



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

WANDERLEI ONOFRE SCHMITZ

**ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E QUIMIOPROTETORA  
DO EXTRATO ETANÓLICO DE CHÁ VERDE  
(*Camellia sinensis*)**

---

Londrina  
2005

**WANDERLEI ONOFRE SCHMITZ**

**ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E QUIMIOPROTETORA  
DO EXTRATO ETANÓLICO DE CHÁ VERDE**

*(Camellia sinensis)*

**EFEITO QUIMIOPROTETOR DO CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*)**

**INDUZIDO PELO AGENTE LIPOPEROXIDANTE**

**DIETILNITROSAMINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Halha O. Saridakis

Londrina  
2005

**WANDERLEI ONOFRE SCHMITZ**

**ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E QUIMIOPROTETORA  
DO EXTRATO ETANÓLICO DE CHÁ VERDE  
(*Camellia sinensis*)**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Maria B. Martinelli de Oliveira

---

Rubens Cecchini

---

Halha Ostrensky Saridakis

Londrina, 25 de maio de 2005.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação a minha mãe Hilda Onofre Schmitz, *in memória*. Muitas saudades.

## AGRADECIMENTOS

A Dra. Halha que aceitou ser minha orientadora apesar de todos os seus compromissos e preocupações. Aceitou assim mais este compromisso com um sorriso e palavras amigas. Muitíssimo abrigado.

Ao professor Rubens que colaborou muito cedendo seu laboratório e seus vastos conhecimentos, além de ter muita paciência com este “intruso” entre seus orientandos.

Ao professor Dirceu que com sua compreensão dos erros humanos, soube entender as limitações e qualidades deste aluno.

A professora Dalva que teve paciência com este aluno que com certeza deve ter dado muito trabalho e ocupado os rotas vapores do laboratório de química por muito tempo, para o preparo do extrato vegetal que foi fundamental para o início da pesquisa.

A minha esposa, pois sem sua inestimável ajuda não seria possível este sonho. E com certeza enquanto existir a vida seguiremos juntos.

Aos colegas do Mestrado, com quem juntos trilhamos este caminho de novidades e expectativas, às vezes com algumas tristezas, mas sempre com o coração aberto e uma palavra amiga para amenizar os desastres no laboratório.

Em especial ao Wander que sempre esteve por perto para contar as novidades e rirmos muito enquanto esperávamos nossa senha no RU. Muito sucesso no seu doutorado, amigo.

A Andréia minha amiga do peito que sempre esteve presente em todos os momentos deste mestrado, onde rimos e choramos muito, mas no final tudo dá certo. Não se preocupe!

Ao Emerson meu padrinho de casamento e amigo de longa data, basta dizer que moramos juntos por três anos no quart hotel, sofrimento dispensável, mas irremediável. Obrigado pelas cepas de MRSA E MSSA.

Um grande abraço à fisioterapeuta mais querida do mestrado, a Flavinha que compartilhava nossas horas de espera no RU, obrigado pela dica da UNIGRAN, estou lhe devendo esta!!

Quero agradecer aos funcionários: Claci “Sandra”, Zui, Pedrinho que colaboraram com o bom andamento das minhas pesquisas sei que sem o apoio deles não teria conseguido chegar lá. Um abraço para os amigos:

Agradeço também o Alexandre que ajudou muito com meus ratinhos, desculpe as mordidas, mas faz parte da profissão. Um abraço Xandão.

As pós-graduandas: Ariane, Ligiane e Eliana com quem compartilhamos o laboratório.

Não posso me esquecer das queridas estagiárias que freqüentavam o laboratório, algumas só de passeio (brincadeirinha!): Dielen, Érika, Giselle; Alessandra. Um grande abraço para todas, não deixem a Ritinha saber disso!!!

E a todos que de alguma forma colaboraram com este trabalho, mesmo sem saber ou até sem querer!

**SCHMITZ, Wanderlei Onofre. Atividades antimicrobiana e quimioprotetora do extrato etanólico de chá verde (*Camellia sinensis*). 2005. 58f. Dissertação (Mestrado em Patologia experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.**

## RESUMO

O chá verde é uma bebida consumida mundialmente, sobretudo em países asiáticos. Suas propriedades biológicas têm sido amplamente estudadas. As catequinas presentes no chá demonstram atividades: antioxidante, antiinflamatória, quimioprotetora, anticarcinogênica e antimicrobiana. A classe das catequinas inclui a: epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), galato-3-epicatequina (ECG), galato-3-epigalocatequina (EGCG) (Figura 1). As catequinas correspondem a aproximadamente 26,7% dos compostos derivados das folhas secas do chá verde, dos quais 11% são formados por EGCG, 10% de EGC, 2% de ECG, 2,5% EC e 15% de polifenóis não identificados. O objetivo deste trabalho foi: 1) determinar a atividade antimicrobiana do extrato de chá verde (ECV) e 2) avaliar o efeito quimioprotetor do extrato do ECV, em relação à lipoperoxidação e citotoxicidade provocada pela Dietilnitrosamina (DEN) em fígado de rato bem como verificar a presença de toxicidade. Para avaliar a atividade antimicrobiana, utilizaram-se inicialmente cepas padrão: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 produtora de  $\beta$ -lactamase, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os resultados mais promissores obtidos nesta etapa foram com a cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Os estudos subseqüentes com 22 cepas hospitalares de *S. aureus* sendo 11 MRSA e 11 MSSA, indicaram que o ECV apresenta isoladamente atividade bacteriostática, mas quando associado à oxacilina (6  $\mu$ g/mL) apresenta atividade bactericida. A DEN é um reconhecido cancerígeno que depende de ativação do sistema metabolizador de drogas do fígado (MFO) para exercer sua ação carcinogênica e tóxica, especialmente no fígado, rim e trato digestório alto. O desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas na hepatocarcinogênese química consiste em uma etapa obrigatória, assim como a proliferação celular que neste órgão ocorre, por exemplo, após a perda de células decorrente da necrose, sendo esta etapa de necrose necessária na carcinogênese hepática. Foram utilizados ratos machos Wistar expostos a doses únicas de 200 mg/Kg de DEN via intra-peritoneal e dose única de 120 mg/Kg de ECV por via oral, em diferentes momentos experimentais. Após 24 horas em relação ao tratamento com DEN, os animais foram sacrificados sendo avaliado: 1) os níveis de AST/ALT no plasma, 2) a lipoperoxidação por quantificação de TBARS e FOX no fígado, 3) a ocorrência de necrose e hemorragia hepática através do estudo histopatológico. A ação quimioprotetora e a diminuição da lipoperoxidação foram comprovadas pela redução dos valores das transaminases, TBARS, FOX e diminuição da intensidade da necrose hepática quando o ECV foi administrado previamente a DEN. Com esses resultados pode-se dizer que o ECV apresentou atividade antioxidante e quimioprotetora neste modelo experimental.

**Palavras-chave:** Chá verde – Aspectos da saúde. Produtos de ação antimicrobiana. Patologia experimental.

**SCHMITZ, Wanderlei Onofre. Atividades antimicrobiana e quimioprotetora do extrato etanólico de chá verde (*Camellia sinensis*). 2005. 58f. Dissertação (Mestrado em Patologia experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.**

### **ABSTRACT**

Green tea is a beverage consumed worldwide, especially in Asian countries. Biological properties have been widely studied. The catechins present in tea show activities: antioxidant, anti-inflammatory, chemopreventative, anticarcinogenic and antimicrobial. The class of catechins include: epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epigallocatechin-3-epicatechin (ECG), epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (Figure 1). Catechins make up approximately 26.7% of compounds derived from the dried leaves of green tea, of which 11% are made up of EGCG, 10% EGC, ECG 2%, 2.5% EC and 15% polyphenols unidentified. The objective was to: 1) the antimicrobial activity of green tea extract (GTE) and 2) evaluate the effect chemopreventative extract ECV in relation to lipid peroxidation and cytotoxicity caused by diethylnitrosamine (DEN) in rat liver and verify the presence of toxicity. To evaluate the antimicrobial activity were used initially standard strains: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 producing  $\beta$ -lactamase, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The most promising results were obtained in this step with the strain of *S. aureus* ATCC 25923. Subsequent studies with 22 hospital strains of *S. aureus* and 11 MRSA and 11 MSSA, indicated that the VCS has bacteriostatic activity alone, but when g / mL) has bactericidal activity. The DEN is a combined with oxacillin (6 known carcinogen that depends on activation of the drug metabolizing liver (MFO) to exert its toxic and carcinogenic action, especially in the liver, kidney and digestive tract level. The development of preneoplastic lesions in hepatocarcinogenesis in chemistry is a required step, and cellular proliferation in this organ occurs, for example, after the loss of cells due to necrosis, this step is necessary necrosis in liver carcinogenesis. We used male Wistar rats exposed to doses of 200 mg / kg DEN intraperitoneally and a single dose of 120 mg / kg of CVE orally at different times of trial. After 24 hours prior to treatment with DEN, the animals were sacrificed and evaluated: 1) the levels of AST / ALT in plasma, 2) the quantification of lipid peroxidation by TBARS and FOX in the liver, 3) the occurrence of hepatic necrosis and hemorrhage by histopathology. The action chemopreventative and decreased lipid peroxidation, were confirmed by reduction of transaminase, TBARS, FOX and decreasing the intensity of hepatic necrosis when ECV was administered prior to DEN. With these results we can say that the ECV had an antioxidant activity and chemopreventative this experimental model.

**Keywords:** Green tea – Health aspects. Products antimicrobial. Experimental pathology.



## LISTA DE FIGURAS

### ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*)

- Figura 1** – Curva de Crescimento das Amostras 6R e 6S de *S. aureus* na Presença ou Ausência de ECV ..... 31

### EFEITO QUIMIOPROTETOR DO CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*) INDUZIDO PELO AGENTE LIPOPEROXIDANTE DIETILNITROSAMINA

- Figura 1** – Níveis de lipoperoxidação através da quantificação de TBARS em animais intoxicados com DEN e tratados ou não com ECV ..... 49
- Figura 2** – Níveis de lipoperoxidação através da quantificação do Complexo Fe(III)-Xilenol Laranja (FOX) em animais intoxicados com DEN e tratados ou não com ECV ..... 50
- Figura 3** – Estudo histopatológico do tecido hepático dos animais intoxicados com DEN e tratados ou não com ECV Fórmula estrutural característica das catequinas ..... 51

## LISTA DE TABELAS

### ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*)

- Tabela 1** – Concentração Inibitória Mínima do Extrato de Chá Verde para Cepas Bacterianas Padrão ..... 29
- Tabela 2** – Atividade Bacteriostática do ECV sobre Amostras de *S. aureus* MSSA (S) e MRSA (R)..... 30
- Tabela 3** – Efeito da associação de oxacilina (6 µg/mL) com diferentes concentrações de ECV sobre cepas hospitalares de *S. aureus* MRSA..... 32

### EFEITO QUIMIOPROTETOR DO CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*) INDUZIDO PELO AGENTE LIPOPEROXIDANTE DIETILNITROSAMINA

- Tabela 1** – Parâmetros Fisiológicos, Bioquímicos e Histológicos dos Ratos Intoxicados com DEN e Tratados com ECV..... 48

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AAPH** – 2,2-azobis amidinopropano dihidroclorido

**ALT** – Alanina aminotransferase

**AST** – Aspartato aminotransferase

**ATCC** - American type culture collection

**CCl<sub>4</sub>** – Tetracloroeto de carbono

**CHP** – Hidroperóxido de cumeno

**CIM** – Concentração inibitória mínima

**DEN** – Dietilnitrosamina

**EC** – Epicatequina

**ECG** – Galato-3-epicatequina

**ECV** – Extrato de chá verde

**EGC** – Epigalocatequina

**EGCG** – Galato-3-epigalocatequina

**FOX** – Complexo Fe(III)-xilenol laranja

**HE** – Hematoxilina e eosina

**I** – Inibição total

**IP** – Inibição parcial

**MDA** – Malondialdeido

**MHA** – Agar Muller Hinton

**MHC** – Caldo Muller Hinton

**MRSA** – *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina

**MSSA** – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina

**PBP2** – Proteínas ligantes de penicilina

**R** – Resistente

**TBARS** – Ácido tiobarbitúrico

**TSB** – Tryptic soy broth

**UF** – Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

### ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*)

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
2.1 EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHA DE <i>CAMELLIA SINENSIS</i> .....	24
2.2 BACTÉRIAS .....	24
2.2.1 Bactérias padrão .....	24
2.2.2 Bactérias isoladas de pacientes hospitalizados.....	24
2.3 MÉTODOS .....	25
2.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de ECV frente às bactérias padrão e de origem hospitalar .....	25
2.3.2 Efeito antimicrobiano do ECV sobre as amostras de <i>S. aureus</i> de origem hospitalar .....	25
2.3.3 Efeito da associação de ECV com oxacilina 6 µg/mL sobre o crescimento de <i>S. aureus</i> (MRSA) .....	26
2.3.4 Curva de crescimento bacteriano das Amostras 6R e 6S de <i>S. aureus</i> .....	26
<b>3 RESULTADOS</b> .....	27
3.1 DETERMINAÇÃO DA CIM DE ECV FRENTE AS BACTÉRIAS ESTUDADAS .....	27
3.2 A AÇÃO DO ECV SOBRE AS BACTÉRIAS DE ORIGEM HOSPITALAR.....	27
3.3 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ECV COM 6 µg/ML DE OXACILINA FRENTE AS AMOSTRAS DE <i>S. AUREUS</i> MRSA .....	28
3.4 CURVAS DE CRESCIMENTO DAS AMOSTRAS 6R E 6S DE <i>S. AUREUS</i> .....	28
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35

