

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

Keny Gonçalves Tirapeli

**Alterações em marcadores do estresse oxidativo
ocasionadas por diferentes tempos de tratamento com chá
mate (*Ilex paraguariensis*) no processo de envelhecimento**

ARAÇATUBA

2014

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

Keny Gonçalves Tirapeli

**Alterações em marcadores do estresse oxidativo
ocasionadas por diferentes tempos de tratamento com chá
mate (*Ilex paraguariensis*) no processo de envelhecimento**

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

2014

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

- T596a Tirapeli, Keny Gonçalves.
Alterações em marcadores do estresse oxidativo ocasionadas por diferentes tempos de tratamento com chá mate (*Ilex paraguariensis*) no processo de envelhecimento / Keny Gonçalves Tirapeli. - Araçatuba, 2014
97f. : il. + 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.Perimenopausa 3.Antioxidantes
4.Peroxidação de lipídeos 5.Envelhecimento I. T.

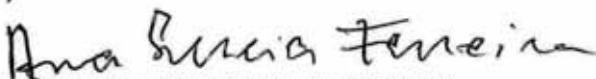
CDD 612

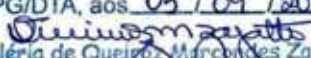
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE KENY GONÇALVES TIRAPELI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, DO(A) FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA.

Aos 04 dias do mês de agosto do ano de 2014, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro do CAOE (Câmpus - Rodovia), reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. ANA CLAUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE do(a) Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Prof. Dr. FABIO ERMINIO MINGATTO do(a) Curso de Zootecnia / Câmpus de Dracena-UNESP, Profa. Dra. ANA LUCIA DOS ANJOS FERREIRA do(a) Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de KENY GONÇALVES TIRAPELI, intitulada "Alterações em marcadores do estresse oxidativo ocasionadas por diferentes tempos de tratamento com chá mate (*Ilex paraguariensis*) no processo de envelhecimento". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Profa. Dra. ANA CLAUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE


Prof. Dr. FABIO ERMINIO MINGATTO


Profa. Dra. ANA LUCIA DOS ANJOS FERREIRA

Confere com o original.
SPG/DTA, aos 03 / 09 / 2014.

Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto
Supervisora de Seção

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 22.09.1983, São José do Rio Preto - SP.

Filiação: Odalice Gonçalves da Silva Tirapeli e Paulo Tirapeli

2003/2007: Curso de Graduação em Nutrição - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Campus de Botucatu - SP.

2008/2009: Curso de Especialização em Nutrição na Saúde e Qualidade de Vida – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP - SP.

2009/2010: Curso de Especialização em Alimentos Funcionais, Fitoterapia e Suplementação - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP - SP.

2012/2014: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível 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.

À minha família, meu alicerce e exemplo de vida.

A Deus, por me dar meios para lutar em busca de meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por permitir a realização do sonho de ser mestre, mesmo diante de tantos empecilhos. Muitas vezes este sonho parecia algo muito distante, mas em Deus encontrei forças para continuar, acreditando que tudo seria possível.

Aos meus pais, Paulo e Odalice, pelo incentivo na busca de meus ideais, pela vida, pelo carinho e por todo zelo. Obrigada por compartilharem do mesmo sonho comigo, por vibrarem a cada vitória e por sofrerem juntos os momentos de angústia. Vocês souberam entender os momentos de ausência e me ensinaram que com muita luta e persistência tudo seria possível.

Às minhas irmãs, Karina e Keity pelos momentos de alegria, companheirismo e amizade, por estarem ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

Ao meu noivo, Francisco por ser meu porto seguro e grande incentivador do meu crescimento profissional e à sua família pelo carinho, compreensão.

À minha orientadora, professora Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, pelos ensinamentos e amizade. Por sua humildade, exemplo a ser seguido pelos futuros mestres. Com certeza seus ensinamentos foram muito além de qualquer protocolo. Obrigada por compartilhar toda sua experiência.

À minha coorientadora, professora Adriane Belló-Klein, da UFRGS, pela disposição em ajudar e valiosas sugestões.

Às minhas companheiras de trabalho do Laboratório de Bioquímica, Arianne e Camila, e aos estagiários, Vanessa, Guilherme, Matheus, Estefani, Guilherme e Francine pelo apoio no dia a dia durante a execução dos experimentos e pelo trabalho em equipe, sem o qual não seria possível chegar até aqui.

A todos os colegas do Departamento de Ciências Básicas- FOA/UNESP pela assistência diária.

A todos os docentes do Departamento de Ciências Básicas da FOA/UNESP, que gentilmente compartilharam informações, instalações e equipamentos.

Aos funcionários da biblioteca, pela disponibilidade em ajudar.

A todos os funcionários do Biotério Central da FOA/UNESP, pela disposição em me auxiliar diariamente.

À UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”) e ao Programa Multicêntrico de Ciências Fisiológicas pela oportunidade da realização deste curso de pós-graduação.

“É exatamente disso que a vida é feita, momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo o mais importante: nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada! Por isso temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível”.

Chico Xavier

*“Ninguém ignora tudo.
Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso aprendemos sempre.”*

Paulo Freire

TIRAPELI KG. Alterações em marcadores do estresse oxidativo ocasionadas por diferentes tempos de tratamento com chá mate (*Ilex paraguariensis*) no processo de envelhecimento. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

RESUMO

Eritrócitos têm sido utilizados para investigar dano oxidativo e possíveis intervenções com antioxidantes no envelhecimento. O chá mate (CM) ou *Ilex paraguariensis* reduz o dano oxidativo, porém sua ação em fêmeas velhas ainda não foi elucidada. Neste trabalho foi investigado pela primeira vez, em ratas velhas na perimenopausa, o efeito tempo-dependente do tratamento com CM sobre o dano oxidativo e a defesa antioxidante. Os animais foram divididos em Adulta-controle (5 meses de idade), Velha-Basal (17 meses de idade), Velha tratada e não tratada. Os grupos tratados receberam CM diariamente (20 mg/kg m.c., gavagem) durante duas, quatro e seis semanas, e não tratados receberam água. A capacidade antioxidante plasmática (FRAP), malonaldeído (MDA) e as atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) foram avaliadas nos eritrócitos. No grupo Velha-basal houve redução de FRAP e das enzimas antioxidantes, e aumento de MDA em comparação ao Adulta-controle. O CM aumentou FRAP, SOD e GPx, e reduziu MDA, após quatro e seis semanas, mas não alterou CAT. Os resultados indicam que o CM é um tratamento promissor para reduzir o acúmulo de dano oxidativo associado à idade em eritrócitos de fêmeas na perimenopausa e que o efeito na FRAP é cumulativo.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*; perimenopausa; antioxidantes; peroxidação de lipídeos; envelhecimento.

TIRAPELI KG. Changes in markers of oxidative stress caused by different treatment times with mate tea (*Ilex paraguariensis*) in the aging process. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

ABSTRACT

Erythrocytes have been used to investigate oxidative damage and possible intervention with antioxidant in aging. Mate tea (MT) or *Ilex paraguariensis* reduces oxidative damage, but its action on aged females has not yet been elucidated. It was investigate, for the first time, in natural aged rats in perimenopause the time-dependent effect of MT treatment on oxidative damage and antioxidant defenses. Animals were divided into Adult-control (5 months old), Aged-baseline, Aged treated and Aged untreated. Treated groups received MT daily (20 mg/kg body weight, gavage) for two, four or six weeks, aged untreated group received water by gavage. Plasma antioxidant capacity, determined by ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, malondialdehyde levels (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) enzymes were evaluated in erythrocytes. Aged-baseline animals (17 months) had decreased FRAP and enzymatic antioxidant defenses and increased MDA when compared to Adult-control (5 months). MT treatment increased FRAP, SOD, GPx, and decreased MDA after four weeks, but did not change CAT. MT is a promising treatment to reduce the accumulation of age-related oxidative damage in erythrocytes in aged rats in perimenopause and the effect is cumulative in FRAP.

Keywords: *Ilex paraguariensis*; perimenopause; antioxidant; lipid peroxidation; aging.

ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$ = oxigênio singleto

AU = ácido úrico

CAT = catalase

CM = chá mate

Cu = Cobre

CuZn-SOD ou SOD1 = superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

DNA = ácido desoxirribonucleico

Mn-SOD2 = superóxido dismutase dependente de manganês

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EO = estresse oxidativo

ERO = espécies reativas de oxigênio

FADH_2 = flavina adenina dinucleotídeo na forma reduzida

Fe^{2+} = íon ferroso

Fe^{3+} = íon férrico

FRAP = *Ferric Reducing Antioxidant Power* (Capacidade antioxidante plasmática)

GPx = glutathione peroxidase

GSH = glutathione reduzida

GSSG = glutathione oxidada

H^+ = hidrogênio

H_2O_2 = peróxido de hidrogênio

HCl = ácido clorídrico

$\text{L}^\bullet$ = radical lipídico

LDL = lipoproteína de baixa densidade

LH = ácido graxo poli-insaturado

$\text{LOO}^\bullet$ = radical peroxila

LOOH = hidroperóxido lipídico

m.c. = massa corpórea

MDA = malonaldeído

MgSO_4 = sulfato de magnésio

Mn = manganês

Mn-SOD = superóxido dismutase dependente de manganês

NaCl = cloreto de sódio

NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida

O₂ = oxigênio molecular

O₂⁻ = ânion superóxido

OH[•] = radical hidroxila

PL = peroxidação lipídica

rpm = rotações por minuto

SOD = superóxido dismutase

SOD1 = superóxido dismutase do tipo 1

SOD2 = superóxido dismutase do tipo 2

SOD3 = superóxido dismutase do tipo 3

TBA = ácido tiobarbitúrico

TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA = ácido tricloroacético

TPTZ = 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina

Zn = zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	O processo de peroxidação lipídica.	25
Figura 2	Estrutura eletrônica de algumas espécies reativas de oxigênio.	26
Figura 3	Redução do O ₂ pela transferência univalente de elétrons e formação de intermediários reativos.	26
Figura 4	Produção de ERO em células de mamíferos.	27
Figura 5	Reação de Fenton (A) e Reação de Haber-Weiss (B).	28
Figura 6	Mecanismo de ação de antioxidantes.	29
Figura 7	Principais sistemas de defesa antioxidante <i>in vivo</i> e suas reações com ERO.	31
Figura 8	Relação entre envelhecimento e estresse oxidativo.	36
Figura 9	Grupos experimentais, acompanhamento do ciclo estral e diferentes períodos de tratamento das fêmeas adultas e velhas.	40
Figura 10	Massa corpórea ao final do experimento de ratas adultas e velhas, tratadas ou não com CM, por diferentes períodos de tempo. Valores expressos como média±erro padrão, n=10/grupo. [#]Quando comparados Velha-basal com Adulta-controle, teste t <i>Student</i>, p<0,05. sem = semanas.	45

- Figura 11 Duração do ciclo estral em ratas adultas e velhas, tratadas ou não com CM, por diferentes períodos de tempo. Valores expressos como média±erro padrão, n = 10/grupo. [#]Quando comparado Velha-basal com Adulta-controle, teste t *Student*, p<0,05. sem = semanas. 46
- Figura 12 Malonaldeído (MDA) em eritrócitos de ratas adultas e velhas, tratadas ou não com CM, por diferentes períodos de tempo. Valores expressos como média±erro padrão, n = 10/grupo. [#]quando comparado Velha-basal com Adulta-controle (teste t de *Student*); [&]quando comparado Velha-basal com Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (ANOVA, pós-teste Dunett); ^{*}quando comparado Velha tratada com Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (teste t *Student*), p<0,05. sem = semanas. 47
- Figura 13 Capacidade antioxidante plasmática (FRAP) de ratas adultas e velhas, tratadas ou não com CM, por diferentes períodos de tempo. Valores expressos como média±erro padrão, n = 10/grupo. [#]quando comparado Velha-basal com Adulta-controle (teste t de *Student*); [&]quando comparado Velha-basal e Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (ANOVA, pós-teste Dunett); ^{*}quando comparado Velha tratada com Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (teste t *Student*), p<0,05. sem = semanas. 48
- Figura 14 Ácido úrico (AU) plasmático em ratas adultas e velhas, tratadas ou não com CM, por diferentes períodos de tempo. Valores expressos como média±erro padrão, n = 10/grupo. [&]quando comparado Velha-basal com Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (ANOVA, pós-teste Dunett); ^{*}quando comparados Velha tratada com Velha não tratada, nos diferentes

períodos de tempo (teste t *Student*), $p < 0,05$. sem = semanas. 49

Figura 15 Efeito cumulativo do CM na capacidade antioxidante plasmática (FRAP) de ratas velhas tratadas, por diferentes períodos de tempo. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão, n = 10/grupo. sem= semanas. 50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Consumo de ração (g/animal/dia) e de água (mL/animal/dia) de ratas adultas e velhas, tratadas ou não com CM, por diferentes períodos de tempo. Valores expressos como média±erro padrão, n = 10/grupo. teste t *Student*, para comparação entre Velha tratada com Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo p<0,05. sem = semanas. 46
- Tabela 2 Atividade das enzimas antioxidantes em eritrócitos de ratas adultas e velhas, tratadas ou não com CM, por diferentes períodos de tempo. Valores foram expressos como média±erro padrão, n = 10/grupo. [#]quando comparado Velha-basal com Adulta-controle (teste t *Student*); [&]quando comparado Velha-basal e Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (ANOVA, pós-teste Dunett); *quando comparado Velha tratada com Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (teste t de *Student*), p<0,05. Unidades de medida: SOD (UE/mg proteína); GPx (mmol GSH/min/mg de proteína); CAT (nmol H₂O₂/min/mg de proteína). 50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 Estresse Oxidativo	24
3.2 Espécies Reativas de Oxigênio	25
3.3 Sistemas antioxidantes	29
3.4 Chás como fontes de antioxidantes naturais	32
3.5 Envelhecimento e Estresse Oxidativo	35
3.6 Eritrócitos e Estresse Oxidativo	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Chá Mate	38
4.2 Animais e grupos experimentais	38
4.2.1 Validação dos grupos experimentais	39
4.3 Preparo e análise das amostras biológicas	41
4.3.1 Determinação de Malonaldeído	41
4.3.2 Capacidade Atioxidante Plasmática – FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)	41
4.3.3 Ácido Úrico	42
4.3.4 Determinação da atividade da Superóxido Dismutase	42
4.3.5 Determinação da atividade da Glutathione Peroxidase	43
4.3.6 Determinação da atividade da Catalase	43
4.3.7 Determinação da concentração de proteínas	43
4.4 Análise Estatística	43
5 RESULTADOS	45
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	73

ANEXO 1 Certificado de Aprovação do Comitê de Ética	74
ANEXO 2 Artigo científico	75

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo (EO) é um processo resultante de um desequilíbrio entre a produção celular de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes, com a prevalência de um estado pró-oxidante (HALLIWELL, 1992). Entre as ERO de maior destaque tem-se ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e oxigênio singlete (1O_2). O sistema de defesa antioxidante enzimático é composto principalmente por superóxido dismutase (SOD), considerada a primeira linha de defesa do organismo contra ERO; catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), responsáveis por remover o H_2O_2 gerado pela SOD (JACOB et al., 2013; SCANDALIOS, 2005), além de outras moléculas endógenas, como por exemplo, glutathione e ácido úrico (AU) (ARUOMA, 1998).

O envelhecimento é um processo natural e multifatorial caracterizado por mudanças no metabolismo que comprometem o estado de homeostase (BELLANTI et al., 2013; CUI et al., 2012; KIM, 2003). O aumento global no número de pessoas acima de 60 anos, principalmente nos países subdesenvolvidos (SCAZUFCA et al., 2002) associado ao aumento da expectativa de vida não só no Brasil, mas em outros países, tem despertado o interesse dos pesquisadores na busca de novas e viáveis alternativas para minimizar os problemas advindos deste processo (DA SILVA et al., 2010).

No envelhecimento observa-se uma maior formação de ERO e redução da defesa antioxidante, o que resulta em acúmulo de danos oxidativos e consequentemente aumento progressivo dos riscos de morbidade e mortalidade por doenças associadas ao aumento e à cronicidade do EO (CALABRESE et al., 2004; YANG et al., 2001; HARMAN, 2006; JUNQUEIRA et al., 2004; LAURENT et al., 2008; LEE; WEI, 2007; MONAGHAN et al., 2009; PANDEY, RIZVI, 2010). Em fêmeas esse acúmulo torna-se maior na perimenopausa (ZITFANOVA et al., 2011), período que antecede ao final da vida reprodutiva e que é marcado por diversas alterações metabólicas (KERMATH, GORE, 2012).

Muitas das doenças associadas ao EO resultam da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados de membranas biológicas. Esse processo, denominado peroxidação lipídica (PL), afeta não só a fluidez, como também o transporte de íons

e atividade de enzimas, comprometendo assim a função celular (AYALA et al., 2014; CHIU et al., 1989; SANGUEETA, et al., 2005).

A membrana do eritrócito pode ser comparada com a membrana plasmática das células eucarióticas, em relação à estrutura e função (NIKI, 2009), sendo altamente sensível ao dano oxidativo (PANDEY, RIZVI, 2010). Isso torna os eritrócitos um modelo celular intensamente utilizado para investigar danos oxidativos associados à idade e outras condições, e também possíveis intervenções com diferentes produtos naturais antioxidantes, *in vivo* e *in vitro* (WIDÉN et al., 2012; SANGUEETA et al., 2005; XU et al., 2014).

Na tentativa de minimizar o acúmulo de danos oxidativos durante o envelhecimento têm sido consideradas estratégias capazes de melhorar a atividade antioxidante enzimática (HALLIWELL, 2012), o que pode ser feito por meio da dieta (JUNQUEIRA et al., 2004). A utilização de produtos naturais ricos em polifenóis reduz danos oxidativos relacionadas à idade em diferentes organismos, tecidos e também nos eritrócitos (ANGELONI et al., 2012; QUEEN, TOLLEFSBOL, 2010; YODIN et al., 2000).

Destaca-se dentre esses produtos a erva-mate (*Ilex paraguariensis*), planta nativa da América do Sul, com elevada capacidade antioxidante, amplamente consumida nesse continente, após diferentes formas de preparo (chimarrão, tereré e chá) e que vem ganhando rápida penetração no mundo inteiro (HECK, MEJLA, 2007; DA SILVA et al., 2008). Nos últimos anos vários estudos têm demonstrado que o chá mate (CM), em diferentes doses, promove melhora em marcadores do EO em diversos tecidos (ARÇARI et al., 2011; BOAVENTURA et al., 2012; DA SILVA et al., 2008; MARTINS et al., 2009), porém, os efeitos em eritrócitos de fêmeas na perimenopausa necessitam ser elucidados.

Como citado anteriormente, a perimenopausa é marcada pelas irregularidades no ciclo reprodutivo e antecede à menopausa, período no qual ocorrem profundas modificações na defesa antioxidante e maior acúmulo de dano oxidativo. Entender essas modificações e propor alternativas naturais que possam preveni-las ou minimizá-las ainda na fase da perimenopausa pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias que resultem em melhor qualidade de vida para mulheres após a menopausa. Essa constatação, associada à total inexistência de

informações a cerca das ações do CM em função do tempo de tratamento na perimenopausa, levou à proposição deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi investigar em eritrócitos e no plasma de ratas velhas na perimenopausa, o efeito de diferentes tempos de tratamento (duas, quatro e seis semanas) com CM no dano oxidativo e na defesa antioxidante enzimática.

