik and E. L. da Silva, "Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects", *Nutrition*, vol. 28, pp. 657-664, 2012.
- [50] M. D'Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulio, C. Giovannini and R. Masella, "Polyphenols, dietary sources and bioavailability", *Ann Ist Super Sanità*, vol. 43, pp. 348, 2007.
- [51] T. Jayakumar, P. A. Thomas and P. Geraldine, "Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats", *Exp. Gerontol*, vol. 42, pp. 183-191, 2007.
- [52] V. Senthil Kumaran, K. Arulmathi, R. Srividhya and P. Kalaiselvi, "Repletion of antioxidant status by EGCG and retardation of oxidative damage induced macromolecular anomalies in aged rats", *Exp. Gerontol*, vol. 43, pp. 176-183, 2008.
- [53] E. Niki, "Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects", *Free Radic Biol Med*, vol. 47, pp. 469-84, 2009.
- [54] P. G. Gandra, A. A. Alves, D. V. Macedo and L. T. Kubota, "Electrochemical determination of antioxidant capacity for physical exercise evaluation", *New Chemical*, vol. 27, pp. 980-985, 2004.
- [55] X. Zhu, Z. Tang, B. Cong, J. Du, C. Wang, L. Wang, X. Ni and J. Lu, "Estrogens increase cystathionine- γ -lyase expression and decrease inflammation and oxidative stress in the myocardium of ovariectomized rats", *Menopause*, 2013.
- [56] R. L. Matsumoto, D. H. Bastos, S. Mendonça, V. S. Nunes, W. Bartchewsky, M. L. Ribeiro and C. P. de Oliveira, "Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA

expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and total antioxidant status in healthy young women”, *J Agric Food Chem*, vol. 57, pp. 1775-1780, 2009.

[57] M. E. Inal, G. Kanbak and E. Sunal, “Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging”, *Clin Chim Acta*, vol. 305, pp. 75-80, 2001.

[58] J. L. Wu, Q. P. Wu, X. F. Yang, M. K. Wei, J. M. Zhang, Q. Huang and X. Y. Zhou, “L-malate reverses oxidative stress and antioxidative defenses in liver and heart of aged rats”, *Physiol Res*, vol. 57, pp. 261-268, 2008.

[59] V.S. Kumaran, K. Arulmathi and P. Kalaiselvi, “Senescence mediated redox imbalance in cardiac tissue: antioxidant rejuvenating potential of green tea extract”, *Nutrition*, vol. 25, pp. 847-854, 2009.

[60] S. J. Posadas, V. Caz, C. Largo, B. De la Gandara, B. Matallanas, G. Reglero and E. De Miguel, “Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats”, *Exp Gerontol*, vol. 44, pp. 383-389, 2009.

[61] A. F. Aydin, C. Kucukgergin, G. Ozdemirler-Erata, N. Kocak-Toker and M. Uysal, “The effect of carnosine treatment on prooxidant-antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats”, *Biogerontology*, vol. 11, pp. 103-109, 2010.

[62] R. Perez-Campo, M. López-Torres, S. Cadenas, C. Rojas and G. Barja, “The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach”, *J Comp Physiol B*, vol. 168, pp. 149-158, 1998.

[63] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur and J. Telser, “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”, *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 39, pp. 44-84, 2007.

[64] H.R. Andersen, Y.B. Nielsen, F. Nielsen and P. Grandjean, “Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes”, *Clin Chem*, vol. 43, pp. 562-8, 1997.

[65] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, “Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death, In: Free Radicals in Biology and Medicine”, 4th ed, *Oxford University Press*, pp. 187-267B, 2007.

[66] S. I. Rizvi and P.K. Maurya, “Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans”, *Mol Biotechnol*, vol. 37, pp. 58-6, 2007.

[67] P. Gianni, K. J. Jan, M. J. Douglas, P. M. Stuart and M. A. Tarnopolsky, “Oxidative stress and mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle”, *Exp Gerontol*, vol. 39, pp. 391-400, 2004.