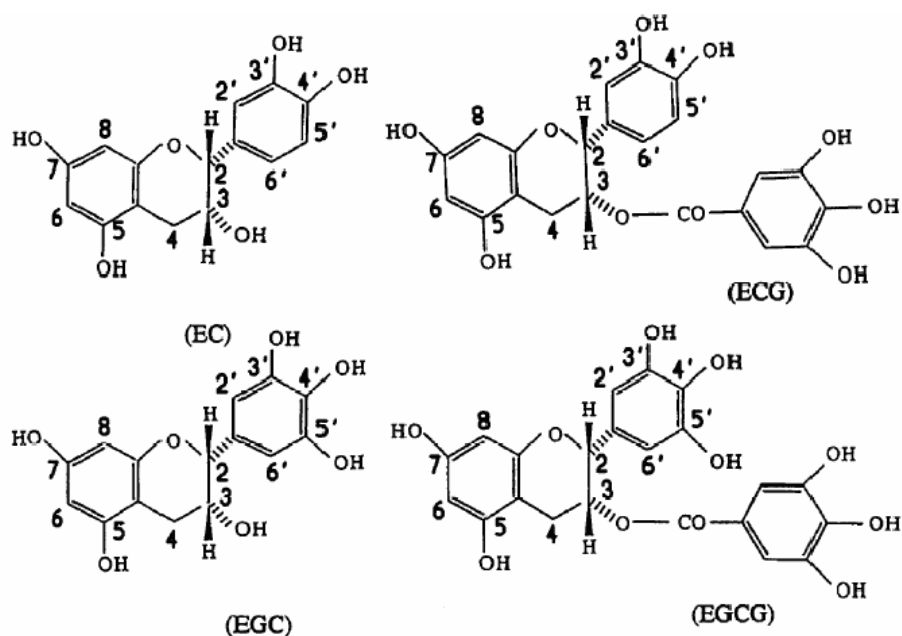
**EFEITO QUIMIOPROTETOR DO CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*) INDUZIDO  
PELO AGENTE LIPOPEROXIDANTE DIETILNITROSAMINA**

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	40
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
2.1 REAGENTES .....	43
2.2 PREPARO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>CAMELLIA SINENSIS</i> .....	43
2.3 ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO .....	43
2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	44
2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA AST E ALT .....	44
2.6 QUANTIFICAÇÃO DE TBARS EM FÍGADO DE RATOS.....	44
2.7 ENSAIO DE FOX (COMPLEXO Fe(III)-XILENOL LARANJA) .....	45
2.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	45
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	46
<b>3 RESULTADOS</b> .....	47
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55

## RESUMO GERAL DA PROPOSTA EXPERIMENTAL

O chá verde é uma bebida consumida mundialmente, sobretudo em países asiáticos. Suas propriedades biológicas têm sido amplamente estudadas. As catequinas presentes no chá demonstram atividades: antioxidante, antiinflamatória, quimioprotetora, anticarcinogênica e antimicrobiana. A classe das catequinas inclui a: epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), galato-3-epicatequina (ECG), galato-3-epigallocatequina (EGCG) (Figura 1). As catequinas correspondem a aproximadamente 26,7% dos compostos derivados das folhas secas do chá verde, dos quais 11% são formados por EGCG, 10% de EGC, 2% de ECG, 2,5% EC e 15% de polifenóis não identificados. O objetivo deste trabalho foi: 1) determinar a atividade antimicrobiana do extrato de chá verde (ECV) e 2) avaliar o efeito quimioprotetor do extrato do ECV, em relação à lipoperoxidação e citotoxicidade provocada pela Dietilnitrosamina (DEN) em fígado de rato bem como verificar a presença de toxicidade. Para avaliar a atividade antimicrobiana, utilizaram-se inicialmente cepas padrão: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 produtora de  $\beta$ -lactamase, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os resultados mais promissores obtidos nesta etapa foram com a cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Os estudos subseqüentes com 22 cepas hospitalares de *S. aureus* sendo 11 MRSA e 11 MSSA, indicaram que o ECV apresenta isoladamente atividade bacteriostática, mas quando associado à oxacilina (6  $\mu$ g/mL) apresenta atividade bactericida. A DEN é um reconhecido cancerígeno que depende de ativação do sistema metabolizador de drogas do fígado (MFO) para exercer sua ação carcinogênica e tóxica, especialmente no fígado, rim e trato digestório alto. O desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas na hepatocarcinogênese química consiste em uma etapa obrigatória, assim como a proliferação celular que neste órgão ocorre, por exemplo, após a perda de células decorrente da necrose, sendo esta etapa de necrose necessária na carcinogênese hepática. Foram utilizados ratos machos Wistar expostos a doses únicas de 200 mg/Kg de DEN via intra-peritoneal e dose única de 120 mg/Kg de ECV por via oral, em diferentes momentos experimentais. Após 24 horas em relação ao tratamento com DEN, os animais foram sacrificados sendo avaliado: 1) os níveis de AST/ALT no plasma, 2) a lipoperoxidação por quantificação de TBARS e FOX no fígado, 3) a ocorrência de necrose e hemorragia hepática através do estudo histopatológico. A ação quimioprotetora e a diminuição da lipoperoxidação foram comprovadas pela redução dos valores das transaminases, TBARS, FOX e diminuição da intensidade da necrose hepática quando o ECV

foi administrado previamente a DEN. Com esses resultados pode-se dizer que o ECV apresentou atividade antioxidante e quimioprotetora neste modelo experimental.



**Figura 1** – Fórmulas estruturais das Catequinas

**Fonte:** ZHANG, A et al. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isômeros on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life Sciences*, v. 61, p. 383-94, 1997.

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*)

### MATERIAL E MÉTODOS

**Extrato Etanólico de Folha de *Camellia sinensis*** - Preparado de 300 gramas utilizando a parte seca das folhas da *Camellia sinensis* fornecida pela Quimer Ervas Medicinais. Após a extração com Álcool Etilico Absoluto, o produto foi filtrado em papel de filtro e concentrado em rota vapor com temperatura de aproximadamente 40 °C.

**Bactérias Padrão** - Foram utilizadas bactérias padrão originárias da American Type Culture Collection (ATCC) - *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 produtora de  $\beta$ -lactamase, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**Bactérias Isoladas de Pacientes Hospitalizados** - 22 cepas de *Staphylococcus aureus*, 11 sensíveis (MSSA) e 11 resistentes (MRSA) a oxacilina As amostras foram isoladas de pacientes provenientes do Hospital Universitário do Norte do Paraná (HUNP) de Londrina.

**Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ECV Frente às Bactérias Padrão e de Origem Hospitalar** - Diferentes concentrações de ECV foram adicionadas ao Ágar Muller Hinton (MHA), vertidas em placas de Petri estéreis (técnica de Pour-plate). Aliquotas de 10  $\mu$ l de diferentes diluições bacterianas ( $10^4$  e  $10^3$  UFC/mL) foram dispensadas, sobre a superfície do meio + ECV A leitura foi realizada após incubação a 36 °C por 24 horas, comparando com o controle (crescimento em MHA sem ECV).

**Efeito Antimicrobiano do ECV Sobre as Amostras de *S. aureus* de Origem Hospitalar** - Para definir a atividade do ECV como bacteriostática ou bactericida, as bactérias foram inoculadas em MHC com ECV. Após incubação a 36°C por 18-24 horas, as culturas foram repicadas para placas de MHA sem ECV e a leitura de crescimento, ou não, foi realizada após condições de incubação iguais às já citadas.

**Efeito da Associação de ECV com Oxacilina 6  $\mu$ g/mL Sobre o Crescimento de *S. aureus* (MRSA)** - As amostras de MRSA foram cultivadas em MHC acrescido de oxacilina e ECV,



após 24 horas a 36°C, foram plaqueadas em MHA e foi verificada a presença ou não de crescimento.

**Curva de Crescimento Bacteriano** - Com as cepas de *S. aureus* 6S (MSSA) e 6R (MRSA) foram realizadas curvas de crescimento, em presença e na ausência de ECV. O inóculo foi de  $10^5$  UFC/mL, e as bactérias foram cultivadas a 36°C com agitação. Foram tomadas alíquotas no tempo zero (T<sub>0</sub>), 2 (T<sub>2</sub>), 4 (T<sub>4</sub>), 6 (T<sub>6</sub>), 12 (T<sub>12</sub>) e 24 (T<sub>24</sub>) horas.

## **EFEITO QUIMIOPROTETOR DO CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*) INDUZIDO PELO AGENTE LIPOPEROXIDANTE DIETILNITROSAMINA**

### **MATERIAL E MÉTODOS**

**Reagentes** - folhas secas de *C. sinensis* Quimer Ervas Medicinais, Cloreto férrico 1mM (FeCl<sub>3</sub>), Dietilnitrosamina (DEN), ácido ascórbico 1Mm, Sulfeto de Ferro 1mM, 3,3'- bis [N,N-di (carboximetil) amino-metil]-o-cresol sulfoneftaleína (xilenol laranja), da Sigma Chemical Company, USA. Formaldeído, ácido sulfúrico, metanol HPLC e ácido tioderivado da malonilurea (TBA 1%), da Merck. Kit Transaminases (AST e ALT) da Laborlab.

**Animais e Ambiente de Experimentação** - Ratos Wistar machos, pesando de 200 a 250g, foram mantidos em gaiolas contendo seis (6) animais. A ração granulada e água foram oferecidas “*ad libitum*”. A temperatura ambiente, a umidade relativa e um baixo nível de ruído foram mantidos os mais estáveis possíveis.

**Delineamento Experimental** - os animais, foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas coletivas e divididos em 5 grupos. Grupo 1 - controle; Grupo 2 – inoculado DEN; Grupo 3 – tratado com ECV; Grupo 4 – tratado com ECV 3 horas antes a DEN e Grupo 5 – tratado com ECV 12 horas após a DEN. Os animais foram inoculados com doses únicas de 200 mg/Kg de DEN via intra peritoneal (i.p.) e/ou doses únicas de 120 mg/Kg de ECV de via oral (v.o.), sacrificados 24 horas após inoculação da DEN. Foram retirados fragmentos do fígado, que foram congelados em nitrogênio líquido para análises posteriores, além de soro para dosagem das transaminases.

**Determinação da Atividade da AST e ALT** - O soro foi colhido e refrigerado para subsequente dosagem de AST e ALT, utilizando-se método colorimétrico para transaminases, padronizado pela Laborlab Sistemas Diagnósticos Ltda.

**Quantificação de TBARS em Fígado de Ratos** - Um mL do homogenato do fígado foi misturado a 0,2 mL de água destilada, 1 mL de TCA (28%) e 1 mL de TBA (1% em NaOH 50 mM). A reação de lipoperoxidação foi forçada por ferro (1 mM) e ácido ascórbico (1 mM). Após adição dos componentes os tubos foram agitados, incubados a 95°C por 15 min., posteriormente foram colocados em banho de gelo e, acrescentados 2,0 mL de n-butanol,

agitados vigorosamente por 40 seg. e submetidos à centrifugação de 3.000g por 20 min. extração foi realizada pela adição de butanol. A leitura da intensidade de cor da fase orgânica foi feita em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 535 e 572 nm.

**Ensaio de FOX (Complexo Fe(III)-Xilenol Laranja)** - O fígado foi homogeneizado na proporção de 100 mg para 10 mL de metanol e centrifugado. Após centrifugação os tubos foram preparados com: 500 µL de FeSO<sub>4</sub> (1 mM), 200 µL de H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> (0,25 M), 200 µL de xilenol (1 mM), 1000 µL de água e 100 µL de amostra. Foram incubados 24 horas e quantificados em espectrofotômetro em 560 nm. Após a leitura foi adicionado 5 µL de hidroperóxido de cumeno (0,19%), seguido de incubação e uma nova leitura. Os níveis de hidroperóxidos lipídicos foram expressos em equivalentes de hidroperóxido de cumeno em nmoles CHP/g fígado.