A literatura apresenta dados conflitantes quando são avaliados parâmetros do EO em fêmeas e em muitos dos trabalhos o período da vida reprodutiva não é levado em consideração. Portanto, foi também objetivo deste trabalho avaliar não só os efeitos do tratamento com CM, como também as possíveis variações resultantes do envelhecimento nas fêmeas na perimenopausa.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a capacidade antioxidante plasmática pelo método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) em fêmeas velhas, após o tratamento com CM na dose de 20 mg/kg de m.c., por duas, quatro e seis semanas;
- Avaliar se o tratamento com CM é capaz de promover alterações no dano oxidativo aos lipídeos, por meio da determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), mais especificamente o MDA;
- Verificar as alterações na atividade de enzimas antioxidantes, CAT, SOD e GPx, resultantes do tratamento com CM por diferentes períodos de tempo;
- Observar qual o tempo de tratamento com CM necessário para que ocorra alteração dos parâmetros acima e a existência ou não de efeito cumulativo;
- Averiguar a ocorrência de mudanças nos parâmetros do EO ao longo do tempo, nas fêmeas não tratadas com CM.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Estresse Oxidativo

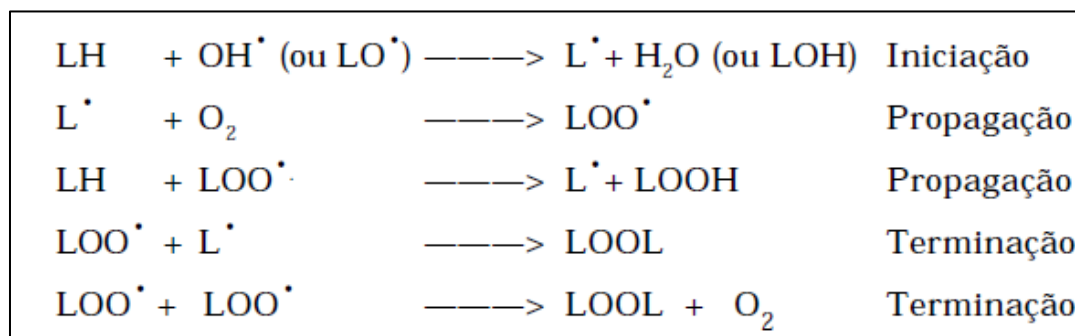
Inicialmente o EO foi definido como um desequilíbrio entre a formação de ERO e as defesas antioxidantes (SIES, 1985), o que pode ocorrer tanto por aumento na formação dessas espécies quanto pela redução das defesas (BERRA et al., 2006; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2007). Mais recentemente EO passou a ser referido como um processo que resulta de “uma interrupção da sinalização redox e de seu controle” (JONES, 2006).

Este processo é responsável por danos oxidativos em macromoléculas (carboidratos, lipídios, proteínas e DNA), e acarreta em drásticas consequências nos diversos sistemas biológicos. Podem ocorrer alterações em vias de sinalização e de transcrição (FONCEA et al., 2000), aumento da proliferação celular e até mesmo morte celular em decorrência do EO (SCHRINER et al., 2005; BARREIROS et al., 2006).

A peroxidação dos lipídeos das membranas é um dos indicadores mais utilizados para estudos de dano oxidativo (BEZERRA et al., 2004; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010) e consiste, de uma maneira geral, no ataque principalmente dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas plasmáticas por ERO, especialmente $\text{OH}^\bullet$, pela retirada de H^+ de um carbono e inserção de O_2 , resultando na formação de hidroperóxidos. A partir daí, serão desencadeadas reações em cadeia que vão potencializar os danos oxidativos (AYALA et al., 2014).

A PL pode ser dividida nas fases de iniciação, propagação e terminação (Figura 1). Nesse processo há o sequestro do H^+ do ácido graxo poli-insaturado (LH) da membrana celular por $\text{OH}^\bullet$ ou radical alcóxila ($\text{LO}^\bullet$), levando à formação de radical lipídico ($\text{L}^\bullet$). Este por sua vez interage com O_2 , formando radical peróxila ($\text{LOO}^\bullet$), substância altamente instável, que sequestrará outro hidrogênio de outro ácido graxo poli-insaturado, formando novamente $\text{L}^\bullet$ e hidroperóxido lipídico (LOOH), dando continuidade à reação em cadeia.

Figura 1. O processo de peroxidação lipídica.



Fonte: FERREIRA, MATSUBARA, 1997.

Embora alguns dos produtos da PL sejam de fundamental importância em processos inflamatórios, quando em excesso estão estreitamente relacionados com o envelhecimento, a doença de Alzheimer, aterosclerose, cardiopatia, osteopenia e câncer (CALABRESE et al., 2004; PANDEY, RIZVI, 2010; SAMPAIO, DE MORAIS, 2010; YANG et al., 2001).

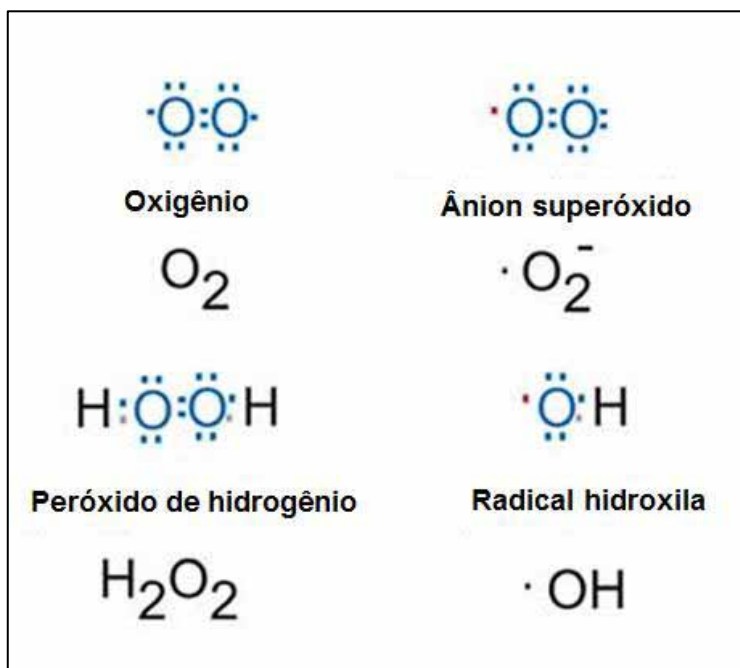
Os $L^{\bullet}$ formados na PL podem sofrer decomposição, formando aldeídos, como o malonaldeído (MDA), altamente tóxico (NIKI, 2012) e mutagênico ao organismo. O MDA pode interagir com biomoléculas, como proteínas e DNA, formando adutos, que, se não reparados vão ocasionar os processos patológicos já citados acima (AYALA et al., 2014). MDA é um biomarcador do EO frequentemente utilizado, nos mais variados tipos de estudos descritos na literatura (POSADAS et al., 2009; RAMESH et al., 2012).

3.2 Espécies Reativas de Oxigênio

As ERO são produzidas durante o metabolismo celular normal, sendo amplamente encontradas nos sistemas biológicos. Embora recebam essa denominação geral, essas espécies podem ser diferenciadas em radiculares ou não radiculares. As primeiras são altamente reativas por apresentarem na última camada eletrônica número ímpar de elétrons, o que gera um campo magnético, que irá facilitar reações com qualquer molécula próxima. Já as espécies não-radicalares possuem elevada reatividade decorrente da troca de elétrons que podem promover entre diferentes moléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Entre as ERO de

maior destaque (Figura 2) tem-se o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (ARUOMA,1998).

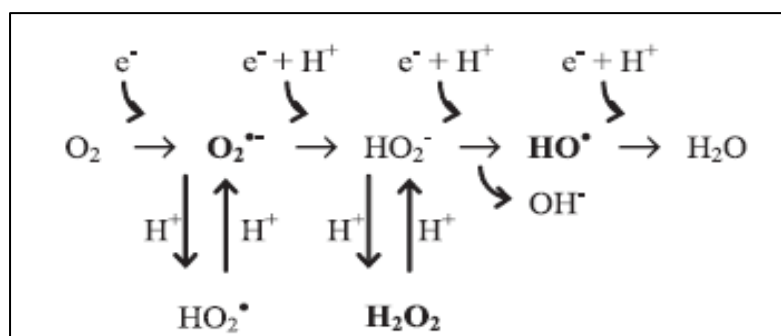
Figura 2. Estrutura eletrônica de algumas espécies reativas de oxigênio.



Fonte: Adaptado de [http:// www.biotek.pt/pt/resources/articles/reactive-oxygen-species.html](http://www.biotek.pt/pt/resources/articles/reactive-oxygen-species.html)

A produção das ERO pode ocorrer por meio de reações de redução monovalente do O_2 (Figura 3), por diferentes vias.

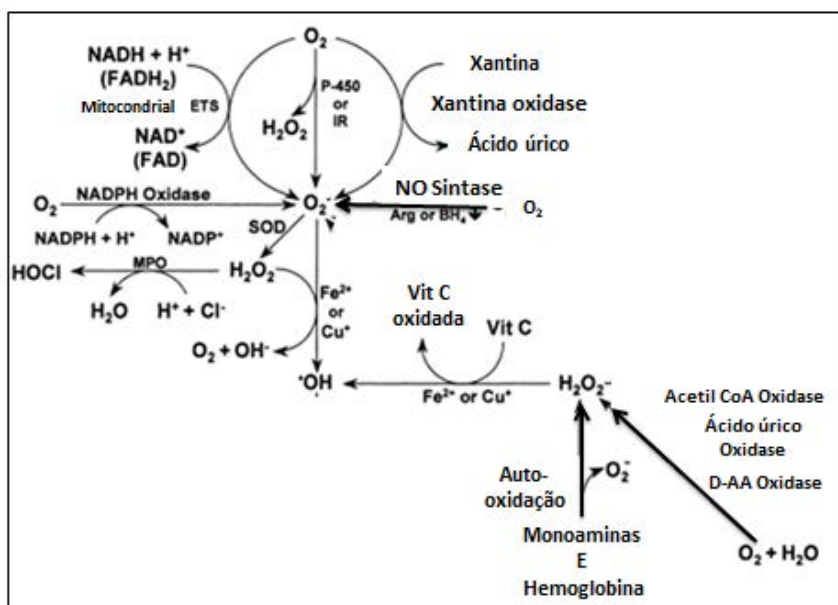
Figura 3. Redução do O_2 pela transferência univalente de elétrons e formação de intermediários reativos.



Fonte: GUARATINI et al., 2007.

O $O_2^{\cdot -}$ pode ser produzido na oxidação do NADPH pelas NADPH oxidases; oxidação de xantina ou hipoxantina, catalisada pela xantina oxidase; oxidação de equivalentes redutores, como NADH e $FADH_2$, via cadeia de transporte de elétrons mitocondrial; auto oxidação das mono aminas dopamina, epinefrina e norepinefrina, flavina e hemoglobina, na presença de quantidades traço de metais de transição; redução mono eletrônica do O_2 pelo sistema P_{450} e redução mono eletrônica do O_2 pelas oxido nítrico sintases, na deficiência de arginina ou tetraidropteridina. As vias de produção de $O_2^{\cdot -}$ estão representadas na Figura 4. Esta espécie, que pode dar origem a $OH^{\cdot}$, é capaz de atacar os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares e o DNA (WINTERBOURN, KETTLE, 2003).

Figura 4. Produção de ERO em células de mamíferos.

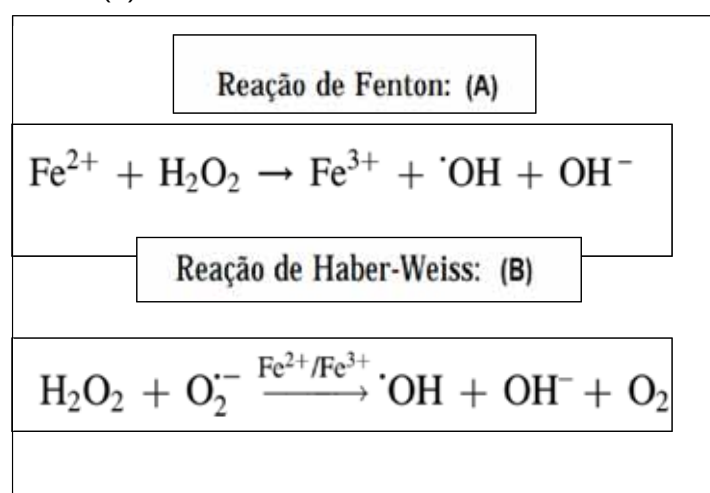


AA=aminoácidos; Arg=L-arginina; BH4=(6R)-5,6,7,8,tetrahydro-L-biopterina; ETS=sistema de transporte de elétrons; FAD=flavina adenina dinucleotídeo (oxidada); $FADH_2$ =flavina adenina dinucleotídeo (reduzida); H_2O_2 =peróxido de hidrogênio; HOCl=ácido hipocloroso; H^+ =hidrogênio; IR=radiação ionizante; MPO=mieloperoxidase; NAD^+ =nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada); NADH= nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida); $NADP^+$ =nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada); NADPH=nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida); $O_2^{\cdot -}$ =ânion Superóxido; $OH^{\cdot}$ =radical hidroxila; P-450=citocromo P-450; SOD=superóxido dismutase; Vit C= vitamina C. Fonte: Adaptado de FANG et al., 2002

O H_2O_2 é produzido em peroxissomos, mitocôndrias e membranas celulares pela dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$, por ação das SOD. Essa espécie também é formada através da redução do O_2 por dois elétrons, via citocromo P_{450} ; D-aminoácido oxidase, acetil coenzima A oxidase ou AU oxidase (FANG et al., 2002). É uma espécie não radicalar e por este motivo não apresenta reatividade significativa. Seu efeito nocivo provém do grande potencial que apresenta em transpor membranas celulares por difusão simples, podendo ocasionar danos ao DNA. Além disso, é precursor do $\text{OH}^{\cdot}$, na reação de Fenton. Embora potencialmente nociva essa espécie atua na ativação do fator nuclear de transcrição kappa-B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$), importante mediador de processos inflamatórios (SIES et al., 2014).

O $\text{OH}^{\cdot}$ é considerado é uma das espécies mais deletérias ao organismo, em virtude de sua alta capacidade em reagir com qualquer molécula biológica. Possui meia vida curta e não existe um mecanismo de defesa específico para sua remoção (VASCONCELOS et al., 2007). Sua produção ocorre principalmente através da reação de H_2O_2 com metais de transição, como por exemplo, cobre ou ferro, através das reações de Fenton e de Haber-Weiss (Figura 5) ou por ação da radiação ionizante na água. O $\text{OH}^{\cdot}$ ataca rapidamente a cadeia lateral de diversos aminoácidos e proteínas, promovendo a inclusão de um radical ou remoção de H^+ (BARREIROS et al., 2006), o que pode resultar em perda de atividade de enzimas e consequentemente morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Figura 5. Reação de Fenton (A) e reação de Haber-Weiss (B).



Fonte: Adaptado de CHEN, SCHOPFER, 1999.

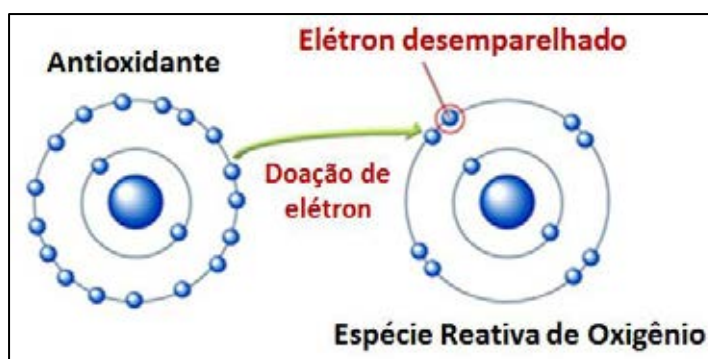
O $^1\text{O}_2$ consiste na forma excitada eletronicamente do oxigênio molecular, por meio de reações de fotossensibilização ou reações enzimáticas. Não possui elétrons desemparelhados na última camada (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), mas é altamente reativo, podendo dar início ao processo de PL (AYALA et al., 2014).

Embora causem efeitos deletérios quando em excesso, concentrações adequadas de ERO são essenciais para os processos de proliferação, diferenciação e apoptose de células, além da fagocitose (VASCONCELOS et al., 2007). Por este motivo, a manutenção de concentrações fisiológicas de ERO é fundamental, e mecanismos que evitem o excesso dessas espécies e/ou que reparem danos resultantes desse excesso são fundamentais (POLJSK et al., 2013).

3.3 Sistemas antioxidantes

São denominadas antioxidantes “substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas às do substrato oxidável, regeneram o substrato ou previnem significativamente a oxidação do mesmo” (HALLIWELL, 1991). Para tanto, agem interrompendo a cadeia de reação por meio da doação de elétrons ou de hidrogênio (Figura 6), levando à formação de ERO de conformações mais estáveis, ou retardando o processo de PL (DE ANGELIS; TIRAPEGUI, 2007). Dessa forma, são capazes de prevenir ou minimizar a ocorrência dos danos oxidativos às biomoléculas e estruturas celulares (BRIGELIUS-FLOHE, 1999; HALLIWELL, 1991; TIRAPEGUI, 2006; RATNAM et al., 2006), bem como reparar os danos já instalados (SIES, 1993).

Figura 6. Mecanismo de ação de antioxidantes.



Fonte: Adaptado de http://healthyprotocols.com/2_antioxidant.htm

Constituem parte desse sistema de defesa antioxidante as enzimas SOD, CAT e GPx. As SODs (EC 1.15.1.1) são metaloenzimas que catalisam a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , aumentando de forma significativa a velocidade da reação (BOWLER et al., 1992). São consideradas como uma das primeiras linhas de defesa contra ERO. Sua capacidade antioxidante foi demonstrada pela primeira vez por meio de estudos realizados por McCord e Fridovich, em 1969. Estas enzimas podem conter diferentes íons em seus sítios ativos, como cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe). As isoformas mais estudadas até o momento são as dependentes de cobre e zinco (CuZn-SOD ou SOD1), encontrada principalmente no citosol e a dependente de manganês (Mn-SOD ou SOD2), presente na matriz mitocondrial. A SOD3, também dependente de cobre e zinco, sendo relatada principalmente em pulmão, extracelularmente (ZELKO et al., 2002).

A CAT (EC 1.11.1.6) é uma enzima que apresenta em seu sítio ativo o grupo heme. Sua função é catalisar a conversão do H_2O_2 formado na reação de dismutação da SOD em H_2O e O_2 (GAETANI et al., 1996). A CAT é encontrada principalmente em peroxissomos, principal organela responsável pela detoxificação celular (VASCONCELOS et al., 2007). Embora seja encontrada em diversos órgãos, possui elevada atividade em eritrócitos e fígado (DJORDJEVIC, 2004). A diminuição da atividade dessa enzima pode comprometer todo sistema antioxidante enzimático, pois o H_2O_2 pode acarretar também inibição da atividade de SOD, podendo elevar os níveis de $O_2^{\cdot -}$ (BAKALA et al., 2012). CAT é uma enzima que possui baixa afinidade para H_2O_2 , sendo mais útil na eliminação de H_2O_2 em concentrações mais elevadas (SANZ et al., 2006).

