

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS DE SUPLEMENTOS ORAIS NÃO-HERBÁCEOS E  
HERBÁCEOS EM CAMUNDONGOS**

**GABRIELA COUTINHO**

**VILA VELHA-ES**  
**AGOSTO/2015**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS DE SUPLEMENTOS ORAIS NÃO-HERBÁCEOS E  
HERBÁCEOS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade  
Vila Velha, como pré-requisito do Programa  
de Pós-graduação em Ciências  
Farmacêuticas para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas

**GABRIELA COUTINHO**

**VILA VELHA-ES**  
**AGOSTO/2015**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C871a Coutinho, Gabriela.

Efeitos de suplementos orais não-herbáceos e herbáceos em camundongos / Gabriela Coutinho. – 2015.  
35 f : il.

Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –  
Universidade Vila Velha, 2015.  
Inclui bibliografias.

1. Suplementação alimentar. 2. Produtos herbáceos. 3. Produtos não-herbáceos. 4. Chá. 5. Shake. I. Pereira, Thiago de Melo Costa. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615.53

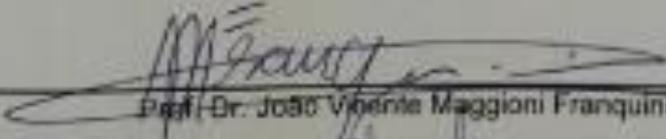
GABRIELA COUTINHO

EFEITOS DE SUPLEMENTOS ORAIS NÃO-HERBÁCEOS E  
HERBÁCEOS EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada à Universidade  
Vila Velha, como pré-requisito do Programa  
de Pós-graduação em Ciências  
Farmacêuticas para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas

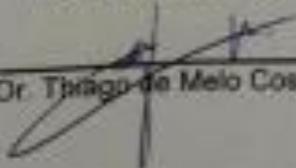
Aprovada em 31 de Agosto de 2015.

Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. João Vicente Maggioni Franquini - UVV

  
Prof. Dra. Juliana Hott Fucio Lizardo - UFES

  
Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade - UVV

  
Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira (orientador) - UVV

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À minha família, em especial ao meu marido Gley, pela paciência e incentivo. Aos meus filhos, Guilherme e Gael, peço desculpas pelos momentos em que estive ausente. Vocês são, e sempre serão os meus maiores tesouros! Agradeço imensamente à minha sogra, Maria das Graças, sem ela nada disso teria sido possível, foi a primeira a se comprometer a me ajudar com as crianças nessa fase, assim como minha mãe que também sempre foi grande incentivadora e minha amiga Olímpia.

Ao meu orientador, Dr. Thiago de Melo Costa Pereira, pela confiança em mim depositada, por me oferecer ajuda quando achei que não daria mais conta, pela disponibilidade manifestada para orientar este trabalho, a boa vontade em passar seus conhecimentos, ensinar técnicas no laboratório, por puxar minha orelha quando necessário, pelas palavras amigas e o abraço fraterno nas horas difíceis. Sinto profunda admiração por esse homem, professor e amigo!

Ao meu co-orientador Dr. Tadeu Uggere de Andrade, pelas orientações desde a época da graduação e por ter me dado oportunidade de continuar meus estudos. Por um lado me sinto em falta por não ter conseguido mostrar todo meu potencial, infelizmente as coisas ficaram mais complicadas do que eu poderia imaginar, mas me sinto feliz em poder vencer mais essa etapa da minha vida tendo esse professor como amigo que sei que posso contar por toda a vida. Serei sempre muito grata por tudo!

Às minhas companheiras no laboratório 29, primokas Adrielly e Placielle! Foram muitas tardes de trabalhos, experimentos, bate papos e até faxina, mas não tenho nem palavras para agradecer por tudo que fizeram por mim e por este trabalho que começou nas mãos de vocês também. Pessoas mais que especiais que tenho certeza que ainda irão crescer muito, pois não lhes faltam determinação e coragem. Não posso deixar de agradecer em especial a minha amiga Adrielly, menina que conheci há alguns anos ainda na graduação, mas nunca imaginávamos que teríamos tamanha afinidade, e que principalmente neste último ano, pude perceber que tenho uma amiga para o que der e vier.

Ao dedicado aluno de iniciação científica Bruno Prati, pela disponibilidade e boa vontade em ajudar durante toda a parte prática do experimento, inclusive nos finais de semana. Quero ter a sorte de poder ser atendida por este futuro médico daqui a alguns anos.

A todas as pessoas que colaboraram para o término deste trabalho, todos os alunos de iniciação científica do laboratório, ao sempre simpático e amigo Jean Louzada e não posso esquecer a mestranda Paola, que chegou já no final deste trabalho, mas se mostrou muito amiga e prestativa sempre.

Ao Mário, funcionário do biotério da UVV que por tantas vezes se colocou a disposição para ajudar no cuidado dos animais utilizados.

Ao professor Hildegardo Seibert França e suas alunas Polianna e Larissa, pela análise dos materiais nos laboratórios da UFES e IFES.

Ao professor Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira que prontamente me acolheu e me passou muito conhecimento.

Aos demais amigos pelo apoio e incentivo, em especial minha amiga Giulianna pela parceria, aos grupos de mães amigas “de Abril” e “Marista” pelos momentos de descontração e desabafos. Agradeço aos amigos que a corrida me deu, especialmente à Denise que se transformou em amiga para a vida e Nei, que de certa forma me apresentou o esporte que utilizei como válvula de escape para muitos problemas e frustrações.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo – FAPES, pela bolsa de estudos e financiamento deste trabalho. A Universidade de Vila Velha – UVV por proporcionar conhecimentos e estrutura necessários para realização deste trabalho.

“Para ganhar conhecimento, adicione coisas todos os dias. Para ganhar sabedoria,  
elimine coisas todos os dias.”

*Lao-Tsé*

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

Introdução

..... 6

Métodos

..... 8

Resultados

..... 12

Discussão

..... 19

Referências

..... 24

ANEXOS

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> Parâmetros ponderais e de consumo de ração e água dos grupos controle, shake, chá e shake + chá ..... | 13 |
| <b>Tabela 2</b> Parâmetros comportamentais dos grupos controle, shake, chá e shake + chá.....                         | 14 |
| <b>Tabela 3</b> Parâmetros bioquímicos analisados dos grupos controle, shake, chá e shake + chá.....                  | 15 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Detecção de cafeína em amostras de Chá por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e cromatogramas típicos das amostras de Chá e *Shake* (respectivamente) obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ..... 12
- Figura 2** Quantificação de produtos avançados de proteína oxidada (AOPP). Níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) em tecido hepático e renal de animais após respectivos tratamentos (controle, chá, shake ou shake + chá)..... 16
- Figura 3** Aspecto microscópico do fígado de camundongos após respectivos tratamentos (controle, chá, shake ou shake + chá)..... 17
- Figura 4** Aspecto microscópico do rim de camundongos após respectivos tratamentos (controle, chá, shake ou shake + chá)..... 18

## RESUMO

COUTINHO, Gabriela, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, Agosto de 2015. **Efeitos de suplementos orais não-herbáceos e herbáceos em camundongos.** Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira. Co-orientador: Tadeu Uggere de Andrade.

**Objetivo:** Dados recentes em humanos sugerem que a suplementação com produtos herbáceos e não-herbáceos podem ser prejudiciais à saúde. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do uso crônico de dois suplementos orais (*Shake* e Chá) em camundongos Balb/C.

**Métodos:** Para tanto, 46 camundongos machos foram alocados em 4 grupos: 1) “Controle” (leite semidesnatado, 0.5mL/dia, n=10); 2) “*Shake*” (0.5mL/dia, n=12); 3) “Chá” (0.5mL/dia, n=12); 4), “*Shake+Chá*” (0.25mL/dia cada, n=12), por 28 dias. Os camundongos e a ração foram pesados diariamente. A glicemia e o comportamento motor dos animais foram monitorados semanalmente. Após eutanásia, foram realizadas avaliações séricas bioquímicas seguidas de histologia hepática e renal. Também se avaliou estresse oxidativo por produtos avançados de oxidação proteica (AOPP). Quanto à análise química, a quantificação de cafeína dos suplementos foi feita por cromatografia em camada delgada e por cromatografia líquida de alta eficiência.

**Resultados:** Embora o uso crônico de suplementação oral tenha contribuído para o controle do peso, o grupo exposto à associação *Shake+Chá* mostrou alterações no comportamento motor, provavelmente pelo efeito da cafeína presente nos produtos. Além disso, foi observado aumento de 175% de AST ( $p < 0.05$ ) nos animais tratados com a associação em relação ao Controle além do aumento de ~10 vezes de AOPP no tecido renal de todos os grupos tratados com a suplementação oral ( $p < 0.05$ ). Não foram observadas alterações histológicas.

