

LIGA DE ENSINO DO RIO GRANDE DO NORTE
FACULDADE NATALENSE PARA O DESENVOLVIMENTO DO RIO GRANDE DO
NORTE- FARN

CURSO DE NUTRIÇÃO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE CATEQUINAS DO CHÁ VERDE
EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

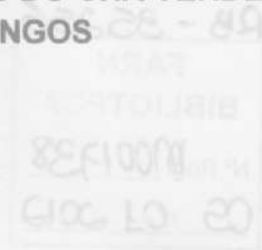
KELLY CRISTINA DE PAIVA SOUZA

NATAL/RN

2011

KELLY CRISTINA DE PAIVA SOUZA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE CATEQUINAS DO CHÁ VERDE EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS



Catálogo na Publicação – Biblioteca da FARN
Setor de Processos Técnicos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Nutrição da
Faculdade Natalense para o Desenvolvimento do Rio Grande do Norte, como
requisito final para a obtenção do grau de bacharel em Nutrição.

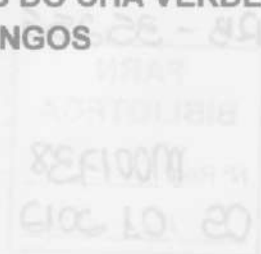
Orientador: Prof. M.Sc. André Luiz Silva Davim

NATAL/RN

2011

KELLY CRISTINA DE PAIVA SOUZA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE CATEQUINAS DO CHÁ VERDE EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS



Catálogo na Publicação – Biblioteca da FARN
Setor de Processos Técnicos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Nutrição da
Faculdade Natalense para o Desenvolvimento do Rio Grande do Norte, como
requisito final para a obtenção do grau de bacharel em Nutrição.

Orientador: Prof. M.Sc. André Luiz Silva Davim

NATAL/RN

2011

KELLY CRISTINA DE PAIVA SOUZA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO AO CURSO DE
NUTRIÇÃO DA FACULDADE NATALENSE PARA O DESENVOLVIMENTO
DO RIO GRANDE DO NORTE, APROVADO EM: 29 DE NOVEMBRO 2011,
PELA BANCA EXAMINADORA, COMPOSTA PELOS SEGUINTE
MEMBROS:

ANDRÉ LUIZ SILVA DAVIM

(Orientador)

ÉRIKA ALESSANDRA MELO DA COSTA

(1º Membro Examinador)

CLÁUDIA MARTINS DE OLIVEIRA

(2º Membro Examinador)

A Deus, que me permitiu chegar até aqui, superando todas as dificuldades, e
meu pai, que me apoiou em todos os momentos, e minha mãe, que me apoiou
incondicionalmente em todos os instantes e ao meu pai, por seu apoio e incentivo ao
longo dessa jornada.

Deus, que me permitiu chegar até aqui, superando todas as dificuldades, e
meu pai, que me apoiou em todos os momentos, e minha mãe, que me apoiou
incondicionalmente em todos os instantes e ao meu pai, por seu apoio e incentivo ao
longo dessa jornada.

A Deus, que me permitiu chegar até aqui, superando todas as dificuldades, e
meu pai, que me apoiou em todos os momentos, e minha mãe, que me apoiou
incondicionalmente em todos os instantes e ao meu pai, por seu apoio e incentivo ao
longo dessa jornada.

A Deus, que me permitiu chegar até aqui, superando todas as dificuldades, e
meu pai, que me apoiou em todos os momentos, e minha mãe, que me apoiou
incondicionalmente em todos os instantes e ao meu pai, por seu apoio e incentivo ao
longo dessa jornada.

A Deus, que me permitiu chegar até aqui, superando todas as dificuldades, e
meu pai, que me apoiou em todos os momentos, e minha mãe, que me apoiou
incondicionalmente em todos os instantes e ao meu pai, por seu apoio e incentivo ao
longo dessa jornada.

A Deus, que me permitiu chegar até aqui, superando todas as dificuldades, e
meu pai, que me apoiou em todos os momentos, e minha mãe, que me apoiou
incondicionalmente em todos os instantes e ao meu pai, por seu apoio e incentivo ao
longo dessa jornada.

A Deus, que me permitiu chegar até aqui, superando todas as dificuldades, e
meu pai, que me apoiou em todos os momentos, e minha mãe, que me apoiou
incondicionalmente em todos os instantes e ao meu pai, por seu apoio e incentivo ao
longo dessa jornada.

*Dedico este trabalho à Deus, que inspirou os meus
passos até a realização desse sonho; à minha mãe, que me apoio
incondicionalmente em todos os instantes e ao meu pai, por seu apoio e incentivo ao
longo dessa jornada.*

A Deus, que me permitiu chegar até aqui, superando todas as dificuldades, e
meu pai, que me apoiou em todos os momentos, e minha mãe, que me apoiou
incondicionalmente em todos os instantes e ao meu pai, por seu apoio e incentivo ao
longo dessa jornada.

A Deus, que me permitiu chegar até aqui, superando todas as dificuldades, e
meu pai, que me apoiou em todos os momentos, e minha mãe, que me apoiou
incondicionalmente em todos os instantes e ao meu pai, por seu apoio e incentivo ao
longo dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me permitiu chegar até aqui, inspirando meu caminho, sustentando o meu ser. Agradeço pelas incontáveis bênçãos derramadas sobre minha vida ao longo dessa jornada. Creio que jamais poderei retribuir por tão grande amor.

Aos meus pais, por todo o suporte, amor, paciência e humor nessa jornada. Devo à sua dedicação e fé a realização deste tão antigo e agora real, sonho.

Agradeço em especial ao meu orientador André Davim, pela confiança em mim depositada. Seu saber me fez crescer muito não apenas quanto ao projeto, mas enquanto profissional e ser humano. Obrigada pelo seu exemplo, paciência e dedicação.

Agradeço à base de pesquisa da qual fui membro, em especial ao Leônidas, Frazão, Diego e Leandro, por todo o apoio e saberes compartilhados durante a realização da pesquisa.

À Elizabeth, técnica do laboratório de histologia, que me emprestou seus conhecimentos e sua singular benevolência.

Ao corpo docente da instituição FARN pelos ensinamentos e incentivos repassados ao longo do curso.

Ao departamento de Bioquímica da UFRN pelo apoio na conclusão desse estudo.

As nutricionistas Daisy Nobre, Iêda Maria e Elsa Marques, que me proporcionaram conhecimento e incentivo, engrandecendo meu crescimento profissional e também, pessoal.

A minha amiga Renata Palhano, pelas madrugadas compartilhadas, as palavras de incentivo e encorajamento e sua alegria. Obrigada por fazer parte da minha história.

A minha amiga Edilza, pelas orações, palavras, e exemplo pessoal. Agradeço por nossas parcerias em trabalhos, projetos e por todos os momentos em que fui presenteada com seu carinho e amizade.

A minha amiga Dayana Lima, meus sinceros agradecimentos por nossas conversas e seu auxílio criativo ao tornar minha apresentação em slides tão bonita.

Agradeço também as amigas Rose, Jéssica e Metúsula, pelo incentivo, amizade e parcerias singulares em sala de aula e fora dela. Agradeço também pelas boas risadas.

À minha querida amiga Marineide, meus sinceros agradecimentos por seu incentivo e seu carinho em tantos momentos onde permanecer já não era tão fácil.

Às minhas amigas Isa, Valéria e Cris, agradeço por cada palavra, por cada oração e momentos partilhados. Poder chamá-las de amigas me alegra, me edifica.

À minhas amigas, Sheyla e Emília, que a muito fazem parte dos meus dias, agradeço pela amizade, amor e apoio nessa nova fase de minha caminhada.

À minha querida amiga Marineide, meus sinceros agradecimentos por seu incentivo e seu carinho em tantos momentos onde permanecer já não era tão fácil.

Sou imensamente grata a Deus por ter ainda tantas pessoas a agradecer, pessoas essas que tenho a graça de poder chamar de amigos, de ter seus ombros para apoiar meus cansaços, suas palavras para dar força aos meus passos e seu amor, para abençoar ainda mais este presente chamado vida! A todos eles, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O chá verde é atualmente a segunda bebida mais consumida do mundo, ficando atrás somente da água. Essa planta de origem asiática tem chamado a atenção da comunidade científica devido às suas propriedades terapêuticas, as quais se destacam a atividade antioxidante, anticarcinogênica, antiinflamatória, dentre outras. Tais propriedades estão associadas à presença das catequinas, que são polifenóis amplamente encontrados no chá verde. Considerando sua utilização como agente terapêutico e uma demanda cada vez mais crescente da população em busca de seus benefícios, há um interesse considerável em determinar os riscos que o chá verde pode causar à saúde. Estudos evidenciaram efeitos de toxicidade referentes ao seu consumo em longo prazo. Assim, a avaliação do potencial mutagênico, isto é, potencial de causar lesão no DNA, se torna necessário para assegurar o uso relativamente seguro de plantas medicinais. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar, in vivo, o potencial mutagênico das catequinas presentes no chá verde, através do ensaio de micronúcleo em células de medula óssea de roedores. Para a realização dos experimentos, foram utilizados oito camundongos machos adultos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, com peso entre 20 e 30g, escolhidos aleatoriamente. Os camundongos foram pré- tratados por um período de nove dias e eutanasiados no décimo dia, onde foi colhida a medula óssea para análise microscópica, a fim de verificar a presença ou não de micronúcleos. Após análise em microscopia óptica não foi observado a presença de micronúcleos na concentração e tempo avaliados. A utilização do chá verde como agente terapêutico é cada vez maior, visto que diversos estudos relatam suas propriedades biológicas. Assim, com os resultados obtidos nesse estudo, pode-se propor uma alternativa terapêutica barata e de fácil acesso, e segura no sentido de mesmo em doses elevadas de catequinas, não causar danos à molécula de DNA. Como forma de complementar esse estudo, temos como perspectivas futuras analisar a atuação do chá verde, com diferentes concentrações de catequinas, incluindo a de 85% e em doses diárias por um tempo prolongado, a fim de se observar se o tempo passa a ser ou não um fator determinante para a indução da lesão.