**Análise Histológica** - Fragmentos hepáticos foram fixados em formalina tamponada 10%, processados e corados por hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram examinadas e a quantificação de eventual hemorragia e/ou necrose foi feita através da observação de 10 campos, seguinte código: 0 (ausente), 1+ (discreta), 2+ (moderada), 3+ (acentuada).

**Análise Estatística** - Para avaliar o efeito da DEN e do ECV sobre os diferentes grupos experimentais foi utilizada a Análise de Variância de ANOVA, e para comparação entre as médias foi utilizado o Teste de Tukey. Foram considerados como estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E CONCLUSÕES

- 1) O ECV apresentou atividade bacteriostática em diferentes concentrações para diferentes microrganismos. *S. aureus* foi a espécie a menor concentração de ECV.
- 2) O ECV associado à oxacilina apresentou efeito bactericida sugerindo sua atividade como inibidor de  $\beta$ -lactamase.
- 3) Os animais tratados com ECV apresentaram redução significativa dos valores de ALT e uma tendência de queda dos valores de AST traduzindo sua quimioproteção.
- 4) Valores obtidos na quantificação do TBARS dos grupos tratados com ECV traduz uma diminuição da lipoperoxidação das membranas.
- 5) A quantificação do FOX dos grupos tratados com ECV, são condizentes com os resultados do TBARS, bem como com os obtidos na avaliação histopatológica.
- 6) Os resultados do histopatológico confirmam os resultados encontrados na dosagem de TBARS e FOX.

O extrato vegetal do chá verde pode ser um composto promissor no tratamento e na prevenção de infecções bacterianas. Esperamos que no futuro possa-se determinar um possível emprego deste composto como adjuvante no tratamento de infecções bacterianas, principalmente as causadas por *S. aureus* MRSA. Além disso, o ECV é capaz de diminuir a citotoxicidade do DEN, diminuindo a lesão celular e a lipoperoxidação da membrana da célula hepática. Estes resultados indicam que o chá verde pode agir como antioxidante e quimioprotetor nas condições testadas. Tendo em vista os resultados obtidos e o possível uso do chá como um adjuvante na medicina moderna, outros estudos são necessários para entendermos claramente as propriedades químicas, farmacológicas e os mecanismos pelos qual o chá verde pode agir como antibacteriano, quimioprotetor e antioxidante no nosso organismo.

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*)

Wanderlei Schimitz<sup>1</sup>, Rubens Cecchini<sup>2</sup>, Dirceu Estevão<sup>2</sup>, Dalva Trevisan Ferreira<sup>5</sup>, Emerson D. Cavassin<sup>4</sup>, Alexandre Saito<sup>2</sup>, Halha O. Saridakis<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Mestrando Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

<sup>4</sup> Hospital Universitário de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

<sup>5</sup> Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

### RESUMO

O chá verde é uma bebida mundialmente consumida, sobretudo em países asiáticos. Suas propriedades biológicas têm sido amplamente estudadas, graças a seus componentes flavonóides e catequinas. Estes compostos apresentam atividades: antioxidante, quimioprotetora, antiinflamatória, anticarcinogênica e antimicrobiana. Por outro lado, existem relatos de efeitos indesejáveis quando o chá é consumido em excesso. Neste trabalho, após a avaliação da toxicidade do extrato, foram realizados testes para determinar sua atividade antimicrobiana, utilizando, inicialmente, cepas padrão: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 produtora de  $\beta$ -lactamase, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os resultados mais promissores nessa etapa foram obtidos com *S. aureus*, espécie utilizada para estudos posteriores quando foram avaliadas 22 cepas hospitalares sendo 11 MRSA e 11 MSSA. Nossos resultados indicam que o ECV apresenta atividade bacteriostática isoladamente e bactericida, quando associado à oxacilina (6  $\mu$ g/mL).

**Palavras-chave:** *Camellia sinensis*. Chá verde. Flavonóides. Catequinas. Ação antibacteriana.

## ABSTRACT

Green tea is a beverage world wide consumed, especially in oriental countries. It's presents biological properties such as chemoprotection, antiinflammatory, anti-carcinogenic, antimicrobial and others. Undesirable effects have also been described. Based on results obtained in toxicity tests (low reversible toxic effect), in this study we analyzed the antimicrobial activity of green tea ethanolic extract (GTE) for reference strains Hamilton-Miller (2001) and 22 *Staphylococcus aureus* hospital isolates. Away those, 11 were MRSA and 11 MSSA. On results than that ECV in the used concentrations, presents a bacteriostatic effect and when associated to oxacillin (6 µg/mL) a bacteriocidal effect was observed.

**Keywords:** Camellia sinensis. Green Tea. Flavonoids. Catechins. Bacteriocidal.

## 1 INTRODUÇÃO

A bebida conhecida como "chá" corresponde à infusão de folhas do arbusto *Camellia sinensis* L. Na forma de chá preto é consumida mundialmente, embora nos países orientais o chá verde seja mais utilizado. É também na forma de chá verde que a maioria dos estudos sobre suas atividades biológicas é realizada.

Dentre suas propriedades farmacológicas são citadas: antioxidantes, quimioprotetora, anticancerígena, antiinflamatória, estimulante imunológico, antiviral e antibacteriana, além de outras (CATURLA et al., 2003; JUN et al., 2002; HAMILTON-MILLER, 2001; TODA et al., 1989).

Essas propriedades terapêuticas estão diretamente relacionadas com as estruturas químicas de catequinas e flavonóides, compostos bioativos mais importantes do chá (COOK; SAMMAN, 1996; ANGHILERI; THOVVENOT, 2000).

Entre as catequinas, são encontradas: epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), galato-3-epicatequina (ECG), galato-3-epigalocatequina (EGCG) e flavonóides (kempferol, quercetina e miricetina). Além desses, outros componentes descritos são: xantinas (caféina, teofilina e teobromina), teoflavinas (teoflavina, teoflavina-3-galato, teoflavina-3'-galato, teoflavina-3,3'-galato), taninos e saponinas (teosaponinas). As catequinas correspondem a aproximadamente 25 % dos compostos derivados das folhas secas do chá verde (RICE-EVANS et al., 1996; ZUANAZZI in SIMÕES et al., 2002; MELLO; SANTOS in SIMÕES et al., 2002). A atividade antibacteriana do chá foi reconhecida aproximadamente há cem anos. Desde então, vários mecanismos tem sido propostos para explicar essa atividade: inibição de síntese protéica da PBP2, alterações durante a divisão da parede bacteriana por inibição das autolisinas e lesão de membrana citoplasmática através de radicais livres (YAM et al., 1998, HAMILTON-MILLER; SHAH, 1999; ARAKAWA et al., 2004).

Segundo Stapleton e Taylor (2002) existe uma relação direta entre a estrutura das catequinas e sua atividade antibacteriana. Assim, catequinas com dihidroxilação nas posições 2'-4'- ou 2'-6' do anel B e dihidroxilação nas posições 5-7 do anel A, apresentam maior atividade antibacteriana contra *S. aureus* MRSA.

Com o objetivo de esclarecer a atividade antibacteriana do chá vários estudos têm sido realizados. Em 1989, Toda et al., descreveram a ação bactericida do chá verde contra *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteridis*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, e *Vibrio cholerae*. Kubo et al.

(1992) estudando os 10 componentes voláteis mais abundantes do chá verde, encontraram atividade inibitória de alguns compostos isoladamente e ação sinérgica entre outros, para as bactérias estudadas, dentre elas *Streptococcus mutans*, *Propionibacterium acne*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*. Foi ainda descrita atividade antibacteriana da fração EGCG frente a *E. coli* enterohemorrágica (0157:H7) (OSAWA et al., 1999).

Os autores Otake et al. (1991), observaram que a mistura das catequinas encontradas no extrato do chá verde pode evitar a aderência de *S. mutans* aos dentes, sugerindo seu uso na prevenção de cáries.

Yee et al., (2002) verificaram, em pacientes que consumiam grandes quantidades de chá verde, menores taxas de infecção por *Helicobacter pylori*, quando comparados com pacientes que consomem pouco ou nenhum chá. Takabayashi et al. (2004) administraram 20 mg/mL de chá verde diariamente, durante 10 dias a cobaias infectados com *H. pylori*. Após esse tempo, as amostras cultivadas dos estomago, mostraram que o número de UFC diminuiu significativamente após o tratamento, sugerindo efeito antibacteriano contra *H. pylori*.

Vários componentes do chá apresentam atividade contra *S. aureus*, especialmente *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Em 1999, Shiota et al. demonstraram ação sinérgica do chá verde com a oxacilina em *S. aureus* MRSA e em outras bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases, sugerindo a inibição da produção dessas enzimas. Hamilton-Miller e Shah (2000) isolaram do chá um novo princípio ativo, denominado composto "P", com propriedade antibacteriana para *S. aureus* MRSA. Este composto foi identificado como galato-3-epicatequina (ECG) e apresenta ação sinérgica com oxacilina frente a cepas de MRSA.

Lee et al. (2003) realizaram um estudo com bactérias patogênicas incluindo *S. aureus* MRSA, *S. aureus* resistente a ciprofloxacina, *Enterococcus* resistente a vancomicina e *P. aeruginosa* resistente a ciprofloxacina e obtiveram atividade antibacteriana em concentrações de 1,6 mg/mL para todas as bactérias testadas. Os resultados obtidos por diferentes autores sugerem que a ação antibacteriana do chá verde pode ser eficiente, no entanto, mais estudos são necessários para definir sua aplicação segura como fármaco e/ou como inibidor da atividade enzimática de  $\beta$ -lactamases e outras enzimas responsáveis pela resistência a antimicrobianos. Desta forma o objetivo deste trabalho foi o de verificar se o ECV tem atividade modulatória da resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, utilizando-se como modelo a oxacilina, em cepas isoladas de pacientes provenientes do Hospital Universitário do Norte do Paraná (HUNPR) de Londrina.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE *CAMELLIA SINENSIS* (ECV).

Foi preparado um extrato etanólico de 300 g. de folhas secas de *C. sinensis* adquiridas da Quimer Ervas Mediciniais. Após a extração com etanol absoluto, o produto foi filtrado em papel de filtro e concentrado até secura em rota vapor com temperatura de aproximadamente 40 °C e posteriormente utilizado em diferentes concentrações nos testes empregados.

### 2.2 BACTÉRIAS

#### 2.2.1 Bactérias padrão.

*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 produtora de  $\beta$ -lactamase, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

#### 2.2.2 Bactérias isoladas de pacientes hospitalizados.

Foram selecionadas 22 cepas de *Staphylococcus aureus*, das quais 11 eram sensíveis (MSSA) e outras 11 resistentes (MRSA) a oxacilina, isoladas de pacientes provenientes do Hospital Universitário do Norte do Paraná (HUNPR) de Londrina. A concentração inibitória mínima determinada para oxacilina foi 6  $\mu\text{g/mL}$ .

## 2.3 MÉTODOS

### 2.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de ECV frente às bactérias padrão e de origem hospitalar.

Diferentes concentrações de ECV (1000 a 5000 µg/mL de meio) foram adicionadas ao ágar Muller Hinton (MHA), fundido e resfriado a 40°C e as misturas foram vertidas em placas de Petri estéreis.(técnica de pour-plate).

A suspensão do crescimento bacteriano (fase log) foi obtida após 3 horas a 36°C em caldo Muller Hinton (MHC), a amostra foi diluída por comparação com a escala de Macfarland ( $10^8$  UFC/mL) e diluições seriadas foram realizadas a partir desta amostra. Aliquotas de 10 µl das diferentes diluições fornecidas foram dispensadas sobre a superfície do meio + ECV, de forma a obter número de colônias passível de contagem.

A leitura foi realizada após incubação a 36 °C por 24 horas, comparando o número de UFC das placas contendo MHA acrescido de diferentes concentrações de ECV com placas controle (crescimento em MHA sem ECV).

### 2.3.2 Efeito antimicrobiano do ECV sobre amostras de *S. aureus* de origem hospitalar.

Para definir se a atividade antibacteriana do ECV poderia ser caracterizada como bacteriostática ou bactericida, as bactérias ( $10^4$  UFC/mL) foram inoculadas em MHC contendo ECV em diferentes concentrações. Após incubação a 36°C por 18-24 horas, as culturas foram repicadas para placas de MHA sem ECV e a leitura de crescimento, ou não, foi realizada após condições de incubação iguais às já citadas.

### **2.3.3 Efeito da associação de ECV com oxacilina 6 µg/mL sobre o crescimento de *S. aureus* (MRSA)**

As 11 amostras de MRSA foram cultivadas em MHC, acrescido de 6 µg de oxacilina/mL de meio e duas concentrações de ECV, 1000 e 1500 mg/mL, e incubadas por 24 horas a 36°C . Após esse tempo, foram plaqueadas em MHA e reincubadas por 24 horas a 36°C quando foi verificada a presença ou não de crescimento.