**Conclusão:** Diante das avaliações das atividades motoras e bioquímicas alteradas, sugerimos a necessidade de estudos experimentais adicionais com produtos herbáceos e não-herbáceos para fundamentação quanto à segurança dessas substâncias amplamente consumidas pela população.

**Palavras-chave:** Suplementação, Produtos Herbáceos, Produtos Não-Herbáceos, *Shake*, Chá

## **ABSTRACT**

COUTINHO, Gabriela, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, Agosto de 2015. **Effects of oral supplements non-herbal and herbal in mice.** Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira. Co-orientador: Tadeu Uggere de Andrade.

**Objective:** *Recent findings in humans suggest that supplementation with non-herbal and herbal products may be harmful to health. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of chronic use of two oral supplements (Shake and Tea) in Balb/C mice.*

**Methods:** *For this purpose, 46 male mice were divided into 4 groups: 1) “Control” (semi-skimmed milk, 0.5mL/day, n=10); 2) “Shake” (0.5mL/day, n=12); 3) “Tea” (0.5mL/day, n=12); 4) “Shake+Tea” (0.25mL/day each, n=12) for 28 days. Mice and feed were weighed daily, and glycemia of animals and the motor behavior were monitored weekly. After euthanasia, serum biochemical analysis was performed followed by hepatic and renal histological analysis. Moreover, the oxidative stress was determined through advanced oxidation protein products (AOPP) analysis. In relation to chemical analysis, quantification of caffeine in supplements was performed by thin-layer-chromatography and high-performance-liquid-chromatography.*

**Results:** *Although the chronic use of non-herbal and herbal products may be able to contribute to weight control, the animals exposed to “Shake+Tea” association have changes in the pattern of behavior, probably by the effect of caffeine present in products. Moreover, was observed an increase of 175% of AST ( $p < 0.05$ ) in animals treated with the association compared to the Control group beyond the ~10-fold increase of AOPP in the renal tissue of all the groups treated with oral supplementation ( $p < 0.05$ ). Histological changes were not observed.*

**Conclusion:** *According to behavioral and biochemical evaluations, we suggest the need for further experimental studies with non-herbal and herbal products to state reasons for the safety of these substances widely consumed by the population.*

**Keywords:** *Supplementation, Herbal products, Non-herbal products, Shake, Tea*

## INTRODUÇÃO

O uso de ervas como recurso terapêutico tem ocorrido desde a antiguidade, por volta de 2100 a.C., na antiga China e na Índia<sup>1</sup>, estendendo-se até o atual século seja em tratamentos tradicionais<sup>2,3,4</sup> até o uso contínuo através de suplementos nutricionais<sup>5</sup>. Embora diversos benefícios sejam atribuídos a diversas espécies vegetais, nem sempre as características de eficácia e toxicidade dos produtos comercializados são conhecidas por falta de investigações sistemáticas e rigorosas.

Recentemente, suplementos dietéticos de origem natural e/ou industrial têm sido amplamente consumidos em todo o mundo, com um forte apelo midiático vinculado à “alimentação saudável”<sup>6</sup>. Além disso, sendo considerados “naturais” e, portanto, livre de reações adversas<sup>7,8</sup>, esses produtos são, muitas vezes, apresentados suscitando esperanças infundadas e expectativas que não podem ser cumpridas<sup>9</sup>. Paralelamente, outro agravante é que por serem tratados como produtos alimentares, muitos suplementos nutricionais e preparações à base de plantas estão isentos de normas rígidas de licenciamento rotineiramente impostas sobre drogas sintéticas ou produtos medicinais, não havendo, portanto, exigência de aprovação antes da comercialização<sup>5,8,10</sup>. Ainda que faltem evidências do benefício clínico desses produtos seja em curto, médio ou longo prazo, alguns desses suplementos à base de ervas têm sido reconhecidos como potenciais causadores de lesão hepática<sup>5,8,11-13</sup>.

Atualmente, o contexto se agrava devido a negligência de possíveis efeitos tóxicos pelos consumidores, sendo subestimado inclusive por muitos profissionais de saúde<sup>10,14</sup>. Entre vários exemplos desse contemporâneo comportamento humano, ascende recentemente uma prática de substituição parcial de dietas tradicionais pelo consumo de suplementos alimentares<sup>9,10,14</sup>. Essas preparações normalmente utilizam plantas especialmente selecionadas ou até mesmo ervas enriquecidas com diferentes nutrientes, oligoelementos, vitaminas e minerais, em que o número exato de produtos misturados, bem como sua composição exata é desconhecido<sup>8</sup>. Sua distribuição é feita na forma de bebidas, comprimidos, cápsulas e barras energéticas para o controle de peso, cosméticos e suporte nutricional para melhoria do bem-estar, através de agentes independentes de venda e *marketing on-line*<sup>14</sup>. Inclusive, Stickel *et al.*<sup>10</sup> enfatizam que esse tipo de informação *on-line* é preocupante pelo fato de clientes leigos confundirem o anúncio veiculado com informações científicas embasadas.

Embora ainda não haja muitos estudos em modelos experimentais quanto a suplementação com produtos herbáceos e não-herbáceos a relação entre lesões hepáticas e esses produtos tem aumentado na última década. Os primeiros relatos se iniciaram com a descrição de casos na Suíça e Espanha em 2005<sup>10</sup>, existindo atualmente mais de 50 relatos de casos descritos em várias partes do mundo<sup>5,8,12-19</sup>. Em uma mesma edição do *Journal of Hepatology*, Elinav *et al.*<sup>5</sup> descreve casos de 12 pacientes que sofreram lesão hepática aguda inexplicável, aparentemente associada ao consumo recente de suplementos nutricionais, enquanto Schoepfer *et al.*<sup>8</sup> descrevem outros 10 casos de hepatite tóxica. Na maior parte desses casos, os pacientes utilizavam a suplementação com o objetivo de perder peso. Em contrapartida, Ignarro & Heber<sup>20</sup>, tentam refutar alguns desses relatos de caso alegando que os critérios utilizados para causalidade de doenças hepáticas seriam meramente especulativos, já que os pacientes utilizavam vários produtos diferentes em combinação (entre 3 e 17 tipos), tornando extremamente difícil, senão impossível, identificar a substância tóxica fundamental. Mais recentemente, Teschkw *et al.*<sup>21</sup> também concluíram que há falta de critérios para os testes realizados, não havendo um método de avaliação específico, rebaixando os níveis de causalidade com base nessas deficiências.

Por outro lado, no corrente ano, surgiram mais duas publicações<sup>11,22</sup> que retomam a hipótese da relação da suplementação alimentar com produtos herbáceos e não-herbáceos bem como suas consequências deletérias para os consumidores. Ao mesmo tempo, uma das maiores lacunas para o entendimento de possíveis sequelas está na falta de ensaios pré-clínicos (experimentais) que apresentem o impacto do consumo crônico desses suplementos quanto a possíveis riscos e/ou reações de toxicidade. Enquanto isso, paradoxalmente, o consumo desses produtos por humanos vêm aumentando nos últimos anos<sup>5,8-12,14,19,22</sup>, especialmente em nosso país, ainda que não existam ensaios clínicos que comprovem sua inocuidade e/ou eficácia.

Dessa forma, avaliar a possível participação de lesões causadas pela suplementação oral com produtos herbáceos e não-herbáceos são necessários para conhecer a segurança desses produtos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do uso crônico de dois produtos amplamente utilizados como suplementos alimentares, inclusive em substituição de algumas refeições, sendo eles o “Shake” (suplemento não herbáceo) e “Chá” (suplemento herbáceo), particularmente sobre os efeitos comportamentais motores, bioquímicos e histológicos de camundongos Balb/C submetidos às dietas respectivas.

## MÉTODOS

O material utilizado para a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi composto por placas de sílica gel GF<sub>254</sub> como fase estacionária e mistura de acetato de etila, metanol e água (25: 3,3 :1,25) , como fase móvel. Em seguida, aplicou-se separadamente em forma de banda 5 µL das soluções de amostras de *Shake* (1% em metanol) e Chá (1% em metanol) e 3 µL da solução padrão de cafeína pura (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brazil) a 1% em metanol. Após o término da eluição da fase móvel, a placa foi seca ao ar por 5 minutos e observada sob luz ultravioleta a 254 nm. A mancha com Rf próximo a 0,5 corresponderia à cafeína padrão.