Termos de indexação: catequinas, chá verde, micronúcleo.

ABSTRACT

The use of tea is widespread, second only to water in worldwide consumption. This plant of asian origin has called the attention of the scientific community among to its therapeutic properties, which include the antioxidant activity, anticarcinogenic, anti-inflammatory and others. It's properties are associated to the presence of the catechins, which are widely found in green tea polyphenols. Considering the rise of its consumption and their use as therapeutic agent there is considerable interest in evaluat the risks that green tea can cause to health. Studies showed effects of toxicity for your long-term consumption. Thus, the evaluation of mutagenic potential, that is, potential to cause damage in the DNA, it becomes necessary to ensure the relatively safe use of medicinal plants. In this way, this study aims to evaluate, *in vivo*, the mutagenic potential of catequins present in green tea, through the micronucleus test cells in bone marrow of rodents. For the realization of the experiments, were used ten adult male mice of the species *Mus musculus*, Swiss lineage, weighing between 20 and 30 g, chosen randomly. They were pre-treated for nine days and sacrificed on the tenth day, where it was harvested bone cells for microscopic analysis to verify the presence or not of micronucleus. After optical microscopy analysis, the presence of micronucleus was not observed in the period and concentration evaluated. The use of green tea as a therapeutic agent is high, since several studies report their biological properties. Acording to the results obtained in this study, we can propose an alternative therapy wich is cheap and easily accessible, and secure in the sense that even in high doses of catechins, no damage was observed in DNA molecule. To complement this study, we have, as future prospects, evaluate the actions of green tea with different concentrations of catechins, including 85% and in daily doses for an extended time, to see if the time may or not be a determining factor for the induction of damage in the genetic material.

Index terms: catechins, green tea, micronucleus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo de fabricação dos chás	17
Figura 2 - Fórmula estrutural das catequinas	20
Figura 3 - A estrutura do micronúcleo	30
Figura 4 - Diferença na coloração de PCE e NCE	32
Figura 5 – Fotomicrografias de eritrócitos da medula óssea de camundongo tratado com solução salina	33
Figura 6 – Fotomicrografia de eritrócitos da medula óssea de camundongo tratado com concentração de 85% de catequinas	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA** → Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- DNA** → Ácido desoxirribonucléico
- EC** → Epicatequina
- ECG** → Galato 3 epicatequina
- EGC** → Epigallocatequina
- EGCG** → Galato 3 epigallocatequina
- FDA** → Food and Drug Administration
- GTE** → Green tea extract
- GTT** → Teste de Intolerância à Glicose
- IMC** → Índice de Massa Corporal
- LPS** → Lipopolissacarídeo
- MN** → Micronúcleo
- NCE** → Eritrócito normocromático
- OCDE** → Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico
- OMS** → Organização Mundial de Saúde
- PCE** → Eritrócito Policromático
- PG** → Peptídeo Glicano
- ROS** → Reactive oxygen species
- TMR** → Taxa Metabólica de Repouso
- UVB** → Raios ultravioleta B

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1 CHÁ VERDE	16
3.1.1 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA.....	19
3.1. 1.1 BIODISPONIBILIDADE DAS CATEQUINAS.....	20
3.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	21
3.2.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	21
3.2.2 ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA E ANTICARCINOGÊNICA.....	22
3.2.3 ATIVIDADE ANTI INFLAMATÓRIA	23
3.2.4 EXERCÍCIO FÍSICO E EMAGRECIMENTO	24
3.2.5 EFEITOS ADVERSOS.....	26
3.3 MUTAGENICIDADE.....	27
4 TESTE DO MICRONÚCLEO	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 MATERIAL.....	31
4.1.2 GRUPO EXPERIMENTAL	31
4.2 TESTE DO MICRONÚCLEO	31
4.3 OBTENÇÃO DO MATERIAL DE MEDULA ÓSSEA	31

4.2.2 PREPARAÇÃO E LEITURA DAS LÂMINAS	32
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

O chá verde é uma bebida de sabor agradável, obtido a partir da infusão de folhas e brotos da planta *Camellia sinensis*, sendo esta pertencente à família Theaceae. Atualmente, se destaca como sendo uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006). Originário da China, o chá é cultivado e consumido pelas suas características de aroma, sabor e propriedades medicinais em mais de 160 países, especialmente, asiáticos (KUMUDAVALLY et al., 2008). Possui em sua composição algumas vitaminas como as vitaminas C, B, e E, além de minerais como o potássio, magnésio e substâncias alcalóides. (SAITO, et al., 2007b). Dentre as substâncias bioativas mais estudadas atualmente, está a categoria dos flavonóides, que constituem o mais importante grupo de compostos fenólicos e estão naturalmente presente em diversos alimentos como frutas, vegetais, e alguns alimentos processados (chás, vinho tinto e chocolate). (VARGAS; SUAREZ et al., 2004, SAITO, et al., 2007 b).

As propriedades biológicas do chá verde, como atividade anti-inflamatória (DAVIM et.al., 2010, FERRARIO et al., 2011), anticarcinogênica, antitumoral, antilipêmica, quimiopreventiva, antioxidante (CHEN JH et al., 2004, SIDDIQUI et al., 2009), termogênica e redutora de risco cardiovascular (DULOO et. al., 1999 ; FAGUNDES, COSTA, 2003, WANG et al., 2011), vem cada vez mais despertando o interesse da comunidade científica e da população de modo geral. Além disso, surgem todos os dias, mais e mais aplicações para os extratos do chá verde. (SAITO, S. T, 2007). Entretanto, estudos evidenciaram efeitos adversos referentes ao seu consumo em longo prazo (BARTELS et al, 2003; INOUE et al, 2011).

Muitos compostos que fazem parte da composição química das plantas utilizadas como medicinais, podem ser mutagênicos e até carcinogênicos, quando ingeridos de forma indiscriminada. Equivocadamente a cultura popular acredita que fazer o uso exagerado de determinada planta não causa mal algum, pelo simples fato desta ser de origem natural. O emprego terapêutico do chá exige o conhecimento de seus compostos farmacologicamente ativos para a avaliação das potencialidades terapêuticas, tóxicas e para a formulação de uma estratégia adequada para seu uso.

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determina através da Resolução nº 90, de 2004, que todo medicamento fitoterápico deve ser avaliado quanto à sua toxicidade aguda ou por doses repetidas, bem como quanto à genotoxicidade.

Para a avaliação da genotoxicidade ou mutagenicidade, caso os fitoterápicos sejam utilizados em tratamentos de longa duração, a ANVISA (2004) determina que sejam empregados o teste de Ames ou o teste do Micronúcleo.

Ainda não existem evidências científicas de que o uso do chá verde seja isento de efeito genotóxico ou mutagênico para o organismo. Assim, a avaliação do potencial mutagênico, isto é, potencial de causar lesão no material genético, se torna necessário para assegurar o uso relativamente seguro do chá verde.

Considerando sua utilização como agente terapêutico e uma demanda cada vez mais crescente da população em busca de seus benefícios, há um interesse considerável em determinar os riscos que o chá verde pode causar a saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Determinar o risco do consumo de chá verde no que se refere ao potencial mutagênico.

2.2 - Objetivos Específicos

Avaliar o potencial mutagênico das catequinas do chá verde através do teste de micronúcleo em células da medula óssea de camundongos em concentração única, utilizando o extrato seco da *Camellia sinensis*.

Determinar, através de análise em microscopia óptica, a presença de micronúcleos nas células da medula óssea de camundongos submetidos ao tratamento com chá verde a uma concentração de 85% de catequinas.