### **2.3.4 Curva de crescimento bacteriano.**

Com as cepas de *S. aureus* 6S (MSSA) e 6R (MRSA) foram realizadas curvas de crescimento, em presença e na ausência de ECV. Foi utilizado o caldo TSB (Tryptic Soy Broth) (149 mL em erlenmayer) com e sem ECV. O inóculo foi obtido por diluição de cultura *over-night* de cada cepa, para obter um inóculo de  $10^5$  UFC/mL. Um mL dessa diluição foi transferido ao erlenmayer contendo TSB e as bactérias foram cultivadas a 36°C com agitação.

Foram tomadas alíquotas no tempo zero ( $T_0$ ) e de duas em duas horas, até  $T_{12}$ . Nova alíquota foi retirada após 24 horas.

A determinação da contagem total de bactérias em UFC foi realizada em ágar TSA (*Tryptic Soy Agar*) e por turvação em espectrofotômetro a 600 nm, nos mesmos tempos.

### 3 RESULTADOS

Os testes de toxicidade utilizando o ECV foi realizado em ratos tratados com dose única de ECV (120 mg/Kg) via oral. Sendo possível avaliar a toxicidade hepática do chá. Para avaliar a extensão do dano celular dosou-se: 1) os níveis de AST/ALT no plasma, 2) a lipoperoxidação por quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBARS e o ensaio de FOX (complexo Fe(III)-xilenol laranja) no fígado, 3) a ocorrência de alterações morfológicas das células hepáticas através do estudo histopatológico. O ECV apresenta baixa toxicidade na avaliação hepática dos animais (dados não apresentados).

#### 3.1 DETERMINAÇÃO DA CIM DE ECV FRENTE AS BACTÉRIAS ESTUDADAS.

A Tabela 1 mostra que o crescimento de todas as bactérias padrão foram totalmente inibidas na concentração de 4000 µg/mL. Dentre as bactérias testadas a exceção foi *S. aureus* que teve seu crescimento inibido na presença de 1000 µg/mL. Ambas as cepas de *K. pneumoniae* tiveram seu crescimento totalmente inibido com 3000 µg/mL. *E. faecalis* e *E. coli* só foram inibidas com 4000 µg/mL.

Analisando os resultados obtidos na Tabela 2, com as cepas de MRSA e MSSA, verificamos que as 22 amostras tiveram seu crescimento inibido pelo ECV na concentração de 1500 µg/mL. Observamos que na concentração de 750 µg/mL as cepas MRSA foram inibidas total ou parcial, já todas as cepas MSSA foram resistentes ao ECV.

#### 3.2 AÇÃO DO ECV SOBRE AS BACTÉRIAS DE ORIGEM HOSPITALAR.

O ECV apresentou atividade bacteriostática, uma vez que as amostras de *S. aureus* MRSA ( $10^4$  UFC/mL) foram cultivadas em MHC com ECV, não apresentavam crescimento bacteriano. Quando alíquotas destas amostras de cultura eram transferidas para MHA sem ECV apresentaram crescimento. No entanto, quando as mesmas foram repicadas para MHA contendo ECV, a inibição do crescimento permaneceu. Os resultados confirmaram

que a ação do ECV isoladamente é bacteriostática, pois inibia o crescimento das bactérias em caldo, mas ao serem plaqueadas em MHA sem a presença do extrato, elas voltavam a crescer. (resultados não apresentados).

### **3.3 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ECV COM 6 µG/ML DE OXACILINA FRENTE ÀS AMOSTRAS DE *S. AUREUS* MRSA**

Com a finalidade de avaliar a atividade de modulação da resistência bacteriana a  $\beta$ -lactâmicos, foram realizados experimentos na presença de uma concentração fixa de oxacilina (6 µg/mL) e de ECV em concentrações variáveis. Na concentração de 1000 µg/mL de ECV em associação com 6 µg/mL de oxacilina foi observada a reversão da resistência em 4 cepas e sete parcialmente, enquanto frente à concentração de 1500 µg de ECV/mL, 9 cepas das 11 R foram totalmente inibidas e duas parcialmente (Tabela 3).

### **3.4 CURVAS DE CRESCIMENTO**

As curvas de crescimento comprovam o efeito bacteriostático, uma vez que a partir do T<sub>4</sub> em presença de ECV ambas as cepas permaneceram com contagens viáveis bastante próximas, na potência 10<sup>5</sup>, até após 24 horas. Já nos controles, sem ECV, a contagem após 24 horas atingiu contagens de até 10<sup>15</sup> UFC/mL (Figura 1).

**Tabela 1** – Concentração Inibitória Mínima do Extrato de Chá Verde frente a Cepas Padrão de Bactérias

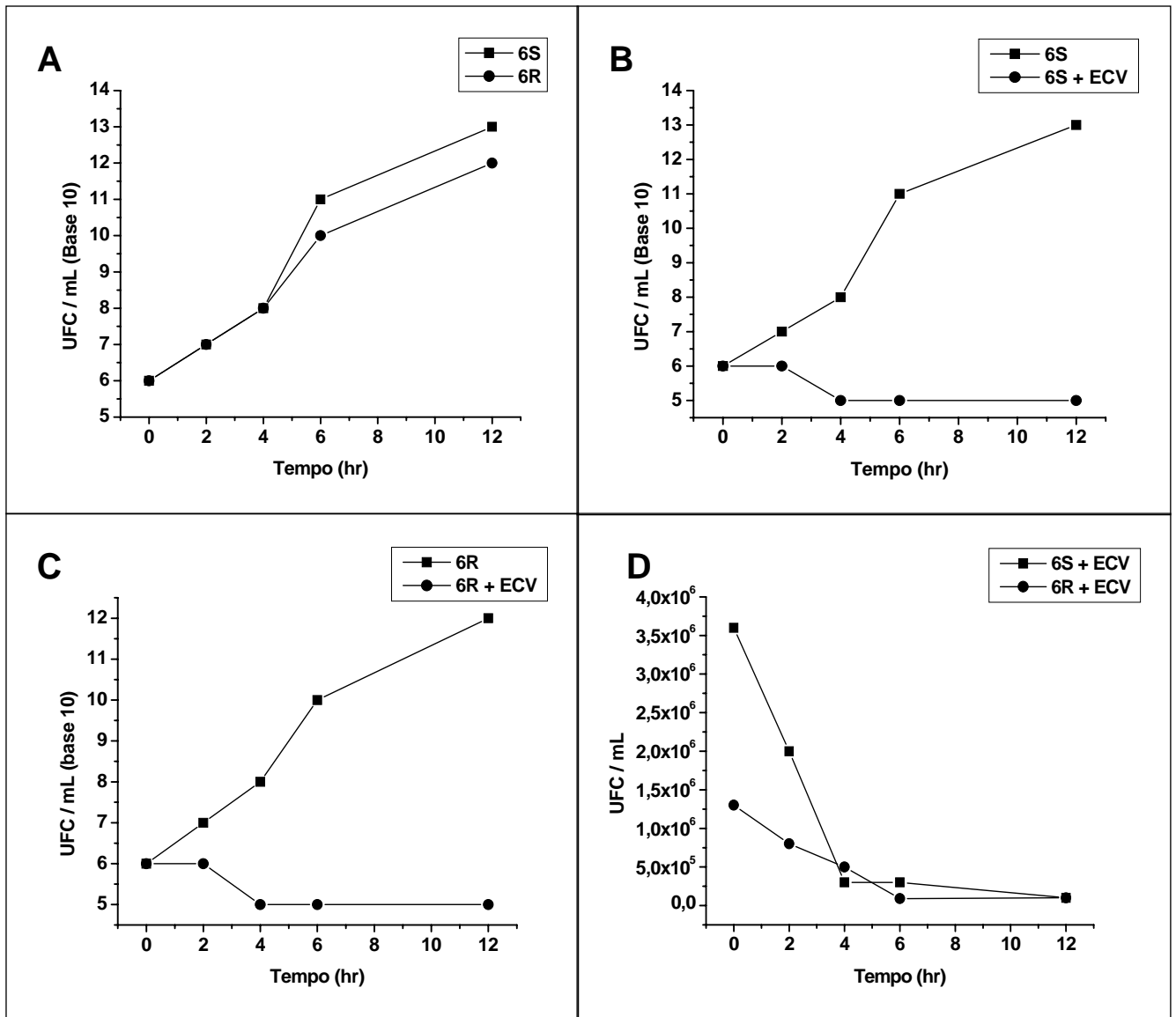
ECV Bactérias	1.000 µg/mL	2.000 µg/mL	3.000 µg/mL	4.000 µg/mL	5.000 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	R	I	I	I	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	R	IP	IP	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	IP	I	I	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70063	IP	IP	I	I	I
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	I	I	I	I	I
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	IP	I	I	I	I
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 23212	R	IP	IP	I	I

Tabela 1 – Bactérias foram cultivadas em MHA contendo diferentes concentrações de ECV. Após incubação a 36 °C por 24 horas, foi observado o efeito do ECV em comparação com o controle (**I** - inibição total do crescimento 100%; **IP** - inibição parcial do crescimento 99 - 50%; **R** – Resistente inibição inferior a 50%).

**Tabela 2** – Atividade Bacteriostática do ECV sobre Amostras de *S. aureus* MSSA (S) e MRSA (R) Detectada em Amostras Cultivadas em MHC+ECV e Transferidas para MHA

ECV	750 µg/mL	1.000 µg/mL	1.500 µg/mL
Inibição Total (I)	0/11S 8/11R	3/11S 11/11R	11/11S 11/11R
Inibição Parcial (IP)	0/11S 3/11R	4/11S 0/11R	0/11S 0/11R
Resistência (R)	11/11S 0/11R	4/11S 0/11R	0/11S 0/11R

Tabela 2 – Bactérias foram cultivadas em MHC acrescido de diferentes concentrações de ECV e após incubação a 36 °C por 24 horas, foram transferidas para duas séries de placas: uma contendo MHA+ECV e a outra sem ECV. A presença de crescimento em placas de MHA sem ECV indica o efeito bacteriostático deste extrato. (S=cepas MSSA, R=MRSA; **I** - inibição total do crescimento 100%; **IP** - inibição parcial do crescimento 99 -50%; **R** – Resistente inibição inferior a 50%).



**Figura 1** – Curva de Crescimento das Amostras 6R e 6S de *S. aureus* na Presença ou Ausência de ECV. **A** Comparação das Curvas de crescimento da cepa 6S em presença e ausência de ECV. **B** Comparação das Curvas de crescimento da cepa 6R em presença e ausência de ECV. **C** Comparação das Curvas de crescimento da cepa 6S e 6R na presença de ECV. **D** Comparação das Curvas de crescimento da cepa 6S e 6R na ausência de ECV.



**Tabela 3** – Efeito da associação de oxacilina (6 µg/mL) com ECV sobre cepas hospitalares de *S. aureus* MRSA

Oxacilina \ ECV	6 µg/mL	1.000 µg/mL 6 µg/mL	1.500 µg/mL 6 µg/mL
Inibição Total (I)	0/11R	4/11R	9/11R
Inibição Parcial (IP)	0/11R	7/11R	2/11R
Resistência (R)	11/11R	0/11R	0/11R

Tabela 3 – As bactérias foram cultivadas em MHB + oxacilina (6 µg/mL) com ou sem ECV, incubadas a 36 °C por 24 horas, e transferidas para placas de MHA sem ECV.

O sinergismo de oxacilina (6 µg/mL) com ECV resultou em efeito bactericida, (**I** - inibição total do crescimento 100%; **IP** - inibição parcial do crescimento 99 -50%; **R** – Resistente inibição inferior a 50%).

## 4 DISCUSSÃO

As numerosas propriedades biológicas do chá verde têm sido amplamente estudadas. Tanto o extrato bruto como frações purificadas das diferentes catequinas presentes nestes extratos, têm sido utilizados em diferentes estudos. Neste estudo foi avaliado o efeito antibacteriano do extrato etanólico (ECV) obtido das folhas de *Camellia sinensis*. Um dos primeiros trabalhos bem conduzidos sobre atividade antibacteriana do ECV foi de Toda et al. (1989) que avaliaram esta propriedade frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, observando inibição de crescimento em ambos os grupos. Em nossa triagem inicial, utilizando cepas padrão, observamos resultados semelhantes (Tabela 1), embora somente a cepa de *S. aureus* (ATCC 25923) foi inibida com menor concentração utilizada (1000 µg/mL). Os possíveis mecanismos descritos da ação antibacteriana de ECV são: inibição de β-lactamases; inibição da síntese de PBP2 e de autolisinas; e ainda lesão da membrana citoplasmática pela ação de radicais livres (YAM et al., 1998; HAMILTON-MILLER; SHAH, 1999; ARAKAWA et al., 2004).