Após identificação por CCD, a cafeína também foi separada e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Esta técnica baseia-se na separação dos componentes de uma amostra, os quais se distribuem em duas fases, uma estacionária (Coluna Nucleosil RP 18 com 250 mm de comprimento e 4,4 mm de diâmetro, e partículas de 3 micra) e outra móvel (metanol:H<sub>2</sub>O/TFA 0,3%), conforme a interação destes com as referidas fases. Todas as análises foram realizadas por método isocrático na proporção de 1:1 dos solventes da fase móvel, num comprimento de onda de 273 nm em um fluxo de 0,50 mL/min. Para obtenção da curva padrão e equação da reta, foram feitas soluções padrões da cafeína pura (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brazil) em 6 concentrações (50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,125 µg/mL e 1,562 µg/mL), solubilizadas em metanol. Para determinação da concentração de cafeína nas amostras de “*Shake*” e “Chá”, foi solubilizado 1 g de cada amostra em 25 mL de metanol. Após processamento em aparelho de ultrassom por 15 minutos, realizou-se filtração em papel de filtro quantitativo e em seguida a análise no CLAE.

Para os ensaios *in vivo*, foram utilizados camundongos machos Balb/C com peso entre 25-40 g. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério de Pesquisa do Complexo “Biopráticas” da Universidade Vila Velha – UVV. Os animais foram mantidos em ambiente com iluminação artificial (ciclo claro-escuro de 12h), temperatura de 22 °C e água filtrada de acordo com o recomendado pelos biotérios de pesquisa. A disponibilidade de ração e água *ad libitum* ocorreu por durante 15 horas/dia e o restante foi substituído pela suplementação oral com os produtos não herbáceo (*Shake*) e herbáceo (Chá). Todo o trabalho com os animais ocorreu de acordo com as regras do guia para o cuidado e uso de animais de laboratório publicado pelo *National Institutes of Health* (NIH *Publication* N 85-23, 1996). Além disso, este trabalho foi

aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UUV, Protocolo nº 299/2013).

Os animais foram separados em 4 grupos experimentais: 1) Controle (leite semidesnatado, 0.5mL/dia, n= 10); 2) *Shake* (0.5mL/dia, n= 12); 3) Chá (0.5mL/dia, n= 12); 4) *Shake* + Chá (0.25mL/dia cada, n= 12). Enquanto o *Shake* foi diluído em leite semidesnatado (1,01 g de Shake em 6,5 ml de leite), o Chá foi diluído em água (0,35 g de Chá em 6,5 mL de água). De acordo com o fabricante, a composição do Shake contém: proteína isolada de soja, glúten, frutose, fibra de aveia, inulina, açúcar caramelizado, óleo vegetal de canola, cloreto de potássio, triglicerídeos de cadeia média, caseinato de cálcio, proteína concentrada do soro de leite, maltodextrina, ortofosfato férrico, vitamina C, sulfato de zinco, vitamina E, niacinamida, gluconato de cobre, D-pantotenato de cálcio, sulfato de manganês, biotina, vitamina B1, vitamina B6, vitamina B9, vitamina B12, vitamina D e fosfato de cálcio dibásico, vitamina A, iodeto de potássio, selenito de sódio, óxido de magnésio, estabilizante celulose microcristalina, goma xantana, carragena e pectina, dióxido de silício, aromatizante, emulsificante lecitina de soja, corante natural de urucum e sucralose. Quanto ao chá, este apresenta em sua composição: maltodextrina, frutose, chá preto, chá verde, cafeína, mistura de ervas aromáticas (cardamomo, malva e hibisco) e aromatizantes. Durante 28 dias, os animais receberam os produtos por gavagem. Diariamente foi realizada a aferição de peso de cada animal, bem como o consumo de ração e água dos respectivos grupos.

O comportamento motor geral dos animais foi avaliado em quatro momentos, uma vez por semana (entre 13h e 17h), através de observação direta em uma caixa de exploração em campo aberto, sendo esta uma gaiola de acrílico opaca (30 x 30 cm), com 16 cm de altura, delimitada em 16 quadrados (7,5 x 7,5 cm). Os animais foram colocados no centro da caixa e foram observados durante 5 minutos por dois observadores independentes para avaliação das variáveis comportamentais. Atividade geral motora foi examinada para determinar se a suplementação oral com produtos não herbáceos e herbáceos causaria hipoatividade, hiperatividade ou não alteração a atividade motora. Para tanto, as variáveis observadas foram: 1) locomoção espontânea (isto é, número de segmentos cruzados pelo animal com todas as patas), 2) "rearing", ou seja, o número de vezes quando o camundongo adquiria a postura vertical em relação à superfície da caixa, 3) "grooming", ou seja, o número de vezes que o animal executa atitudes como lambar pata ou área genital, coçar focinho ou

cabeça. Antes de introduzir cada animal na caixa, a mesma foi lavada para evitar possíveis odores deixados pelos animais anteriores<sup>23</sup>.

Semanalmente, foi medida a glicemia dos animais por meio do sistema Accu-Chek (Roche, Mannheim, Alemanha), obtidas através do sangue da veia caudal<sup>24</sup>. Após tratamento com os suplementos por 28 dias, os animais foram eutanasiados com pentobarbital sódico (60 mg/Kg, i.p.) para a coleta do sangue por meio de punção cardíaca para análises bioquímicas. Após indução da morte, foram retiradas amostras de rim e fígado para quantificação de biomarcadores de *stress* oxidativo e ensaios histopatológicos, os quais serão descritos a seguir.

O sangue retirado por meio de punção cardíaca, no ventrículo direito, foi realizado com uso de uma seringa de 1 mL acoplada a uma agulha de insulina (13x4,5mm). Em seguida, as amostras eram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 1252 g, à temperatura ambiente. Em seguida, o soro era recolhido e armazenado a -20°C até o dia das dosagens bioquímicas séricas: Colesterol total, Triglicerídeos, Ureia, Creatinina, Ácido úrico, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e Proteína C Reativa (PCR). Todas as análises bioquímicas supracitadas foram realizadas por métodos espectrofotométricos obtidos pelo analisador automático AU 400 ou 680 (Olympus/Beckman Coulter, Munich, Germany).

Amostras de fígado e rim foram colhidas, pesadas, seccionadas e fixadas em solução de Bouin a 1:4 em salina. Os rins foram seccionados em duas metades e o fígado em *slices* de 4 mm de espessura. Após fixação por 48h, o material foi mantido em geladeira até o momento da inclusão em parafina, no qual os fragmentos foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de álcool até álcool anidro, colocadas em dois banhos de xilol e em seguida em dois banhos de parafina. Após inclusão, os fragmentos foram cortados com 5 µm de espessura em micrótomo de rotina e os cortes colocados sobre lâminas de vidro tratadas com albumina para aderência tecidual. Em seguida, os cortes foram corados com Hematoxilina-eosina (HE) e *oil red* (Sigma, Estados Unidos). Realizou-se, então, a montagem com verniz automotivo para a preservação dos cortes. As lâminas foram analisadas em microscópio trinocular Olympus AX70 (Olympus Corporation, Japan) acoplado a câmera digital AxioCam ERC 5s (Carl Zeiss, Alemanha).

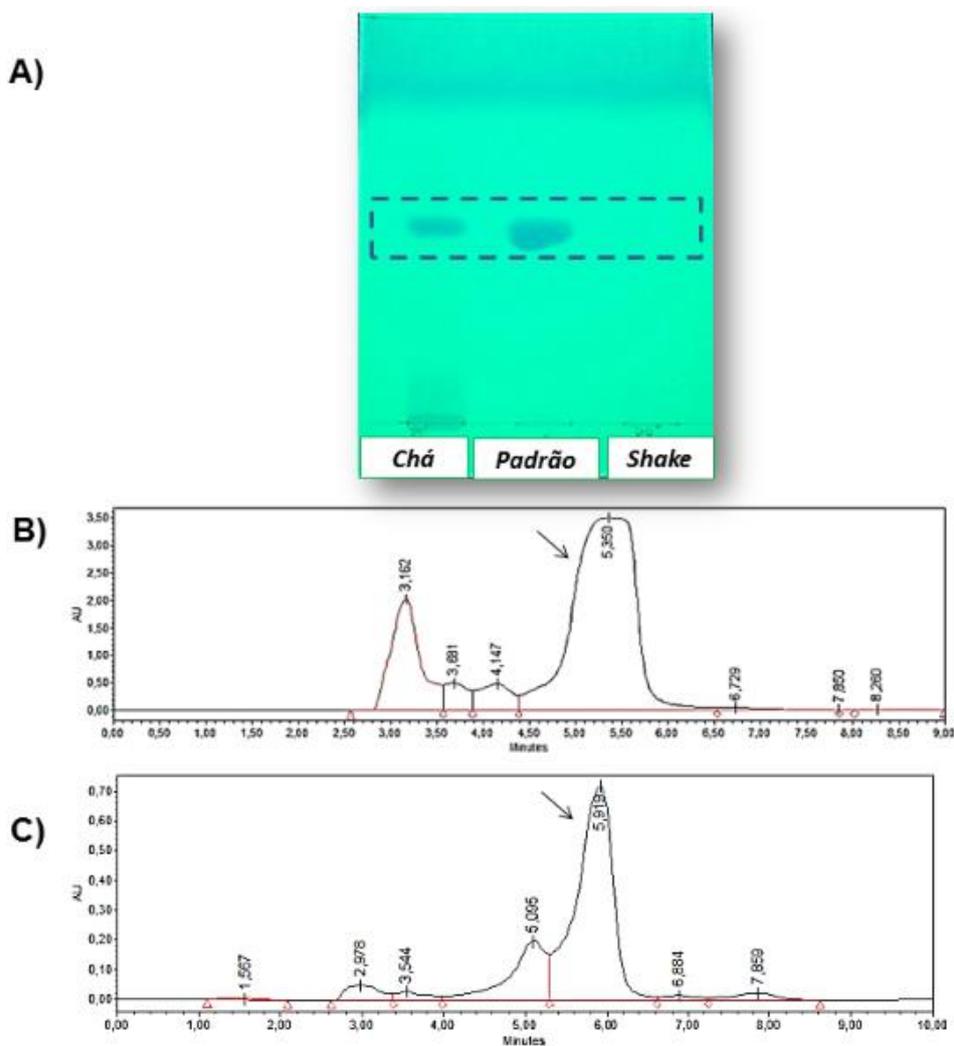
As análises do conteúdo de AOPP foram realizadas de acordo com Witko-Sarsat *et al.*<sup>25</sup>. As AOPP são criadas em situações de estresse oxidativo e analisadas