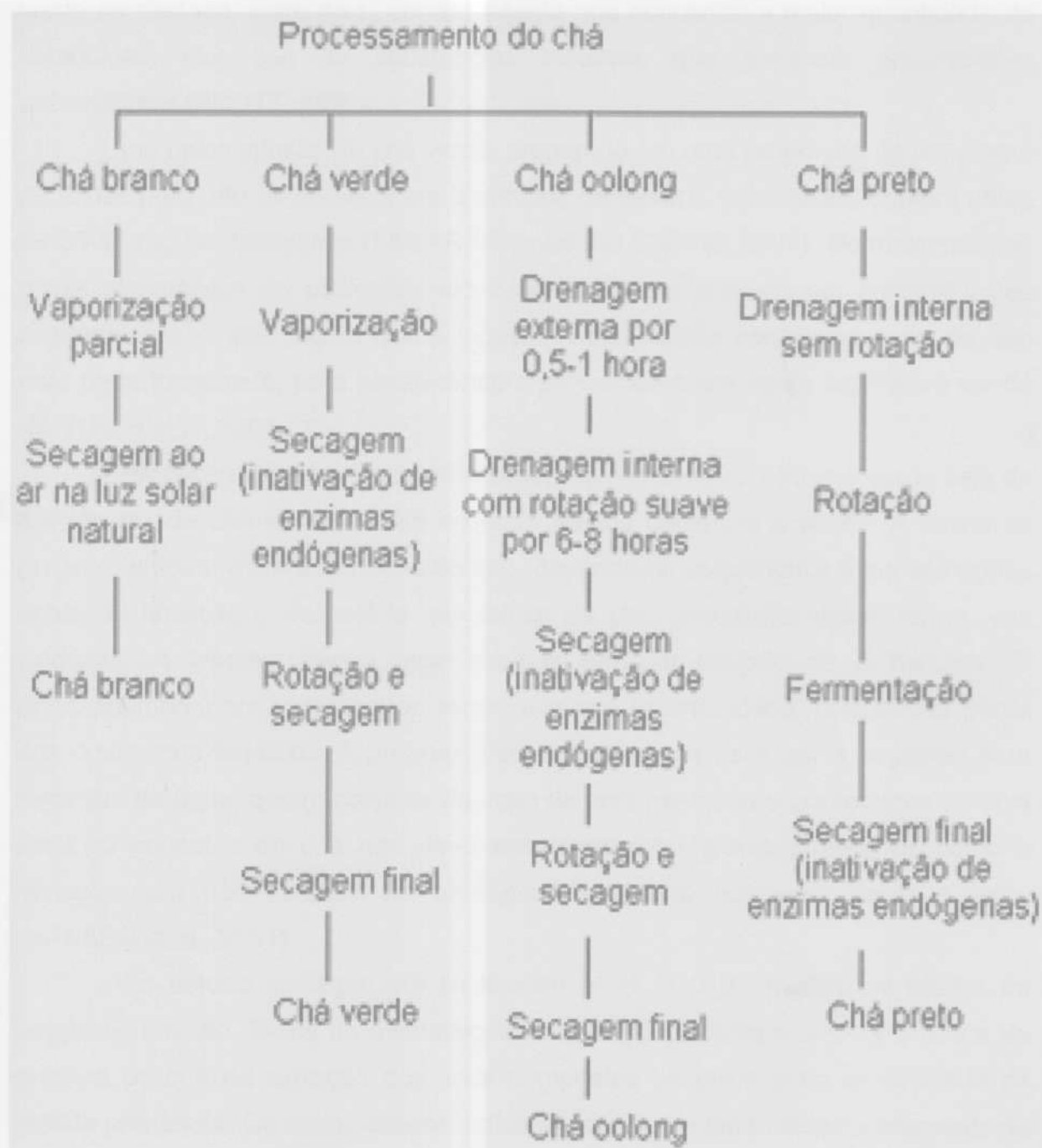
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Chá Verde

A *Camellia sinensis* é uma pequena árvore, bastante ramosa, pertencente à família *Theaceae* (*Tea* *sinensis*) e de origem asiática (SAITO, S.T et al., 2007b)

O chá proveniente das folhas da *Camellia sinensis* pode ser categorizado em quatro tipos, de acordo com seu nível de oxidação: o chá branco, feito das mais tenras folhas, por desidratação solar, mais raro e de maior custo, com alta capacidade antioxidante; o chá verde, o qual não sofre fermentação durante o processamento e deste modo conserva a cor original de suas folhas, o chá *oolong* que é parcialmente fermentado, resultando em um chá verde preto e o chá preto, cujo processo de fermentação é maior do que o do chá *oolong*, contribuindo assim para uma coloração escurecida, além de lhe conferir sabor característico (CHENG TO, 2006) (Figura 1).

Figura 1- Processamento dos chás provenientes da *Camelia sinenses*.



Fonte: Karori, et al, 2007

O grau de fermentação entre os diferentes chás é a chave para a explicação das diferenças entre os constituintes químicos destes, pois quanto maior o grau de fermentação, mais pobre em polifenóis e mais rico em cafeína será o chá. O chá verde se destaca, entre eles, por ser aquele que concentra a maior quantidade de catequinas, que são as substâncias bioativas que possuem propriedades antioxidantes (SCOTT, 1999).

Uma típica infusão de chá verde, preparada em uma proporção de um grama de folhas para 100 ml de água por 3 minutos de fervura, geralmente, contém cerca de 35-45 mg de catequinas (LAMARÃO *apud* BALENTINE 2001). Normalmente, os níveis plasmáticos de polifenóis são baixos, apresentando-se em concentrações micromolares, o que sugere que a ingestão deva ocorrer várias vezes ao dia, em uma dieta fracionada, para possivelmente proporcionar um efeito benéfico à saúde (MANACH et al, 2005).

A *American Dietetic Association* sugere que o consumo de chá verde seja de 4-6 xícaras de chá ao dia, a fim de obter efeitos benéficos à saúde. A forma de preparo também deverá ser considerada, devendo-se esquentar a água até pouco antes da ebulição e despejá-la nas folhas de chá, reduzindo, dessa forma, sua oxidação. A infusão deverá ficar abafada por um período de 5 minutos. O armazenamento por longo tempo também não é recomendado, pois ocorre perda dos compostos fenólicos. A proporção de água e ervas deve ser a seguinte: para cada litro de água, quatro colheres de sopa de erva fresca ou duas colheres de erva seca. O consumo do chá não deve acontecer entre grandes refeições como o almoço, para não interferir na biodisponibilidade de nutrientes como o ferro. (HANSEN et.al., 2001)

Um estudo realizado por Nishiyama et al., (2010), avaliou os efeitos do tempo de infusão, forma de acondicionamento da erva (erva e sachê) e forma de preparo do chá na extração dos seus compostos bioativos e na estabilidade da bebida preparada. Os dados obtidos indicaram que, para um total aproveitamento de suas propriedades antioxidantes, o chá verde deve ser preparado com tempo de infusão de pelo menos 5 minutos, sob agitação leve e a granel, pois o acondicionamento do chá em sachês reduziu a extração dos compostos bioativos do chá; foi visto também que para uma mesma razão erva: água houve uma eficiência maior na extração dos bioativos do chá quando volumes maiores da bebida foram preparados; a bebida preparada mostrou-se estável ao armazenamento em

temperatura ambiente e em geladeira por 24 horas, sem aparentes alterações em seus principais bioativos e sem perdas das suas propriedades antioxidantes. Desta forma, o consumidor pode preparar o chá, mantê-lo em geladeira ou mesmo em temperatura ambiente e consumi-lo ao longo do dia.

3.1.2 Constituição Química

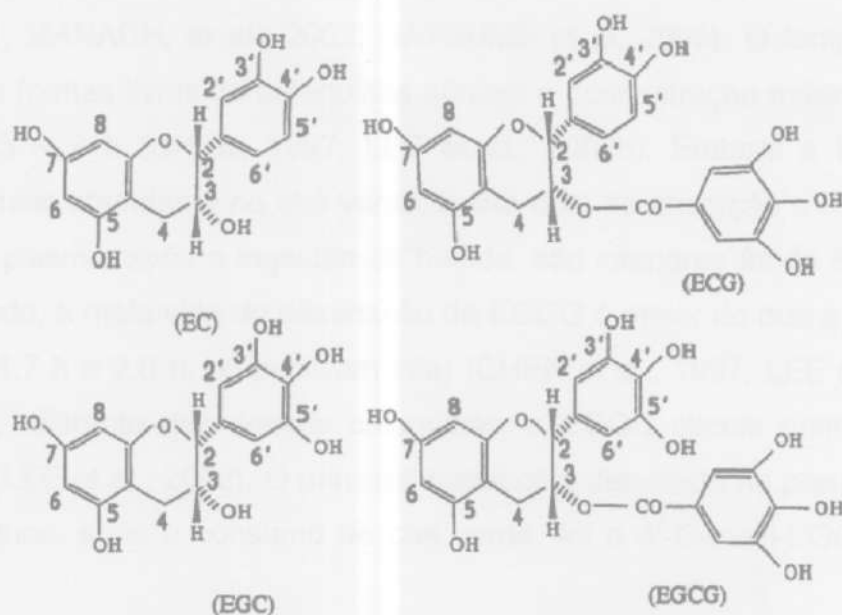
As folhas não fermentadas possuem cerca de 15 a 25% de proteínas, 5% de glicídios, 30- 40% de polifenóis, 1-5% de alcalóides (cafeína 2,9- 4,2%, teofilina 0,02- 0,04%, teobromina 0,15 a 0,2%), sendo estes responsáveis pelo efeito estimulante do chá, vitaminas C, B1, B2 e K, além de minerais como o flúor (130-160 mg/kg) potássio, magnésio, cálcio, ferro, manganês e fósforo entre outros. (HUANG, 1993; TREVISANATO, KIM 2000; SAITO, 2007).