Considerando as diferenças na composição da parede de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, poderíamos supor que a ação do ECV sobre PBP2 seria mais possível em Gram-positivas, enquanto que a composição de paredes das Gram-negativas propiciaria uma ação de lesão de membrana por incorporação desestabilizando facilmente esta membrana (CATURLA et al., 2003). Já, a produção de β-lactamases pode ocorrer em ambos os grupos, bem como a de autolisinas, enzimas essenciais para a divisão celular.

Considerando o aumento crescente de cepas bacterianas multi-resistentes a drogas, em particular as cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (no hemisfério Norte) e oxacilina (no hemisfério Sul), inúmeros trabalhos surgiram no sentido de avaliar o ECV frente a essas bactérias (YAM et al., 1998; HAMILTON-MILLER; SHAH, 2000, HU et al., 2001). Considerando esses relatos e os nossos resultados obtidos, na primeira etapa, passamos a estudar o efeito do ECV frente a cepas de *S. aureus* sensíveis (MSSA) e resistentes (MRSA) à oxacilina, em isolados hospitalares. Conforme demonstrado na Tabela 2, em presença da concentração de 1500 µg/mL do ECV todas as 22 cepas de *S. aureus* (11 MSSA e 11 MRSA) sofreram ação bacteriostática.

Quando utilizamos a associação de oxacilina com ECV (ZHAO et al., 2001; STAPLETON et al., 2004), frente às cepas MRSA foi demonstrado efeito sinérgico (Tabela

3) uma vez que das 11 cepas, nove foram totalmente inibidas em presença de 6 µg/mL de oxacilina e 1500 µg/mL de ECV e somente duas apresentaram inibição parcial. Portanto uma possível explicação da ação da oxacilina em bactérias resistentes é a ação da catequina sobre a enzima β-lactamase, inibindo ou modulando a sua ação e com isso possibilitando a atuação da oxacilina nas bactérias (YAM et al., 1998).

As curvas de crescimento construídas, com as contagens obtidas a partir de cultivo em TSB sem adição de ECV, apresentaram um perfil semelhante; a amostra sensível a oxacilina 6S, no entanto, apresentou contagem superior em uma potência de 10 ao final de 24 h, quando comparada com a amostra 6R (Fig 1A), respectivamente,  $10^{15}$  e  $10^{14}$  UCF/mL. Nas figuras 1B e 1C, comparando o crescimento de cada cepa em presença e na ausência de ECV, é possível observar uma queda brusca das contagens de UFC até  $T_4$  e em seguida a manutenção das contagens até 12 h. Valores obtidos após 24 h de cultivo, apresentaram contagens semelhantes aos anteriores, fato este, que caracteriza a atividade bacteriostática do ECV, este fato confirmaria a ação das catequinas como agentes desestabilizadores que impediriam a divisão das bactérias, mas não seria capaz de provocar sua morte.

Na fig 1D – é possível observar mais detalhadamente que o efeito do ECV ocorre após a primeira hora de incubação, atingindo o menor valor de UFC em  $T_4$ , para 6S e em  $T_6$ , para 6R.

No mecanismo de resistência à oxacilina, ocorre alteração nas proteínas ligadoras de penicilina (PBP e PLP). Como conseqüências, poderiam ocorrer alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática bacteriana, resultando em penetração mais lenta de nutrientes e possivelmente também de ECV, resultando em crescimento mais lento. Isto explicaria a contagem final menor de UFC na curva da cepa 6R e a queda mais demorada do nº de UCF/mL.

Nossos resultados são condizentes com os outros autores. Mas, apontam para a necessidade de estudos mais aprofundados, como a utilização de catequinas purificadas e microscopia eletrônica. Já que o ECV apresentou boa atividade antibacteriana, sendo sua atividade bacteriostática frente às bactérias testadas, mas quando associado a oxacilina passou a ter atividade bactericida frente as cepas de *S. aureus* MRSA. Além de que o ECV apresentou baixa toxicidade, o extrato vegetal do chá verde ou seus componentes podem ser compostos promissores no tratamento e na prevenção de infecções bacterianas. Com os resultados obtidos esperamos que no futuro possa-se determinar um possível emprego deste composto como adjuvante no tratamento de infecções, especialmente pelo *S. aureus* MRSA.

## REFERÊNCIAS

ANGHILERI, L.J.; THOUVENOT, P., 2000. Natural polyphenols-iron interaction: its biological importance. *Biol Trace Elem Res* 73, 251-258.

ARAKAWA, H. et al., 2004. Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin *Biol Pharm Bull* 27, 277-281.

CATURLA, N et al., 2003. The relationship between the antioxidant and the Antibacterial properties of galloylated catechins and the Structure of phospholipid model membranes *Free Radical Biology & Medicine* 34 (6), 648–662.

CECCHINI R.; ARUOMA O. I.; HALLIWELL B., 1990. The action of hydrogen peroxide on the formation of thiobarbituric acid-reactive material from microsomes or from DNA damage by bleomycin or phenanthroline. Artefacts in the thiobarbituric acid test. *Free Radic Res Commun* 10 (4-5), 245-258.

COOK, N.C.; SAMMAN, S., 1996. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources *Nutr Biochem* 7, 66-76.

HAMILTON-MILLER, J.M.T; SHAH, S., 1999. Disorganization of cell division of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a component of tea (*Camellia sinensis*): a study by electron microscopy *FEMS Microbiology Letters* 176, 463-469.

HAMILTON-MILLER, J.M.T; SHAH, S., 2000. Activity of the tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *J Antimicrob Chemother* 46, 852-853.

HAMILTON-MILLER, J.M.T., 2001. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*) *Journal of Medical Microbiology* 50, 4, p. 299-302.

*Radical Biol Med* 19, 271-280.

HU, Z.Q. et al., 2001. Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sulbactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 (3), 361-364.

JUN, Y. et al., 2002. Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes *Chem Physics Lipids* 120, 109-117.

KUBO, I; MUROI, H.; HIMEJIMA M., 1992. Antimicrobial Activity of Green Tea Flavor Components and Their Combination Effects *J Agric Food Chem* 40, 245-240.

LEE, Y.L. et al., 2003. Antibacterial activity of vegetables and juices. *Nutrition*, v. 19, p. 994-996.

MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C., 2002. Taninos in Simões, M.O. et al *Farmacognosia da Planta ao Medicamento* Ed. UFSC, Cap. 24.

OSAWA, K. et al., 1999. The antibacterial activities of peppermint oil and green tea polyphenols, alone and in combination, against enterohemorrhagic *Escherichia coli* *Biocontrol-Science* 4 (1), 1-7.

OTAKE, S. et al., 1991. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res*, 25, 438-443.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids *Free Radic Biol Med* 20, 933-956.

SHIOTA, S. et al., 1999. Marked reduction in the minimum inhibitory concentration (MIC) of beta-lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* produced by epicatechin gallate, an ingredient of green tea (*Camellia sinensis*) *Biological-and-Pharmaceutical-Bulletin* 22 (12), 1388-1390.

STAPLETON, P.D.; TAYLOR, P.W., 2002. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog* 85, 57-72.

STAPLETON, P.D. et al., 2004 Modulation of  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates *International Journal of Antimicrobial Agents* 23, 462–467.

TAKABAYASHI, F. et al., 2004. Inhibitory effect of green tea catechins in combination with sucralfate on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils *J Gastroenterol* 39, 61-63.

TODA, M., OKUBO, S.R. OHNISHI, T. SHIMAMURA, 1989. Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea. *Jpn J Bacteriol* 44: 669–672.

YAM, T.S.; HAMILTON-Miller, J.M.T.; SHAH, S., 1998. The effect of a component of tea (*Camellia sinensis*) on methicillin resistance, PBP2' synthesis, and  $\beta$ -lactamase production in *Staphylococcus aureus* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 42, 211-216.

YEE, Y.K.; KOO, M.W.L.; SZETO, M.L., 2002. Chinese tea consumption and lower risk of *Helicobacter* infection *Journal of Gastroenterology & Hepatology* 17 (5), 552-555.

ZHAO W.H. et al., 2001. Mechanism of Synergy between Epigallocatechin Gallate and  $\beta$ -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 45 (6), 1737–1742.

ZUANAZZI, J.A.S., 2002. *Flavonóides* in Simões, M.O. et al *Farmacognosia da Planta ao Medicamento* Ed. UFSC, Cap. 23.

**EFEITO QUIMIOPROTETOR DO CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*)  
INDUZIDO PELO AGENTE LIPOPEROXIDANTE  
DIETILNITROSAMINA**

Wanderlei Schmitz<sup>1</sup>, Dirceu Estevão<sup>2</sup>, Rubens Cecchini<sup>2</sup>, Alexandre Saito<sup>2</sup>, Halha Ostrensky Saridakis<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mestrando Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

## RESUMO

O chá verde apresenta importantes atividades biológicas a nível antioxidante, quimioprotetor e antiinflamatória, além de possuir atividades antibacteriana e antiviral. Diante desses fatos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito quimioprotetor do extrato de chá verde (ECV) sobre a lipoperoxidação e necrose provocada pelo cancerígeno Dietilnitrosamina (DEN) no fígado de ratos. Foram utilizados ratos machos Wistar expostos a dose única via intra peritoneal de 200 mg/Kg de DEN e por via oral de 120 mg/Kg de ECV em diferentes momentos experimentais. Após 24 horas em relação ao tratamento com DEN, os animais foram sacrificados sendo avaliado: 1) os níveis de AST/ALT no plasma, 2) a lipoperoxidação por quantificação de TBARS e FOX no fígado, 3) a ocorrência de necrose e hemorragia hepática através do estudo histopatológico. A ação quimioprotetora e a diminuição da lipoperoxidação foram verificadas pela diminuição das transaminases, TBARS, FOX (Complexo Fe(III)-Xilenol Laranja) e redução da necrose hepática. No grupo tratado com ECV 12 horas após DEN ocorreu aumento significativo da AST e tendência de aumento da ALT. A avaliação histopatológica confirmou estes resultados, indicando a importância do momento em que se utiliza o quimioprotetor e que o chá verde pode agir como agente quimioprotetor, principalmente quando utilizado de forma preventiva.

**Palavras-chaves:** *Camellia sinensis*. Chá verde. Quimioproteção. Flavonóides. Catequinas.

## ABSTRACT

Green tea thus presents biological activities as: antioxidant, chemoprotector, anti-inflammatory, anticarcinogenesis also antibacterial and antiviral activities. This work has the objective to evaluate the green tea extract chemoprotector effect (ECV) on lipoperoxidation and necrosis phenomena, induced by the carcinogenic DEN in the rat liver. Adult Wistar rats male were used exposed to one intra peritoneal dose of 200 mg/Kg of DEN, and orally, 120 mg/Kg of ECV, in different experimental moments. 24 hours after DEN inoculation and/or ECV, AST/ALT levels were evaluated in plasma, TBARS and FOX were evaluated in liver and hepatic necrosis was observed by histological examination. The chemoprotector action and decrease of lipoperoxidation were detected by decrease of the transaminases, TBARS and FOX decrease in the hepatic necrosis. Group treated with ECV, 12 hours after the inoculation of DEN, showed a significant increase of AST and a non significant increase of ALT; the histopatologic observation confirmed these results, indicating the importance of the moment in which chemoprotector is used and that green tea presents positive results as chemoprotector agent in this experimental model.

**Keywords:** *Camellia sinensis*. Green tea. Chemoprotector. Flavonoids. Catechins.



## 1 INTRODUÇÃO

O chá verde é resultante da infusão das folhas da planta *Camellia sinensis*, rico em polifenóis sendo os flavonóides e as catequinas seus principais componentes terapêuticos. Dentre suas atividades destacam-se: antioxidante, quelante de metais, quimioprotetora/anticarcinogênica e antiinflamatória. Os radicais livres têm importante papel na lesão tecidual, em processos patológicos, como lesões de isquemia e reperfusão, aterosclerose, envelhecimento e carcinogênese (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Estas propriedades do ECV estão diretamente relacionadas com a estrutura química de seus componentes e principalmente com a presença de radicais hidroxil ligados aos seus anéis aromáticos (COOK; SAMMAN, 1996; ANGHILERI; THOUVENOT, 2000). Dentro da classe das catequinas o chá apresenta: epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), galato-3-epicatequina (ECG), galato-3-epigalocatequina (EGCG). As catequinas correspondem a aproximadamente 26% dos compostos derivados das folhas secas do chá verde, dos quais 11% são formados por EGCG, 10% de EGC, 2% de ECG, 2,5% EC e 15% de polifenóis não identificados. O potencial antioxidante das catequinas varia em ordem decrescente: EGCG = ECG > EGC = EC (RICE-EVANS et al., 1996; MELLO; SANTOS, 2002).