em comparação às reações de agentes oxidantes clorinados como as cloraminas. Para tanto, foram utilizados 200 mg de fígado e diluído em 1:5 de PBS, 10 µL de 1,16 M KI foi adicionado em cada tubo. Logo após 20 µL de ácido acético foram adicionados por 2 minutos. A absorbância da reação foi imediatamente lida em 340 nm contra o branco contendo 200µL de PBS, 20µL de ácido acético e 10µL de KI. O conteúdo de AOPP foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 µM realizadas com equivalentes de cloramina T. Os resultados são expressos em µmol de equivalentes de cloramina T/mg proteína. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford<sup>26</sup>. Nessa medida, as amostras precisaram ser diluídas em 1:10. O mesmo procedimento foi realizado com as amostras de rim, utilizando também 200 mg das amostras.

Todos os dados estão expressos como a média ± EPM. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) – 1 via utilizando o *software* Prism (6 Prism, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Quando a ANOVA mostrou diferenças significativas, o teste de Tukey foi usado como uma análise *post hoc*. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

A cafeína na amostra de Chá (Figura 1A) foi detectada através da observação de uma mancha semelhante ao Rf do padrão de cafeína pura, sem alteração de resolução mesmo com a presença dos outros componentes da formulação. Interessantemente, através da análise por CLAE foi possível quantificar a cafeína presente no Chá (Figura 1B) e no *Shake* (Figura 1C) nas duas amostras utilizadas no experimento. Após obtenção da equação da reta com a curva de calibração da cafeína pura ( $y = 168306.9918x - 638538.1667$  com  $r^2 = 0.9938$ ), foi observado no produto “Chá”, a presença de 25 mg de cafeína/g enquanto no *Shake*, foi detectada a presença de 2,5 mg de cafeína/g de amostra.



**Figura 1.** Detecção de cafeína em amostras de Chá por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) evidenciado pelo quadro em linhas pontilhadas (Figura A). Nas figuras “B” e “C”, estão demonstrados os cromatogramas típicos das amostras de Chá e *Shake* (respectivamente) obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As setas indicam a presença de cafeína em ambas amostras, sendo visivelmente superior na amostra de Chá.

De acordo com a tabela 1, a avaliação ponderal demonstrou ganho de peso significativo apenas no grupo Controle, apresentando um incremento de 16% ( $p < 0.05$ ). Os grupos tratados com *Shake*, Chá e a associação *Shake* + Chá não apresentaram ganho de peso (-1%, 1% e 1%, respectivamente). Quanto ao consumo de ração, os animais suplementados com Chá e *Shake* + Chá apresentaram diminuição de consumo de ração em torno de 20% e 35% respectivamente ( $p < 0.05$ ). Não houve alteração quanto ao consumo de água entre os grupos estudados.

**Tabela 1.** Parâmetros ponderais e de consumo de ração e água dos grupos Controle, *Shake*, Chá e *Shake* + Chá.

| Parâmetros                 | Controle<br>(n=6)             | <i>Shake</i><br>(n=10) | Chá<br>(n=10)   | <i>Shake</i> + Chá<br>(n=10) |
|----------------------------|-------------------------------|------------------------|-----------------|------------------------------|
| Peso inicial (g)           | 33.7 ± 1.7                    | 30.7 ± 1.5             | 34.3 ± 1.0      | 33.2 ± 1.0                   |
| Peso final (g)             | 39.1 ± 2.5 (16%) <sup>§</sup> | 30.4 ± 2.2 (-1%)       | 35.2 ± 1.5 (1%) | 33.0 ± 2.1 (1%)              |
| Consumo médio de ração (g) | 6.9 ± 0.4                     | 6.3 ± 0.3              | 5.6 ± 0.3*      | 4.6 ± 0.2 **                 |
| Consumo médio de água (mL) | 12 ± 1.0                      | 12 ± 0.9               | 11.7 ± 0.6      | 13 ± 1.3                     |

<sup>§</sup> $p < 0.05$  vs. Peso inicial,

\* $p < 0.05$  vs. Grupo Controle

\*\* $p < 0.05$  vs. Grupo Shake

Segundo os parâmetros comportamentais motores observados no campo aberto (*open-field*) e descritos na tabela 2, os resultados mostraram que os camundongos tratados com Chá e associação *Shake* + Chá apresentaram diminuição de locomoção (40% e 42%,  $p < 0.05$ , respectivamente) além do número de *rearing* (63% e 44%,  $p < 0.05$ , respectivamente) e *self-grooming* (43% e 51%,  $p < 0.05$ , respectivamente) em relação ao grupo Controle. Não foi observado alteração quanto ao padrão de defecação e ato de urinar entre os grupos estudados ( $p > 0.05$ ).

**Tabela 2.** Parâmetros comportamentais dos grupos Controle, *Shake*, Chá e *Shake* + chá.

| Parâmetros            | Controle<br>(n=6)        | <i>Shake</i><br>(n=5)    | Chá<br>(n=5)             | <i>Shake</i> + Chá<br>(n=5) |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Locomoção             | 34 <sub>√</sub> ± 5      | 36 <sub>√</sub> ± 5      | 21 <sub>√</sub> ± 7*#    | 20 <sub>√</sub> ± 4*#       |
| <i>Rearing</i>        | 9.2 <sub>√</sub> ± 2.0   | 8.4 <sub>√</sub> ± 2.0   | 3.4 <sub>√</sub> ± 1.1*# | 5.2 <sub>√</sub> ± 1.0*#    |
| <i>Self-Grooming</i>  | 3.3 <sub>√</sub> ± 0.8   | 2.1 <sub>√</sub> ± 0.5   | 1.9 <sub>√</sub> ± 0.4   | 1.6 <sub>√</sub> ± 0.2 *    |
| <i>Pellets</i> fecais | 1.7 <sub>√</sub> ± 0.5   | 1.7 <sub>√</sub> ± 0.3   | 1.6 <sub>√</sub> ± 0.3   | 1.8 <sub>√</sub> ± 0.4      |
| Ato de Urinar         | 0.13 <sub>√</sub> ± 0.08 | 0.25 <sub>√</sub> ± 0.09 | 0.18 <sub>√</sub> ± 0.1  | 0.08 <sub>√</sub> ± 0.05    |

\*p&lt;0.05 vs. Controle

#p&lt;0.05 vs. Shake

De acordo com a avaliação bioquímica (tabela 3), foi apresentado que os tratamentos orais com os produtos herbáceos e não-herbáceos utilizados não alteraram significativamente os perfis de glicemia (nem sua variação entre o início e o fim do tratamento), colesterolemia e trigliceridemia entre os grupos ( $p>0.05$ ). Quanto aos marcadores clássicos da função renal, não houve também alteração nem para ureia (Controle:  $76 \pm 3$ ; *Shake*:  $78 \pm 5$ ; Chá:  $66 \pm 5$ ; *Shake* e Chá:  $65 \pm 5$  mg/dL,  $p>0.05$ ) nem para creatinina (Controle:  $0.15 \pm 0.02$ ; *Shake*:  $0.11 \pm 0.01$ ; Chá:  $0.10 \pm 0.01$ ; *Shake* e Chá  $0.15 \pm 0.02$  mg/dL,  $p>0.05$ ). Quanto aos marcadores de função hepática, observou-se um incremento de 87% de ALT (porém não significativo) e 175% de AST ( $p<0.05$ ) do grupo *Shake* + Chá em relação ao grupo Controle. Quanto aos demais grupos *Shake* e Chá houve apenas o aumento expressivo de AST em relação ao Controle (72% e 77%, respectivamente,  $p<0.05$ ).