[68] K. Tokunaga, K. Kanno, M. Ochi, T. Nishimiya, K. Shishino and M. Murase, et al., “Lipid peroxide and antioxidants in the elderly”, *Rinsho Byori*, vol. 46, pp. 783-9, 1998.

[69] C. Walling, “Fenton’s reagent revisited”. *Accts Chem Res*, vol. 8, pp. 125-13, 1975.

- [70] C. Massafra, D. Gioia, C. D. Felice, E. Picciolini, V. De Leo, M. Bonifazi and A. Bernabei, "Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle", *J Endocrinol*, vol. 167, pp. 447-452, 2000.
- [71] B. Halliwell, "Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?", *Lancet*, vol. 344, pp. 721-4, 1994.
- [72] B. Halliwell, "Free radicals and antioxidants: updating a personal view", *Nutr Rev*, vol. 70, pp. 257-65, 2012.
- [73] B. Scolaro, D. D. de Lima, J. G. P. da Cruz and D. D. Dal Magro, "Mate Tea Prevents Oxidative Stress in the Blood and Hippocampus of Rats with Acute or Chronic Ethanol Administration", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2012, pp. 1-8, 2012.
- [74] D. P. Arçari, W. Bartchewsky, T. W. dos Santos, K. A. Oliveira, A. Funck, J. Pedrazzoli, M. F. de Souza, M. J. Saad, D. H. Bastos, A. Gambero, P. de O. Carvalho and M. L. Ribeiro, "Antiobesity effects of Yerba Mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice", *Obesity*, vol. 17, pp. 2127-2133, 2009.
- [75] H. Gao, Z. Liu, X. Qu and Y. Zhao, "Effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on vascular endothelial function and liver lipoprotein receptor gene expression in hyperlipidemic rats", *Fitoterapia*, vol. 84, pp. 264-272, 2013.

Figures – Legends

FIGURE 1

Mass spectroscopy profile of Mate tea (A). Caffeoylquinic derivatives identified in mate tea: 3-CQA (cis 3-o-caffeoylquinic acid; 5-p-CoQA (5-o-p-cumaroylquinic acid); CeQA acid (3-o-feruloylquinic); 4C,5 pCoQA acid (4-o-caffeoyl-5-o-p- cumaroylquinic acid) and cis 4,5-diCQA (4,5-di-o-caffeoylquinic acid) identified by Mass Spectrometry (B).

FIGURE 2

Effect of administration of mate tea on plasma antioxidant capacity, measured by ferric reducing ability (FRAP). Data are presented as mmol/L (mean±standard error), n=10 per group. *p<0.05 when compared with Y; #p<0.05 when compared with S and YMT.

FIGURE 3

Effect of administration of mate tea on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in erythrocytes (A) and liver (B) of rats. Data are presented as nmol/mg protein (mean±standard error), n=10 per group. *p<0.05 when compared with Y; #p<0.05 when compared with S.

FIGURE 4

Effect of administration of mate tea on SOD (A), GPx (B) and CAT (C) activities in erythrocytes of rats. Data are presented as mean±standard error, n=10 per group. Units: SOD, U/min/mg protein (1 unit is equal to the amount of enzyme that inhibits the pyrogallol auto-oxidation by 50%); GPx, mmol of GSH consumed/min/mg protein; CAT, nmols of H₂O₂ consumed/min/mg protein. *p<0.05 when compared with Y; #p<0.05 when compared with S and YMT.

FIGURE 5

Effect of administration of mate tea on SOD (A), GPx (B) and CAT (C) activities in liver of rats. Data are presented as mean±standard error, n=10 per group. Units: SOD, U/min/mg protein (1 unit is equal to the amount of enzyme that inhibits the pyrogallol auto-oxidation by 50%); GPx, mmol of GSH consumed/min/mg protein; CAT, nmols of H₂O₂ consumed/min/mg protein. *p<0.05 when compared with Y; #p<0.05 when compared with com S and YMT.