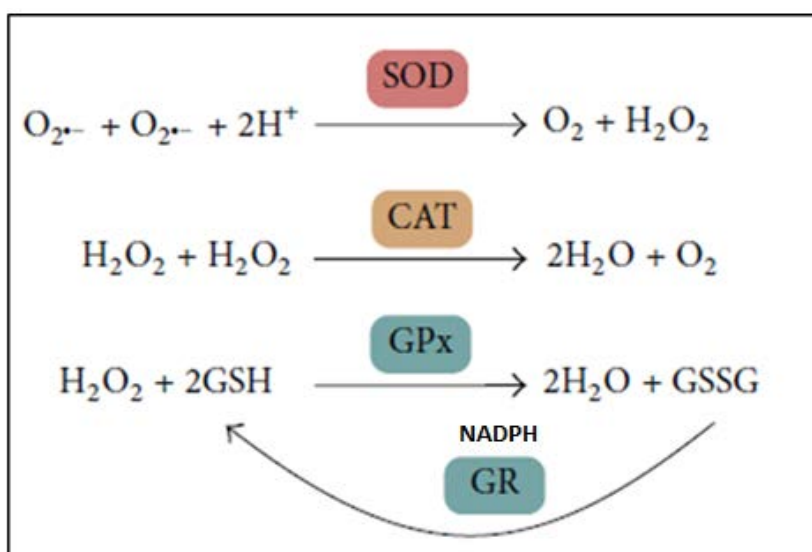
A GPx (EC 1.11.1.9) tem como grupo prostético o selênio e faz parte da família das peroxidases. Até o momento foram identificadas quatro isoformas de GPx, em sítios diversos. A isoforma 1 está presente no citosol das células; a 2 é específica do trato gastrointestinal; a 3 foi descrita no plasma, pulmão e leite materno, enquanto que a isoforma 4 apresenta-se nas membranas e lipoproteínas (BIANCHI, ANTUNES, 1999). Essa família de enzimas é responsável pela degradação do H_2O_2 e de outros peróxidos, com formação de água e álcool, à custa da oxidação da glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG), com

participação de NADPH. GPx possui alta afinidade por H_2O_2 , sendo importante em baixas concentrações de H_2O_2 (SANZ et al., 2006).

A GSSG deve retornar ao estado GSH, para não haver acúmulo do primeiro e favorecimento de uma situação oxidante, por ação de outra enzima antioxidante, denominada glutathiona redutase (GR), que reduz GSSG à custa de NADPH, regenerando GSH (VASCONCELOS et al., 2007).

As ações dessas enzimas antioxidantes estão representadas na Figura 7.

Figura 7. Principais sistemas de defesa antioxidante *in vivo* e suas reações com ERO.



Fonte: Adaptado de PENG et al., 2014.

Além do sistema antioxidante composto por enzimas, há também um sistema não enzimático, composto por moléculas endógenas ou não, dentre as quais, glutathiona (GSH), tocoferóis, ascorbato, AU, β -caroteno e flavonóides (VERGANI et al., 2004).

Por meio da dieta, diferentes antioxidantes naturais podem ser obtidos e a importância dos mesmos na prevenção de doenças relacionadas ao EO deve ser cada vez mais considerada (TIRAPEGUI, 2006). Segundo Halliwell (2004) “nossas defesas antioxidantes são inadequadas em prevenir por completo danos oxidativos”, portanto, a necessidade da ingestão de antioxidantes pela dieta, com o intuito de complementar as defesas antioxidantes endógenas é um fato bem estabelecido na literatura. Porém, levando-se em conta que ERO necessitam estar presentes em

concentrações fisiológicas para a manutenção da saúde, a suplementação com antioxidantes precisa ainda ser exaustivamente estudada. Embora existam na literatura muitos estudos com antioxidantes naturais, ainda é necessária a definição da dose e de tempo de tratamento, antes de sua utilização indiscriminada e em larga escala pela população.

No plasma, a capacidade antioxidante está relacionada não só aos compostos endógenos como também aos antioxidantes provenientes da dieta, sendo de extrema importância estudar este parâmetro e correlacioná-lo com outros marcadores do EO (CAO, et al., 1998). O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) é utilizado rotineiramente para determinação da capacidade antioxidante não só do plasma, como também de sucos, chás e outras bebidas. Por sua facilidade de execução e confiabilidade tem sido um método bastante empregado em estudos que buscam avaliar mudanças decorrentes do envelhecimento (LÓPEZ-ALARCÓNA, DENICOLAB, 2013).

3.4 Chás como fontes de antioxidantes naturais

Os chás são bebidas muito antigas e consumidas em larga escala no mundo inteiro. Há relatos de seu consumo desde 27 a.C (de MORAIS et al., 2009). Diversos estudos demonstram os efeitos benéficos de chás preparados a partir de diferentes espécies, principalmente em relação ao EO, como os chás verde e branco (*Camelia sinensis*) (KUMAR et al., 2012; VESTER et al., 2014). Seus benefícios são atribuídos principalmente aos polifenóis presentes nestes chás, que atuam como agentes redutores, doando H^+ e inibindo a PL, além de elevarem a defesa antioxidante enzimática (FANG et al., 2002; SIES, 2007).

A *Ilex paraguariensis* St. Hillaire, família *Aquifoliaceae*, conhecida como erva mate ou apenas mate, pertence à classe dicotiledônea. Trata-se de uma árvore perene nativa da América do Sul, que pode atingir até 18 metros de altura. Sua classificação botânica foi feita pelo naturalista francês Auguste Saint Hilare e registrada no museu de História Natural em Paris, no ano de 1822 (FERRARI, 2006). O termo *paraguariensis* parece ter sido incorporado ao nome pelo fato dessa espécie ter sido descrita pela primeira vez no Paraguai (OLIVEIRA, ROTTA, 1985).

A erva mate é ingerida há mais de centenas de anos, em diferentes formas de bebidas, como chimarrão, tereré e CM. Para o preparo de chimarrão e tereré a erva deve passar pelos processos de sapeco, secagem e cancheamento, descritos abaixo (BASTOS, TORRES, 2003). Nessas formas de consumo são preparadas infusões em diferentes temperaturas, sendo o chimarrão preparado e consumido com água quente e o tereré com água gelada. Ambos são servidos em cuias e ingeridos com auxílio de bomba de metal (BASTOS, TORRES, 2003). Já o CM é preparado a partir da infusão a quente das folhas secas e picadas da erva mate tostada, o que resulta em um chá com peculiar sabor amargo, muito admirado na América do Sul (MIRANDA et al., 2008). Para se chegar ao CM, a erva deve ser beneficiada por um processo mais detalhado que o utilizado para o chimarrão e tereré, composto pelas etapas descritas abaixo:

1. Colheita: são colhidas as melhores folhas e hastes, que serão ensacadas e pesadas para passarem às próximas etapas;
2. Branqueamento ou Sapeco: as folhas são expostas a altas temperaturas (aproximadamente 500°C) em fogo ou através do contato com madeira queimada. Esse processo, que dura até 3 minutos, tem por finalidade evitar a oxidação das folhas, por inativação das polifenóis oxidases;
3. Secagem ou Barbaqua: as folhas são colocadas em câmaras com calor (100°C) ou fumaça de madeira queimada e há redução da umidade das mesmas (12% para 4,5%), processo que dura em torno de 8 a 24 horas;
4. Envelhecimento ou Cancheamento: o produto seco é posto para envelhecer em câmaras de cimento ou cedro, processo que pode durar até 12 meses, sendo o responsável pelo sabor característico da erva;
5. Acondicionamento: o produto é moído antes de ser embalado para comercialização (HECK, MEJLA, 2007).

Comercialmente a erva mate para o preparo do chá pode ser adquirida a granel, em sachês individuais ou ainda na forma solúvel, produzida industrialmente a partir do contato do extrato aquoso obtido da erva com o ar quente (BASTOS, TORRES, 2003). Diferenças relativas ao tipo de processamento podem causar alterações na composição do produto, além de determinar a capacidade antioxidante do mesmo (BURRIS et al., 2012; ISOLABELLA et al., 2010).

Estima-se que cerca de 30% da população sul-americana consuma em torno de um litro por dia de qualquer uma das bebidas produzidas a partir da erva mate (FILIP et al., 2001). No Brasil, considerado o segundo maior produtor mundial de mate, o consumo per capita é em torno de 1,2 kg/ano. Ocupando importante papel econômico e cultural em países como Argentina, Paraguai, Uruguai e no sul do Brasil, essa erva vem conquistando consumidores nos Estados Unidos e Europa (HECK, MEJLA, 2007).

A erva apresenta superioridade em relação às outras, devido à grande variedade de nutrientes e substâncias bioativas em sua composição, com importantes atividades biológicas e farmacológicas (DA SILVA et al., 2008). Possui grande quantidade de vitaminas (A, B, C, E) e de minerais (Potássio, Magnésio, Cálcio, Manganês, Ferro, Selênio, Fósforo e Zinco) (GOSMANN et al., 2012; HUSSEIN et al., 2011), além de compostos fenólicos, como flavonóides (quercetina e rutina) e ácidos polifenólicos, como o clorogênico e seus derivados. Possui ainda elevadas quantidades de metilxantinas, dentre elas a cafeína, que confere ao mesmo a propriedade estimulante, e saponinas que são responsáveis pelo sabor amargo (PAGLIOSA et al., 2010; PEREIRA et al., 2009). A atividade antioxidante do CM é superior à demonstrada pelo chá verde (*Camellia sinensis*) (VANDERJAGT et al., 2002).

A erva mate mostra-se benéfica em uma ampla variedade de situações, auxiliando no controle do ganho de peso e da adiposidade (HUSSEIN et al., 2011), modulando a atividade da enzima paraoxonase-2 (FERNANDES et al., 2012), melhorando a tolerância à glicose em ratos obesos (PEREIRA et al., 2012) e aumentando a expressão de genes, cujos produtos estão envolvidos na termogênese (ARÇARI et al., 2011). Age também na modulação de processos inflamatórios e inibindo a oxidação da lipoproteína de densidade muito baixa-LDL (DE MORAIS et al., 2009; GUGLIUCCI; GUGLIUCCI et al., 1996; STAHL, 1995; RESENDE et al., 2012).

Além das ações já citadas, a erva mate induz a expressão gênica de enzimas antioxidantes (YEH, YEN, 2006) e neutraliza H_2O_2 , protegendo ainda as membranas contra a PL (SCHINELLA et al., 2000). Apresenta efeito protetor contra a lise de eritrócitos induzida pelo H_2O_2 (PERALTA et al., 2012), mostrando-se como uma

opção muito viável na prevenção de danos decorrentes do EO, devido ao fácil acesso à população e ao seu baixo custo. Em trabalho inédito desenvolvido recentemente em nosso laboratório o tratamento crônico com CM (oito semanas) mostrou-se eficiente em reduzir marcadores do EO em eritrócitos, fígado e no pâncreas em ratas velhas (PEREIRA, 2013).

3.5 Envelhecimento e Estresse Oxidativo

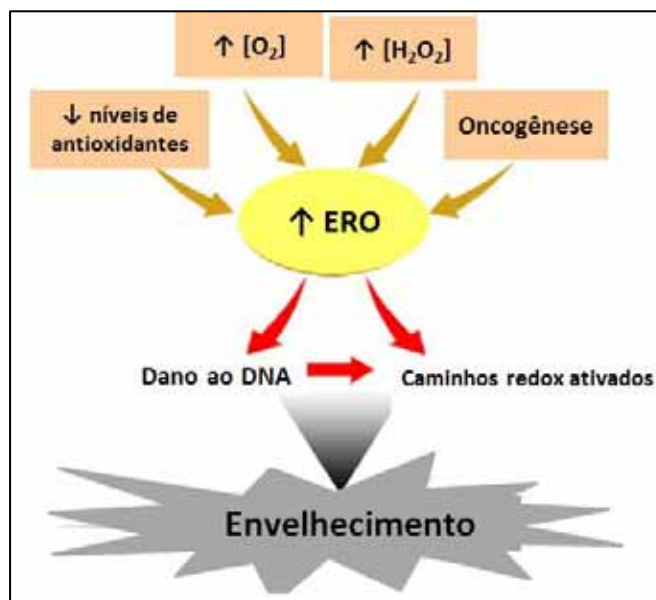
O envelhecimento é um processo biológico natural, multifatorial, complexo e inevitável, caracterizado por declínio das funções fisiológicas celulares (BELLANTI et al., 2013), mudanças na composição bioquímica dos tecidos e comprometimento da homeostase do organismo (KIM, 2003). Diversas teorias foram propostas para explicar esse processo, dentre elas a que o relaciona ao acúmulo de danos oxidativos, descrita pela primeira vez por Harman (1956) é uma das mais bem aceitas até os dias atuais (MEDVEDEV, 1990). Desde então, diversos são os estudos que reforçam essa teoria, demonstrando claramente a relação entre o envelhecimento e o aumento de danos oxidativos, nos mais variados tipos de tecidos (JHA, RIZVI, 2009; KASAPOGLU, OZBEN 2001; KAWAMOTO et al., 2013; UZUN et al., 2013).

Durante o envelhecimento instala-se um estado crônico de EO, decorrente de inúmeros fatores, dentre os quais a maior formação de ERO em diferentes órgãos e tecidos, que aparece como uma das causas do aumento progressivo de morbidade e mortalidade (LEE; WEI, 2007; HARMAN, 1981). Dentre as ERO produzidas em maior quantidade no envelhecimento destaca-se o H_2O_2 formado na mitocôndria (ALMADA FILHO, 2002).

Contribuindo para a manutenção do estado crônico de EO no envelhecimento tem-se ainda a diminuição das defesas antioxidantes (INAL et al., 2001; JUNQUEIRA et al., 2004). As atividades da SOD, CAT e GPx alteram de forma negativa com o avançar da idade (MANIKONDA; JAGOTA, 2012). Além da redução na defesa enzimática, observa-se também menor capacidade antioxidante no plasma (MAURYA; RIZVI, 2010). A redução da defesa antioxidante também tem sido atribuída à menor ingestão e/ou absorção de alimentos fontes de antioxidantes

(POLJSK et al., 2013). Na Figura 8 é representada a relação entre o envelhecimento e o EO.

Figura 8. Relação entre Envelhecimento e estresse oxidativo.



Fonte: Adaptado de LU, FINKEL, 2008.

Os danos oxidativos em diferentes tecidos e estruturas de fêmeas são acentuados na perimenopausa (ZITFANOVA et al., 2011), período de transição para a senescência reprodutiva, caracterizado por alterações nos ciclos reprodutivos e diversas outras mudanças metabólicas (KERMATH, GORE, 2012). Nessa fase ocorrem alterações hormonais que induzem a mudanças no perfil lipídico e outras alterações bioquímicas, que podem preceder doenças cardiovasculares e osteoporose. Após a menopausa o maior dano oxidativo persiste e está associado à diminuição das defesas antioxidantes (NIKI, NAKANO, 1990; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, 2012). Portanto, elevar a defesa antioxidante nessas fases da vida de fêmeas seria uma estratégia importante na tentativa de conter a instalação dos danos oxidativos, num período em que as doenças relacionadas à idade tornam-se mais evidentes (VICTORINO et al., 2013).

3.6 Eritrócitos e Estresse Oxidativo

As células sanguíneas são encontradas em abundância no organismo humano. Embora possuam um eficiente sistema de defesa antioxidante, sofrem com elevada frequência danos oxidativos (JACOB et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2007), pela contínua exposição ao O₂ e às ERO, produzidas durante a oxidação da hemoglobina (SANGEETHA et al., 2005). Suas membranas são altamente sensíveis ao dano oxidativo (PANDEY; RIZVI, 2010) e em termos de estrutura e função podem ser comparadas à membrana plasmática das células eucarióticas (NIKI, 2009). São capazes de refletir a sensibilidade geral do organismo às condições oxidativas (SANGEETHA et al., 2005), sendo frequentemente utilizados para investigar a ocorrência de danos oxidativos associados à idade (PANDEY, RIZVI, 2013) e possíveis intervenções com diferentes produtos naturais antioxidantes (WIDÉN et al., 2012).

A redução da capacidade antioxidante plasmática e da defesa antioxidante enzimática em ratos e humanos, situações comuns no envelhecimento, resultam em dano oxidativo lipídico na membrana eritrocitária (JHA, RIZVI, 2009; RIZVI et al., 2006; SANGEETHA et al., 2005), que muitas vezes podem ser reduzidos com o uso de antioxidantes naturais (POSADAS et al., 2009; RAMESH et al., 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Chá mate

Durante todo o experimento foi utilizado um único lote de CM solúvel (Leão Júnior, Curitiba-PR, Brasil). A capacidade antioxidante foi previamente estimada pelo método FRAP, em 534,67 mmol/L, assim como a concentração de polifenóis (113,37 mg/g do produto utilizado), determinada pelo método de Folin-Ciocalteau (WILEY, SONS, 2002). Também foi confirmada a presença dos polifenóis ácido clorogênico (ácido cis 3-o-cafeoil quínico), ácido 5-o-p-cumaroil quínico, ácido 3-o-feruloilquínico, ácido 4-o-cafeoil-5-o-p-cumaroil quínico e ácido 4,5-di-o-cafeoilquínico (PEREIRA, 2013), considerados os principais antioxidantes do CM (BURRIS et al., 2012; FILIP et al., 2001). Todas as análises do CM foram parte de um trabalho anteriormente realizado no laboratório (PEREIRA, 2013). Diariamente, para o tratamento dos animais, o CM foi dissolvido em água destilada, na temperatura de 80°C, seguindo as instruções do fabricante.

4.2 Animais e grupos experimentais

Foram obtidas do Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP/Campus de Araçatuba, 10 fêmeas adultas (quatro meses de idade) e 70 fêmeas velhas (16 meses de idade) de *Rattus novogicus albinus*, variedade Wistar. Os animais (cinco por caixa) permaneceram durante todo o período experimental no biotério do Departamento de Ciências Básicas, em ambiente com temperatura controlada ($22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar entre $55\pm 10\%$, ciclo claro/escuro de 12 horas. Água e ração padrão (Labina, Purina Brasil) foram disponibilizadas *ad libitum* e os consumos verificados diariamente. A massa corpórea foi avaliada semanalmente. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FOA-UNESP (processo FOA-00462-2013, ANEXO 1). Foram estabelecidos os seguintes grupos e períodos experimentais:

Grupo **Adulta-controle**: fêmeas adultas (quatro meses de idade), com ciclo estral regular; morte aos 5 meses;

Grupo **Velha-Basal**: fêmeas velhas (16 meses de idade); com ciclo estral irregular, morte aos 17 meses;

Grupo **Velha não tratada**: fêmeas velhas (16 meses de idade), com ciclo estral irregular, que ao completarem 17 meses passaram a receber água por gavagem (volume máximo 0,5 mL/dia) durante duas, quatro ou seis semanas. A morte ocorreu nas idade de 17,5; 18 e 18,5 meses, respectivamente;

Grupos **Velha tratada**: fêmeas velhas (16 meses de idade), com ciclo estral irregular, que ao completarem a idade de 17 meses, passaram a receber CM (20 mg/kg m.c./dia, volume máximo 0,5 mL) por gavagem, durante duas, quatro ou seis semanas. A morte ocorreu nas idade de 17,5; 18 e 18,5 meses, respectivamente.