Anderson et al. (2001) realizaram estudos *in vitro* com substância geradoras de radicais livres responsáveis por lesão no DNA, as quais foram inibidas pela adição de catequinas. Esta atividade antioxidante deve-se à sua capacidade de doar átomos de hidrogênio para os radicais livres, estabilizando-os (ARORA, et al., 1998). Cai et al. (2002) estudaram a atividade antioxidante do chá verde em microsomas de fígado de ratos, uma vez que microsomas são sensíveis à lipoperoxidação devido ao alto grau de ácidos graxos poliinsaturados em sua constituição e comprovaram que o chá verde age como inibidor eficaz de lipoperoxidação.

A quimioproteção pode ser definida como a prevenção, inibição, ou reversão de carcinogênese por administração de um ou mais compostos químicos, medicamentos ou componentes naturalmente encontrados na dieta alimentar (LIN; LIANG, 2000). Resultados experimentais mostraram que o chá verde é capaz de inibir o dano celular causado por diferentes carcinógenos. Foi observada diminuição da incidência de focos nos fígados de ratos tratados com dietilnitrosamina e aumento da atividade de glutathione-S-transferase, bloqueando a promoção do tumor (CHENG et al., 1991). Chen et al. (1987) e Qin et al.

(1997) relataram que a adição de chá verde (5%) à dieta de ratos resultou em inibição da hepatocarcinogênese induzida pela aflatoxina B1, um iniciador e promotor completo.

Cao et al. (1996) testaram a ação quimioprotetora do chá verde descafeinado na tumorigênese de fígado e pulmão, em camundongos tratados com DEN. Os autores observaram diminuição significativa no número de tumores pulmonares e hepáticos e mostraram uma relação dose-resposta na atividade quimioprotetora do chá. O efeito quimioprotetor foi investigado em camundongos tratados com dietilnitrosamina (DEN) e chá verde como fonte exclusiva de água. Os animais apresentaram menor incidência de tumores no pulmão e do estômago, sugerindo ação inibitória na tumorigênese induzida por nitrosaminas (WANG et al., 1992).

Katiyar et al. (1993a, b) em experimento semelhante com camundongos alimentados com extrato aquoso de chá verde (0.2% a 2.5%), observaram aumento da atividade da glutatona S-transferase e diminuição do número de focos pré-neoplásicos. Trabalhos realizados com uma fração isolada de polifenóis do chá, na dose de 5 mg por via gástrica, 30 min antes da exposição a DEN, mostraram redução do número de tumores em camundongo, evidenciando redução do número de células tumorais por foco pré-neoplásico. Os resultados encontrados sugerem que o chá verde possui efeito quimioprotetor na tumorigênese induzida pela DEN, pois pode atuar no aumento da atividade enzimática do metabolismo de detoxificação da fase II, ou seja, redução da disponibilidade do metabolismo tóxico da DEN (KATIYAR, et al., 1993b).

Klaunig (1992) verificou o efeito do extrato de chá verde (ECV) em cultura de hepatócitos de camundongos, submetidos a agentes geradores de radicais livres (paraquat, glucose oxidase e xantina oxidase), observando que o ECV inibiu a morte celular induzida por estes agentes.

Chen et al. (2004) analisaram os efeitos quimioprotetores dos polifenóis do chá verde em camundongos tratados com tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>). Os autores verificaram que a administração dos polifenóis levou à diminuição da citotoxicidade, dose-dependente, de todos os parâmetros bioquímicos e histopatológicos avaliados.

As pesquisas já realizadas com chá verde apresentam resultados extremamente benéficas para a saúde humana. Tanto é que o Instituto Nacional do Câncer dos EUA iniciou um programa nacional de utilização do chá verde como quimiopreventivo do câncer (SIDDIQUI et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes parâmetros bioquímicos e morfológicos que permitem verificar o efeito antioxidante e quimioprotetor do ECV em um protocolo experimental utilizando o DEN como um conhecido agente carcinogênico.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 REAGENTES

Dietilnitrosamina (DEN), Cloreto férrico 1mM ( $\text{FeCl}_3$ ), ácido ascórbico 1mM, Sulfeto de Ferro, 3,3'- bis [N,N-di (carboximetil) amino-metil]-o-cresol sulfoneftaleína (xilenol laranja), Sigma Chemical Company, USA; Formaldeído, ácido sulfúrico, metanol HPLC e ácido tioderivado da malonilurea (TBA 1%) Merck. Kit Transaminases (AST e ALT) (Laborlab). Os demais reagentes e compostos utilizados foram da mais alta pureza disponível no mercado.

### 2.2 PREPARO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *CAMELLIA SINENSIS*

O extrato etanólico de chá verde (ECV) foi preparado a partir de 300 g. de folhas secas de *C. sinensis*, adquiridas da Quimer Ervas Medicinais. Após a extração com Álcool Etílico Absoluto, o produto foi filtrado em papel de filtro e concentrado em rota vapor com temperatura de aproximadamente 40 °C, sendo então utilizado em diferentes concentrações para os vários testes realizados.

### 2.3 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Ratos Wistar machos, pesando entre 200 a 250g no início do experimento, foram mantidos em gaiolas de polietileno com tampa de aço inox, sendo grupos de seis (6) animais por gaiola que era forrada com maravalha, trocada três (3) vezes por semana. A ração granulada e água foram oferecidas “*ad libitum*”. A temperatura ambiente foi mantida entre 20 e 25°C, a umidade relativa e um baixo nível de ruído foram mantidos dentro das condições ideais. O fotoperíodo foi controlado para prover luz das 06:00 às 18:00 horas.

## 2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após uma semana de adaptação, os animais foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas coletivas e divididos em 5 grupos alimentados “*ad libitum*” até o término do experimento. Grupo 1 – grupo controle; Grupo 2 – animais inoculados com DEN; Grupo 3 – animais tratados com ECV; Grupo 4 – animais tratados com ECV 3 horas antes a DEN e Grupo 5 – animais tratados com ECV 12 horas após a DEN. Os animais foram inoculados com dose única via intra peritoneal de 200 mg/Kg de DEN e/ou via oral de 120 mg/Kg de ECV e sacrificados por deslocamento cervical 24 horas após inoculação da DEN. Foi coletado o sangue dos animais por punção cardíaca para obtenção do plasma, foram quantificados os níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e fragmentos do fígado foram retirados para análise histológica. Parte das amostras de fígado foram mantidas em freezer (– 80° C) para a quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e para o ensaio de FOX (complexo Fe(III)-xilenol laranja).

## 2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA AST E ALT (REITMAN; RANKEL, 1957)

O plasma, obtido do sangue através de punção cardíaca, foi usado para quantificação de AST e ALT, utilizando-se a análise colorimétrica para transaminases padronizada pela Laborlab Sistemas Diagnósticos Ltda.

## 2.6 QUANTIFICAÇÃO DE TBARS EM FÍGADO DE RATOS

O teste do TBA, modificado por Cecchini et al. (1990), foi utilizado para quantificação de lipoperóxidos conforme procedimento descrito a seguir. Um mL do homogenato foi misturado a 0,2 mL de água destilada, 1 mL de TCA (28%) e 1 mL de TBA (1% em NaOH 50 mM). Para os tubos em que a reação de lipoperoxidação foi acelerada por ferro e ácido ascórbico (FeIII/Ac. Asc.) foram adicionados 0,1 mL de cloreto férrico (1 mM) e

0,1 mL de ácido ascórbico (1 mM). Após adição de todos os componentes os tubos foram homogeneizados em vortex, incubados a 95°C por 15 minutos, transferidos para banho de gelo por aproximadamente 5 minutos. A extração foi realizada pela adição de 2 mL de butanol, agitação no vortex por 40 segundos e centrifugação (centrífuga refrigerada – K70 D) a 3000 rpm por 20 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Varian/série 634 S, com luz visível, fenda de 1,0 nm, nos comprimentos de onda de 535 e 572 nm. O teste foi realizado em duplicata para cada reação e a lipoperoxidação foi avaliada pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e expressas em CHP nmoles/g fígado (BAHAR; TAWFEQ; ABU, 2003).

## **2.7 ENSAIO DE FOX (COMPLEXO Fe(III)-XILENOL LARANJA) MODIFICADO POR HERMES-LIMA ET AL. (1995)**

O fígado foi homogeneizado (homogeneizador Potter) na proporção de 100 mg para 10 mL de metanol (grau de pureza HPLC) e centrifugado (centrífuga refrigerada – K70 D) a 2000 rpm por 10 minutos. Após, as reações foram preparadas com: 500 µL de FeSO<sub>4</sub> (1 mM), 200 µL de H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> (0,25 M), 200 µL de xilenol (1 mM), 1000 µL de água e 100 µL de amostra. Foram incubadas por 24 horas e quantificadas em espectrofotômetro Varian/série 634S em 560 nm contra água. Após esta leitura, foi adicionado aos tubos 5 µL de hidroperóxido de cumeno (CHP) seguido de incubação por 30 minutos e nova leitura em 560 nm. Os níveis de hidroperóxidos lipídicos foram expressos em equivalentes de hidroperóxido de cumeno em nmoles CHP/g fígado. A quantidade de hidroperóxido é baseada nos hidroperóxidos que reagem com o íon metálico Fe(II). O hidroperóxido é reduzido e o ferro é oxidado em Fe(III) que forma um complexo com o Xilenol.

## **2.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Fragmentos do lóbulo hepático mediano de diferentes grupos animais, foram fixados em formalina tamponada 10%, processados e corados por HE. As lâminas

foram examinadas, às cegas, por dois observadores e a quantificação de eventual hemorragia e/ou necrose centro-lobular foi realizada pela observação de 10 campos, utilizando o seguinte critério: 0 (ausente), 1+ (discreta), 2+ (moderada), 3+ (acentuada), (Estevão et al., 2002).

## **2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para avaliar o efeito de DEN e de ECV sobre os diferentes grupos experimentais foi utilizada a Análise de Variância de ANOVA, e para comparação entre as médias foi utilizado o Teste de Tukey. Foram considerados como estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

O ECV foi utilizado para avaliar seu efeito quimioprotetor contra DEN, cujo mecanismo de ação envolve a formação de radicais livres e lesão celular. Para quantificar o efeito quimioprotetor foram utilizados vários parâmetros: dosagem plasmática das transaminases (AST/ALT), quantificação de TBARS e FOX para avaliar a lipoperoxidação das membranas e estudo histopatológico para verificar alterações morfológicas das células.

A tabela 1 mostra os resultados dos parâmetros: peso do fígado, peso relativo do fígado por 100g de animal, dosagem de transaminases e scores de necrose e hemorragia dos grupos. Os animais submetidos ao DEN apresentaram pesos relativos do fígado significativamente menores quando comparados com o controle, indicando presença de lesão hepática. Os valores de AST/ALT do grupo tratado somente com ECV não foram estatisticamente significativos quando comparados com o grupo controle. Valores da AST do grupo ECV+DEN demonstram tendência do efeito quimioprotetor embora não significativo, já os valores de AST são significativamente menores ao grupo tratado com DEN. No grupo DEN+ECV, houve aumento significativo da AST e tendência de aumento da ALT, indicando que o momento em que se utiliza o quimioprotetor é importante para diminuir a lesão causada pela DEN.

O resultado do nível de hemorragia do grupo ECV+DEN é estatisticamente significativo quando comparado com o grupo DEN. O grupo DEN+ECV apresenta tendência de aumento quando comparado com o DEN. Comparando os valores encontrados pela dosagem de AST/ALT. Os valores da intensidade de necrose são significativamente menores nos grupos ECV+DEN e DEN+ECV, quando comparados com o DEN. O fato da necrose de necrose do ECV+DEN ser menor que do grupo DEN+ECV, mostra o efeito quimioprotetor preventivo do ECV.

A Fig. 1 mostra os resultados dos diferentes grupos experimentais obtidos pela quantificação de TBARS os resultados dos grupos ECV+DEN e DEN+ ECV foram significativamente menores ao grupo DEN, indicando ação quimioprotetora do chá verde, os valores de TBARS do grupo ECV são semelhantes ao controle, aparentemente o ECV não provocou lipoperoxidação quando administrado em altas doses (120mg/Kg). A Fig. 2 mostra a quantificação de FOX dos grupos ECV+DEN e DEN+ECV, que foram significativamente menores quando comparados com o grupo DEN, confirmando diminuição da lipoperoxidação, também observada na dosagem de TBARS nestes grupos.