A cafeína é considerada uma droga estimulante; possui efeito sobre a função mental e o comportamento, é diurético, produz excitação, euforia, redução da sensação de fadiga, aumento da atividade motora e pode afetar negativamente a qualidade do sono. Está presente no chá verde, em menores quantidades do que é encontrada no café. Uma xícara do chá contém aproximadamente 6% de cafeína, enquanto que uma xícara de café contém até 25% (VALENZUELA, 2004).

As catequinas representam 90% do total dos flavonóides, sendo que destes, 20-30% podem estar na forma oxidada e 10% na forma de flavonóis (SAIKO 2007). Essas podem ser encontradas também em maçãs, pêras, uvas, vinho tinto e cacau, estando presentes, em maior quantidade, no chá verde. (ARTS; PUTTE; HOLLMAN, 2000)

Dentro da classe das catequinas o chá apresenta: epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), galato-3-epicatequina (ECG), galato-3-epigallocatequina (EGCG). (Figura 2)

Figura 2- Fórmulas Estruturais das Catequinas.



Fonte: LAMARÃO (2009)

O potencial antioxidante das catequinas varia em ordem decrescente: EGCG > ECG > EGC > EC (MELLO & SANTOS, 2002; EI BESHBIHY, 2005). São compostos incolores, hidrossolúveis, que contribuem para o amargor e a adstringência do chá verde (SCHMITZ, 2005).

3.1.3 Biodisponibilidade das catequinas

As catequinas são metabolizadas de forma rápida e extensiva. Um estudo realizado com ratos indicou que a epigallocatequina galato (EGCG), principal catequina encontrada no chá verde é excretada principalmente através da bile, enquanto EGC e EC são excretadas pela urina e bile. A determinação da biodisponibilidade de metabólitos em tecidos alvo pode ser mais importante que os valores de sua concentração no plasma (KIM, LEE, HONG, 2000).

Pesquisadores sugerem que a absorção, distribuição e eliminação das catequinas diferem entre si (CHEN, et al., 1997; LEE et al., 2002b). Além disso, diferenças em parâmetros farmacocinéticos também são observadas quando os flavonóides do chá verde são administrados na forma de substância isolada ou *in natura* (CHEN et al., 1997). Outros estudos feitos em animais e em seres humanos revelaram que, após o consumo do chá verde, as principais catequinas encontradas

no plasma foram a EGC, a EC, a EGCG, a ECG, além de seus metabólitos (MENG et al., 2001; MANACH, et al., 2002; NATSUME et al, 2003). O tempo necessário para que as formas livres de catequinas atinjam a concentração máxima no plasma varia de 1,3 – 2 h (CHEN, 1997; LEE et al., 2002b). Embora a EGCG seja o flavonóide mais abundante no chá verde, a sua taxa de absorção e a concentração máxima no plasma, após a ingestão da bebida, são inferiores às da EGC e da EC. Por outro lado, a meia-vida de eliminação da EGCG é maior do que a da EGC e da EC (3,4 h, 1,7 h e 2,0 h, respectivamente) (CHEN et al., 1997; LEE et al., 2002b). Além disso, diferente das demais catequinas, a EGCG circula principalmente na forma livre (LEE et al., 2002). O principal metabólito detectado no plasma e urina de seres humanos, após o consumo de chá verde, foi o 4'-O-metil-EGC (LEE et al., 2002).

3.2 Atividades Biológicas

3.2.1 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante do chá verde tem sido destacada por diversos autores como uma das principais propriedades biológicas da planta, podendo contribuir de forma significativa na prevenção e/ou no tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e outras. (HONG, J et al., 2001; SONG et al., 2002).

A atividade antioxidante das catequinas deve-se ao mecanismo de transferência de elétron destas para as ROS (espécies reativas de oxigênio), estabilizando estas substâncias, evitando assim, um efeito deletério nas células. (INNATIA, 2006)

O poder antioxidante dos compostos do chá na doença de Alzheimer, por exemplo, tem por meta impedir que a proteína constituída em maior quantidade, a β -amilóide, forme radicais livres e danifique células do tecido nervoso (COSTA e ROSA, 2010).

Guo e colaboradores (2007) sugeriram que os polifenóis encontrados no chá verde podem proteger os neurônios da ação da dopamina por meio da diminuição de

radicais livres e óxido nítrico, podendo o chá verde atuar como um importante agente neuroprotetor na doença de Parkinson.

Os flavonóides também são capazes de interromper a peroxidação de lipídeos e atenuar o consumo de vitamina E (MIURA, et al., 2001).

Wang et al., (2011), realizaram um estudo de metanálise a fim de avaliar a associação entre o consumo de chá verde e um menor risco de doenças cardiovasculares. Foram utilizados treze estudos com o chá preto e cinco com o chá verde. Nos estudos em que se utilizou o chá preto não foram encontradas nenhuma associação significativa, ao contrário do chá verde que, segundo os estudos avaliados, está associado a um menor risco de doenças cardiovasculares.

Em relação ao estresse oxidativo induzido pelo exercício, sabe-se que a realização de uma única sessão de exercício resistido pode ser suficiente para elevar as concentrações plasmáticas de marcadores de danos oxidativos, sugerindo ações indesejáveis dos radicais livres em diversas estruturas celulares, tais como membranas, DNA e proteínas (LEE et al., 2002a; GOLDFARB et al., 2005). Logo, é suposto que o estresse oxidativo induzido pelo exercício favorece a ocorrência de danos musculares, o comprometimento do sistema imune e a redução do desempenho. Destaca-se que os danos causados pelo estresse oxidativo podem ser atenuados por uma série de fatores, dentre eles o estado nutricional e o plano alimentar. Assim, a ingestão de uma dieta rica em antioxidantes contém potencial para prevenir o aumento excessivo do estresse oxidativo promovido pelo exercício resistido, reduzindo os riscos de lesões, sem, no entanto, prejudicar a resposta adaptativa ao esforço (URSO e CLARKSON, 2003)

3.2.2 Atividade Quimiopreventiva e Anticarcinogênica

A *American Association for Cancer Research* tem concordado que a quimioprevenção (uso de agentes químicos naturais ao invés dos sintéticos para prevenção de doenças) é uma alternativa viável para o controle do câncer. Sugere-se que o mecanismo pelo qual tais compostos podem auxiliar no controle do câncer esteja relacionado a mecanismos de apoptose (GOSLAU; CHEN 2011)

Experimentos *in vivo* demonstram o efeito fotoprotetor do chá verde à radiação ultravioleta por diminuir os danos do DNA quando comparados a exames realizados antes da ingestão do chá. Assim, sugere-se que os constituintes do chá verde podem oferecer proteção contra os danos no DNA induzidos por radiação (MORLEY *et al.*, 2005; KUZUHARA *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que EGCG mesmo sem exposição aos raios ultravioleta B (UVB) inibiu diretamente a expressão de metaloproteinases e elastase. A inibição de metaloproteinases pelos polifenóis do chá fornece sustentação para proteção contra o envelhecimento (VAYALIL *et al.*, 2004).

A administração tópica ou oral dos polifenóis do chá inibe a formação de carcinógenos epiteliais. A administração oral crônica dos polifenóis do chá realça caminhos enzimáticos que possuem papel importante na detoxificação de metabólitos cancerígenos por P450 e por outras enzimas e inibição de caminhos enzimáticos determinantes para iniciação do câncer, demonstrando mais uma vez a atividade protetora do chá. A aplicação tópica dos polifenóis do chá na pele do rato demonstrou resultados ainda contra a hiperplasia epidérmica, a inflamação através da proteção contra a infiltração de leucócitos, o aumento dos queratinócitos basais e a indução de ornitina descarboxilase (MUKHTAR *et al.*, 2000; VAYALIL *et al.*, 2004; COOPER *et al.*, 2005;).

Baseado em pesquisas que associam o consumo do chá verde à prevenção de câncer em vários órgãos, SHUKLA e colaboradores (2010) estudaram os efeitos quimiopreventivos dos polifenóis do chá verde (GTP) e os polifenóis do chá preto em tumores induzidos no pulmão de camundongos. O grupo tratado com o chá, quando comparado ao grupo controle, apresentou baixa incidência de tumores nos alvéolos pulmonar. Assim, o estudo sugere que os constituintes polifenólicos das duas cultivares de chá, ou seja, verde e preto, têm efeitos quimiopreventivos na tumorigênese pulmonar induzida em camundongos.