4.2.1 Validação dos grupos experimentais

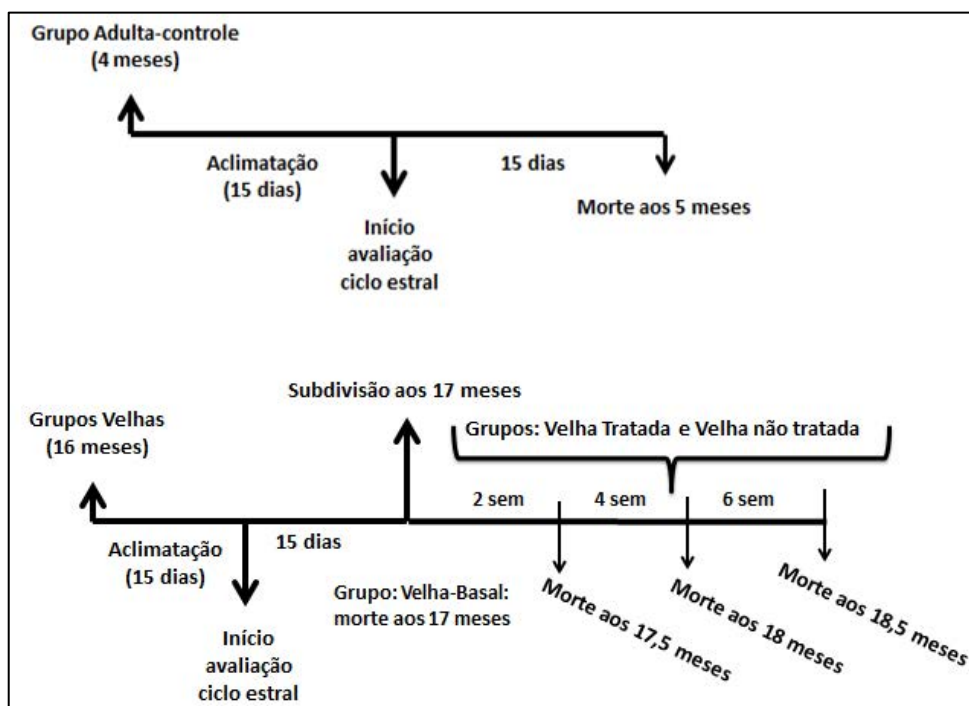
O ciclo reprodutivo de roedores, denominado ciclo estral, tem duração média de quatro ou cinco dias, e apresenta quatro fases, denominadas proestro, estro, metaestro e diestro, que podem ser diferenciadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal (LE FEVRE, MCCLINTOCK, 1988). Na fase de proestro há predominância de células epiteliais nucleadas; no estro de células anucleadas disformes; no metaestro ocorrem proporções equivalentes de leucócitos, células disformes e células epiteliais nucleadas enquanto, que o diestro é caracterizado pela predominância de leucócitos (LONG, EVANS, 1922; MARCONDES et al., 2002).

Para garantir que as fêmeas em cada grupo estavam na mesma fase reprodutiva, a duração do ciclo estral, foi monitorada diariamente após o período de aclimação e durante todo o experimento, através da análise citológica do esfregaço da secreção vaginal, com uso de microscópio ótico Zeiss® (LE FEVRE, MCCLINTOCK, 1988). A coleta do material foi feita com pipeta de plástico, após a instilação de 10 µL de NaCl 0,9% (m/v). Foram adotados cuidados para não haver estimulação da cérvix uterina, durante o procedimento. Assim que retirado, o material foi colocado sobre lâmina para realização de análise citológica.

No grupo Adulta-controle foram utilizadas apenas fêmeas com ciclos regulares, com duração de 4-5 dias. Nos demais grupos, fêmeas com ciclos irregulares e duração superior a quatro ou cinco dias foram permitidas. As alterações constatadas na duração e ritmo do ciclo estral das fêmeas velhas caracterizam o período denominado periostropausa, que equivale a perimenopausa em mulheres. (CHEN et al., 2013; KERMATH, GORE, 2012). Para padronização de nomenclatura, neste trabalho optou-se por utilizar o termo perimenopausa em substituição à periostropausa, como vem sendo feito por alguns autores (CHEN et al., 2013; SU et al., 2013).

A morte dos animais se deu por exsanguinação, por meio de punção cardíaca, após anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/kg de m.c.), estando os animais em jejum de 12 horas. Todo o processo de seleção e tratamento de animais está descrito na Figura 9.

Figura 9. Grupos experimentais, acompanhamento do ciclo estral e diferentes períodos de tratamento das fêmeas adultas e velhas.



4.3 Preparo e análise das amostras biológicas

O sangue obtido por punção cardíaca foi colocado em tubos com heparina e centrifugado (3.000 rpm, 15 minutos, 4°C) para separação do plasma e eritrócitos. O plasma foi estocado em alíquotas, na temperatura de -80°C até o momento das análises. Eritrócitos foram lavados três vezes com NaCl 0,9% (1:1 v/v) e centrifugadas (3.000 rpm, 5 minutos, 25°C). Após cada centrifugação o sobrenadante foi desprezado. Ao final do último procedimento de lavagem uma alíquota de eritrócitos (50µL) foi misturada a uma solução contendo 4 mmol/L de MgSO₄ em 1 mmol/L de ácido acético (1:100 solução/eritrócitos, v/v). Uma alíquota de eritrócitos rompidos foi utilizada imediatamente para determinação das atividades enzimáticas, o restante foi armazenado em freezer -80°C para as determinações de MDA e proteínas.

4.3.1 Determinação de Malonaldeído

A concentração de MDA foi mensurada pelo método TBARS (*Thiobarbituric acid-reactive substances*), como descrito em Buege e Aust (1978), por meio da reação dos produtos de lipoperoxidação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Uma das substâncias que reage ao TBA é o MDA. Para a reação, uma alíquota de eritrócito (250 µL) foi adicionada ao ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) e após centrifugação (1.000 x g, 3 min) o sobrenadante foi coletado e misturado ao TBA 0,67% (m/v). A reação foi incubada em 100°C, durante 15 minutos. A leitura da absorvância foi realizada em 535 nm, após resfriamento até temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar apropriado ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

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

O método FRAP mede o poder antioxidante redutor total e foi avaliado baseado na redução do complexo Fe³⁺-TPTZ (pentilenotetrazol), de cor amarelada.

Esse complexo na presença de um antioxidante origina Fe^{2+} -TPTZ, de coloração azul intensa. A reação ocorre em baixo valor de pH (3,6), com o intuito de manter a solubilidade do ferro e pode ser monitorada em uma absorvância máxima de 595 nm (BENZIE, STRAIN, 1996). Para a reação uma alíquota da amostra (18 μL) foi adicionada ao meio contendo tampão acetato (300 mmol/L, pH 3,6), TPTZ (10 mmol/L) em HCl (40 mmol/L) e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mmol/L) (10:1:1, respectivamente). As leituras das absorvâncias foram feitas em leitora Power Wave 340, Biotek e os resultados expressos em nmol/L, utilizando-se curva padrão de sulfato ferroso.

4.3.3 Ácido úrico

Foi avaliado no plasma, utilizando-se kit AU Liquiform da marca Labtest (Referência 140), com metodologia baseada no método enzimático de Trinder, seguindo-se as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.3.4 Determinação da atividade da Superóxido Dismutase

A atividade da enzima SOD foi quantificada nos eritrócitos por meio do método de Marklund et al. (1974), espectrofotometricamente, utilizando-se pirogalol, composto que em solução aquosa sofre auto-oxidação rapidamente, levando ao surgimento de uma coloração amarelada no meio de reação. O processo de auto-oxidação é dependente da presença de $\text{O}_2^{\cdot -}$. Sendo assim, na presença de SOD o processo será inibido, uma vez que a enzima promoverá a dismutação do $\text{O}_2^{\cdot -}$. O meio de reação foi composto por tampão Tris (50 mmol/L, pH 8,2) e pirogalol (24 $\mu\text{mol/L}$). A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro Hitachi U-1100 (420 nm), utilizando-se 20 μL de eritrócitos. A quantidade de enzima necessária para inibir 50% da auto-oxidação do pirogalol foi considerada como uma unidade enzimática (UE). Os resultados foram expressos em UE/mg de proteína.

4.3.5 Determinação da atividade da Glutathione Peroxidase

GPx foi analisada nos eritrócitos pelo método de Flohé e Gunzler (1984), baseado no consumo de NADPH, em meio de reação contendo 140 mmol/L de tampão fosfato de sódio com 1 mmol/L de EDTA (agente quelante para impedir a oxidação de GSH a GSSG); 0,24 mmol/L de NADPH; 1,0 mmol/L de azida sódica, 5,0 mmol/L de GSH; 0,25 U/mL de glutathione redutase e 0,5 mmol/L de hidroperóxido de tert-butila. O valor do pH do meio foi 7,5. Para as determinações, 50 µL de amostra foram adicionados ao meio de reação. A absorvância foi lida em 340 nm, em espectrofotômetro Hitachi U-1100 e a atividade enzimática expressa em mmol GSH consumido/min/mg proteína.

4.3.6 Determinação da atividade da Catalase

CAT foi determinada nos eritrócitos, com base no decaimento da concentração de H₂O₂. Uma 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 de H₂O₂. A absorvância foi medida em 240 nm, em espectrofotômetro Hitachi U-1100 e os resultados expressos como nmol H₂O₂/min/mg de proteína (BOVERIS, CHANCE, 1973).

4.3.7 Determinação da concentração de proteínas

Para expressar a atividade enzimática e concentração de MDA, a concentração total de proteínas foi determinada nos eritrócitos pelo método de Lowry (1951), utilizando albumina bovina como padrão. As absorvâncias foram determinadas em 625 nm e os resultados, expressos em mg/mL.

4.4 Análise Estatística

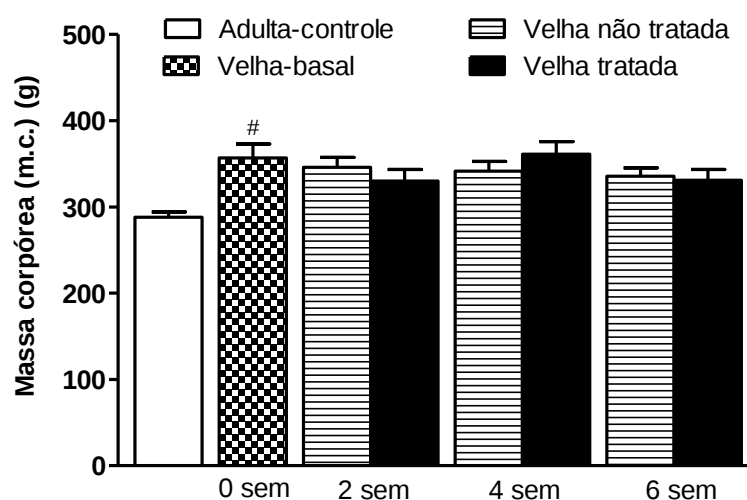
Os dados (média ± erro padrão da média) foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism, versão 5.0. A normalidade foi confirmada pelo teste KS

(Kolmogorov-Smirnov). Teste t *Student* não pareado foi aplicado para comparação entre os grupos Velha-basal e Adulta-controle, Velha não tratada e Velha tratada, respeitando-se os diferentes períodos de exposição ao CM. Análise de Variância (ANOVA), seguida por Dunett foi realizada para comparar Velha-basal com o grupo Velha não tratada, por diferentes períodos de tempo. O nível de significância foi estabelecido em 5%. A regressão linear foi utilizada para estudar o efeito cumulativo do tratamento com CM.

5 RESULTADOS

O envelhecimento resultou em aumento significativo (23%) da massa corpórea das fêmeas, expressa em gramas, como pode ser constatado comparando-se os grupos Adulta-controle ($288 \pm 6,42$ gramas) e Velha-basal ($356,8 \pm 16,29$). O tratamento com CM não ocasionou diferenças nesse parâmetro, independentemente do tempo de tratamento (Figura 10).

Figura 10. Massa corpórea ao final do experimento de ratas adultas e velhas, tratadas ou não com CM, por diferentes períodos de tempo.



Valores expressos como média ± erro padrão, n = 10/grupo.

[#]Quando comparados Velha-basal com Adulta-controle, teste t de Student, $p < 0,05$. sem = semanas.

O tratamento com CM não modificou o consumo hídrico e o consumo de ração, nos tempos de tratamento estudados (Tabela 1).

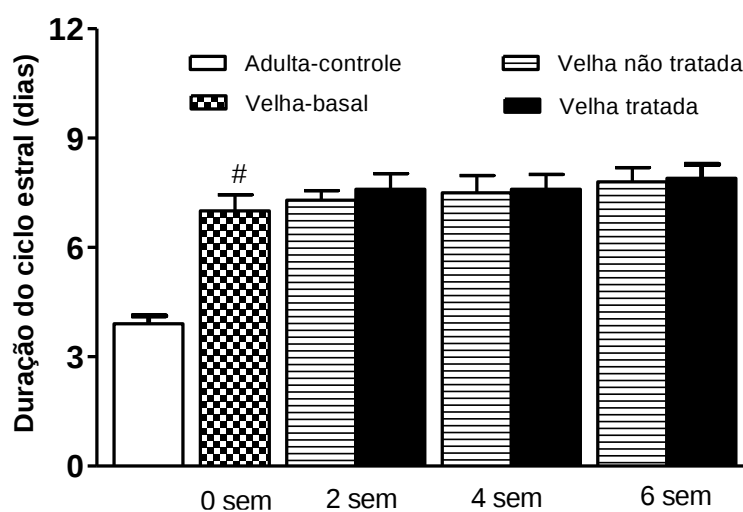
Tabela 1. Consumo de ração (g/animal/dia) e de água (mL/animal/dia) de ratas adultas e velhas, tratadas ou não com CM, por diferentes períodos de tempo.

Grupos	Sem	Consumo de ração (g/animal/dia)	Consumo de água (mL/animal/dia)
Velha não tratada	2	10,87 ± 0,86	24,19 ± 0,32
	4	14,80 ± 1,13	25,09 ± 1,25
	6	13,98 ± 0,83	27,27 ± 0,75
Velha tratada	2	11,73 ± 0,53	20,35 ± 1,67
	4	14,99 ± 1,24	28,17 ± 1,52
	6	13,97 ± 0,83	25,13 ± 1,07

Valores expressos como média ± erro padrão, n = 10/grupo. teste t *Student*, para comparação entre Velha tratada com Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo p < 0,05. sem = semanas.

Como esperado, o ciclo estral apresentou-se com menor duração nas ratas adultas (3,90 ± 0,21 dias) em relação às velhas (Velha-basal; 7,00 ± 0,44 dias). O tratamento com CM nos diferentes tempos não promoveu mudanças no ciclo estral (Figura 11).

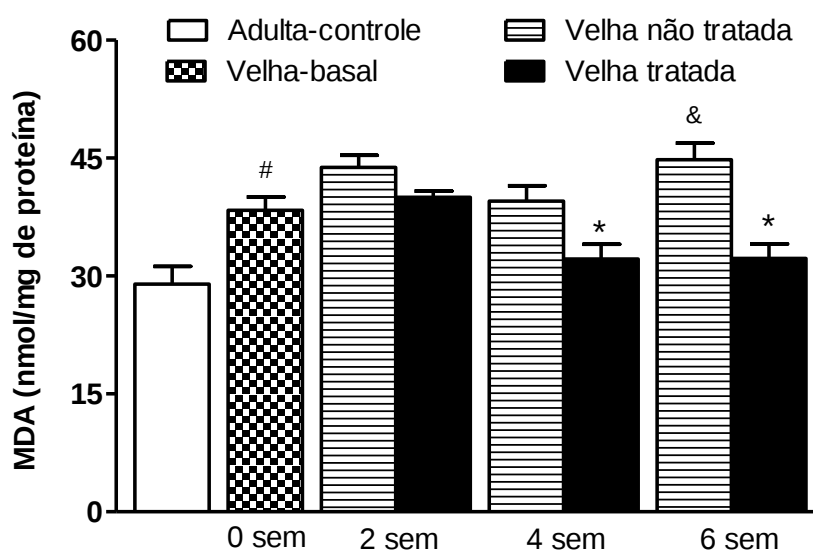
Figura 11. Duração do ciclo estral em ratas adultas e velhas, tratadas ou não com CM, por diferentes períodos de tempo.



Valores expressos como média ± erro padrão, n = 10/grupo. # Quando comparado Velha-basal com Adulta-controle, teste t *Student*, p < 0,05. sem = semanas.

O envelhecimento resultou em um aumento de MDA nos eritrócitos, que foi revertido pelo CM, quando administrado por quatro ou seis semanas. Como pode ser constatado na Figura 12, MDA (nmol/mg proteína) mostrou-se 32,4% maior no grupo Velha-basal ($38,36 \pm 1,71$) em comparação ao grupo Adulta-controle ($28,97 \pm 2,23$). Embora não tenham sido notadas diferenças significantes nos valores obtidos para o grupo Velha-basal e os grupos de ratas Velhas não tratadas por duas e quatro semanas, no grupo seis semanas os valores foram 17% maiores ($44,79 \pm 2,11$; $p < 0,05$), demonstrando que ao longo do tempo ocorreu maior dano oxidativo. O tratamento com CM por duas semanas não modificou de forma significativa os valores de MDA, reduções significativas ($p < 0,05$) foram demonstradas após quatro (Velha não tratada: $39,51 \pm 1,95$, Velha Tratada: $32,16 \pm 1,88$) e seis semanas de tratamento (Velha não tratada: $44,79 \pm 2,11$; Velha Tratada: $32,25 \pm 1,82$). Constatou-se ainda redução percentualmente maior após seis semanas (27,9%), sendo os valores numericamente semelhantes aos observados para o grupo Adulta-controle.

Figura 12. Malonaldeído (MDA) em eritrócitos de ratas adultas e velhas, tratadas ou não com CM, por diferentes períodos de tempo.

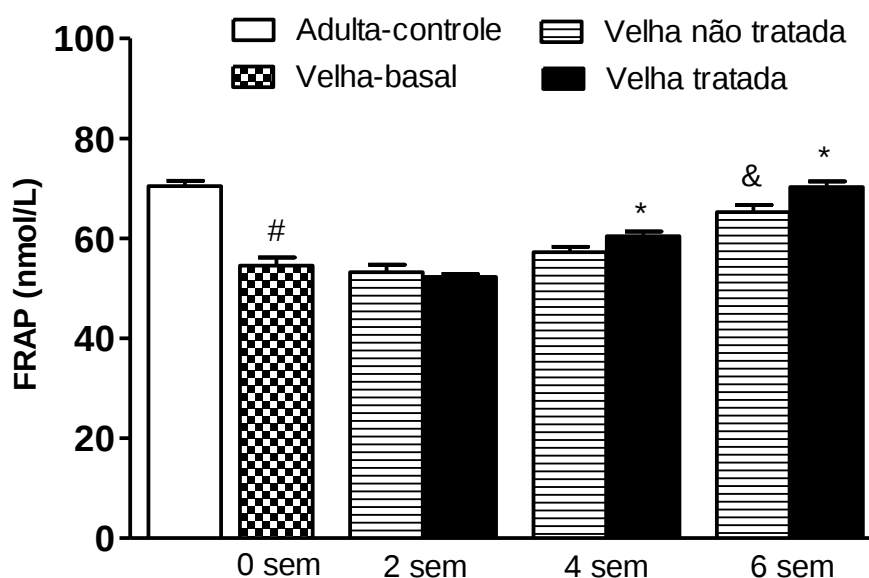


Valores expressos como média $\pm$ erro padrão, $n = 10$ /grupo.