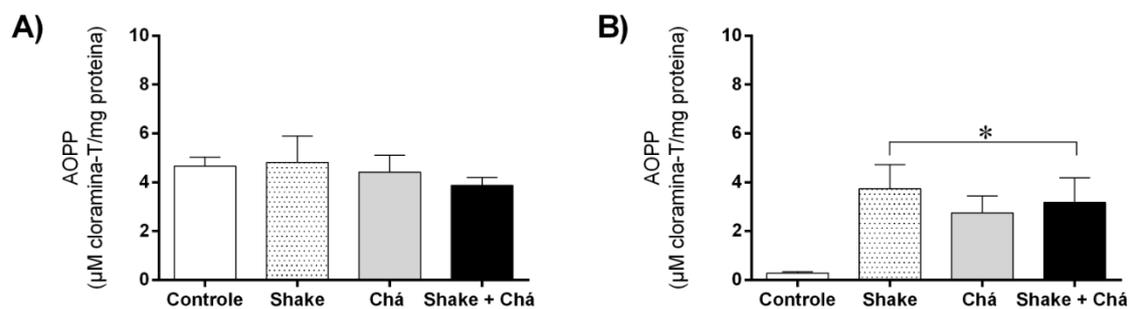
**Tabela 3.** Parâmetros bioquímicos analisados dos grupos Controle, *Shake*, Chá e *Shake + chá*.

| Parâmetros               | Controle<br>(n=6-10) | <i>Shake</i><br>(n=8-12) | Chá<br>(n=8-12) | <i>Shake + Chá</i><br>(n=8-12) |
|--------------------------|----------------------|--------------------------|-----------------|--------------------------------|
| Glicemia (mg/dL)         | 113 ± 6              | 96 ± 8                   | 98 ± 3          | 114 ± 6                        |
| Variação de glicemia (%) | 12.6 ± 9.4           | -5.6 ± 11                | -6 ± 7          | -4.0 ± 8                       |
| Colesterol total (mg/dL) | 85 ± 5               | 77 ± 9                   | 90 ± 4          | 80 ± 5                         |
| Triglicerídeos (mg/dL)   | 117 ± 28             | 168 ± 27                 | 154 ± 14        | 146 ± 36                       |
| Ureia (mg/dL)            | 76 ± 3               | 78 ± 5                   | 66 ± 5          | 65 ± 5                         |
| Creatinina (mg/dL)       | 0.15 ± 0.02          | 0.11 ± 0.01              | 0.10 ± 0.01     | 0.15 ± 0.02                    |
| Ácido úrico (mg/dL)      | 3.4 ± 0.7            | 3.6 ± 0.6                | 3.3 ± 0.3       | 4.3 ± 1.1                      |
| ALT (U/L)                | 58 ± 7               | 71 ± 12                  | 73 ± 18         | 109 ± 39                       |
| AST (U/L)                | 140 ± 12             | 241 ± 39*                | 248 ± 82*       | 386 ± 78*                      |
| PCR (mg/dL)              | 1.02 ± 0.35          | 0.95 ± 0.44              | 0.91 ± 0.19     | 1.6 ± 0.95                     |

\*p&lt;0.05 vs. Controle;

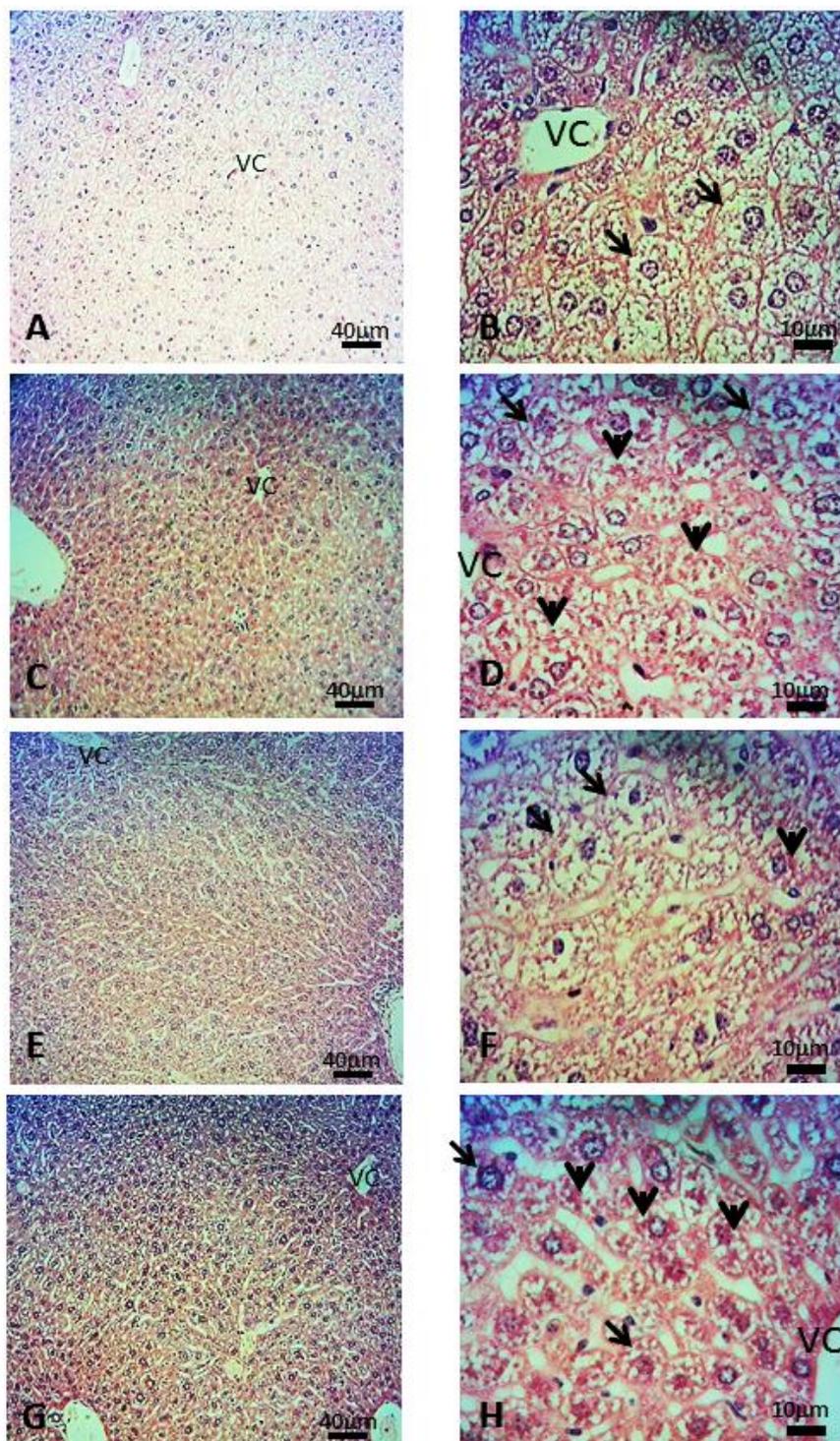
ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; PCR: proteína C reativa

Uma das maneiras de estimar o grau de dano mediado pela oxidação proteica de forma indireta em tecidos é investigar a presença de produtos avançados de proteína oxidada (AOPP). Conforme a Figura 2, foi possível demonstrar que não houve alteração de oxidação proteica em fígado de camundongos tratados com qualquer suplementação (*Shake*: 4.8 ± 1; Chá: 4.4 ± 0.7; *Shake + Chá*: 3.9 ± 0.3 μmol/mg de proteína, respectivamente) em relação ao Controle (4.7 ± 0.4 μmol/mg de proteína). Por outro lado, a concentração de AOPP nos rins de camundongos tratados com produtos não herbáceos e herbáceos (*Shake*: 3.7 ± 1; Chá: 2.7 ± 0.7; *Shake + Chá*: 3.2 ± 1 μmol/mg de proteína, p<0.05) foram superiores ao grupo Controle (0.3 ± 0.05 μmol/mg de proteína).



**Figura 2.** Quantificação de produtos avançados de proteína oxidada (AOPP). Níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) em tecido hepático (A) e renal (B) de animais dos grupos Controle, *Shake*, Chá e *Shake + Chá*. Os valores estão corrigidos com a concentração de proteína e expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0.05$  vs. Controle.