Figures

FIGURE 1

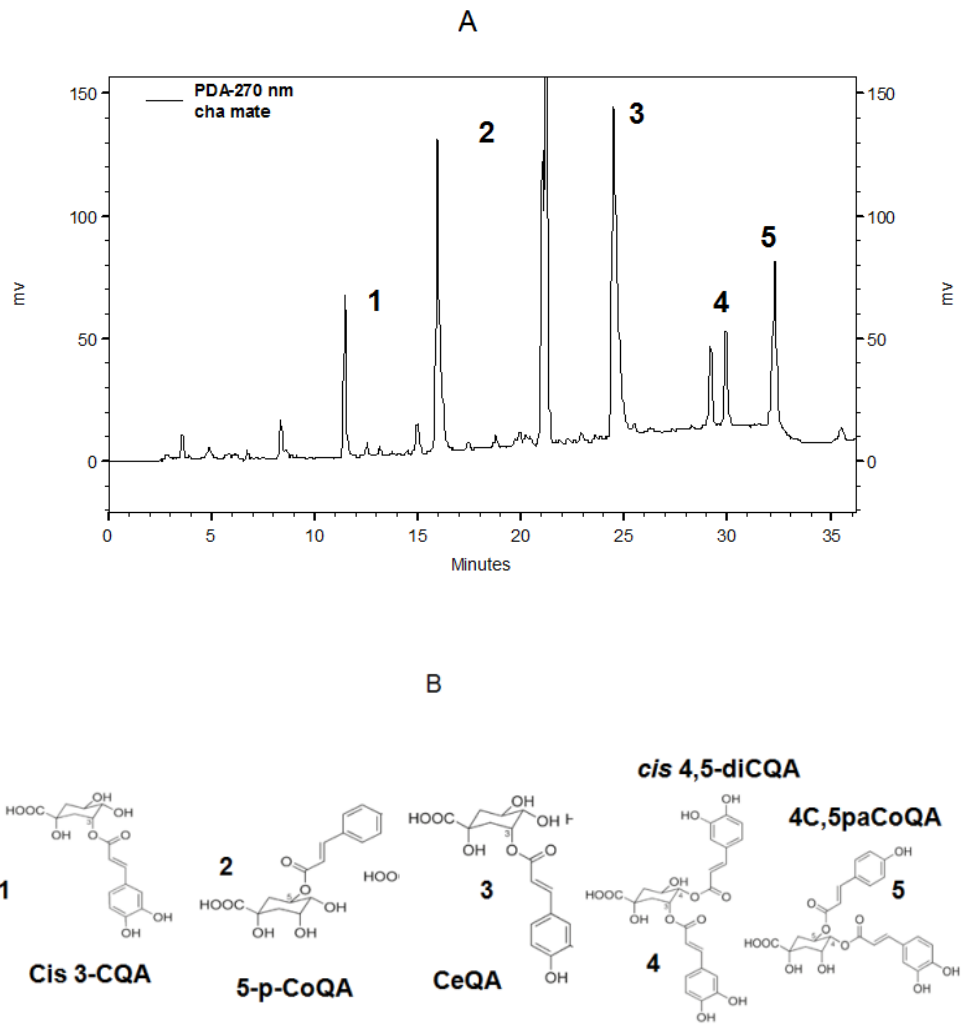


FIGURE 2

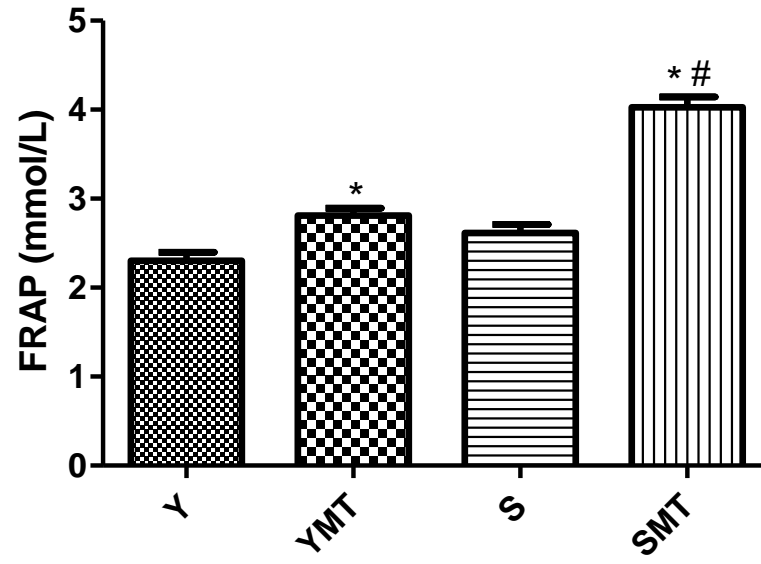


FIGURE 3

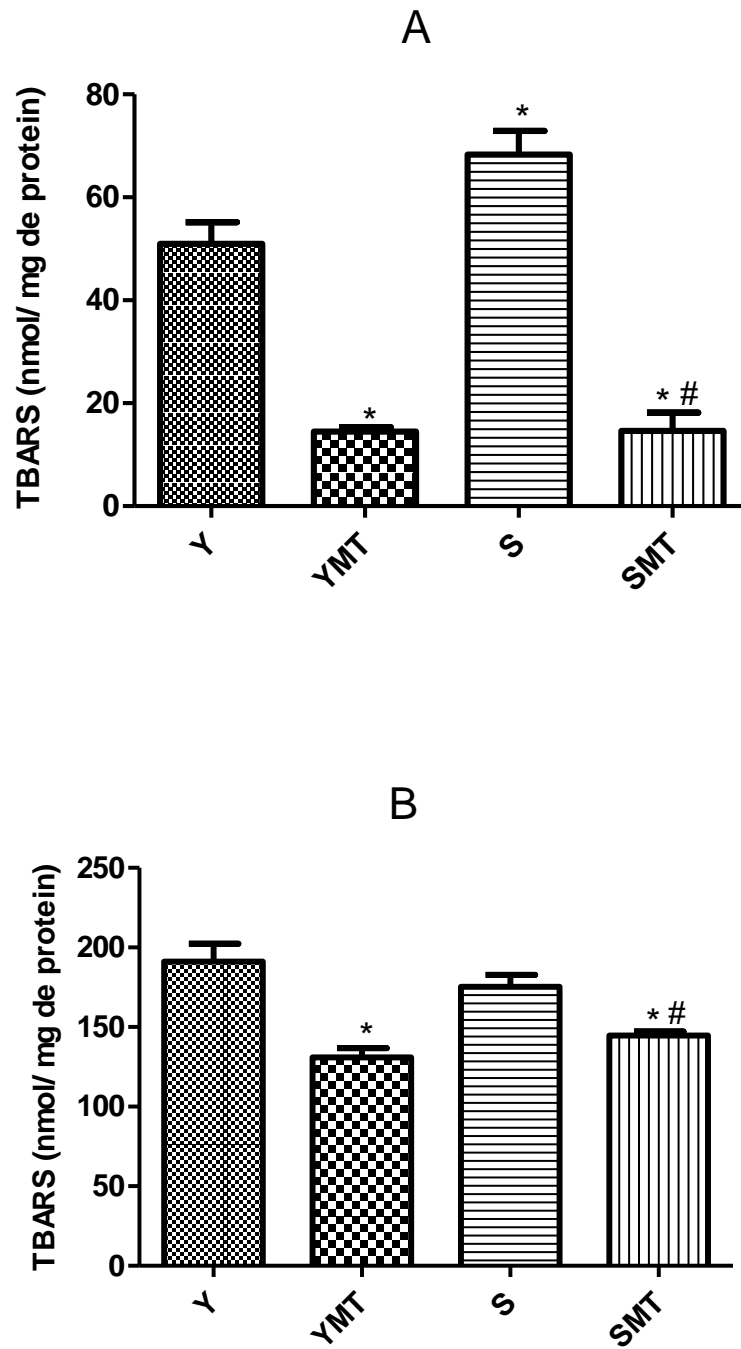


FIGURE 4

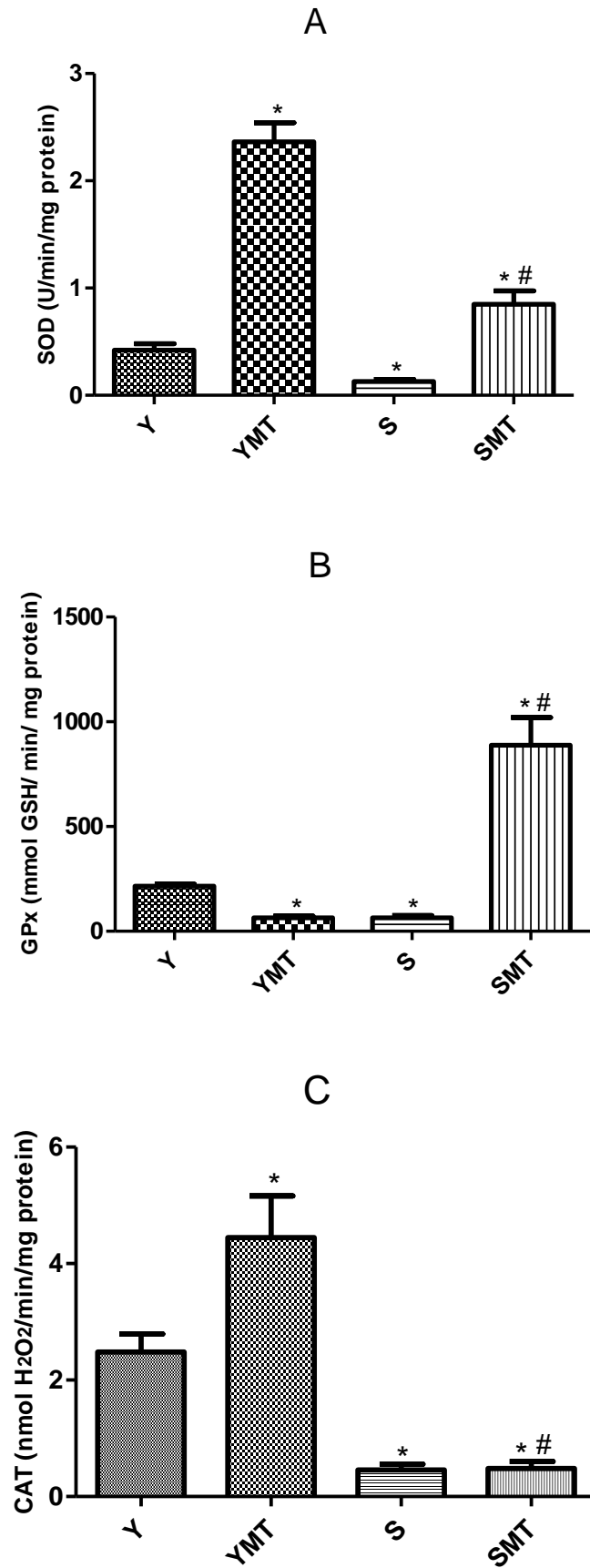