#quando comparado Velha-basal com Adulta-controle (teste t de Student); &quando comparado Velha-basal com Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (ANOVA, pós-teste Dunett); *quando comparado Velha tratada com Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (teste t Student), $p < 0,05$. sem = semanas.

A avaliação dos valores de FRAP no plasma (Figura 13) demonstrou que o CM aumenta a capacidade antioxidante plasmática, diminuída em fêmeas velhas e que esse efeito foi dependente do tempo de tratamento. Ao observar-se os valores de FRAP nos grupos Velha-basal ($54,55 \pm 1,63$) e Adulta controle ($70,48 \pm 1,05$), pôde-se verificar que o envelhecimento resultou em 22% de diminuição ($p < 0,05$), porém ao longo do tempo aumento significativo ($p < 0,05$) foi observado (Velha-basal: $54,55 \pm 1,63$; Velha não tratada, seis semanas: $65,23 \pm 1,47$). O tratamento com CM durante duas semanas não foi capaz de elevar os valores de FRAP, no entanto, quatro semanas e seis semanas de tratamento culminaram em aumentos significantes ($p < 0,05$) de 5,6% e 7,75%, respectivamente.

Figura 13. Capacidade antioxidante plasmática (FRAP) de ratas adultas e velhas, tratadas ou não com CM, por diferentes períodos de tempo.

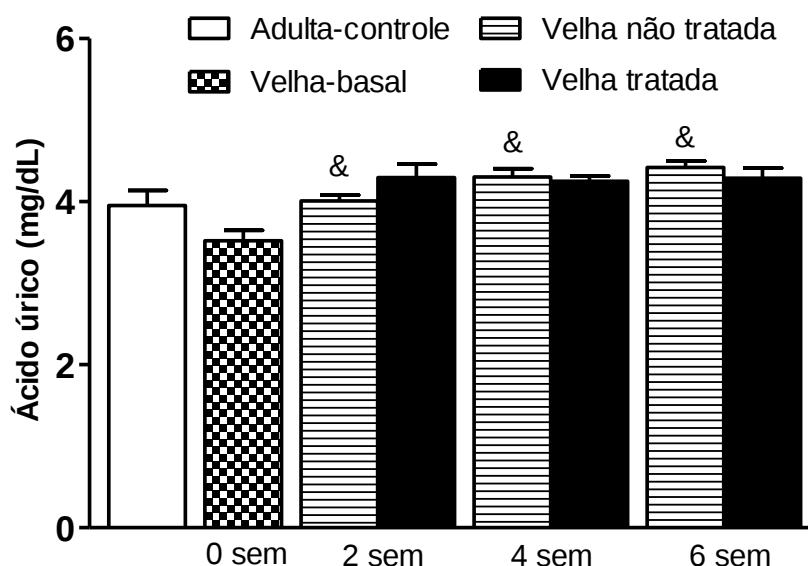


Valores expressos como média $\pm$ erro padrão, $n = 10$ /grupo. # quando comparado Velha-basal com Adulta-controle (teste t *Student*); & quando comparado Velha-basal e Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (ANOVA, pós-teste Dunett); * quando comparado Velha tratada com Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (teste t *Student*), $p < 0,05$. sem = semanas.

Não foram encontradas diferenças significativas na concentração plasmática de AU quando comparados os grupos Velha-basal ($3,39 \pm 0,12$) e Adulta-controle ($3,67 \pm 0,02$), como demonstrado na Figura 14, no entanto, ao longo das semanas

os valores se mostram aumentados, em relação ao grupo Velha-basal. O tratamento com CM não alterou os valores plasmáticos de AU.

Figura 14. Ácido úrico (AU) plasmático em ratas adultas e velhas, tratadas ou não com CM, por diferentes períodos de tempo.



Valores expressos como média±erro padrão, n = 10/grupo. &quando comparado Velha-basal com Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (ANOVA, pós-teste Dunett); *quando comparados Velha tratada com Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (teste t *Student*), p<0,05. sem = semanas.

O tratamento com CM mostrou-se efetivo em elevar a defesa antioxidante enzimática nos eritrócitos, diminuída nas ratas velhas. As atividades da SOD, GPx e CAT foram, respectivamente, 50%, 18% e 36% menores no grupo Velha-basal em comparação ao grupo Adulta-controle (Tabela 2). As reduções nas atividades da SOD e CAT não foram modificadas ao longo do tempo, no entanto reduções estatisticamente significativas foram observadas na GPx. Semelhante ao constatado para FRAP e MDA, o tratamento com CM não promoveu aumento significativo na defesa antioxidante enzimática após duas semanas de tratamento, porém, após quatro e seis semanas houve aumento de 33% e 63%, respectivamente, na atividade de SOD, e de 30% nos valores de GPx. A dose de CM usada neste estudo não modificou de forma significativa a atividade de CAT, em nenhum dos tempos de tratamento estudados.

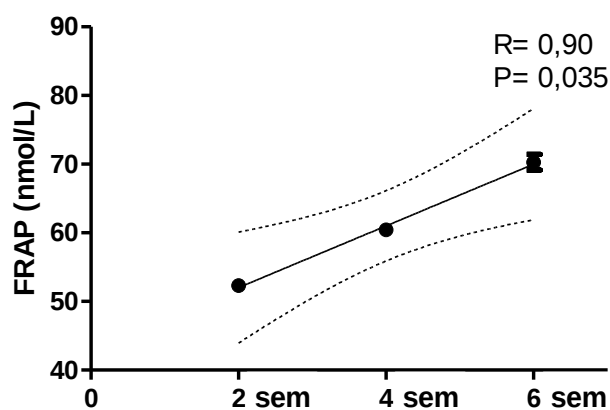
Tabela 2. Atividade das enzimas antioxidantes em eritrócitos de ratas adultas e velhas, tratadas ou não com CM, por diferentes períodos de tempo.

Enzima	Adulta	Velha-basal	2 Semanas		4 Semanas		6 Semanas	
Controle								
			não tratada	tratada	não tratada	tratada	não tratada	tratada
SOD	0.84±0.15	0.43±0.04 [#]	0.50±0.02	0.50±0.04	0.39±0.04	0.52±0.03*	0.40±0.06	0.66±0.06*
GPx	79.4±4.22	65.2±1.45 [#]	56.4±2.51 ^{&}	54.7±2.7	44.3±3.42 ^{&}	57.1±3.52*	51.8±1.63 ^{&}	64.7±4.22*
CAT	0.47±0.04	0.29±0.03 [#]	0.23±0.05	0.30±0.04	0.35±0.03	0.33±0.04	0.36±0.10	0.41±0.04

Valores expressos como média±erro padrão, n = 10/grupo. [#]quando comparado Velha-basal com Adulta-controle (teste t de Student); [&]quando comparado Velha-basal e Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (ANOVA, pós-teste Dunett); *quando comparado Velha tratada com Velha não tratada, nos diferentes períodos de tempo (teste t de Student), p<0,05. Unidades de medida: SOD (UE/mg proteína); GPx (mmol GSH/min/mg de proteína; CAT (nmol H₂O₂/min/mg de proteína).

Os resultados de regressão linear revelaram efeito protetor cumulativo do CM para FRAP foi positivamente associada com o tempo de tratamento (R = 0,90, P = 0,035). Embora tenha sido observado o mesmo efeito protetor para as análises de MDA, SOD, CAT e GPx, estes não puderam ser associados ao tempo de tratamento.

Figura 15. Efeito cumulativo do CM na capacidade antioxidante plasmática (FRAP) de ratas velhas tratadas, por diferentes períodos de tempo.



Valores expressos como média ± erro padrão, n = 10/grupo. sem= semanas.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o efeito do CM em marcadores do EO no plasma e nos eritrócitos de ratas velhas. A literatura apresenta dados conflitantes quando são avaliados parâmetros do EO em fêmeas e em muitos dos trabalhos o período da vida reprodutiva não é levado em consideração. Considerando-se que fêmeas de mesma idade cronológica podem apresentar-se em diferentes fases da vida reprodutiva e que existem diferenças hormonais associadas a cada uma dessas fases (CHEN et al., 2013; KERMATH, GORE, 2012; SU et al., 2013), tomou-se o cuidado de utilizar neste experimento apenas ratas velhas na perimenopausa. Todas as ratas tratadas com CM mantiveram a mesma irregularidade de ciclo estral, que caracteriza a perimenopausa, indicando que o CM não interferiu neste parâmetro.

Embora seja relatado na literatura o efeito do CM na diminuição da m.c. em ratos adultos após oito semanas de tratamento (ARÇARI et al., 2009) e em fêmeas de roedores adultas após 60 dias (PRZYGODDA et al., 2010), a dose e os tempos de tratamento adotados para este estudo não afetaram esse parâmetro, bem como o consumo de ração. Esses dados são importantes por indicarem que a redução dos danos oxidativos não decorreu de restrição calórica, fato bem descrito na literatura (YU et al., 1992).

No modelo experimental utilizado neste estudo, os valores de MDA foram maiores nas ratas velhas, em relação ao grupo Adulta-controle e essa elevação foi mais pronunciada com o avançar da idade. Esses resultados vão de encontro aos trabalhos que demonstraram aumento de MDA com o envelhecimento em coração, pulmão, fígado, rim, músculo (GUNDUZ et al., 2004) e eritrócitos de ratos machos (AYDÍN et al., 2010; KAWAMOTO et al., 2013), homogenato de cérebro de fêmeas de ratos (LEUTNER et al., 2001) e eritrócitos de mulheres velhas (KAWAMOTO et al., 2005).

O CM é uma bebida popular com atividade antioxidante comprovada (BRACESCO et al., 2011; HECK, MEJLA, 2007), sendo que mais de um milhão de pessoas em todo o mundo consome diariamente de um a dois litros de CM (BURRIS et al., 2012). Este trabalho foi o primeiro a investigar o efeito de vários tempos de tratamento na defesa antioxidante e no dano oxidativo em ratas na perimenopausa.

A capacidade do CM, em diferentes doses e tempos de tratamento de reduzir danos oxidativos já havia sido observada em outros modelos experimentais. Estudo preliminar realizado em nosso Laboratório demonstrou o potencial do CM em reduzir a concentração de MDA após oito semanas de tratamento em eritrócitos de fêmeas velhas (PEREIRA, 2013) e neste estudo pode-se observar o mesmo efeito após quatro e seis semanas de tratamento.

Doses de 500 mg/dia, durante 15 dias comprovadamente reduzem o aumento da concentração de MDA induzido pelo álcool em homogenato de cérebro e plasma de machos de roedores com 45 dias de idade (SCOLARO et al., 2012). Em homogenato de fígado de camundongos machos jovens, doses de 1.000 e 2.000 mg/kg, durante 60 dias também mostraram-se efetivas em reduzir o dano oxidativo aos lipídeos (MARTINS et al., 2009). Quando oferecido. Em mulheres adultas saudáveis, diminuição significativa da concentração de MDA foi observada após tratamento agudo (uma hora) e crônico (uma semana) com CM, na dose de 5g/500 ml/dia (MATSUMOTO et al., 2009). A inexistência de modificação de MDA após duas semanas de tratamento, constatada nas ratas velhas neste trabalho, poderia ser atribuída à dose significativamente inferior e diferença do modelo experimental.

Há uma forte correlação entre o aumento de MDA e a diminuição da capacidade antioxidante plasmática durante o envelhecimento (RIZVI, MAURYA, 2007). Os resultados deste trabalho apontam uma diminuição relacionada à idade em FRAP, corroborando dados obtidos em estudos realizados no plasma de homens e mulheres velhas (RIZVI et al., 2006, ANDRIOLLO-SANCHEZ et al., 2005), porém, ao longo do tempo houve um aumento desse parâmetro. A capacidade antioxidante total leva em consideração a ação cumulativa de todos antioxidantes presentes no organismo, como AU, compostos fenólicos, ácido ascórbico, etc. (VASCONCELOS et al., 2007). Quando se determina a capacidade antioxidante pelo método FRAP, todos os antioxidantes solúveis são considerados e até 60% desta capacidade pode ser atribuída ao AU (WAYNER et al., 1987).

No plasma são encontradas quantidades significativas de AU em comparação a outras espécies capazes de neutralizar ERO, o que o torna um potente antioxidante (VASCONCELOS et al., 2007), cuja ação provém principalmente da capacidade de reagir com $\text{OH}^\cdot$ e $\text{LOO}^\cdot$ (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990). Embora

aumento do AU em decorrência do envelhecimento seja relatado no plasma de homens e mulheres (CHANG et al., 2014), nossos resultados não comprovaram tal fato, quando comparadas as fêmeas adultas com as velhas do grupo basal, embora os grupos que finalizaram os experimento com idade superior aos 17 meses, mostraram elevação desse parâmetro. Estes dados corroboram outros autores que demonstraram um aumento do AU ao longo do envelhecimento. Tal situação pode ser resultante de maior síntese de AU por elevação da atividade da xantina oxidase ou por diminuição da hidrólise do mesmo pela enzima uricase (AMES et al., 1981; WAYNER et al., 1987). Iwama et al (2012) acompanharam este parâmetro em diferentes tecidos e plasma de ratos até os 30 meses de idade e verificaram aumento do AU em todos os tecidos, enquanto o plasma apresentou concentrações muito estáveis ao longo do envelhecimento. A maior concentração desse metabólito nos grupos de idade mais avançada justificaria a elevação da FRAP constatada neste estudo nas fêmeas velhas que morreram aos 18,5 meses.

O CM mostrou-se efetivo em reverter a redução de FRAP nas fêmeas na perimenopausa, após quatro e seis semanas de tratamento, em concordância com o constatado após oito semanas de administração para ratas velhas (PEREIRA, 2013). Resultados semelhantes foram observados em adultos saudáveis após uma hora do consumo do chá (5 g/500 mL de água) (DA SILVA et al., 2008) e após ingestão de um litro (20 mg/mL/dia), durante 90 dias, mesmo na presença de dislipidemias (BOAVENTURA et al., 2012), ou ainda em homens e mulheres adultos, após a ingestão de 2,5 g/200 mL de água, durante 60 dias (ARÇARI et al., 2011). Determinada através de outra metodologia (ABTS), a capacidade antioxidante plasmática de mulheres adultas aumentou após uma semana de consumo de 5g/500 mL/dia de CM (MATSUMOTO et al., 2009). Além de aumentar FRAP, o CM ainda demonstrou efeito cumulativo para este parâmetro, sugerindo um aumento progressivo quando são administradas doses adicionais de erva-mate.

Neste estudo, o envelhecimento das fêmeas resultou na redução da atividade das enzimas antioxidantes nos eritrócitos, de forma semelhante ao descrito para machos, quando estudados rim, cérebro, coração e fígado (JAYAKUMA et al., 2007) ou ainda fígado e músculo esquelético (KUMARAN et al., 2008). Resultados semelhantes foram descritos para homogenatos de fígado, rim, coração e pulmão de

ratos velhos (RAMESH et al., 2012). A redução na atividade de SOD em fêmeas velhas pode ser atribuída à variação nas concentrações de hormônios ovarianos, que apresentam comprovado efeito modulatório na atividade da enzima (MOORTHY et al., 2005). Outros fatores que justificariam essa redução seriam o aumento da concentração de H_2O_2 , um modulador negativo e dependente de concentração, da atividade da SOD (SALO et al., 1988), e também o aumento da glicação da enzima nos eritrócitos (ARAI et al., 1987). A redução na atividade da CAT com o aumento da idade parece estar também associada à glicação da enzima (BAKALA et al., 2012).

Observou-se no presente estudo que a utilização de CM por quatro e seis semanas aumentou a atividade da SOD e GPx, mas não foi capaz de alterar a atividade da CAT. Nosso laboratório já havia demonstrado aumento na atividade da SOD e GPx em fêmeas velhas com 19 meses enquanto a atividade da CAT demonstrou-se inalterada após o tratamento com a mesma dose de CM por oito semanas em fêmeas senis. O tratamento com outros produtos naturais, com comprovada capacidade antioxidante, sobre as atividades da SOD, CAT e GPx, geraram resultados controversos. Aumento da atividade das enzimas foi demonstrado em rim e fígado de ratos machos velhos, após tratamento com extrato de *Panax ginseng* (RAMESH et al., 2012). Entretanto, a administração de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) resultou em redução das atividades das enzimas, elevadas em função do envelhecimento (POSADAS et al., 2009). Em fígado e rins de ratos velhos, o uso de *Pleurotus ostreatus* (um tipo de cogumelo conhecido como shimeji) promoveu elevação apenas na atividade de GPx (JAYAKUMAR et al., 2007). Com relação ao uso do CM, poucos são os dados disponíveis sobre os efeitos na atividade das enzimas antioxidantes e não há nenhuma descrição em fêmeas velhas. Elevação na atividade de SOD foi descrita em eritrócitos de mulheres e homens adultos, após 60 dias de tratamento com dose de 2,5g/mL de água/dia, enquanto nenhuma modificação foi constatada na GPx (ARÇARI et al., 2011). A análise da expressão gênica de GPx, SOD e CAT em mulheres adultas saudáveis, após uma semana de ingestão de CM demonstrou que este chá modula positivamente essas enzimas em leucócitos (MATSUMOTO et al., 2009).

Muitos antioxidantes naturais têm seu efeito dose dependente e o uso inadequado dos mesmos pode levar a um estado pró-oxidante. Além disso, uma

redução excessiva das ERO pelo uso desses compostos poderia resultar em inadequação da capacidade de defesa do organismo contra agentes invasores (POLJSK et al., 2013), como também modificações em vias de sinalização essenciais para a manutenção do estado fisiológico (HALLIWELL, 2012). Embora existam evidências de que a administração crônica (por 12 semanas) de 2.000 mg/kg/dia seja bem tolerada (ANDRADE et al., 2012), e apesar de alguns estudos utilizarem no tratamento de seres humanos ou animais doses de CM que variam de de 62,5 mg/kg/dia (PREDIGER et al., 2012) a 2.000 mg/kg/dia, sendo o último equivalente a 3 L/dia (MARTINS et al., 2009), neste estudo optou-se por utilizar dose equivalente a 1 ½ xícara de chá/dia para humanos (300 mL). Além da possibilidade de reduzir, de forma excessiva as ERO, o uso excessivo de CM deve ser visto de forma cuidadosa também porque este produto possui grande quantidade de taninos (BORILLE et al., 2005), substância que, em excesso, pode interagir negativamente com a absorção de diversos nutrientes, como os minerais (COZZOLINO, 1997).

De acordo com Halliwell (2012) aumentar a defesa antioxidante endógena é muito mais importante que qualquer outra estratégia na tentativa de retardar manifestações associadas ao envelhecimento. Este estudo sugere que a administração de baixas doses diárias, equivalentes a 1 ½ xícara CM/dia para humanos, é capaz de promover aumento da defesa antioxidante endógena e redução do dano oxidativo em ratas velhas na perimenopausa.

7 CONCLUSÃO

Fêmeas velhas na perimenopausa apresentam aumento do dano oxidativo, resultante da redução da defesa antioxidante, mas, a administração do CM em baixa dose, por quatro e seis semanas, mostrou-se eficiente em reverter essas alterações decorrentes do envelhecimento, apresentando-se como uma alternativa promissora para minimizar o aumento do EO na perimenopausa.

REFERÊNCIAS

Almada Filho CM. Antioxidante e radicais livres. In: Freitas EV, ed. Tratado de geriatria e gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 709-11.

Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78(11):6858-62.

Andriollo-Sanchez M, Hininger-Favier I, Meunier N, Venneria E, O'Connor JM, Maiani G, Coudray C, Roussel AM. Age-related oxidative stress and antioxidant parameters in middle-aged and older European subjects: the ZENITH study. *Eur J Clin Nutr*. 2005; 59(Suppl 2):S58–S62.

Angeloni C, Pirola L, Vauzour D, Maraldi T. Dietary polyphenols and their effects on cell biochemistry and pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:583901.

Arai K, Magushi S, Fujii S, Itribashi H, Oikawa K, Taniguchi N. Glycation and inactivation of human Cu–Zn– superoxide dismutase: identification of the in vitro glycated sites. *J Biol Chem*. 1987;262(35):16969–72.

Arçari DP, Bartchewsky Jr W, Dos Santos TW, Oliveira KA, DeOliveira CC, Gotardo EM, Pedrazzoli Jr J, Gambero A, Ferraz LFC, Carvalho PO, Ribeiro ML. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;335(2):110–5.

Arçari DP, Bartchewsky W, dos Santos TW, Oliveira KA, Funck A, Pedrazzoli J, de Souza MF, Saad MJ, Bastos DH, Gambero A, Carvalho Pde O, Ribeiro ML. Antiobesity effects of yerba maté extract (*ilex paraguariensis*) in high-fat diet–induced obese mice. *Obesity*. 2009;17(12):2127-33.

Arçari DP, Porto VB, Rodrigues ERV, Martins F, de Lima RJ, Sawaya ACHF, Ribeiro ML, Carvalho PO. Effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) supplementation on

oxidative stress biomarkers and LDL oxidisability in normo- and hyperlipidaemic humans. *J Funct Foods*. 2011;3(3):190–7.

Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc*. 1998;75(2):199-212.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:360438.

Aydín AF, Küskü-Kiraz Z, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Effect of carnosine treatment on oxidative stress in serum, apoB-containing lipoproteins fraction and erythrocytes of aged rats. *Pharmacol Rep*. 2010;62(4):733-9.

Bakala H, Hamelin M, Mary J, Borot-Laloi C, Friguet B. Catalase, a target of glycation damage in rat liver mitochondria with aging. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(10):1527-34.

Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova*. 2006;29(1):113-23.

Bastos DHM, Torres EAFS. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. *Nutrire Rev Soc Bras Aliment Nutr*. 2003;26:77-89.

Bellantini F, Romano AD, Giudetti AM, Rollo T, Blonda M, Tamborra R, Vendemiale G, Serviddio G. Many faces of mitochondrial uncoupling during age: damage or defense? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013;68(8):892-902.

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70–6.

Berra CM, Menck CFM, Di Mascio P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Quim Nova*. 2006;29(6):1340-44.

Bezerra FJL, Rezende AA, Rodrigues SJ, Almeida MG. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da peroxidação lipídica em ratos tratados com sevoflurano. *Rev Bras Anesthesiol*. 2004;54(5):640–9.

Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr*. 1999;12(2):123-30.

Boaventura BC, Di Pietro PF, Stefanuto A, Klein GA, de Moraes EC, de Andrade F, Wazlawik E, da Silva EL. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. *Nutrition*. 2012;28(6):657-64.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 1973;134(3):707-16.

Bowler C, Van MM, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1992;43:83-116.

Bracesco N, Sanchez, AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J Ethnopharmacol*. 2011;136(3):378-84.

Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(9-10):951-65.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-10.

Burris KP, Harte FM, Davidson PM, Stewart Jr CN, Zivanovic S. Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* a. st.hil.): a review. *Chilean J Agric Res*. 2012;72(2):268-74.

Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Colombrita C, Spadaro F, Butterfield DA, Giuffrida Stella AM. Increased expression of heat shock proteins in rat brain during aging: relationship with mitochondrial function and glutathione redox state. *Mech Ageing Dev*. 2004;125(4):325-35.

Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr*. 1998;68(5):1081–7.

Chang HT, Shen HC, Hu YC, Chen YF, Tung TH. Clinical investigation of metabolic syndrome in the female elderly occupational population. *Aging Clin Exp Res*. 2014; 26(4):453-60.

Chen S, Asakawa T, Ding S, Liao L, Zhang L, Shen, J, Yu J, Sugiyama K. Chaihu-Shugan-San administration ameliorates perimenopausal anxiety and depression in rats. *Plos One*. 2013;8(8):e72428

Chen SX, Schopfer P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase. *Eur J Biochem*. 1999;260(3):726-35.

Chiu D, Kuypers F, Lubin B. Lipid peroxidation in human red cells. *Semin Haematol*. 1989;26(4):257–76.

Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct*. 2012;2012:646354.

Da Silva EL, Neiva TJC, Shirai M, Terao J, Abdalla DSP. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. *Food Res Int*. 2008;41(10):973–9.

Da Silva HS, de Lima AMM, Galhardoni R. Envelhecimento bem-sucedido e vulnerabilidade em saúde: aproximações e perspectivas. *Interface Com Saúde Educ*. 2010;14(35):867-77.

De Angelis RC, Tirapegui J. *Fisiologia da nutrição humana: aspectos básicos, aplicados e funcionais*. 2nd ed. São Paulo: Atheneu; 2007.

De Moraes EC, Stefanuto A, Klein GA, Boaventura BC, de Andrade F, Wazlawik E, Di Pietro PF, Maraschin M, da Silva EL. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects

and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. J Agric Food Chem. 2009;57(18):8316-24.

De Moraes SM, Cavalcanti ESB, Costa SMO, Aguiar LA. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. Rev Bras Farmacogn. 2009;19(1b):315-20.

Djordjevic VB. Free radicals in cell biology. Int Rev Cytol. 2004;237:57-89.

Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition. 2002;18(10):872-9.

Fernandes ES, Machado MO, Becker AM, Andrade F, Maraschin M, Silva EL. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase - 2: in vitro and in vivo studies. Nutrition. 2012;28(11-12):1157-64.

Ferrari E. Os potenciais da cadeia produtiva da erva-mate como fator de desenvolvimento regional sustentável do médio alto Uruguai do Rio Grande do Sul. Santa Cruz do Sul: Edunisc; 2006.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Assoc Med Bras. 1997;43(1):61-8.

Filip R, Lopez P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. Fitoterapia. 2001;72(7):774-8.

Flohé L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 1984;105:114-21.

Foncea R, Carvajal C, Almarza C, Leighton F. Endothelial cell oxidative stress and signal transduction. Biol Res. 2000;33(2):89-96.

Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. Blood. 1996;87(4):1595-9.

Gosmann G, Barlette AG, Dhamer T, Arçari DP, Santos JC, Camargo ER, Acedo S, Gambero A, Gnoatto SCB, Ribeiro ML. Phenolic compounds from maté (*Ilex paraguariensis*) inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Plant Foods Hum Nutr*. 2012;67(2):156–61.

Guaratini T, Medeiros MHG, Colepicolo Pio. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Quim Nova*. 2007;30(1):206-13.

Gugliucci A, Stahl AJC. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Mol Biol Int*. 1995;35(1):47–56.

Gugliucci A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;224(2):338–44.

Gündüz F, Sentürk UK, Kuru O, Aktekin B, Aktekin MR. The effect of one year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. *Physiol. Res*. 2004;53(2):171-6.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: University Press; 1989.

Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 1990;280(1):1-8.

Halliwell B. Electron transfer: switches in enzymes. *Nature*. 1991;354(6350):191-2.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*. 2004;52(8 Pt 1):253–65.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*. 2012;70(5):257-65.

Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 1992;59(5):1609–23.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11(3):298-300.

Harman D. Free radical theory of aging: an update increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1067:10-21.

Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78(11):7124-8.

Heck CI, de Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci.* 2007;72(9):138-51.

Hussein GME, Matsuda H, Nakamura S, Akiyama T, Tamura K, Yoshikawa M. Protective and ameliorative effects of maté (*Ilex paraguariensis*) on metabolic syndrome in TSOD mice. *Phytomedicine.* 2011;19(1):88–97.

Inal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta.* 2001;305(1-2):75-80.

Isolabella S, Cogoi L, López P, Anesini C, Ferraro G, Filip R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. *Food Chem.* 2010;122(3):695–9.

Iwama M, Kondo Y, Shimokado K, Maruyama N, Ishigami A. Uric acid levels in tissues and plasma of mice during aging. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(8):1367–70.

Jacob KD, Hooten NN, Trzeciak AR, Evans MK. Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mech Ageing Dev.* 2013;134(3-4):139–57.

Jha R, Rizvi SI. Age-dependent decline in erythrocyte acetylcholinesterase activity: correlation with oxidative stress. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009;153(3):195-8.

Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(9-10):1865-79.

Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, Deucher GP. Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 2004;25(1-2):5-16.

Kasapoglu M, Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol.* 2001;36(2):209-20

Kawamoto EM, Munhoz CD, Glezer I, Bahia VS, Caramelli P, Nitrini R, Gorjão R, Curi R, Scavone C, Marcourakis T. Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2005;26(6):857-64.

Kawamoto EM, Vasconcelos AR, Degaspari S, Böhmer AE, Scavone C, Marcourakis T. Age-related changes in nitric oxide activity, cyclic GMP, and TBARS levels in platelets and erythrocytes reflect the oxidative status in central nervous system. *Age.* 2013;35(2):331-42.

Kermath BA, Gore AC. Neuroendocrine control of the transition to reproductive senescence: lessons learned from the female rodent model. *Neuroendocrinology.* 2012;96(1):1-12.

Kim S. Molecular biology of aging. *Arch Surg.* 2003;138(10):1051-4.

Kumar M, Sharma VL, Sehgal A, Jain M. Protective effects of green and white tea against benzo(a)pyrene induced oxidative stress and DNA damage in murine model. *Nutr Cancer.* 2012;64(2):300-6.

Laurent G, Solari F, Mateescu B, Karaca M, Castel J, Bourachot B, Magnan C, Billaud M, Mechta-Grigoriou F. Oxidative stress contributes to aging by enhancing pancreatic angiogenesis and insulin signaling. *Cell Metab.* 2008;7(2):113-24.

Lee HC, WeiYH. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med*. 2007;232(5):592-606.

LeFevre J, McClintock MK. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. *Biol Reprod*. 1988;38(4):780-9.

Leutner S, Eckert A, Müller WE. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J Neural Transm*. 2001;108(8-9):955-67.

Long JA, Evans HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. Berkely: Memoirs of the University of California;1922.

López-Alarcóna C, Denicolab A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta*. 2013;763:1–10.

Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R. Protein measurement whit the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.

Maklund S. Pyrogallol autooxidation. In: Greenwald RA, ed. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton: CRC Press; 1985. p. 243-7.

Manikonda PK, Jagota A. Melatonin administration differentially affects age-induced alterations in daily rhythms of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male rat liver. *Biogerontology*. 2012;13(5):511–24.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002;62(4a):609-14.

Martins F, Suzan AJ, Cerutti SM, Arçari DP, Ribeiro ML, Bastos DH, Carvalho PO. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. *Br J Nutr*. 2009;101(4):527-32.

Matsumoto RL, Bastos DH, Mendonça S, Nunes VS, Bartchewsky W, Ribeiro ML, Oliveira Carvalho 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*. 2009;57(5):1775-80.

Maurya PK, Rizvi SI. Age-dependent changes in glutathione-s-transferase: correlation with total plasma antioxidant potential and red cell intracellular glutathione. *Indian J Clin Biochem*. 2010;25(4):398-400.

McCord JM, Fridovich IJ. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969;244(22):6049-55.

Medvedev Z. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1990;65(3):375–98.

Miranda DDC , Arçari DP, Pedrazzoli J Jr, Carvalho PO, Cerutti SM , Bastos DHM, Ribeiro ML. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*. 2008;23(4):261-5.

Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett*. 2009;12(1):75–92.

Moorthy K, Sharma D, Basir SF, Baquer NZ. Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferases in naturally menopausal rats. *Exp Gerontol*. 2005;40(4):295-302.

Niki E, Nakano M. Estrogens as antioxidants. *Methods Enzymol*. 1990;186:330-3.

Niki E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? *FEBS Lett*. 2012;586(21):3767-70.

Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(5):469-84.

Oliveira MC, Schoffen JPF. Oxidative stress action in cellular aging. *Braz Arch Biol Technol.* 2010;53(6):1333-42.

Oliveira YMM, Rotta E. Área de distribuição natural de erva-mate. In: *Anais do 10º Seminário sobre Atualidades e Perspectivas Florestais: Silvicultura da Erva-Mate*; 1983; Curitiba. Curitiba: EMBRAPA; 1985. p. 17-36.

Pagliosa CM, Vieira MA, Podestá R, Maraschin M, Zeni ALB, Amante ER, Amboni R DMC. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *Food Chem.* 2010;122(1):173-8.

Pandey KB, Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3(1):2-12.

Pandey KB, Rizvi SI. Resveratrol up-regulates the erythrocyte plasma membrane redox system and mitigates oxidation-induced alterations in erythrocytes during aging in humans. *Rejuvenation Res.* 2013;16(3):232-40.

Peng C, Wang X, Chen J, Jiao R, Wang L, Li YM, Zuo Y, Liu Y, Lei L, Ma KY, Huang Y, Chen ZY. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *Biomed Res Int.* 2014;2014:831841.

Peralta IN, Cogoi L, Filip R, Anesini C. Prevention of hydrogen peroxide-induced red blood cells lysis by *Ilex paraguariensis* aqueous extract: participation of phenolic and xanthine compounds. *Phytother Res.* 2012;27(2):192-8.

Pereira AAF. Chá mate (*Ilex paraguariensis*) melhora a defesa antioxidante e diminui o dano oxidativo em fêmeas Wistar senis [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2013.

Pereira ALF, Vidal TF, Constant PBL. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. *Nutrire Rev Soc Bras Aliment Nutr.* 2009;34(3):231-47.

Pereira DF, Kappel VD, Cazarolli LH, Boligon AA, Athayde ML, Guessier SM, Da Silva EL, Silva FRMB. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. *Phytomedicine*. 2012;19(10):868–77.

Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:956792.

Posadas SJ, Caz V, Largo C, De la Gándara B, Matallanas B, Reglero G, De Miguel E. Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp Gerontol*. 2009;44(6-7):383–9.

Przygodda F, Martins ZN, Castaldelli APA, Minella TV, Vieira LP, Cantelli K, Fronza J, Padoin M J. Effect of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) on serum cholesterol, triacylglycerides and glucose in Wistar rats fed a diet supplemented with fat and sugar. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2010;20(6):956-61.

Queen BL, Tollefsbol TO. Polyphenols and aging. *Curr Aging Sci*. 2010;3(1):34–42.

Ramesh T, Kim SW, Sung JH, Hwang SY, Sohn SH, Yoo SK, Kim SK. Effect of fermented *Panax ginseng* extract (GINST) on oxidative stress and antioxidant activities in major organs of aged rats. *Exp Gerontol*. 2012;47(1):77-84.

Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *J Control Release*. 2006;113(3):189-207.

Resende PE, Verza SG, Kaiser S, Gomes LF, Kucharski LC, Ortega GG. The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. *J Ethnopharmacol*. 2012;144(3):735–40.

Rizvi SI, Jha R, Maurya PK. Erythrocyte plasma membrane redox system in human aging. *Rejuvenation Res*. 2006;9(4):470-4.

Salo DC, Lin SW, Pacifini RE, Davies KJN. Superoxide dismutase is preferentially degraded by a proteolytic stem from red blood cells following oxidative modification by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 1988;5(5-6):335–9.

Sampaio RC, Moraes C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. *Motriz*. 2010;16(2):506-15.

Sánchez-Rodríguez MA, Ruiz-Ramos M, Correa-Muñoz E, Mendoza-Núñez VM. Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly mexicans as characterized by antioxidant enzymes. *BMC Musculoskelet Disord*. 2007;8:124.

Sánchez-Rodríguez MA, Zacarías-Flores M, Arronte-Rosales A, Correa-Muñoz E, Mendoza-Núñez VM. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause*. 2012;19(3):361-7.

Sangeetha P, Balu M, Haripriya D, Panneerselvam C. Age associated changes in erythrocyte membrane surface charge: modulatory role of grape seed proanthocyanidins. *Exp Gerontol*. 2005;40(10):820-8.

Sanz A, Pamplona R, Barja G. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(3-4):582-99.

Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(7):995-1014.

Scazufca M, Cerqueira ATAR, Menezes PR, Prince M, Vallada HP, Miyazak MCOS, Domingos NAM, Antunes EH, Macedo GC, Almeida SA, Matsuda CMCB. Investigações epidemiológicas sobre demência nos países em desenvolvimento. *Rev Saúde Pública*. 2002; 36(6):773-8.

Schinella GR, Troiani G, Dávila V, de Buschiazzi PM, Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269(2):357-60.

Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*. 2005;308(5730):1909-11.

Scolaro B, de Lima DD, da Cruz JGP, Dal Magro, DD. Mate tea prevents oxidative stress in the blood and hippocampus of rats with acute or chronic ethanol administration. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:314758.

Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H, ed. *Oxidative stress*. London: Academic Press; 1985. p. 1.

Sies H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem*. 2014;289(13):8735–41.

Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993;215(2):213-9.

Sies H. Total antioxidant capacity: appraisal of a concept. *J Nutr*. 2007;137(6):1493-5.

Su JY, Xie QF, Liu WJ, Lai P, Liu DD, Tang LH, Dong TT, Su ZR, Tsim KW, Lai XP, Li KY. Perimenopause amelioration of a TCM recipe composed of radix astragali, radix angelicae sinensis, and folium epimedii: an in vivo study on natural aging rat model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:747240.

Tirapegui J. *Nutrição: fundamentos e aspectos atuais*. 2n ed. São Paulo: Atheneu; 2006.

Uzun D, Korkmaz GG, Sitar ME, Cebe T, Yanar K, Cakatay U, Aydın S. Oxidative damage parameters in renal tissues of aged and young rats based on gender. *Clin Interv Aging*. 2013;8:809-15.

VanderJagt TJ, Ghattas R, VanderJagt DJ, Crossey M, Glew RH. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life Sci*. 2002; 70(9):1035–40.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*. 2007;30(5):1323-38.

Vergani L, Floreani MAR, Ceccon M, Napoli E, Cabrelle A, Valente L, Bragantini F, Leger B, Dabbeni-Sala F. Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *Eur J Biochem*. 2004;271(18):3646–56.

Vester H, Holzer N, Neumaier M, Lilianna S, Nüssler AK, Seeliger C. Green Tea Extract (GTE) improves differentiation in human osteoblasts during oxidative stress. *J Inflamm*. 2014;18:11-5.

Victorino VJ, Panis C, Campos FC, Cayres RC, Colado-Simão AN, Oliveira SR, Herrera AC, Cecchini AL, Cecchini R. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women. *Age*. 2013;35(4):1411-21.

Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human-blood plasma. *Biochim Biophys Acta*. 1987;924(3):408-19.

Widén C, Ekholm A, Coleman MD, Renvert S, Rumpunen K. Erythrocyte antioxidant protection of rose hips [*Rosa spp*]. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:621579.

Wiley J, Sons I. Determination of total phenolics by folin-ciocalteau colorimetry. *Curr Protoc Food Analyt Chem*. 2002; 11.1.11-11.1.8.

Winterbourn CC, Kettle AJ. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305(3):729-36.