3.2.3 Atividade Anti inflamatória

Diversos estudos têm demonstrado que o chá verde também possui um bom potencial anti inflamatório. Davim e colaboradores (2010), realizaram um estudo *in vivo* a fim de avaliar o potencial anti inflamatório do chá na redução do edema. Após

nove dias de tratamento com o chá verde, numa concentração de 0,6 mg de catequinas, por kg do animal, os animais sofreram indução de lesão, sendo esta avaliada em períodos de 5 minutos e 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas após sua indução. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que no grupo tratado com o chá verde, houve uma importante redução do edema da pata a partir da segunda hora após a indução da inflamação, sendo essa redução mais significativa no intervalo entre 5 e 24 horas. Com isso, concluiu-se que em modelo experimental de lesão muscular, as catequinas presentes no chá verde apresentaram bom potencial antiinflamatório reduzindo o edema de forma significativa no intervalo de até 24 horas, quando comparado ao grupo controle.

Nakanish et al (2010) investigaram o efeito da epigallocatequina-3-galato (EGCG) e galato de epicatequina (ECG), na expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão em células da polpa dentária humana, estimuladas com fatores derivados de bactérias como o lipopolissacarídeo (LPS) e o peptídeooglicano (PG). Os autores observaram que a presença de EGCG e ECG reduziu, significativamente, a expressão de fatores inflamatórios nas células expostas ao LPS e ao PG. Como conclusão, o estudo sugeriu que as catequinas do chá verde podem atuar na prevenção da exacerbação da pulpíte.

Outro estudo realizado por Cavet e colaboradores (2011), avaliou os efeitos anti-inflamatório e anti-oxidante da epigallocatequina galato (EGCG), nas células epiteliais da córnea humana. No grupo tratado com EGCG houve uma diminuição dose-dependente na liberação de citocinas/ quimiocinas pró inflamatórias, demonstrando que em razão do efeitos antiinflamatório e antioxidante encontrados, a ECGC pode ter um potencial terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias da córnea, incluindo olho seco.

3.2.4 Exercício físico e emagrecimento

Entre uma variedade de efeitos benéficos conferidos pelo consumo do chá verde, grande atenção tem sido dada a sua capacidade de redução da gordura corporal.

Em relação ao emagrecimento, Kajimoto et al (2005) realizaram um estudo com 195 indivíduos que por 12 semanas consumiram 250 ml de uma bebida

contendo catequinas, com o objetivo de avaliar a redução da gordura corporal, bem como a segurança de sua utilização em indivíduos eutróficos e com sobrepeso. Os indivíduos que consumiram a bebida placebo (41,1mg/dia de catequinas) eram considerados grupo controle. Outro grupo, considerado de baixa dose de ingestão, recebeu a bebida contendo catequinas no café da manhã e no jantar e uma garrafa de bebida placebo no almoço, totalizando três garrafas ao dia (444,3mg/dia de catequinas); e por último, o grupo considerado de alta dose de ingestão recebeu três garrafas da bebida contendo catequinas em todas as refeições (665,9mg/dia de catequinas). Os resultados do estudo revelaram significativa redução na massa corporal, Índice de Massa Corporal (IMC), na circunferência da cintura e na relação cintura/quadril nos grupos que ingeriram baixas e altas doses de catequinas. A medida da cintura indicou significativa redução na área total de gordura e de gordura visceral em ambos os grupos, concluindo assim que a bebida contendo as catequinas do chá foi eficaz na redução da gordura corporal e seguro, quando administrado continuamente por 12 semanas. O estudo sugere ainda que o consumo de chá verde pode ser benéfico para muitas pessoas e colaborar ainda para a redução de riscos relacionados ao estilo de vida como a diabetes e as dislipidemias.

Um grupo de pesquisadores investigou, em dois estudos com humanos, os efeitos da ingestão aguda do extrato de chá verde sobre a oxidação de gordura durante o exercício de intensidade moderada e também avaliaram sua resposta em relação a tolerância à glicose. Doze participantes fizeram parte do estudo "A" e 11 participantes integraram o estudo "B". Todos os participantes eram saudáveis de acordo com resultados de um questionário de saúde geral. O grupo A ingeriu cápsulas contendo extrato de chá verde, sem cafeína, numa concentração equivalente a 3,5 xícaras de chá, enquanto o outro grupo ingeriu apenas o placebo de farinha de milho. Ao final do estudo, observaram que o grupo que ingeriu as cápsulas com o chá apresentou, em relação ao grupo placebo, uma maior oxidação de gordura corporal, demonstrando assim que durante o exercício de intensidade moderada, neste caso o ciclismo, o chá verde pode aumentar a oxidação de gorduras, favorecendo o processo de emagrecimento. (JEUKENDRUP et al., 2008)

Em um estudo duplo cego controlado com placebo, Cardoso (2011) avaliou os efeitos do consumo de chá verde e da prática ou não de exercício físico resistido

sobre a Taxa Metabólica de Repouso (TMR) e a composição corporal em mulheres com IMC entre 25 a 35kg/m² divididas em quatro grupos (grupo 1 chá verde; grupo 2 placebo; grupo 3 chá verde mais exercícios resistidos; grupo 4 placebo mais exercícios resistidos) durante um período de dois meses. Todas as voluntárias dos quatro grupos foram submetidas às análises bioquímicas e às avaliações da TMR por meio de calorimetria indireta e da composição corporal pela bioimpedância elétrica. Os resultados mostraram que o grupo um perdeu uma quantidade de peso relevante para o período de estudo, e apresentou diminuição da TMR, perda de peso, diminuição de gordura corporal e mantiveram a massa magra. O grupo dois, utilizando placebo, não perdeu peso, ganhou massa gorda além de apresentar diminuição da massa magra e da TMR. Quando os grupos com exercícios físicos resistidos foram comparados, observou-se que as voluntárias do grupo três apresentaram resultados significativamente melhores que as do grupo quatro, ou seja, embora não tenham perdido peso, tiveram sua composição corporal modificada, com perda de gordura e ganho de massa muscular; apresentaram também aumento da força muscular e redução dos níveis de triglicérides. Os resultados deste estudo sugerem que o consumo de chá verde pode ser um aliado alimentar efetivo para a perda de peso e diminuição da gordura corporal, sem que haja perda da massa muscular.

3.2.5 Efeitos Adversos

Segundo Bartels et al., (2003) o consumo diário de chá obtido de 65g de folhas, durante 5 anos, pode levar a disfunção hepática, problemas gastrointestinais como constipação e irritação gástrica, diminuição do apetite, insônia, hiperatividade, nervosismo, hipertensão e aumento dos batimentos cardíacos. Os autores ainda complementam que altas doses podem causar efeitos adversos significantes pelo conteúdo de cafeína, especificamente palpitações, dor de cabeça e vertigem. É importante que se tenha cautela quanto ao seu uso, dosagem, modo de preparo, além de outras recomendações importantes, uma vez que ainda não existe um consenso quanto a sua dosagem.

Cruz e colaboradores (2010) estudaram o efeito do chá verde no peso corporal e no teste de tolerância à glicose (GTT). No fígado, estudaram a fosforilação do

receptor de insulina e da proteína Shc quanto a sua presença, expressão e suas alterações morfológicas. Após tratamento dos grupos experimentais, foi observada uma perda de peso corporal significativa e melhora do teste de intolerância à glicose. Os animais que receberam tratamento com chá verde apresentaram lesões no fígado, o que surpreendeu os pesquisadores, já que o uso do chá ocasionou melhora no sinal insulínico e diminuição da gordura corporal. Essas lesões se caracterizaram por congestão, infiltrado inflamatório focal, hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer. As lesões descritas podem estar relacionadas com um processo de citotoxicidade ocasionado pelo chá verde, como acima mencionado, provavelmente sendo o resultado de uma agressão multifatorial. A necrose hepatocelular focal também foi encontrada nos animais que tomaram o chá.

Inoue et al, (2011) avaliaram a toxicidade dos polifenóis do chá verde em diversos órgãos de ratos saudáveis e com colite induzida. Os resultados, após comparação entre os grupos tratados, indicaram que altas doses de chá verde na dieta interrompe funções do rim, através da redução de enzimas antioxidantes e expressões da proteína de choque térmico, não só na colite, mas também em ratos saudáveis.