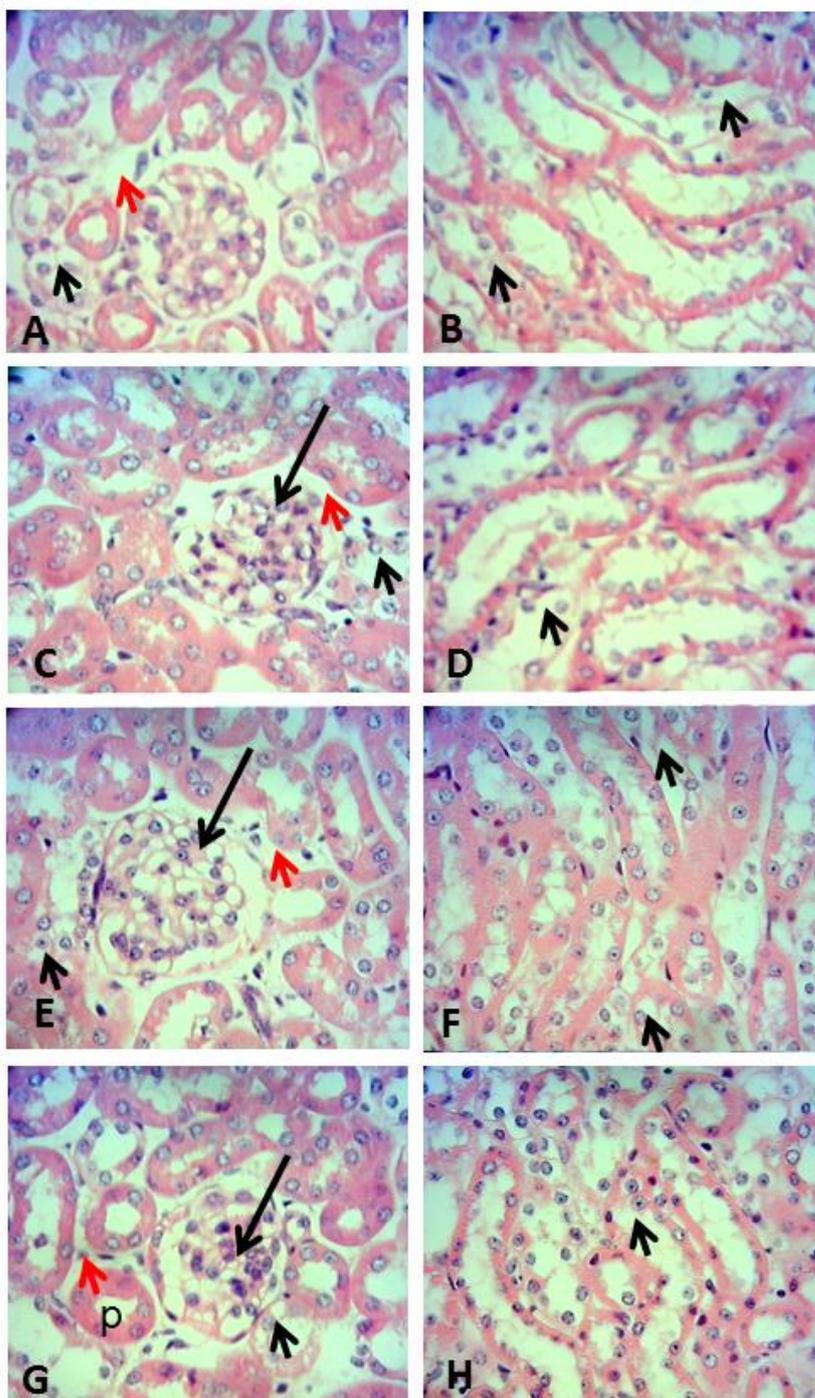
Em relação à análise histológica hepática, todos os grupos experimentais apresentaram arquitetura normal, semelhantemente ao grupo Controle, não apresentando focos de necrose tampouco infiltrados inflamatórios intralobulares. (Figura 3). Além disso, a coloração dos cortes com *oil red* (dados não mostrados) não evidenciou depósitos de gordura em nenhum dos grupos. Esse quadro histológico foi compatível com o diagnóstico de degeneração hidrópica panlobular tanto no grupo Controle como nos três grupos experimentais, sem diferenças importantes entre os grupos.



**Figura 3.** Aspecto microscópico do fígado de camundongos Controle (A e B), Chá (C e D), *Shake* (E e F) ou *Shake* + Chá (G e H). Em todos os grupos há acentuada vacuolização de hepatócitos (setas pretas) distribuída em todo o lóbulo hepático. Nos grupos Chá, *Shake* e *Shake* + Chá observa-se presença de pequenos depósitos hialinos (cabeças de seta). Coloração hematoxilina e eosina.

Quanto ao aspecto histológico renal, todos os grupos experimentais apresentaram semelhança com o grupo Controle. Glomérulos com aparência normal,

apresentando apenas discreto edema no interstício tubular e área periglomerular, acompanhado de discreta vacuolização de células epiteliais tubulares na região medular (Figura 4).



**Figura 4.** Aspecto microscópico do rim de camundongos Controle (A e B), Chá (C e D), *Shake* (E e F) ou *Shake + Chá* (G e H). Os glomérulos não apresentam alterações evidentes. Observou-se discreto edema no interstício tubular (setas vermelhas) evidenciados em A, C, E e G. Há discreta vacuolização de algumas células epiteliais tubulares na região medular (setas pretas) em B, D, F e H. Coloração hematoxilina e eosina.

## DISCUSSÃO

Há cerca de 10 anos surgiram os primeiros relatos de caso associando o uso da suplementação oral de alguns produtos herbáceos e não-herbáceos com lesões hepáticas. Atualmente já são mais de 50 relatos de casos descritos em vários países<sup>5,8,9,11-19,22</sup>, sendo que a maioria dos pacientes envolvidos tinham como objetivo a perda de peso. Apesar de tais evidências, ainda não há na literatura ensaios pré-clínicos que apresentem o impacto do consumo crônico desses suplementos quanto a possíveis riscos e/ou reações de toxicidade. Portanto, nosso trabalho é o primeiro que utiliza modelos experimentais para avaliação do efeito do uso crônico de dois produtos amplamente utilizados comercialmente como suplementos alimentares, inclusive em substituição de algumas refeições, sendo eles os “*Shakes*” e “*Chás*”, particularmente sobre os efeitos comportamentais motores, bioquímicos e histológicos.

Em relação à caracterização química dos produtos avaliados, a quantidade de cafeína encontrada na amostra de Chá (25 mg de cafeína por grama de amostra) foi inferior à quantidade descrita no rótulo do produto (50 mg de cafeína por grama de amostra). Paralelamente, foi observada a presença de 2,5 mg de cafeína em cada grama de *Shake*, apesar do rótulo deste produto não mencionar a presença do mesmo. Deve ser enfatizado que suplementos alimentares e preparações a base de plantas são tratados na maioria dos países como produtos alimentares e estão isentos das normas rígidas de licenciamento que rotineiramente são impostas sobre drogas sintéticas ou produtos medicinais antes da comercialização<sup>2,5,9,27</sup>. Mesmo assim, *sites* que veiculam propaganda desses produtos atestam rigoroso controle de qualidade, além de existirem artigos que também defendam as mesmas características desses produtos<sup>20</sup>. Vale ressaltar que, por se tratar de produtos a base de espécies vegetais, os constituintes químicos podem variar de acordo com a estação, local, altitude no qual a erva foi cultivada, de modo que o mesmo produto possa alterar de lote para lote<sup>27</sup>, o que poderia explicar, em parte, os valores discrepantes encontrados no presente estudo.

As propagandas dos produtos de suplementação alimentar ressaltam o compromisso de fornecer soluções saudáveis para a epidemia mundial da obesidade, distribuindo suplementos nutricionais voltados principalmente para o controle de peso e promoção do “bem estar”<sup>9,20</sup>. Entretanto, Esteghamati *et al.*<sup>28</sup> enfatizam a escassez de dados que mostrem que o tratamento em longo prazo para perda de peso com mistura de ervas seja seguro e eficaz, alegando benefícios clínicos insignificantes, tal qual o uso de placebo. Nesse contexto ainda então aparentemente contraditório,

nossos dados evidenciam que os produtos administrados no presente estudo podem de fato contribuir para o controle do peso, conforme indicação do rótulo. Como a cafeína é capaz de estimular a lipólise acompanhada de termogênese<sup>29</sup>, poderíamos atribuir parte desse efeito a esta metilxantina. Com base em nossos dados por CLAE, pode-se afirmar que os grupos tratados com Chá e associação foram expostos a 0,9 mg e 0,45 mg de cafeína/dia, respectivamente. Outros trabalhos já demonstram semelhante resposta em habituais consumidores de Chás que continham baixo teor de cafeína, como o Chá-verde<sup>30</sup>. Mesmo assim, convém ressaltar que nossos dados são insuficientes para validar esses suplementos como ideais para o controle do peso, pois outros possíveis riscos inerentes ao consumo contínuo desses produtos ricos em cafeína em longo prazo podem desencadear efeitos tóxicos os quais já são amplamente descritos na literatura<sup>30,31</sup>. Considerando que o fabricante desses produtos sugere a substituição de duas refeições diárias por *Shake* e o consumo de Chá “várias vezes ao dia” para perda de peso, podemos inferir que o indivíduo estaria exposto a aproximadamente 215 mg de cafeína diariamente (130 mg contidos no *Shake* + 85 mg contidos no Chá), sendo conhecidamente uma dose elevada para humanos<sup>31</sup>.