Xu X, He J, Liu G, Diao X, Cao Y, Ye Q, Xu G, Mao W. Hemolysis assessment and antioxidant activity evaluation modified in an oxidized erythrocyte model. *J Agric Food Chem*. 2014;62(9):2056–61.

Yang S, Madyastha P, Bingel S, Ries W, Key L. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J Biol Chem*. 2001;276(8):5452-8.

Yeh CT, Yen GC. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *J Nutr*. 2006;136(1):11-5.

Youdim KA, Shukitt-Hale B, MacKinnon S, Kalt W, Joseph JA. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1523(1):117-22.

Yu BP, Suescun EA, Yang SY. Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction. *Mech Ageing Dev*. 1992;65(1):17-33.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and Ec-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(3):337-49.

Zitňanová I, Rakovan M, Paduchová Z, Dvořáková M, Andrežálová L, Muchová J, Simko M, Waczulíková I, Duračková Z. Oxidative stress in women with perimenopausal symptoms. *Menopause*. 2011;18(11):1249-55.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-SP

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Alterações em marcadores teciduais e sanguíneos de ~~extresse~~ oxidativo" sob responsabilidade da Pesquisadora ANA CLÁUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE e colaboração de Keny Gonçalves Tirapeli, Adriane Belló Klein, Susana Francisca Llesuy, Rita Cássia Menegati Dornelles e Camila Scacó Pereira está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo FOA-00462-2013.

CERTIFICATE

We certify that the research "Changes in tissue and blood markers of oxidative stress, induced by different mate tea (*Ilex paraguariensis*) treatments", process number FOA-00462-2013, under responsibility of ANA CLÁUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE and with collaboration of Keny Gonçalves Tirapeli, Adriane Belló Klein, Susana Francisca Llesuy, Rita Cássia Menegati Dornelles and Camila Scacó Pereira agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.


Prof. Dr. EDILSON ERVOLINO
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 – Vila Mendonça
Tel (18) 3636-3234 Fax (18) 3636-3333 E-mail: eervolino@fso.unesp.br

Anexo 2. Artigo submetido para a revista científica *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Time-dependent changes of antioxidant defenses and lipid peroxidation in erythrocytes of aged female rats induced by a low dose of mate tea (*Ilex paraguariensis*)

Authors' names:

Keny Gonçalves Tirapeli^a, Camila Scacco Pereira^a, Ariana Aparecida Ferreira Pereira^a, Matheus da Silva Brasilino^b, Antonio Hernandez Chaves Neto^b, Rita Cássia Menegati Dornelles^c, Adriane Belló-Klein^d, Susana Francisca Llesuy^e, Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune^c

Institutional mailing addresses:

^aPrograma de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brazil

^bDepartment of Basic Sciences, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brazil

^cPrograma de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas and Department of Basic Sciences, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brazil

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

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

*Corresponding author:

Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune

Department of Basic Sciences

Araçatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista - UNESP

Rodovia Marechal Rondon, km 527, CEP 16018-805

Araçatuba, SP, Brazil

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

Abstract

Erythrocytes have been used as model cells to investigate oxidative damage and possible intervention with antioxidant in the study of aging. Mate tea (MT) reduces oxidative damage, but its action on aged females has not yet been elucidated. We investigated the effects of MT on oxidative damage and antioxidant defenses in erythrocytes of aged female rats. Animals were divided into adult (A, 5 months old), baseline (B), controls (C2, C4, C6) and MT treated groups (M2, M4, M6). Control groups, baseline, and treated groups were 17 months old. Treated groups received MT daily (20 mg/kg body weight, gavage) for two, four, or six weeks, respectively. Plasma antioxidant capacity, determined by ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, malondialdehyde levels (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) enzymes were evaluated in erythrocytes. Baseline animals (17 months) had decreased FRAP and enzymatic antioxidant defenses and increased MDA when compared to adult animals (5 months). MT treatment increased FRAP, SOD, GPx, and decreased MDA after four weeks, but did not change CAT. The use of a low dose of MT is a promising treatment to reduce the accumulation of age-related oxidative damage in erythrocytes in female rats.

Keywords: mate tea, oxidative stress, aging, antioxidant defense, lipid peroxidation

1. Introduction

The chronic state of oxidative stress results in the accumulation of oxidative damage and has been assumed to be an underlying cause of many age-related manifestations [1, 2]. In women, oxidative damage is more significant in the menopausal period, resulting from decreased antioxidant defenses [3].

Oxidative stress results from an imbalance between the cellular production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses [4]. The latter includes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) enzymes, as well as other numerous endogenous molecules (e.g. glutathione and uric acid) [5]. Decreased antioxidant defense has been identified as one of the major causes of oxidative damage accumulation during aging [6].

Erythrocytes have been extensively used to investigate age-associated oxidative damage and possible intervention with different natural antioxidant products [7, 8]. The erythrocyte membrane is highly sensitive to oxidative damage [9] and can be compared to the plasma membrane of most eukaryotic cells in terms of structure and function [10]. Membrane lipids are particularly susceptible to ROS because of their high polyunsaturated fatty acid content, and lipid peroxidation can affect fluidity, ion transport, and loss of enzymatic activity of the cell [8, 11]. Lipid peroxidation is intimately involved in age-related manifestations, like Alzheimer's disease, atherogenesis, cardiopathy, and osteopenia [9,12,13].

Dietary supplementation with natural polyphenol-rich products has been considered a promising approach to counteract age-related manifestations [14]. For example, polyphenols may stimulate resistance to oxidative stress in erythrocytes [15, 16]. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is rich in polyphenols and therefore has

antioxidant capacity. It is widely consumed as a tea in southern Latin America and is gaining in popularity around the world [17]. Several studies have demonstrated the ability of high doses of mate tea (MT) to reduce oxidative damage in different tissues [18-22]. However, the effects of a low dose of MT on markers of oxidative stress in erythrocytes of females during aging are not fully understood and need to be further investigated.

Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of a low dose of MT on oxidative damage and antioxidant defenses in aged female rats and to verify the necessary MT treatment time to promote adaptations of antioxidant systems. Changes on oxidative stress parameters were also observed during aging.

2. Materials and Methods

2.1. Mate tea. Soluble mate tea (MT, Leão Jr. ®, Curitiba, PR, Brazil) was obtained in the local market and the same batch was used during the whole experiment. This batch was previously characterized in another study, which demonstrated the high polyphenol content [23]. MT was prepared daily according to the manufacturer's instructions.

2.2. Animals and experimental groups. Female Wistar rats of 5 months (adult group A) and 17 months old were housed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ $55 \pm 5\%$ relative humidity, 12 h/12 h light/dark cycle, with free access to commercial feed (Purina, Brazil) and water. Aged animals (17 months old) were subdivided into a baseline group (B), control groups (C2, C4, and C6) and MT treated groups (M2, M4, and M6). Animals from M2, M4, and M6 groups received MT daily (20 mg/kg body weight) by gavage for two, four, and six weeks, respectively. Water was administered by gavage for two (C2), four

(C4), and six (C6) weeks to control groups. Groups A and B were euthanized when they reached 5 and 17 months old, respectively; groups C and MT were euthanized after their specific treatment time. The number of animals per group was ten.

The estrous cycle was monitored through vaginal fluid analysis for two weeks before the treatment started, two weeks during the treatment period, and two weeks before the sacrifice of animals from groups C and MT. In groups A and B, the estrous cycle was monitored for two weeks before sacrifice. Only adult female rats (group A) with regular estrous cycle and aged acyclic female rats (groups B, C, and MT) were used. The acyclic phase was characterized by irregular cycles and can be compared to the perimenopausal phase in women [24-25].

Body weight (BW), water, and food consumption were measured daily until the end of the experiment. After different treatment periods, the animals were anesthetized using sodium pentobarbital (50mg/kg BW) and a cardiac puncture was performed, resulting on death of animals by exsanguination. The protocol was approved by the local institutional Animal Care and Use Committee (Protocol Number: 00462-2013).

2.3. Blood Samples. Blood was obtained by cardiac puncture, transferred to heparinized tubes and centrifuged at 1000 x g for 15 min at 4°C (Centrifuge 5810R-rotor S-4-104, Eppendorf, USA). Plasma was removed by aspiration and then frozen at -80°C until analysis. Erythrocytes were washed three times with saline solution and then centrifuged at 1000 x g for 3 min at room temperature. Erythrocytes were prepared by adding a solution containing 4 mmol/L MgSO₄ and 1 mmol/L acetic acid (1:100 solution/erythrocytes, v/v) and frozen at -80°C.

2.4. *Determination of antioxidant capacity in plasma.* The antioxidant capacity was determined using the ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay) as described by Benzie and Strain [26]. Absorbance was estimated at 595 nm (Hitachi U 1100, Tokyo, Japan) and the results were calculated using FeSO_4 as a standard.

2.5. *Determination of thiobarbituric acid reactive substances in erythrocytes.* The lipid peroxidation products were measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), which results in the production of malondialdehyde (MDA), the main product of this reaction. MDA was determined as described by Buege and Aust [27]. Trichloroacetic acid (10% w/v) was added to the sample to precipitate proteins and to acidify the medium. This mixture was then centrifuged (1000 x g, 3 min). Thiobarbituric acid (0.67% w/v) was added to the reaction medium after extraction of the 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 protein. The molar absorption coefficient used was $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.6. *Plasmatic uric acid assay (UA).* Uric acid was quantified by the enzymatic colorimetric method, based on oxidation catalyzed by uricase (Labtest Diagnóstica Kits SA, MG, Brazil).

2.7. *Determination of antioxidant enzymatic defense in erythrocyte.* SOD, CAT, and GPx were estimated in erythrocytes. SOD activity was assayed by the method of Marklund and Marklund [28] based on the inhibition of autoxidation of pyrogallol at an alkaline pH by the enzyme. The amount of enzyme required to achieve 50% inhibition of autoxidation of pyrogallol was considered as one unit of enzymatic activity. CAT activity was analyzed as described by Boveris and Chance [29], based

on the consumption of the substrate hydrogen peroxide and results were expressed as nmol of H₂O₂ consumed/min/mg protein. GPx activity was assayed as ascribed by Flohé [30], which measured NADPH oxidation at 340 nm and was expressed as mmol of GSH consumed/min/mg protein.

2.8. Erythrocyte protein assay. To express enzyme activity, the protein concentration was estimated by the Lowry method with bovine serum albumin used as standard [31].

2.9. Statistical Analysis. The statistical analyses were performed using Graph Pad Prism (version 5.0). The data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). To examine individual main effects, age, and treatment with MT, groups A, B, C, and MT were compared using the unpaired Student's *t*-test. Analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's *post hoc* test was used to investigate possible variations during aging. $p < 0.05$ was considered as significant in all analyses.

3. Results

To investigate the effects of aging on antioxidant defense and oxidative damage, adults (A) and aged female rats (B, baseline group) were compared. To verify the effects of time on aging-associated changes, groups C2, C4, and C6 were compared to group B. The effects of MT treatment were investigated by comparing all control groups (C2, C4, and C6) to their respective treated groups (M2, M4, and M6).

Food, water intake and BW did not change during the experimental period in all groups (data not shown).

Aging resulted in increased lipid peroxidation products and MT reversed this effect. MDA was 32.4% higher in group B ($p < 0.05$) (38.36 ± 1.71 nmol/mg) than in group A (28.97 ± 2.23 nmol/mg) (Figure 1). Although no difference was observed between B and C2 (43.83 ± 1.51 nmol/mg) or C4 (39.51 ± 1.95 nmol/mg), the values of C6 (44.79 ± 2.11 nmol/mg) were 17% higher than B. After two weeks of MT treatment, there was no difference in MDA (C2: 43.83 ± 1.51 nmol/mg; M2: 40.01 ± 0.79 nmol/mg); however, a significant reduction in values occurred after four (C4: 39.51 ± 1.95 nmol/mg; M4: 32.16 ± 1.88 nmol/mg) and six weeks (C6: 44.79 ± 2.11 nmol/mg; M6: 32.25 ± 1.82 nmol/mg) of MT treatment. The differences were 18.6% and 27.9% respectively. MDA values of M6 were much closer to adult animals.

MT treatment was able to reverse the reduction of plasma antioxidant activity resulting from aging. FRAP values (Figure 2) were decreased (22%) in group B (54.55 ± 1.63 nmol/L) when compared to group A (70.48 ± 1.05 nmol/L). No significant differences were observed between groups B and C2 (53.25 ± 1.48 nmol/L) or B and C4 (57.23 ± 1.07 nmol/L), but FRAP in group C6 (65.23 ± 1.47 nmol/L) was significantly higher than in B. MT treatment for two weeks (M2: 52.30 ± 0.54 nmol/L) was not able to increase FRAP; however, after four weeks (M4: 60.44 ± 0.91 nmol/L) and six weeks (M6: 70.29 ± 1.12 nmol/L), significant increases of 5.6% and 7.75% respectively were found.

Plasma uric acid was modified during aging, but was unchanged with MT treatment. There was no difference between groups A (3.67 ± 0.02 mg/dL) and B (3.39 ± 0.12 mg/dL), however the comparison between group B and control groups (C2: 4.01 ± 0.07 mg/dL; C4: 4.30 ± 0.10 mg/dL; C6: 4.41 ± 0.07 mg/dL) demonstrated that there was a slight but significant increase in this parameter over

time (Figure 3). No differences were found when all control groups were compared to their respective MT-treated groups (M2: 4.29 ± 0.16 mg/dL; M4: 4.24 ± 0.06 mg/dL; M6: 4.28 ± 0.12 mg/dL).

Antioxidant enzymatic defense was decreased during aging, and MT administration resulted in increased SOD and GPx activity. The values of SOD, GPx, and CAT activity (Table 1) were 50%, 18% and 36% lower in group B than in A, respectively. No changes were observed on SOD and CAT activity when groups C2, C4 or C6 were compared to B; however, there was a significant reduction in GPx over time. The values were 14% (C2), 32% (C4) and 21% (C6) lower than group B. In the other studied parameters, MT did not alter enzymatic antioxidant defense after two weeks of treatment. After four and six weeks of MT treatment, a 33% and 63% increase in SOD was observed. GPx activity was significantly higher in M4 (30%) and M6 (30%) than in the control groups (C4 and C6). The MT dose used in this study was not sufficient to promote significant changes in CAT even after six weeks of treatment.

4. Discussion

Mate tea is a popular beverage in South America and has recently been investigated as a natural supplement to decrease oxidative stress [22]. We demonstrated that a low dose of MT can be used to increase antioxidant defense and reduce oxidative damage during pre-estropause and may be a treatment to correct the high level of oxidative stress during the perimenopause period.

Changes in oxidative stress markers during aging can be markedly variable, depending on gender, animal model, age, and analytical techniques. As a result, we

chose to analyze the changes caused by aging in the experimental model before observing the actions of MT treatment.

Female aging is accompanied by reproductive failure. In female rats, this period is called estropause, and can be characterized by absence of estrous cycles. This phase is preceded by pre-estropause, which shows irregular cycles and can be compared to the perimenopause in women [25]. A few studies have showed increased oxidative stress in aged females [32, 33], but there is no information on this for the pre-estropause and perimenopause periods.

To investigate the effects of aging on female rats, we used erythrocytes which are continually exposed to oxidative species, due to ROS production during hemoglobin oxidation that can reflect the sensitivity of the animal to oxidative condition [8].

In agreement with the literature, we observed that aging results in increased lipid peroxidation as indicated by increased erythrocyte MDA levels. Increased age-related MDA has been demonstrated in several tissues (e.g. heart, lung, liver, kidney, and gastrocnemius and soleus muscles) of male rats [34] and in female mouse brain [32]. Increased MDA in erythrocytes has been noted in male rats during aging [35]. A significant increase was also demonstrated in aged women when compared to young healthy ones [36]. High MDA levels in aged animals can be a result of inadequate antioxidant levels [7].

There is a high correlation between oxidative damage and antioxidant capacity during aging [37]. Antioxidant FRAP is a very simple method used to evaluate the severity of oxidative stress in aging [38]. A progressive and slow decline in plasma FRAP was observed during aging in women and men [37, 39], but age-related

variations in FRAP of female rodents have not been described in the literature. Our results showed an age-related decrease in plasma FRAP when comparing the adult group to the baseline group, and an increase was observed in relation to age, when group C6 (18.5 months) was compared to group B (17 months). Next, we investigated UA, since 60% of plasma FRAP can result from UA [40], and an increase in UA has been associated with aging [41]. Although there was no difference between adult and baseline groups, a significant increase in UA was observed when control aged groups were compared to baseline. These data indicated that during aging, an increase in UA may occur, in agreement with the literature. This increase in UA could be a result of decreased UA hydrolysis by uricase and/or increased UA production by xanthine oxidase [41]. The UA increase observed in our results can explain the increased FRAP in group C6.

The antioxidant enzymatic system includes SOD, CAT, and GPx. SOD converts superoxide to hydrogen peroxide, and CAT and GPx remove hydrogen peroxide [5, 42, 43]. Studies correlating antioxidant enzymatic activity and aging are controversial. Most authors have shown decreased age-related enzymatic activity in healthy and male rats in several tissues, including erythrocytes [33, 44, 45]. Supporting these data, we observed lower SOD, GPx and CAT activity in aged groups when compared to adult groups, although decreased activity over 6 weeks was observed only in GPx. Decreased CAT activity may affect overall antioxidant enzyme defense, since H_2O_2 is an inhibitor of SOD activity [46]. A reduction in the enzymatic antioxidant defense observed in our results may be the result of an accumulation of H_2O_2 and superoxide anion, contributing to greater accumulation of oxidative damage during aging. Another study showed no significant changes in CAT, SOD, and GPx during aging in

erythrocytes [47], while others showed CAT and GPx increases with age in erythrocytes of healthy people, SOD was negatively correlated with aging [33]. In a different study using human erythrocytes, no differences were observed in SOD in the aged group, although there was a decrease in GPx activity [48]. These discrepancies in results can be attributed to differences in age, gender, and species studied.

Different approaches with natural antioxidants have been proposed to minimize oxidative stress during aging. MT is a popular beverage with high antioxidant activity [18, 49]. More than one million people around the world consume about one to two liters of MT daily [50]. In this study, we demonstrated that low daily doses, equivalent to two cups of tea per day in humans, increased antioxidant defense and reduced oxidative damage in aged female rats. Previous studies have used different doses of MT, ranging from 62.5 mg/kg/day [51] up to 2000 mg/kg/day, the latter equivalent to 3 L of tea per day [22]. Although there are indications that the administration of 2000 mg/kg/day is well tolerated for chronic administration [52], we chose to use 20 mg/kg/day, a hundred times lower than that used in some studies. MT has a great amount of tannin [53], which in excess can interact negatively with the absorption of certain nutrients, like minerals [54]. Furthermore, dietary antioxidant intake should be balanced, since ROS plays a role in normal physiological signaling and is crucial for the maintenance of ROS and antioxidant balance [55].

Our data showed that low a dose of MT was able to reduce MDA increase caused by aging when used for at least 4 weeks. The capacity of MT treatment to reduce MDA has been established in other experimental models, but there are no reports on the effects of MT in erythrocytes of aged females. MT treatment (500

mg/day) over 15 days reduced MDA increase induced by alcohol in 45 day-old male rats [56]. Martins et al. [22] reported a decrease in MDA in six week old male mice when 1000 or 2000 mg/kg was administered for 60 days. Another study demonstrated that both acute (one hour) and chronic treatment (one week) with MT (5 g/500 mL/day) in healthy adults resulted in a significant decrease of MDA plasma levels [19]. Our study found no reduction of this parameter after two weeks, possibly because we used a significantly lower dose than that used in the previous study.