3.3 Mutagenicidade

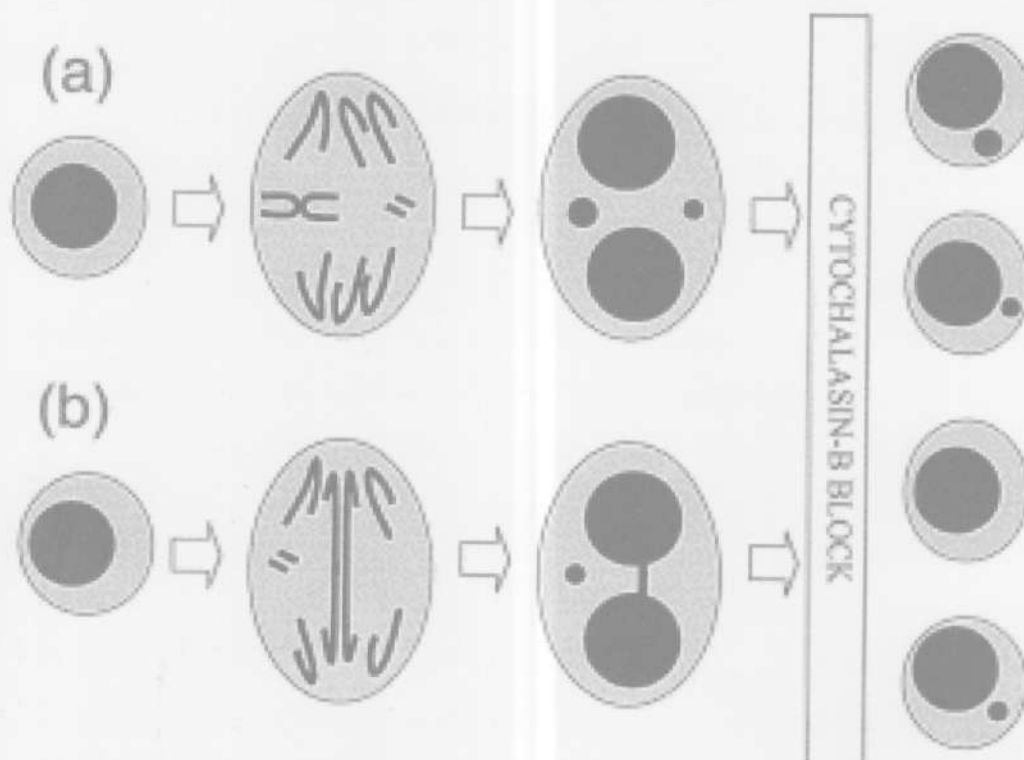
A mutagenicidade diz respeito à indução de alterações transmissíveis permanentes da quantidade ou da estrutura do material genético das células ou organismos. Estas alterações podem envolver um único gene ou segmento de gene, um bloco de genes ou cromossomas. As alterações do material genético das células podem ocorrer espontaneamente ou ser induzidas em consequência da exposição à ionização, à radiação de raios ultravioletas ou a substâncias genotóxicas. Em princípio, a exposição humana a substâncias mutagênicas pode resultar em frequências acrescidas de mutações acima da linha de base. Os danos hereditários na descendência e, possivelmente, nas gerações seguintes, de pais expostos a substâncias mutagênicas podem continuar se forem induzidas mutações nas células germinativas dos pais. As mutações das células somáticas (ou diplóides) podem ser letais ou podem ser transmitidas para as células filhas com consequências nocivas para o organismo afetado. (RIBEIRO, 2003)

Uma mutação é definida com uma mudança na sequência do DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica. Uma vez que as mutações são frequentemente associadas com o desenvolvimento de cânceres e defeitos ao nascimento, o conhecimento do potencial genotóxico de um agente químico industrializado ou naturalmente presente no ambiente é uma informação essencial para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de risco para o homem. (BURNS e BOTTINO, 1991)

3.4 Teste do Micronúcleo

Muitos agentes tóxicos apresentam uma capacidade de reagir com o material genético das células. Quando uma célula é exposta, por exemplo, a uma substância química tóxica, é possível encontrar pequenas massas intracitoplasmáticas de cromatina, com aspecto de um núcleo pequeno, presentes no citoplasma das células. Estas estruturas são denominadas de micronúcleos, sendo estes resultantes de quebras cromossômicas ou de cromossomos perdidos durante a divisão celular (FENECH, 2000). (Figura 3)

Figura 3- A origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro [a]; em [b], a formação de uma ponte citoplasmática e de um micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico.



Fonte: Ribeiro & Marques (2003).

O teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* visa detectar e quantificar a ação mutagênica e/ou anti-mutagênica de agentes indutores, sendo amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais como parte de uma bateria de testes recomendada para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001). O referido teste é o ensaio *in vivo* mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (MACGREGOR et al., 1987; HAYASHI et al.; 1994).

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), recomenda, com base em recomendações internacionais (OMS, FDA, OECD), que todo medicamento fitoterápico deve ser avaliado quanto a sua toxicidade e

genotoxicidade. Para tanto, ela recomenda que sejam utilizados os Testes de Ames ou o teste do micronúcleo. (ANVISA, 2004)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Grupo Experimental

Foram utilizados 10 camundongos machos, da espécie *Mus musculus* (Swiss albino), procedentes do biotério da Faculdade Natalense para o Desenvolvimento do Rio Grande do Norte com peso variando entre 20 e 30 gramas, idade entre 7 e 12 semanas. Os animais foram mantidos durante todo o período do experimento em caixas individuais de polipropileno, com tampa-grade, recebendo água e alimento *ad libitum*, em ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de 23 ± 2 °C.

O presente estudo está de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, EUA, *National Research Council*).

4.2 Metodologia

Para comparação e validação dos resultados, foram utilizados dois grupos controle. Para o controle negativo, foi administrado aos animais solução salina a 0,9% e no grupo experimental, o extrato seco do chá verde, com uma concentração de 85% de catequinas, ambas através da técnica de gavagem, por nove dias consecutivos e ininterruptos.

4.3 Obtenção do material de medula óssea

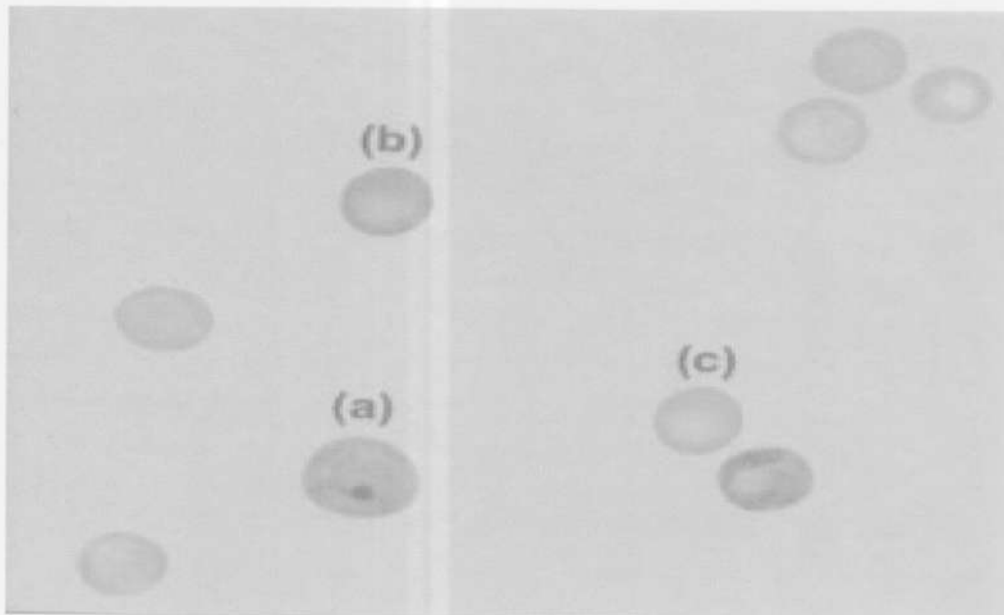
A obtenção do material da medula óssea seguiu a metodologia descrita por Ribeiro (2003). Após o período de tratamento no biotério, os animais foram conduzidos ao laboratório de histologia para eutanásia e demais procedimentos metodológicos para realização do teste de micronúcleo. Logo após esse procedimento, foi realizada a dissecação da pele e dos tecidos que recobrem a região do fêmur, expondo o mesmo. Com a utilização de um bisturi, cortou-se as extremidades distal e proximal do fêmur, expondo o canal medular.

Com uma seringa, contendo um ml de soro fetal bovino, retirou-se a medula óssea, que foi posteriormente transferida para um tubo falcon de 15 ml. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 5 minutos, a uma velocidade de 1000 rpm, para que as células fossem precipitadas.

4.4 Preparação e leitura das lâminas

Após a centrifugação, o sedimento foi ressuspendido em adicionais 0,5 ml de soro fetal bovino e o esfregaço foi realizado a partir de duas gotas da suspensão pingadas na extremidade fosca da lâmina, previamente marcada com o código do animal. Em seguida, com o auxílio de outra lâmina num ângulo de 45°, realizou-se o esfregaço. Após o processo, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e a coloração foi feita utilizando-se o corante de Leishman previamente diluído. As lâminas foram lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante e deixadas secar ao ambiente. Segundo Ribeiro et al (2003), a coloração tem o objetivo de diferenciar eritrócito policromático (PCE) de eritrócito normocromático (NCE). Eritrócitos policromáticos (PCE) ou jovens se coram de azul claro e eritrócitos normocromáticos se coram de vermelho-telha. (Figura 4)

Figura 4- Diferença na coloração de PCE e NCE: (a) eritrócito policromático micronucleado (PCEMN); (b) eritrócito policromático; (c) eritrócito normocromático.