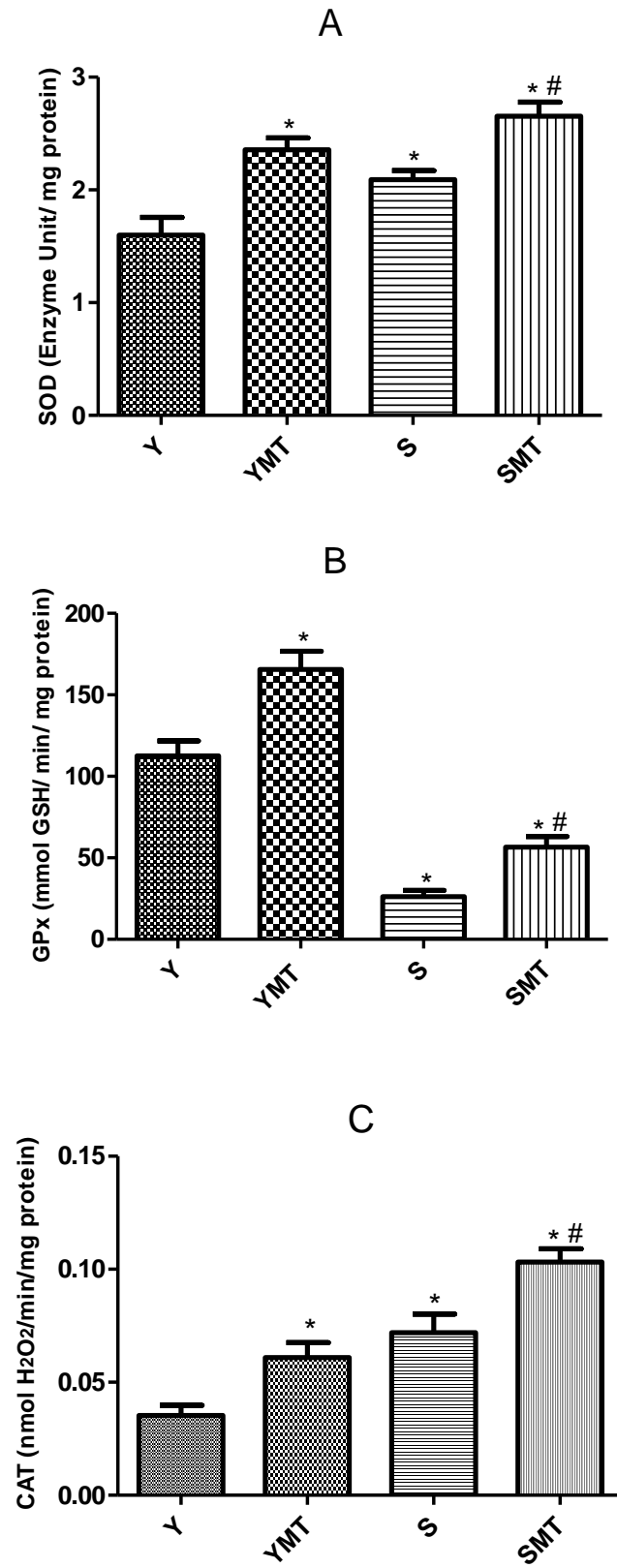


FIGURE 5



TABLE

Table 1. Plasma estrogen concentration, determination of aspartate aminotransferase (GOT) and alanine aminotransferase (GPT) in plasma of rats.

| Parameters | Groups | | | |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Y | YMT | S | SMT |
| Plasma estrogen concentration (pg/mL) | 540.7±83.26 | 254.3±93.87 | 176.6±21.15 | 341.5±125.3 |
| Aspartate aminotransferase (GOT) (IU/mL) | 308.6±73.27 | 303.6±32.24 | 438.0±80.23 | 387.0±56.83 |
| Alanine aminotransferase (GPT) (IU/mL) | 565.2±91.23 | 536.6±38.53 | 497.8±27.34 | 461.0±64.13 |

Data are presented as mean±standard error, n=10 per group. Statistical significance: p<0.05.