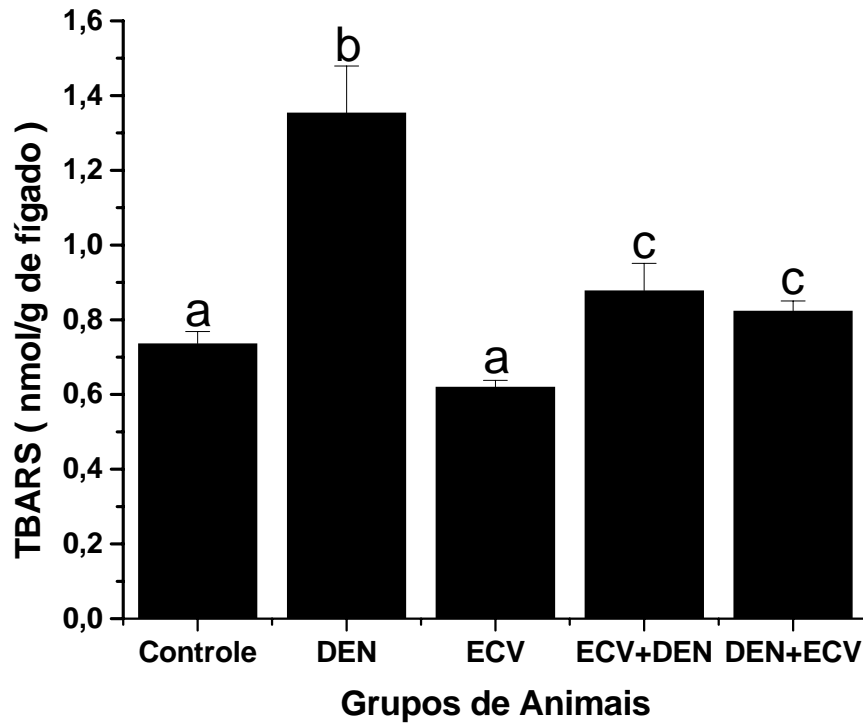


Os resultados da avaliação histopatológica do fígado de ratos (Fig 3) dos diferentes grupos experimentais (controle, DEN, ECV, ECV+DEN e DEN+ECV) 24 hs após intoxicação pela DEN. Corte 1 - observamos na região centro-lobular do fígado do controle, sem lesão aparente; corte 2 - região de tecido hepático do grupo DEN, com focos de necrose; corte 3 - região centro-lobular do fígado do grupo ECV, onde são observadas degenerações celulares reversíveis causadas pelo acúmulo de água no interior das células; corte 4 - região centro lobular do grupo tratado com ECV+DEN, com focos de necrose, menores que os encontrados no grupo DEN; corte 5 - região tecidual do grupo tratado com DEN+ECV, com focos de necrose menores que do grupo DEN, porém maiores quando comparados com o grupo ECV+DEN, confirmando menor quimioproteção quando o ECV é administrado após o agente lesivo. Os resultados mostram que o ECV possui ação quimioprotetora frente ao efeito citotóxico da DEN.

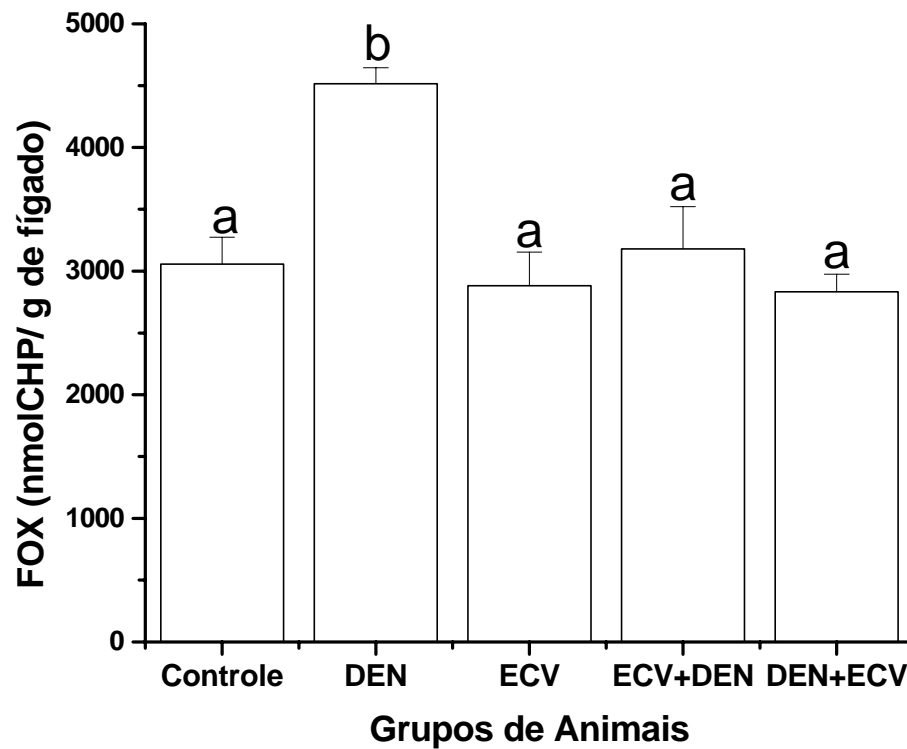
**Tabela 1** – Parâmetros nutricionais, bioquímicos e histopatológicos dos animais submetidos aos diferentes tratamentos

Parâmetros GRUPOS	Peso do Fígado	Peso Relativo	AST (U/L)	ALT (U/L)	Hemorragia	Necrose
	24 h após DEN (g)	do Fígado/100g de animal (%)				
Controle <sup>(6)</sup> (salina)	12,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	44,36 ± 2,08 <sup>a</sup>	27,78 ± 2,48 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
DEN <sup>(6)</sup>	9,4 ± 0,7 <sup>b</sup>	3,9 ± 0,5 <sup>b</sup>	348,6 ± 35,8 <sup>b</sup>	310,0 ± 39,1 <sup>b</sup>	1,1±0,1 <sup>b</sup>	2,7±0,2 <sup>b</sup>
ECV <sup>(6)</sup>	12,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	4,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	40,5 ± 2,2 <sup>a</sup>	24,9 ± 2,6 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
ECV/DEN <sup>(6)</sup>	8,6 ± 0,6 <sup>b</sup>	3,7 ± 0,3 <sup>b</sup>	287,7 ± 50,5 <sup>c</sup>	195,1 ± 28,5 <sup>c</sup>	0,3±0,2 <sup>c</sup>	1,6±0,1 <sup>c</sup>
DEN/ECV <sup>(6)</sup>	8,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	3,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	478,0 ± 15,2 <sup>d</sup>	427,5 ± 39,2 <sup>d</sup>	1,4±0,3 <sup>d</sup>	2,0±0,1 <sup>d</sup>

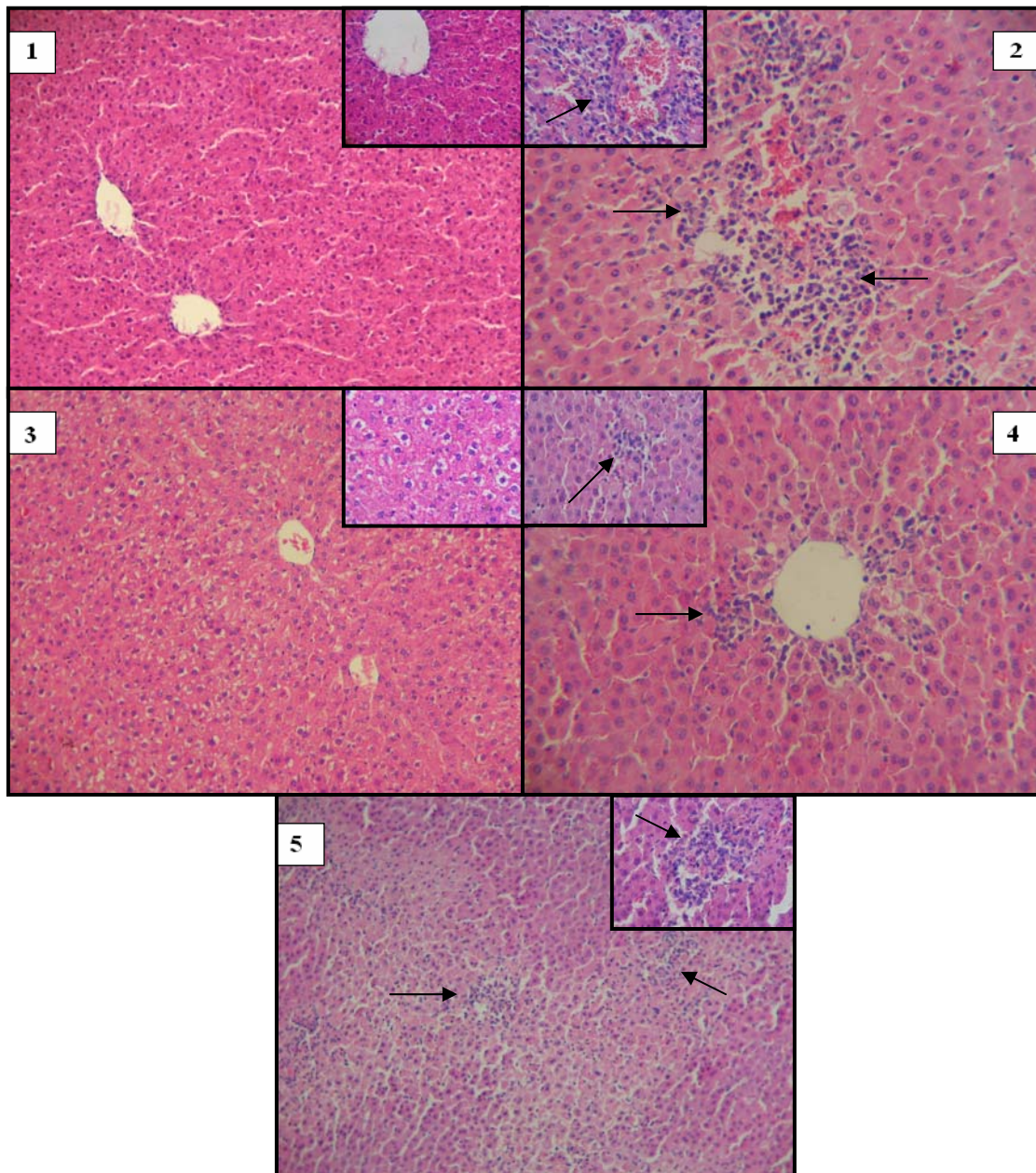
Tabela 1 – Os animais receberam dose única de DEN (200 mg/Kg) e/ou ECV (120 mg/Kg), sacrificados 24 horas após inoculação de DEN. Foram quantificados no plasma os níveis de AST/ALT, o fígado foi utilizado para análise histológica. ( ) = número de animais por grupo; AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase; intensidade de hemorragia e necrose: 0 = ausente, 1+ = discreta, 2+ = moderada, 3+ = acentuada; Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si em nível de p<0,05 (teste de Tukey).



**Figura 1** – Níveis de lipoperoxidação através da quantificação de TBARS em animais pertencentes aos diferentes grupos de estudo tratados com DEN e/ou ECV. Os ratos foram inoculados com dose única via intra peritoneal de 200 mg/Kg de DEN e/ou via oral de 120 mg/Kg de ECV e sacrificados por deslocamento cervical 24 horas após inoculação de DEN. Amostras do fígado foram utilizadas na quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e expressas em nmoles/g fígado. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si em nível de  $p < 0,05$  (teste de Tukey).



**Figura 2** – Níveis de lipoperoxidação através da quantificação do Complexo Fe(III)-Xilenol Laranja (FOX) em animais intoxicados com DEN e tratados ou não com ECV. Os ratos foram inoculados com dose única via intra peritoneal de 200 mg/Kg de DEN e/ou via oral de 120 mg/Kg de ECV e sacrificados por deslocamento cervical 24 horas após inoculação da DEN. Fragmentos do fígado foram utilizados para realização da quantificação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos, expressos em equivalentes de hidroperóxido de cumeno em nmoles CHP/g fígado. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si em nível de  $p < 0,05$  (teste de Tukey).



**Figura 3** – Estudo histopatológico do tecido hepático dos animais intoxicados com DEN e tratados ou não com ECV. Fragmentos hepáticos do lóbulo mediano dos animais foram processados e corados por HE. As lâminas foram examinadas e a quantificação de eventual hemorragia e/ou necrose foi feita através da observação de 10 campos, seguinte código: 0 (ausente), 1+ (discreta), 2+ (moderada), 3+ (acentuada). Corte 1 - controle; corte 2 - DEN; corte 3 - ECV; corte 4 - ECV+DEN e corte 5 - DEN+ECV. (  $\longrightarrow$  ) indica os focos de necrose nos tecidos.