Fonte: Livro de Mutagênese Ambiental (2003)

As lâminas foram analisadas na objetiva de 40x para encontrar campos com boa qualidade técnica, onde as células estivessem bem espalhadas, não danificadas e coradas apropriadamente. Após a localização do campo, a análise das células para a presença de micronúcleos foi feita em aumento de 100x (objetiva de imersão). Os resultados foram registrados através de fotomicrografia.

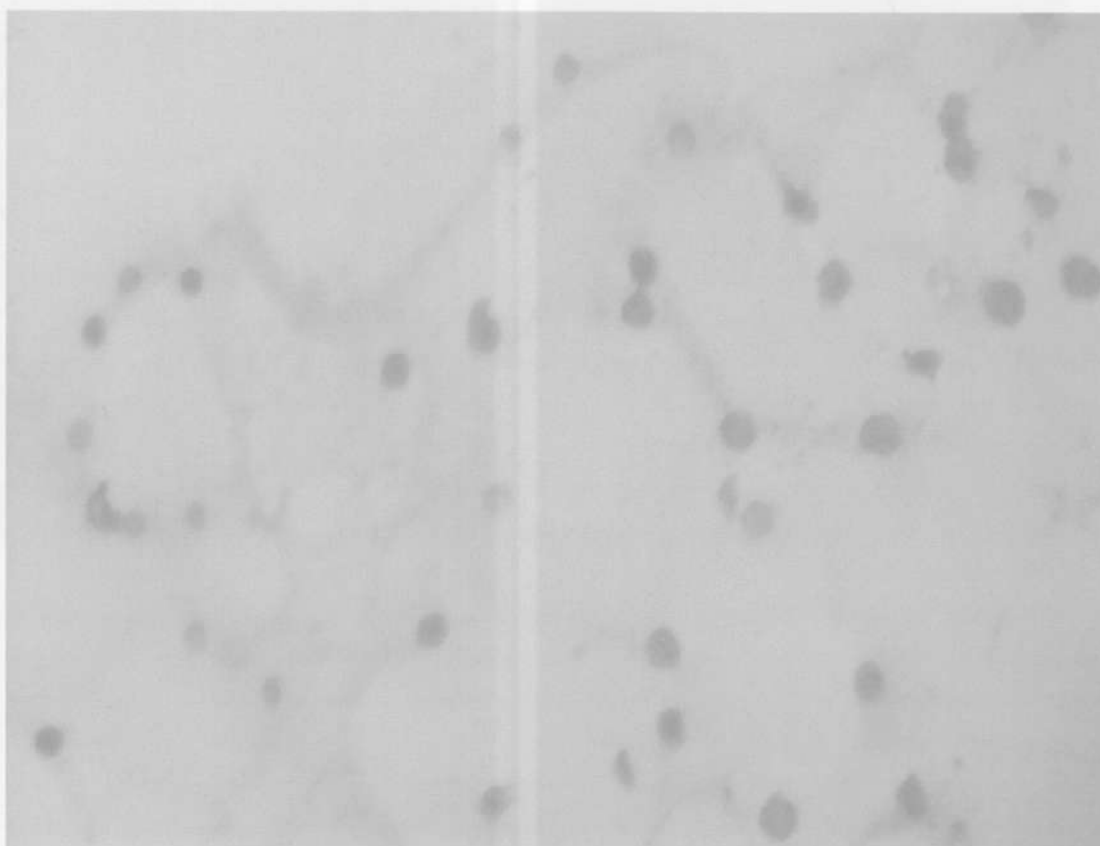


Figura 1: Imagem de uma lâmina de células coradas.

5 RESULTADOS

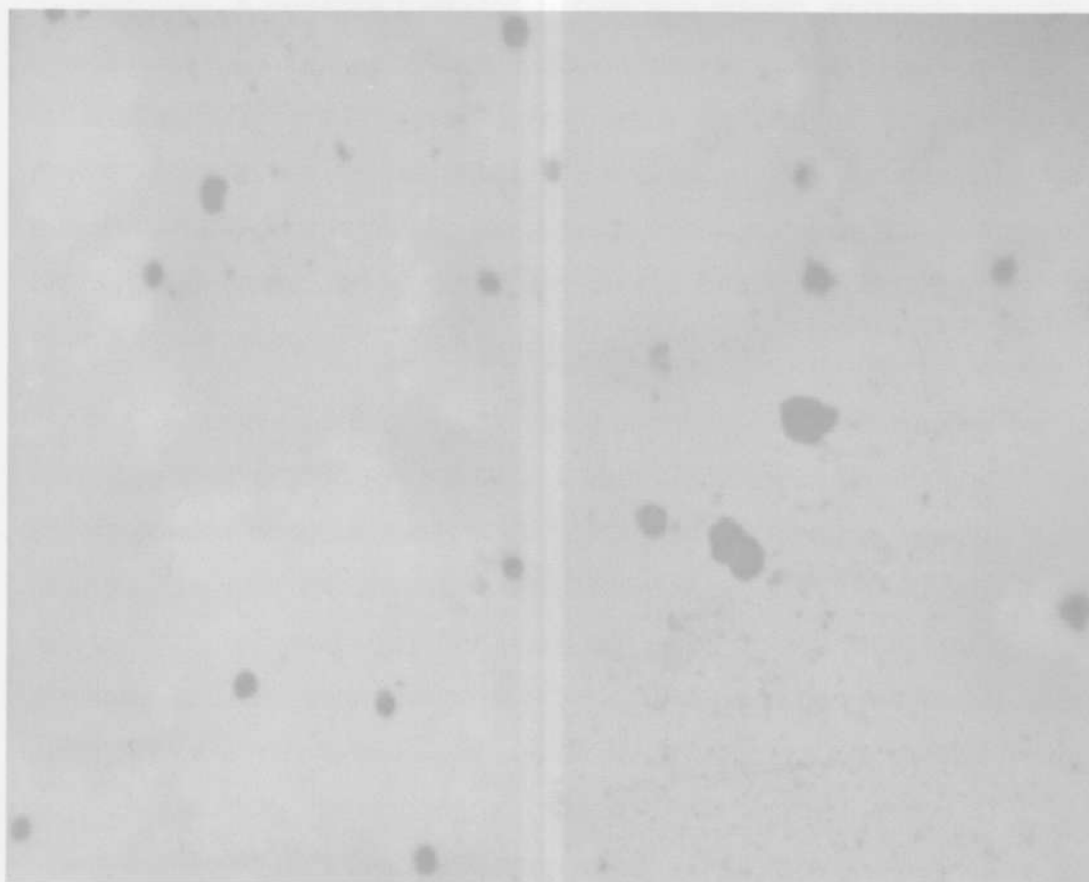
A partir dos resultados obtidos através da análise em microscopia óptica, não foi observada a presença de micronúcleos nas células da medula óssea dos camundongos tratados com chá verde a uma concentração de 85% de catequinas, indicando que, no período estudado e na concentração avaliada, as catequinas do chá, possivelmente não apresentam riscos à saúde (Figuras 5, 6 e 7).

Figura 5- Fotomicrografia de eritrócitos de medula óssea de camundongo tratado com solução salina (grupo controle). Objetiva de 40x.



Fonte: Dados da pesquisa, 2011.

Figura 6 - Fotomicrografia de eritrócitos de medula óssea de camundongo tratado com concentração de 85% de catequinas (grupo experimental). Aumento de 40x.



Fonte: Dados da pesquisa, 2011.

6 DISCUSSÃO

A exposição do ser humano e do ambiente a diversas substâncias químicas favorece a ocorrência de efeitos deletérios que estas podem causar, os quais podem gerar danos à saúde, tais como neurotoxicidade, efeitos carcinogênicos e mutagênicos. A genética toxicológica teve sua origem, enquanto ciência, a partir da relação entre compostos tóxicos e DNA, uma vez que foi reconhecida a importância da mutagênese como passo prévio para os perigos potenciais dos agentes mutagênicos para o meio ambiente e a população. É importante salientar que existe a possibilidade de que a ação mutagênica venha a manifestar-se após muitos anos, no aumento da incidência de câncer ou má formação congênita devido aos ditos efeitos acumulativos (FLORES e YAMAGUCHI, 2008)

O presente estudo avaliou, inicialmente através de análise microscópica, a formação de micronúcleos em células de medula óssea em camundongos utilizando a metodologia descrita por Ribeiro (2003) e adotada pela *Sociedade Brasileira de Mutagênese*, que determina os procedimentos a serem seguidos para realização do teste. Foram utilizados camundongos, por estes apresentarem padrões metabólicos similares aos humanos (Boone et al., 1990). A partir dos resultados obtidos através da análise em microscopia óptica, não foi encontrada a presença de micronúcleos nas células dos camundongos tratados com extrato seco de chá verde na concentração de 85% de catequinas.

Utilizando metodologia semelhante, Leite e colaboradores (2006) que avaliaram o potencial mutagênico do *Ginkgo Biloba L.*, através do ensaio de micronúcleo, concluindo que o extrato de suas folhas não apresentou atividade mutagênica e citotóxica para todas as doses testadas nas condições experimentais utilizadas.