Curiosamente, o comportamento motor dos grupos investigados demonstrou alterações, em que o tratamento com Chá e associação *Shake* + Chá promoveu diminuição de locomoção, além do número de *self-grooming* e *rearing*. Parte desses efeitos poderiam também ser atribuídos ao psicoestimulante cafeína<sup>32</sup>. Inclusive, El Yacoubi *et al.*<sup>33</sup> discutem a respeito das alterações no comportamento motor após administração de doses elevadas de cafeína quando associadas ao estresse, tanto em camundongos como em humanos, e mostra que é possível haver diminuição da atividade locomotora, fenômeno que pode estar associado ao *stress* causado pela troca de ambiente do animal. Além disso, de acordo com observações de Blanchard *et al.*<sup>34</sup>, animais silvestres tendem a fugir, ao passo que os animais criados em laboratório tendem a ficar paralisados (*freezing stress*) quando expostos a uma situação estressante. De acordo com essa observação, a suplementação com Chá poderia ter intensificado o baixo comportamento exploratório dos grupos “Chá” e “Shake+ Chá”.

A suposta correlação entre os casos de lesão hepática provocada pela suplementação com produtos não herbáceos e herbáceos continua a despertar interesse da área clínica devido aos crescentes relatos de casos na literatura<sup>5,8,9,11-19,22</sup>, em que a alteração laboratorial mais comum é a elevação das transaminases hepáticas, sinalizando possível toxicidade hepatocelular<sup>35</sup>. Nossos resultados experimentais corroboram esse achado clínico, especialmente quando os produtos

*Shake* e Chá estão associados, apresentando um efeito sinérgico, uma vez que as doses da associação dos respectivos produtos foram reduzidas à metade quando comparado aos grupos com único produto. Um fato agravante é que são descritos diversos suplementos à base de plantas com propriedades hepatotóxicas especialmente em pacientes com comorbidades que exigem múltiplas terapias de longo prazo<sup>21,27</sup>. Curiosamente, 30 a 40% dos pacientes internados não descrevem a utilização destes para seus médicos<sup>3</sup>, muitas vezes por estarem fazendo auto-medicação<sup>9</sup> e por acharem que por serem “naturais”, são, portanto, imediatamente seguros<sup>8</sup>. Dessa forma, ao determinar o diagnóstico de danos hepáticos em pacientes por incremento de enzimas hepáticas, nossos dados respaldam que durante as investigações clínicas dos possíveis agentes etiológicos sejam considerados o uso de suplementos alimentares herbáceos e não-herbáceos como possíveis interferentes.

Embora em nossos dados séricos de glicose, triglicerídeos e colesterol não foram alterados entre os grupos estudados, é importante enfatizar que nossos animais eram hígidos, não havendo morbidades associadas. Inclusive, outros trabalhos já mostraram que os camundongos Balb/C sem comorbidades são animais altamente resistentes ao desenvolvimento de dislipidemias e alterações de glicemia, mesmo sob dietas hipercalóricas<sup>36</sup>, diferente do que ocorre com os humanos.

Um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante do organismo caracteriza o estresse oxidativo<sup>37</sup>. Embora haja um apelo midiático indicando que a suplementação com produtos herbáceos ou não-herbáceos possam atuar combatendo o estresse oxidativo, verificamos que há um aumento de oxidação proteica renal nos grupos tratados com *Shake*, Chá e também com a associação. Um recente estudo que investigou os possíveis efeitos do Chá verde sobre o estresse oxidativo concluiu que altas doses de catequina, como geralmente é visto em suplementos dietéticos, podem perturbar o equilíbrio oxidativo através da inibição de determinadas enzimas antioxidantes<sup>38</sup>. Por outro lado, doses baixas e médias de Chá verde tendem a provocar efeitos benéficos principalmente no intestino grosso, fígado e rins de camundongos, contrastando com o uso de doses elevadas que podem levar ao câncer colorretal, além da indução de disfunções hepáticas e renais<sup>39</sup>. Em relação à AOPP hepática, por não encontrarmos diferença entre os grupos, esse resultado poderia ser justificado pelo maior aumento de atividade antioxidante no fígado quando comparado ao tecido renal<sup>40</sup>, conseguindo assim manter as ERO em equilíbrio. Ainda que não seja apresentado nesse trabalho as defesas antioxidantes envolvidas tais como glutathione (peroxidase e redutase),

superóxido dismutase e catalase, nossos dados salientam sobre o risco de dano oxidativo induzido por esses produtos, principalmente em exposições crônicas (como observado nos rins), com doses aumentadas ou em indivíduos com o sistema antioxidante deficiente. Como exemplo, Senadhi *et al.*<sup>35</sup> relatam um caso de uso de suplementos a base ervas por um paciente imunodeprimido que apresentava baixa atividade de glutathione.

Em relação ao intervalo de administração estipulado para os respectivos grupos, tentamos ao máximo mimetizar as condições sugeridas nas embalagens dos produtos de substituir duas refeições por dia com suplementação e manter uma refeição livre. Para tanto, durante 9 horas por dia, os animais foram expostos unicamente aos suplementos. Por não haver estudos prévios sobre dose desses produtos em camundongos, inicialmente as doses de *Shake* e Chá foram estabelecidas baseando-se num volume adequado de plenitude gástrica que o camundongo suportaria por via oral<sup>41</sup> mantendo a mesma diluição indicada no rótulo dos produtos. Em paralelo, também utilizamos um cálculo para conversão de doses para humanos baseado no peso corrigido com a área de superfície corporal das espécies<sup>42</sup>. Utilizando essa fórmula proposta para conversão<sup>42</sup>, foi percebido que a dose diária administrada de *Shake* seria 47% menor quando comparada a utilizada convencionalmente indicada para humanos de 70Kg (26g/porção). Quanto a dose do Chá, utilizando o mesmo cálculo, a dose seria de 4,8 g de Chá/dia, correspondendo aproximadamente a uma dose 3 vezes maior que a indicada pelo rótulo (1,7g/porção). Em consequência, na associação *Shake* + Chá (onde observamos resultados mais expressivos), a dose do *Shake* estaria reduzida em 73% comparada ao uso humano enquanto a dose de Chá se aproximaria mais da convencionalmente utilizada (2.4g/porção/dia).

Em conclusão, nossos resultados indicam que o uso crônico de produtos comerciais herbáceos e não-herbáceos podem ser capazes de contribuir para o controle do peso. Entretanto, os animais expostos à associação *Shake* + Chá apresentaram alteração no padrão de comportamento motor, provavelmente pelo efeito da cafeína. Apesar dos resultados negativos histológicos, foi observado aumento de AST e aumento de oxidação proteica no tecido renal dos respectivos animais, sugerindo a necessidade de mais estudos experimentais para fundamentação quanto à segurança desses produtos amplamente consumidos pela população.

**CONFLITO DE INTERESSES**

Todos os autores concordam com a publicação do artigo e declaram que não há conflito de interesses de qualquer natureza.

**AGRADECIMENTOS**

Agradecemos o apoio recebido da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES, #61981311/2013) e do Laboratório de Análises Clínicas Tommasi.

**REFERÊNCIAS**

1. Schuppan D, Jia JD, Brinkhaus B, Hahn EG. Herbal products for liver diseases: a therapeutic challenge for the new millennium. *Hepatology*. 1999 Oct;30(4):1099-104.
2. Navarro VJ, Lucena MI. Hepatotoxicity induced by herbal and dietary supplements. *Semin Liver Dis*. 2014 May;34(2):172-93. doi: 10.1055/s-0034-1375958.
3. Verma S, Thuluvath PJ. Complementary and alternative medicine in hepatology: review of the evidence of efficacy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Apr;5(4):408-16.
4. Hostettmann K, Marston A. Twenty years of research into medicinal plants: results and perspectives. *Phytochemistry Review*, 2002; 1(3):275-85.
5. Elinav E, Pinsker G, Safadi R, Pappo O, Bromberg M, Anis E, et al. Association between consumption of Herbalife nutritional supplements and acute hepatotoxicity. *J Hepatol*. 2007 Oct;47(4):514-20.
6. Heymsfield SB, van Mierlo CA, van der Knaap HC, Heo M, Frier HI. Weight management using a meal replacement strategy: meta and pooling analysis from six studies. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 May;27(5):537-49.
7. Strader DB, Seeff LB. Zakim and Boyer hepatology. In: Boyer TD, Wright TL, Manns MP, editors. *Hepatotoxicity of herbal preparations*. Philadelphia: US Saunders – Elsevier; 2006. p. 551–560.
8. Schoepfer AM, Engel A, Fattinger K, Marbet UA, Cribiez D, Reichen J, et al. Herbal does not mean innocuous: ten cases of severe hepatotoxicity associated with dietary supplements from Herbalife products. *J Hepatol*. 2007 Oct;47(4):521-6.
9. Stickel F. Slimming at all costs: Herbalife-induced liver injury. *J Hepatol*. 2007 Oct;47(4):444-6. Epub 2007 Jul 27.