## 4 DISCUSSÃO

As propriedades biológicas do chá verde têm sido mundialmente estudadas mundialmente. A avaliação de sua atividade quimioprotetora tem sido investigada em diferentes protocolos experimentais (CHENG et al, 1991; KATIYAR et al, 1993 a,b; TAMURA et al, 1997).

A DEN é um conhecido cancerígeno que depende de ativação pelo sistema metabolizador de drogas do fígado (MFO) para exercer sua ação carcinogênica e tóxica, especialmente ao nível de fígado, rim e tratos respiratório e digestório alto. A participação da necrose na hepatocarcinogênese química, estimulando a proliferação celular e o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas parecer necessária na etapa de iniciação da carcinogênese hepática (HAW et al., 2000; ESTEVÃO et al., 2002).

Verifica-se que o grupo pré-tratado com ECV (ECV+DEN) apresentou redução significativa dos valores de ALT e tendência de redução de AST, quando comparados com o grupo DEN, sugerindo menor lesão celular nos animais tratados com o ECV antes da DEN. No grupo pós-tratado com ECV houve aumento significativo da AST e tendência de alta da ALT, indicando aumento da lesão quando o ECV é utilizado após a intoxicação com o DEN. Este aumento pode estar relacionado com a ação dos componentes do ECV, principalmente as catequinas que possuem capacidade de se incorporar e complexar com membranas lipoprotéicas (CATURLA et al, 2003). Portanto, a lesão na membrana celular causada pela DEN é aumentada pela ligação de altas concentrações de catequinas, especialmente a parte hidrofóbica mais interna que irá aumentar a desestabilização desta membrana (KUMAZAWA et al, 2004).

Tsuchiya (1999) demonstrou que as catequinas do chá verde podem diminuir a fluidez das membranas tanto na parte hidrofílica, como hidrofóbica, sugerindo que altas doses de chá verde podem desestabilizar a membrana e criar poros promovendo maior liberação das enzimas AST e ALT. Outro mecanismo sugere a ação pró-oxidante das catequinas em presença de metal como o cobre, onde radicais livres podem provocar aumento da permeabilidade da membrana e/ou lateralização das proteínas da membrana gerando poros, permitindo assim uma maior liberação das enzimas AST/ALT (AZAM et al, 2004). O grupo com apenas ECV apresentou valores de AST/ALT semelhantes ao controle, mostrando que o ECV nas concentrações utilizadas não causou injúria celular importante.

Os valores de intensidade de necrose indicam que ocorreu menor lesão celular nos grupos ECV+DEN e DEN+ECV quando comparados com o grupo DEN. Os níveis do grupo ECV+DEN foi menor que do grupo DEN+ECV. Apesar de não significativo, este resultado reforça a idéia de que o ECV age melhor quando utilizado antes da intoxicação pela DEN. Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com os obtidos por Chen et al. (2004), que utilizando camundongos tratados com chá verde e posteriormente com tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) apresentaram diminuição da lesão hepática.

O comportamento do ECV difere de outros quimioprotetores clássicos com o Dietilditiocarbamato (DDTC) que atinge seu máximo de quimioproteção 4 horas após a intoxicação pela DEN, nas mesmas condições experimentais (ESTEVÃO et al., 2002). Zhu et al. 2000 demonstraram que as catequinas apresentam uma meia-vida de 2 horas após o aporte oral. A meia-vida da eliminação das catequinas depois da dose oral foi de aproximadamente 8 horas. Lee et al. 2002 também demonstraram tempos de meia-vida de 3 a 4 horas para EGCG e 2 horas para EC/EGC. Com esta variação de tempo de meia-vida dos componentes do chá, a faixa de quimioproteção é maior nos animais tratados com chá, que tratados com outros quimioprotetores clássicos.

Destaca-se o fato na análise histopatológica do fígado dos animais tratados apenas com ECV demonstrarem degenerações celulares reversíveis causadas pelo acúmulo de água no interior das células. Sabe-se o chá verde em altas doses pode alterar a morfologia das células hepáticas, pelo fato de suas catequinas ligarem-se a membrana plasmática desestabilizando sua estrutura, ou atuarem em nível de membrana mitocondrial levando a diminuição de produção de ATP e alterações na bomba de Na/K. Estas alterações são classicamente em patologia, consideradas leves e reversíveis. Schmidt et al (2005) utilizando o chá verde em cultura de hepatócitos de ratos observaram que altas concentrações de chá causavam citotoxicidade, confirmando em parte nossos resultados.

A lipoperoxidação das membranas celulares causada pela formação de radicais livres pode ser avaliada pela dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e através do Complexo Fe(III)-Xilenol Laranja (FOX) (HERMES-LIMA et al., 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Os grupos ECV+DEN e DEN+ECV apresentaram valores de TBARS e FOX significativamente inferiores aos encontrados no grupo tratado com DEN, sugerindo ação antioxidante do chá verde. Os resultados de TBARS e FOX do grupo ECV foram semelhantes aos do controle. Mostrando correlação com os resultados das enzimas AST/ALT e indicando não haver lesão celular e lipoperoxidação das membranas dos animais tratados somente com ECV. Cai et al. (2002), observaram a ação

antioxidante do chá em microsomas hepáticos de ratos frente ao 2,2-azobis amidinopropano dihidroclorido (AAPH). Saffari e Sadrzadeh (2004) verificaram que o chá verde protege a membrana de eritrócitos contra agentes lipoperoxidantes.

Além dos grupos tratados com dose única de ECV, foi realizado testes com ratos tratados com ECV 2% via oral “*ad libitum*” por 35 dias. Na avaliação da ação quimioprotetora do ECV frente a DEN (200mg/Kg), os resultados expressaram tendência de queda dos valores de AST/ALT, principalmente ALT e TBARS e FOX. Esta tendência embora não significativa, sugere o efeito protetor do chá em baixas doses administrada por tempo prolongado. Os ratos tratados apenas com ECV apresentaram valores de AST/ALT, TBARS e FOX semelhantes aos valores do grupo controle, não demonstrando efeitos tóxicos ou alterações histopatológicas após tratamento com ECV por longo período. Segundo Chen (1997) a meia vida do ECV é maior que a meia vida de suas catequinas isoladamente, fato que fortalece o uso do extrato completo como agente quimioprotetor.

O presente estudo sugere que o ECV é capaz de inibir a lipoperoxidação da célula hepática e a citotoxicidade da DEN. Diferentes autores têm demonstrado que a redução por quimioprotetores da citotoxicidade provocada pela DEN, reduz significativamente o número de focos pré-neoplásicos (KLAUNIG; KAMENDULIS, 1999; ESTEVÃO et al., 2002). Nossos resultados sugerem que o ECV pode agir como antioxidante e quimioprotetor nas condições testadas. Tendo em vista os resultados e o possível uso do chá na medicina, outros estudos são necessários para melhor esclarecer as propriedades químicas e os mecanismos pelos quais o chá verde pode agir como antioxidante e quimioprotetor em nosso organismo.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, R.F. et al. Green tea catechins partially protect DNA from  $\cdot$ OH radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals. *Carcinogenesis*, v. 22, n. 8, p. 1189-1193, Aug, 2001.
- ANGHILERI, L.J.; THOUVENOT, P. Natural polyphenols-iron interaction: its biological importance. *Biol Trace Elem Res*, v. 73, p. 251-258, Mar, 2000.
- ARORA, A; MURALEEDHARAN, G.N.; STRASBURG, G.M. Structur-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol Med*, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1998.
- AZAM, S. et al. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicology in Vitro*, v. 18 (5), p. 555-561, 2004.
- BAHAR, A.; TAWFEQ, A.A.; ABU B.S. Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus*. *Journal of Ethnopharmacology* 87, 237-240, 2003.
- CAI, Y.J. et al. Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. *Chem Physics Lipids*, v. 120, p. 109-117, 2002.
- CAO, J. et al. Chemopreventive Effects of Green and Black Tea on Pulmonary and Hepatic Carcinogenesis. *Fundamental and applied toxicology* v. 29, p. 244-250, 1996.
- CATURLA, N. et al. The relationship between the antioxidant and the Antibacterial properties of galloylated catechins and the Structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 34, n. 6, p. 648-662, 2003.
- CECCHINI, R.; ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B. The action of hydrogen peroxide on the formation of thiobarbituric acid-reactive material from microsomes or from DNA damage by bleomycin or phenanthroline. Artefacts in the thiobarbituric acid test. *Free Radic. Res. Commun*, v. 10, p. 245-258, 1990.
- 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*, v. 80 (3), p. 742-751, 2004.



CHEN, L. et al. Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab Dispos*, v. 25, n. 9, 1997.

CHEN, Z.Y. et al. Effect of six edible plants on the development of aflatoxin B1-induced  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase positive hepatocytoc foci in rats. *Chinese Journal of Oncology*, n. 9, p. 109-111, 1987.

CHENG, S. et al. Progress in studies on the antimutagenicity and anticarcinogenicity of green tea epicatechins. *Chin Med Sci*, v.6 (4), p. 233-238, 1991.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr Biochem*, v. 7, p. 66-76, 1996.

ESTEVAO, D.; SAITO, A.Y.; GUALTIERI, K.A. Protective effect by diethyldithiocarbamate on hepatocytic and preneoplastic foci induced by diethylnitrosamine. *Biosaúde*, v. 4, n. 1, p. 37-50, 2002.

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

Hwa, K.L. et al. Hepatoprotective effects of bergenin, a major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 469-474, 2000.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue based on the Fe(III)Xylenol orange complex formation. *Free Radic Biol Med*, v. 19, p. 271-280, 1995.

KATIYAR, S.K. et al. Protection against N-nitrosodiethylamine and benzo[a]pyrene-induced forestomach and lung tumorigenesis in A/J mice by green tea. *Carcinogenesis*, v. 14 (5), p. 849-855, May, 1993 (a).

KATIYAR, S.K.; AGARWAL, R.; MUKHTAR, H. Protective effects of green tea polyphenols administered by oral intubation against chemical carcinogen-induced forestomach and pulmonary neoplasia in A/J mice. *Cancer Lett*, v. 73 (2-3), p. 167-172, Sep, 1993 (b).

KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M. Mechanisms of cancer chemoprevention in hepatic carcinogenesis: modulation of focal lesion growth in mice. *Toxicological Sciences*, v. 52, p. 101-106, 1999.

KUMAZAWA, S. et al. Direct evidence of interaction of green tea polyphenols, epigallocatechin gallate, with lipid bilayers by solid-state nuclear magnetic resonance. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 68, p. 1743-1747, 2004.

LEE, M.J. 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*, v. 11, p. 1025-32, Oct, 2002.

LIN, J.K.; LIANG, Y.C. Cancer Chemoprevention by Tea Polyphenols. *Proc. Natl. Sci. Counc*, v. 24, n. 1, p. 1-13, 2000.

MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C. Taninos In Simões, M.O. et al *Farmacognosia da Planta ao Medicamento* Santa Catarina: UFSC, Cap. 24, p. 527-554, 2002.

QIN, G. et al. Inhibition of aflatoxin B1-induced initiation of hepatocarcinogenesis in the rat by green tea. *Cancer Lett*, v. 112, p. 149-154, 1997.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 28, p. 56-63, 1957.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, v. 20, p. 933-956, 1996.

SAFFARI, Y.; SADRZADEH, S.M. Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life Sci*, v. 74, p. 1513-1518, Feb, 2004.

SÁNCHEZ-PÉREZ, Y. et al. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.*, v. 217 (1), p. 25-32, 2005.

SCHMIDT, M. et al. Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. *Food and Chemical Toxicology*, v. 43 (2), p. 307-314, 2005.

SIDDIQUI, I.A. et al. Antioxidants of the beverage tea in promotion of human health. *Antioxid Redox Signal*, v. 6, p. 571-582, Jun, 2004.

SKRZYDLEWSKA et al. Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. *Phytomedicine*, v. 9, p. 232-238, Apr, 2002.

TAMURA, K. et al. Inhibition by green tea extract of diethylnitrosamine-initiated but not choline-deficient, L-amino acid-defined diet-associated development of putative preneoplastic, glutathione S-transferase placental form-positive lesions in rat liver. *Jpn J Cancer Res.*, v. 88 (4), p. 356-362, 1997.

TSUCHIYA, H. Effects of Green Tea Catechins on Membrane Fluidity. *Pharmacology*, v. 59, p. 34-44, 1999.

WANG, Z.Y. et al. Inhibition of N-nitrosodiethylamine- and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced tumorigenesis in A/J mice by green tea and black tea. *Cancer Res*, v. 52 (7), p. 1943-1947, 1992.

XIAO, J. et al. Green tea extracts protected against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, v. 36 (4), p. 243-246, 2002.

ZHU, M.; Chen, Y.; Li, R.C. Oral absorption and bioavailability of tea catechins. *Planta Medica*, v. 66, p. 444-447, Jun, 2000.