In the present study, MT improved FRAP in aged female rats in a time-dependent manner. Similarly, increased FRAP was noticed only after four weeks of treatment. The capacity of MT (25 g/500 mL/day) to increase FRAP has been demonstrated in adult healthy patients after one hour of consumption [20]. However, Matsumoto et al. [19] observed no difference in this parameter in adult women after one hour. However, after one week, the results of the ABTS assay were enhanced. Using the same method, enhancement was observed after MT ingestion for 60 days (2.5 g in 200 ml of water) by adults [19]. Boaventura et al. demonstrated a significant increase in FRAP levels in adults that ingested one liter (20 mg MT/mL) of MT for 90 days, including those who had dyslipidemia [21].

When studying the effects of MT on antioxidant enzymes, the results reported in the literature are varied, and these discrepancies could be associated with treatment time, dose, gender, and experimental model. We observed that treatment with MT over four weeks increased SOD and GPx activity, but was not able to alter CAT activity. Previous studies have shown enhancement of SOD activity in erythrocytes of adult people (women and men) after 60 days of MT ingestion [18]. Likewise, the activity of these enzymes in erythrocytes of young male rats was increased after MT

treatment when oxidative stress was induced by ethanol [56]. The analysis of the leukocytic gene expression by GPx, SOD, and CAT one week after MT ingestion in adult healthy women demonstrated that this tea is a positive modulator of the process [19]. Our results are especially notable, as according to Halliwell [55], increasing the intrinsic antioxidant defense is the most important strategy to delay aging. In addition, increased antioxidant defense can improve longevity [57].

5. Conclusion

We concluded that the use of a low dose of mate tea is a promising treatment to reduce the accumulation of age-related oxidative damage in erythrocytes in female rats.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors wish to thank Karina Vieira for corrections in English grammar.

References

- [1] D. Harman, "Free radical theory of aging: an update increasing the functional life span," *Annals of the New York Academy e Sciences*, vol. 1067, pp. 10–21, 2006.
- [2] P. Monaghan, N.B. Metcalfe and R. Torres, "Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: Mechanisms, measurements and interpretation," *Ecol Lett*, vol. 12, pp.75–92, 2009.

- [3] 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, no. 13, pp. 361-367, 2012.
- [4] B. Halliwell, "Reactive oxygen species and the central nervous system," *Journal of Neurochemistry*, vol. 59, no.5, pp. 1609–1623, 1992.
- [5] O.I. Aruoma, "Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 75, no. 2, pp. 199-212, 1998.
- [6] V.B.C.Junqueira , S. B.M. Barros, S.S. Chan, L. Rodrigues , L. Giavarotti, R. L. Abud and G. P. Deucher, "Aging and oxidative stress," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 25, no. 1–2, pp. 5–16, 2004.
- [7] C. Widén, A. Ekholm, M. D. Coleman, S. Renvert, and K. Rumpunen, "Erythrocyte antioxidant protection of rose hips [*Rosa* spp.]," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2012, pp.621579, 2012.
- [8] P. Sangeetha, M. Balu, D. Haripriya and C. Panneerselvam, "Age associated changes in erythrocyte membrane surface charge: Modulatory role of grape seed proanthocyanidins," *Experimental Gerontology*, vol. 40, no. 10, pp. 820–828, 2005.
- [9] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 3, no. 1pp. 2-12, 2010.
- [10] E. Niki, "Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects," *Free Radical Biology E Medicine*, vol. 47, no.5, pp. 469-484, 2009.
- [11] D. Chiu, F. Kuypers and B. Lubin, "Lipid peroxidation in human red Cells," *Semin. Haematol.*, vol.26, pp. 257–276, 1989.
- [12] S. Yang, P. Madyastha, S. Bingel, W. Ries and L. Key, "A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts," *Journal of Biological Chemistry*, vol.276, no. 8, pp.5452-5458, 2001.
- [13] V. Calabrese, G. Scapagnini, A. Ravagna, C. Colombrita , F. Spadaro , D.A. Butterfield , A.M. Giuffrida Stella , "Increased expression of heat shock proteins in rat brain during aging: relationship with mitochondrial function and glutathione redox state," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 125, no. 4, pp. 325–335, 2004.

- [14] B.L. Queen, T.O. Tollefsbol, "Polyphenols and aging," *Curr Aging Sci*, vol. 3, pp. 34–42, 2010.
- [15] K. A. Voudin, B. shukitt-hale, mackonnons, W. kalt, J.A. Joseph, "Polyphenols enhance red blood cell resistance to oxidative stress in vitro and in vivo," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1523, pp. 117, 2000.
- [16] C. Angeloni, L. Pirola, D. Vauzour, T. Maraldi, "Dietary polyphenols and their effects on cell biochemistry and pathophysiology," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2012, 2012.
- [17] C. I. Heck and E.G. de Mejla, "Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations," *Journal of Food Science*, vol. 72, no. 9, pp. 138-151, 2007.
- [18] D. P. Arçari, V. B. Porto, E. R. V. Rodrigues, F. Martins, R. J. de Lima, A. C. H. F. Sawaya, M. L. Ribeiro and P.O. Carvalho, "Effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) supplementation on oxidative stress biomarkers and LDL oxidisability in normo- and hyperlipidaemic humans," *Journal of Functional Foods*, vol. 3, no. 3, pp. 190–197, 2011.
- [19] R. L. Matsumoto, D. H. Bastos, S. Mendonça, V.S. Nunes, W. Bartchewsky, M.L. Ribeiro and P. O. Carvalho, "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.
- [20] E. L. da 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 Research International*, vol. 41, no. 10, pp. 973–979, 2008.
- [21] B. C. B. Boaventura, P.F. Di Pietro, A. Stefanuto, G. A. Klein, E. C. de Moraes, F. 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, no. 6, pp. 657–664, 2012.
- [22] F. Martins, A. J. Suzan, S. M. Cerutti, et al., "Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver," *British Journal of Nutrition*, vol. 101, no. 4, pp. 527–532, 2009.
- [23] D.P. Arçari, W. Bartchewsky, T. W. dos Santos, Karim A. Oliveira, Alexandre Funck, J. Pedrazzoli, M. F.F. de Souza, M. J. Saad, D.H.M. Bastos, A. Gambero, P.O.

- Carvalho and M.L. Ribeiro, "Antiobesity Effects of yerba maté Extract (*Ilex paraguariensis*) in High-fat Diet-induced Obese Mice," *Obesity*, vol. 17, no.12, 2009.
- [24] J. J. Le Fevre and M. K. McClintock, "Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior," *Biol Reprod*, vol. 38, no. 4, pp. 780-789, 1988.
- [25] B. A. Kermath and A. C. Gore, "Neuroendocrine control of the transition to reproductive senescence: lessons learned from the female rodent model," *Neuroendocrinology*, vol. 96, no. 1, pp. 1–12, 2012.
- [26] I.F. Benzie and J. J. Strain, "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay," *Analytical Biochemistry*, vol. 239, no. 1, pp. 70-76, 1996.
- [27] J. A. Buege and S. D. Aust, "Microsomal lipid peroxidation," *Methods in Enzymology*, vol. 52, pp. 302-310, 1978.
- [28] S. Marklund and G. Marklund, "Involvement of the superoxide anion in radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase," *European Journal of Biochemistry*, vol. 47, no. 3 pp. 469-474, 1974.
- [29] A. Boveris and B. Chance, "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen," *Biochemical Journal*, vol. 134, no. 3, pp. 707-716, 1973.
- [30] L. Flohé and W. A. Gunzler, "Assay of glutathione peroxidase," *Methods in Enzymology*, vol. 105, pp. 114-121, 1984.
- [31] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265-275, 1951.
- [32] S. Leutner, A. Eckert, and W. E. Müller, "ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain," *Journal of Neural Transmission*, vol. 108, no. 8-9, pp. 955–967, 2001.
- [33] M. E. Inal, G. Kanbak, and E. Sunal, "Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging," *Clinica Chimica Acta*, vol. 305, no. 1-2, pp. 75-80, 2001.

- [34] F. Gündüz, Ü. K. Sentürk, O. Kuru, B. Aktekin and M. R. Aktekin, "The Effect of One Year's Swimming Exercise on Oxidant Stress and Antioxidant Capacity in Aged Rats," *Physiol. Res.*, vol. 53, pp. 171-176, 2004.
- [35] E. M. Kawamoto, A. R. Vasconcelos, S. Degaspari, A. E. Böhmer, C. Scavone and T. Marcorakis "Age-related changes in nitric oxide activity, cyclic GMP, and TBARS levels in platelets and erythrocytes reflect the oxidative status in central nervous system," *Age (Dordr)*, vol. 35, no. 2, pp. 331-342, 2013.
- [36] E. M. Kawamoto, C. D. Munhoz, I. Glezer, et al. , "Oxidative stress in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease," *Neurobiology of Aging*, vol. 26, no. 6, pp. 857–864, 2005.
- [37] S. I. Rizvi, R. Jha, and P. K. Maurya, "Erythrocyte plasma membrane redox system in human aging," *Rejuvenation Research*, vol. 9, no. 4 pp. 470-474, 2006.
- [38] C. López-Alarcóna, and A. Denicolab, "Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays," *Analytica Chimica Acta*, vol. 763, pp.1– 10, 2013.
- [39] M. Andriollo-Sanchez, I. Hininger-Favier, N. Meunier, et al. , "Age-related oxidative stress and antioxidant parameters in middle-aged and older European subjects: the ZENITH study," *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 59, no. 2, pp. 58–62, 2005.
- [40] D. D. M. Wayner, G. W. Burton, K. U. Ingold, L. R. C. Barclay, and S. J. Locke, "The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human-blood plasma," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 924, no. 3, pp. 408–419, 1987.
- [41] B.N. Ames, R. Cathcart, E. Schwiers, And P. Hochsteint, "Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis," *Proc. NatL Acad. Sci. USA*, vol. 78, No. 11, pp. 6858-6862, 1981.
- [42] K. D. Jacob, N. N. Hooten, A. R. Trzeciak and M. K. Evans, "Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 134, no. 3-4, pp.139–157, 2013.

- [43] J.G. Scandalios, "Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 38, no. 7, pp. 995-1014, 2005.
- [44] V. S. 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," *Experimental. Gerontology.*, vol 43, no. 3, pp. 176-183, 2008.
- [45] L. Guemouri, Y. Artur, B. Herbeth, C. Jeandel, G. Cuny, and G. Siest, "Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood," *Clinical Chemistry*, vol. 37 no. 11, pp. 1932-1937, 1991.
- [46] H. Bakala, M. Hamelin, J. Mary, C. Borot-Laloi and B. Friguet, "Catalase, a target of glycation damage in rat liver mitochondria with aging," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1822, no.10, pp. 1527-1534, 2012.
- [47] Y. A. Barnett and C. M. King, "An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans," *Mutation Research*, vol. 338, no. 1–6, pp. 115–128, 1995.
- [48] V. M. Mendoza-Núñez, M. Ruiz-Ramos, M. A. Sánchez-Rodríguez, R. Retana-Ugalde, and J. L. Muñoz-Sánchez, "Aging–related oxidative stress in healthy humans," *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, vol. 213, no 3, pp.261-268, 2007.
- [49] N. Bracesco, A. G. Sanchez, V. Contreras, T. Menini, and A. Gugliucci, "Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 136, no. 3, pp. 378-384, 2011.
- [50] K.P. Burris, F.M. Harte, P.M Davidson, C.N. Stewart Jr., and S Zivanovic, "Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.): a review," *Chilean Journal of Agricultural Research* , vol. 72, no. 2, pp. 269-274, 2012.
- [51] R.D.S. Prediger, M.S. Fernandes, D. Rial, S. Wopereis, V.S. Pereira, T.S. Bosse, C.B. Da Silvab, R.S. Carradore, M.S. Machado, V. Cechinel-Filho and L. Costa-Camposb, "Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory," *Journal of Ethnopharmacology*, vol.120, pp. 465–473, 2008.

- [52] F. Andrade, C. A. C. Albuquerque, M. Maraschin, and E. L. da Silva, "Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract: Results of acute and 90 days subchronic toxicity studies in rats and rabbits," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 2, pp. 328–334, 2012.
- [53] A. W. Borille, C. B. Reissmann, and R. J. S. Freitas "Relação entre compostos fitoquímicos e o nitrogênio em morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) ," *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, vol. 23, no. 1, pp.183-198, 2005.
- [54] S. M. F. Cozzolino, "Biodisponibilidade de minerais," *R. Nutr. Campinas*, vol. 10, pp. 87-98, 1997.
- [55] B. Halliwell, "Free radicals and antioxidants: updating a personal view," *Revista de Nutrição*, Vol. 70, no.2, 257–265, 2012.
- [56] 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.
- [57] R. Saraymen, E. Kilic, S. Yazar, and M. Cetin, "Influence of sex and age on the activity of antioxidant enzymes of polymorphonuclear leukocytes in healthy subjects," *Yonsei Med J*, vol. 44, no. 1, pp. 9-14, 2003.

Figures – Legends

FIGURE 1

Effects of age and MT treatment on MDA in erythrocytes. Values were expressed as mean $\pm$ standard error, n=10/group. [#]when comparing baseline group (B) to adult (A), Student's t-test; [&]when comparing groups C2, C4, and C6 to group B (ANOVA

followed by Dunett's *post hoc* test); *when comparing groups M2, M4, and M6 to C2, C4, and C6, respectively (Student's *t*-test). Significance level: 5%.

FIGURE 2

Effects of age and MT treatment on plasma antioxidant capacity (FRAP). Values were expressed as mean $\pm$ standard error, $n=10/\text{group}$. #when comparing group baseline (B) to adult (A), Student's *t*-test; &when compared C2, C4, and C6 groups to group B (ANOVA followed by Dunett's *post hoc* test); *when comparing groups M2, M4, and M6 to C2, C4, and C6, respectively (Student's *t*-test). $p<0.05$.

FIGURE 3

Effects of age and MT treatment on plasma uric acid. Values were expressed as mean $\pm$ standard error, $n=10/\text{group}$. &when comparing groups C2, C4, and C6 to B (ANOVA followed by Dunett's *post hoc* test). $p<0.05$.

Figures

FIGURE 1

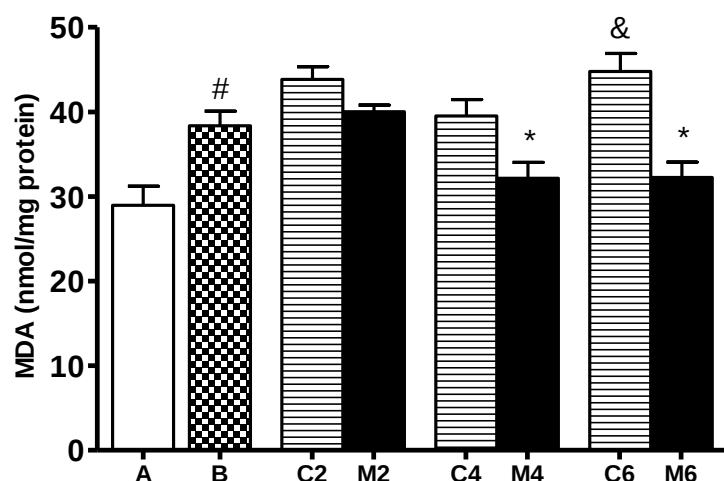


FIGURE 2

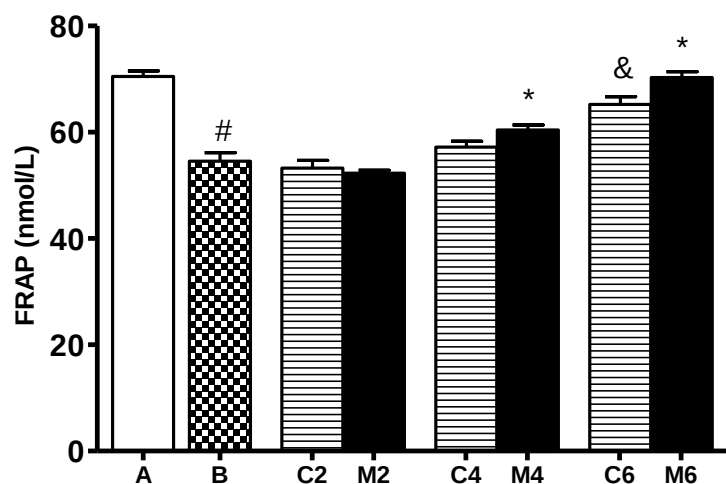
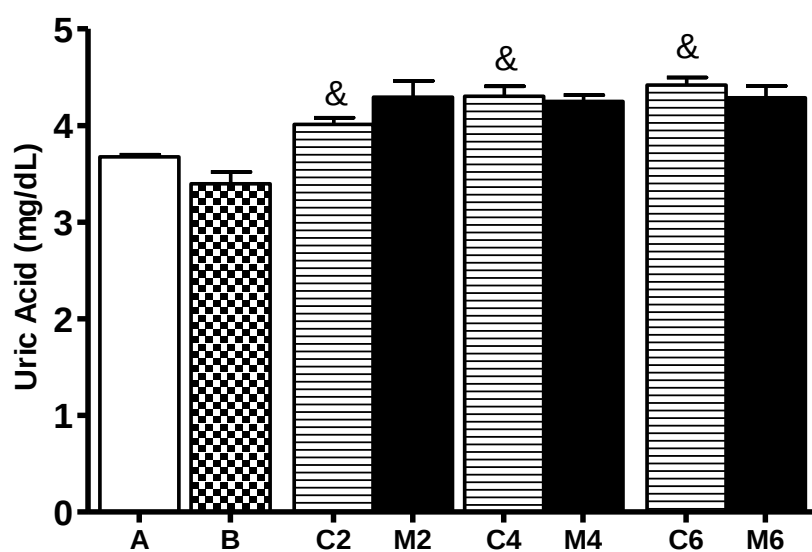


FIGURE 3



TABLE

TABLE 1

Mean $\pm$ standard error of enzymatic activity of SOD, CAT, and GPx in female adults (A), baseline (B), control groups (C2, C4, and C6) and MT treated groups (M2, M4 and M6). Units: U/min/mg protein (SOD), mmol GSH/min/mg protein (GPx) and nmol H_2O_2 /min/mg protein (CAT). N=10 per group. #when comparing baseline group (B) to

adult (A), Student's *t*-test; &when comparing groups C2, C4, and C6 to B (ANOVA followed by Dunett's *post hoc* test); *when comparing groups C2, C4, and C6 to M2, M4, and M6, respectively (Student's *t*-test). $p < 0.05$ were considered statistically significant in all analyses.

TABLE 1

Enzyme	A	B	C2	M2	C4	M4	C6	M6
SOD	0.84±0.15	0.43±0.04 [#]	0.50±0.02	0.50±0.04	0.39±0.04	0.52±0.03*	0.40±0.06	0.66±0.06*
GPx	79.4±4.22	65.2±1.45 [#]	56.4±2.51 ^{&}	54.7±2.7	44.3±3.42 ^{&}	57.1±3.52*	51.8±1.63 ^{&}	64.7±4.22*
CAT	0.47±0.04	0.29±0.03 [#]	0.23±0.05	0.30±0.04	0.35±0.03	0.33±0.04	0.36±0.10	0.41±0.04