10. Stickel F, Kessebohm K, Weimann R, Seitz HK. Review of liver injury associated with dietary supplements. *Liver Int.* 2011 May;31(5):595-605
11. Garrido-Gallego F, Muñoz-Gómez R, Muñoz-Codoceo C, Delgado-Álvarez P, Fernández-Vázquez I, Castellano G. Acute liver failure in a patient consuming Herbalife products and Noni juice. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015 Apr;107(4):247-8.
12. Chen GC, Ramanathan VS, Law D, Funchain P, Chen GC, French S, et al. Acute liver injury induced by weight-loss herbal supplements. *World J Hepatol.* 2010 Nov 27;2(11):410-5. doi: 10.4254/wjh.v2.i11.410.
13. Ramanathan VS, Hensley G, French S, Eysselein V, Chung D, Reicher S, et al. Hypervitaminosis A inducing intra-hepatic cholestasis--a rare case report. *Exp Mol Pathol.* 2010 Apr;88(2):324-5. doi: 10.1016/j.yexmp.2009.11.007
14. Bunchorntavakul C, Reddy KR. Review article: herbal and dietary supplement hepatotoxicity. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013 Jan;37(1):3-17. doi: 10.1111/apt.12109.
15. Manso G, López-Rivas L, Salgueiro ME, Duque JM, Jimeno FJ, Andrade RJ, et al. Continuous reporting of new cases in Spain supports the relationship between Herbalife® products and liver injury. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2011 Oct;20(10):1080-7. doi: 10.1002/pds.2180.
16. Jóhannsson M, Ormarsdóttir S, Olafsson S. [Hepatotoxicity associated with the use of Herbalife]. *Laeknabladid.* 2010 Mar;96(3):167-72.
17. Duque JM, Ferreiro J, Salgueiro E, Manso G. [Hepatotoxicity associated with the consumption of herbal slimming products]. *Med Clin (Barc).* 2007 Feb 17;128(6):238-9.
18. Chao S, Anders M, Turbay M, Olaiz E, Mc Cormack L, Mastai R. [Toxic hepatitis by consumption Herbalife products a case report]. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2008 Dec;38(4):274-7.

19. Stickel F, Droz S, Patsenker E, Bögli-Stuber K, Aebi B, Leib SL. Severe hepatotoxicity following ingestion of Herbalife nutritional supplements contaminated with *Bacillus subtilis*. *J Hepatol*. 2009 Jan;50(1):111-7. doi: 10.1016/j.jhep.2008.08.017.
20. Ignarro L, Heber D, Henig YS, Bejar E. Herbalife nutritional products and liver injury revisited. *J Hepatol*. 2008 Aug;49(2):291-3; author reply 293-4. doi:10.1016/j.jhep.2008.05.005.
21. Teschke R, Eickhoff A. Herbal hepatotoxicity in traditional and modern medicine: actual key issues and new encouraging steps. *Front Pharmacol*. 2015 Apr 23;6:72. doi: 10.3389/fphar.2015.00072.
22. Mengual-Moreno E, Lizarzábal-García M, Ruiz-Soler M, Silva-Suarez N, Andrade-Bellido R, Lucena-González M, et al. [Case reports of drug-induced liver injury in a reference hospital of Zulia state, Venezuela]. *Invest Clin*. 2015 Mar;56(1):3-12. Spanish.
23. da Silveira NS, de Oliveira-Silva GL, Lamanes Bde F, Prado LC, Bispo-da-Silva LB. The aversive, anxiolytic-like, and verapamil-sensitive psychostimulant effects of pulegone. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(5):771-8.
24. Damián JP, Acosta V, Da Cuña M, Ramírez I, Oddone N, Zambrana A, et al. Effect of resveratrol on behavioral performance of streptozotocin-induced diabetic mice in anxiety tests. *Exp Anim*. 2014;63(3):277-87.
25. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996 May;49(5):1304-13.
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
27. Raschi E, De Ponti F. Drug- and herb-induced liver injury: Progress, current challenges and emerging signals of post-marketing risk. *World J Hepatol*. 2015 Jul 8;7(13):1761-71. doi: 10.4254/wjh.v7.i13.1761.

28. Esteghamati A, Mazaheri T, Vahidi Rad M, Noshad S. Complementary and alternative medicine for the treatment of obesity: a critical review. *Int J Endocrinol Metab.* 2015 Apr 20;13(2):e19678. doi: 10.5812/ijem.19678.
29. Liu AG, Arceneaux KP 3rd, Chu JT, Jacob G Jr, Schreiber AL, Tipton RC, et al. The effect of caffeine and albuterol on body composition and metabolic rate. *Obesity (Silver Spring).* 2015 Aug 4. doi:10.1002/oby.21163.
30. Gurley BJ, Steelman SC, Thomas SL. Multi-ingredient, caffeine-containing dietary supplements: history, safety, and efficacy. *Clin Ther.* 2015 Feb 1;37(2):275-301. doi: 10.1016/j.clinthera.2014.08.012.
31. Ahluwalia N, Herrick K. Caffeine intake from food and beverage sources and trends among children and adolescents in the United States: review of national quantitative studies from 1999 to 2011. *Adv Nutr.* 2015 Jan 15;6(1):102-11. doi: 10.3945/an.114.007401.
32. Davis JM, Zhao Z, Stock HS, Mehl KA, Buggy J, Hand GA. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 Feb;284(2):R399-404. Epub 2002 Oct 24. PubMed PMID: 12399249.
33. El Yacoubi M, Ledent C, Ménard JF, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors. *Br J Pharmacol.* 2000 Apr;129(7):1465-73.
34. Blanchard RJ, Blanchard DC. Bringing natural behaviors into the laboratory: a tribute to Paul MacLean. *Physiol Behav.* 2003 Aug;79(3):515-24.
35. Senadhi V, Arora D, Arora M, Marsh F. A rare cause of drug-induced hepatitis in an immunocompromised patient and the role of glutathione. *World J Hepatol.* 2012 Aug 27;4(8):248-51.
36. Otero P, Bonet B, Herrera E, Rabano A. Development of atherosclerosis in the diabetic BALB/c mice. Prevention with Vitamin E administration.

- Atherosclerosis. 2005 Oct;182(2):259-65. Epub 2005 Apr 14. PubMed PMID: 16159598.
37. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*. 2004 Oct;44(4):381-6.
38. Bártíková H, Skálová L, Valentová K, Matoušková P, Szotáková B, Martin J, et al. Effect of oral administration of green tea extract in various dosage schemes on oxidative stress status of mice in vivo. *Acta Pharm*. 2015 Mar;65(1):65-73. doi: 10.1515/acph-2015-0007.
39. Murakami A. Dose-dependent functionality and toxicity of green tea polyphenols in experimental rodents. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Sep 1;557:3-10. doi: 10.1016/j.abb.2014.04.018.
40. Maiti S, Chatterjee AK. Differential response of cellular antioxidant mechanism of liver and kidney to arsenic exposure and its relation to dietary protein deficiency. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2000 Jun 1;8(4):227-235. PubMed PMID: 10996542.
41. Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011 Sep;50(5):600-13. PubMed PMID: 22330705; PubMed Central PMCID:PMC3189662.
42. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008 Mar;22(3):659-61.

Anexo:

Parecer Consubstanciado

---

**Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UVV)****Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UVV)****PARECER CONSUBSTANCIADO****Parecer Nº. 299/2013- Protocolo de Pesquisa**

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira

**Efeitos da suplementação oral com produtos "Herbalife" em camundongos.**Situação: **APROVADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Vila Velha (CEUA- UVV) analisou na sessão do dia 19 de março de 2014 o processo nº 299- 2013, referente o projeto: "Efeitos da suplementação oral com produtos "Herbalife" em camundongos", tendo como responsável Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira sendo considerado adequado e satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem esta comissão.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais das Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Vila Velha.

Solicita-se ao (à) pesquisador (a) o envio a esta CEUA, de relatórios parciais sempre quando houver alguma alteração no projeto, bem como o relatório final enviado em PDF.

Vila Velha, 19 de março de 2014.

**Prof. Dr. João Luiz Rossi Junior**  
Coordenador da CEUA-UVV.