O suco de berinjela, muito usado pela população na redução do colesterol e no combate a artrite, aterosclerose, gota, reumatismo e diabetes e a infusão de carqueja, usada no combate a inflamações, principalmente as do trato digestório, anemia, cálculos biliares, diarreias e enfermidades da bexiga, rins e pâncreas foram avaliados por Peron et al., (2008) quanto a sua mutagenicidade. Em conclusão, observaram que ambos os compostos não apresentaram efeito mutagênico em ratos

Wistar, indicando uma segurança maior de uso destas plantas pelo homem, nos testes e concentrações utilizadas.

Magalhães et al, (2010) avaliaram o efeito genotóxico de extratos de *P. venusta*, utilizada popularmente para o tratamento de vitiligo e outras doenças, em camundongos utilizando os testes de micronúcleo e o de aberração cromossômica. Em conclusão, os autores não encontraram efeito genotóxico ou mutagênico do extrato avaliado. Os resultados encontrados nesses estudos corroboram com os encontrados no presente trabalho.

Pinho et al, (2010) avaliaram a atividade mutagênica do chá de carqueja *in vivo* e *in vitro*, realizado através do teste de *Allium cepa* L. e o de aberrações cromossômicas, utilizando 4 grupos experimentais tratados com, água, 20g/L de carqueja, 200g/L de carqueja e 400g/L de paracetamol. Este estudo evidenciou um efeito mutagênico do chá em células vegetais (*Allium cepa*) e em células humanas (aberrações cromossômicas) cultivadas, mas vale salientar que o efeito foi evidenciado na maior concentração, equivalente a 10 xícaras de chá. Este estudo demonstra que o efeito é dependente da dose, portanto recomenda-se que o chá de carqueja seja consumido com moderação. Este resultado se opõe ao encontrado nesse estudo, uma vez que foi observada atividade mutagênica na substância analisada.

É importante ressaltar que estudos similares ainda são poucos, tendo em vista que a preocupação com o possível efeito danoso das plantas medicinais à saúde é relativamente novo.

7 CONCLUSÃO

O consumo de produtos naturais, incluindo o chá verde, tem aumentado acentuadamente nas últimas décadas. Diversos estudos relatam suas propriedades biológicas e cada vez mais, aumenta a oferta de produtos que utilizam o chá verde como seu princípio ativo, a fim de atender um consumidor que busca uma alternativa natural para prevenção de doenças e promoção da saúde.

Assim, com os resultados obtidos nesse estudo, pode-se propor uma alternativa terapêutica barata e de fácil acesso, e segura no sentido de mesmo em doses elevadas de catequinas, não apresentar potencial mutagênico na concentração e tempo avaliados. Outras etapas são necessárias para determinação de atividade mutagênica, e, como forma de complementar esse estudo, temos como perspectivas futuras analisar a atuação do chá verde, em diferentes concentrações de catequinas incluindo a concentração utilizada nesse estudo, com doses diárias e em um tempo prolongado, a fim de se observar se o tempo passa a ser ou não um fator determinante para a indução da lesão ao material genético.

REFERÊNCIAS

ADA Reports. Position of the American Dietetic Association: functional foods. **J Am Diet Assoc** LEE, M. J.; MALIAKAL, P.; CHEN, L. S.; MENG, X. F; 2002.

ADHAMI, V. M.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. **Journal of Nutrition**, Philadelphia ,v.133, p.2417-2424, Jul. 2003

BARTELS, C. L, Miller SJ. Dietary supplements marketed for weight loss. **Nutr Clin Pract**. n. 8. 2003

BONDOC, F. Y.; et al., Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v.11, 2004.

BRASIL 2004d. **Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução no. 90 de 16 de março de 2004*. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004

CAVET, M.E, et al., Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells. **Mol Vis**. 17: 533-542. 2011

CHEN, J. H, et al., Green tea polyphenols prevent toxin-induced hepatotoxicity in mice by down-regulating inducible nitric oxide-derived prooxidants. **Am J Clin Nutr** 80: 742-751.2004

CHEN, L et al., Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenols in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, Baltimore, v.25, n.9, Jun, 1997

CHENG, T. O. All teas are not created equal: the chinese green tea and cardiovascular health. **International Journal of Cardiology**, v. 108, n. 3. 2006

COOPER. R, MORRÉ. J, MORRÉ, D. M. Medicinal benefits of green tea: part I. review of noncancer health benefits. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, 11: 521-528. 2005

CUNHA PC.; SILVA AP.; ROQUE OR.; **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2003

DULLOO A. G. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, n.70. 1999.

FAGUNDES, R.L.M; COSTA, Y.R. Uso de alimentos funcionais na alimentação. **Higiene Alimentar**, v.17,2003.

GOLDFARB, A. H; BLOOMER, R. J; MCKENZIE, M. J. Combined Antioxidant Treatment Effects on Blood Oxidative Stress after Eccentric. *Med Sci Sports Exerc*. n.37, p.234-239, 2005.

GOSSLAU et al., The importance of natural products characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Mol. Nutr. Food Res.*, v.55, p.74-82, 2011

GUO. S et al., Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. *Biological psychiatry*. 2007;62:1353-1362

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3 ed., **Oxford: University Press**. Cap. 1-3, p. 1-245. 1999

HONG et al., Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. **Biochemical Pharmacology**, New York, v.62, p.1175-1183, Nov. 2001.

INNATIA. Te verde y salud, publicado em 15/05/2006. Disponível em <<http://cosmeticanatural.iespana.es/>>. Acesso em 05 jun.2011

Kajimoto, O, et al., Tea Catechins with a galloyl Moiety reduce body weight and Fat. **Journal of Health Science**. 2005.

KARORI, et al. Antioxidant capacity of different types of tea products. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n.19, p. 2287-2296, 2007.

KIM, S. Lee MJ, Hong J. Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols. **Nutr Cancer**. 2000.

KUMUDAVALLY, K. V. et al. Green tea - a potential preservative for extending the shelf life of fresh mutton at ambient temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 426-433, 2008.

KUZUHARA T et al., DNA and RNA as new binding targets of green tea catechins. **The Journal of Biological Chemistry**. 2006.

LAMARAO, R.C ; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 22, n. 2, p. 257-269. mar/abr. 2009.

MANACH et al., Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr**.; 2002

MANACH et al., Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies. **Am J Clin Nutr**. 2005.

MAO J.L et al., Pharmacokinetics of Tea Catechins after Ingestion of green Tea and (-)-Epigallocatechin-3-gallate by Humans Formation of Different Metabolites and Individual Variability. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** October 2002.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciência Tecnologia Alimentação**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 401-407, abr./jun. 2006

Meng X et al., **Formation and identification of 4'-O-methyl-($\square$)-epigallocatechin in humans**. **Drug Metab**. 2001

Michelle C Venables et al., Green tea extract ingestion, fat oxidation, and glucose tolerance in healthy humans, *Am J Clin Nutr* March 2008 vol. 87 no. 3 778-784

MIURA, T et al., Antidiabetic activity of the Rhizoma of *Anemarrhena asphodeloides* and active components, mangiferin and its glucoside. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 24, p. 1009-1111, 2001a

Morley N et al., The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine*. 2005

MUKHTAR H, KATIYAR SK & AGARWAL R. Green tea and skin: anticarcinogenic effects. *Archives of Dermatology* 136: 989-994. 2000

NAKANISHI, T, et al., Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. *European Journal of Oral Sciences* Volume 118, Issue 2, pages 145–150, 2010

NETO, L.O ; MEDEIROS, M. I. T. ; DAVIM, A. L. S. Avaliação do potencial antiedematogênico do chá-verde (*camellia sinensis*) em modelo experimental de lesão muscular. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC)**, 62. Natal/RN. 2010

NISHIYAMA et al., Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 30(Supl.1): 191-196, 2010.

NIU. K et al., Green tea consumption is associated with depressive symptoms in the elderly. *Am J Clin Nutr*. December. vol. 90 no. 6. 2009

PERVA-UZUNALIC, A. et al. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, v. 96, n. 4, p. 597-605, 2006.

Ribeiro LR (2003) Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: Ribeiro, LR, Salvadori DMF, Marques EK (org) *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Editora da ULBRA.

SAITO, S. T. et al. Characterization of the constituents and antioxidant activity of Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var. *assamica* IAC-259 cultivar) extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9409-9414, 2007b.

SCOTT LUPER, N. D. A review of plants used in the treatment of liver disease: part two. **Alternative medicine review**, Vol 4 Num 3 1999.

URSO, M.L., CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, 2003.

VARGAS, S. M., et al., Rubisco activase e chaperone activity is regulated by a post-translational mechanism in maize leaves. **J. Exp. Bot.** 55: 2533-2539, 2004.

VAYALIL, P. K, ELMETS, C. A & KATIYAR, S.K. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. **Carcinogenesis** 24: 927-936. 2003

WANG, Z.M et al., Black and green tea consumption and the risk of coronary artery disease: a meta-analysis. **Am J Clin Nutr.** 2011