UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Vitor Nieri

COMPARAÇÃO ENTRE O CHÁ VERDE EM INFUSÃO E O CHÁ VERDE INCORPORADO EM CRISTAL LÍQUIDO LIOTRÓPICO EM MODELO ANIMAL SUBMETIDO A TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE

Sorocaba/SP
2021

Ficha Catalográfica

Nieri, Vitor
N579c Comparação entre o chá verde em infusão e o chá verde incorporado em cristal líquido liotrópico em modelo animal submetido a treinamento intervalado de alta intensidade / Vitor Nieri. – 2021.
78 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Grotto
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2021.

1. Chá. 2. Antioxidantes. 3. Cristais líquidos. 4. Exercício físico. I. Grotto, Denise, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Elaborada por Regina Célia Ferreira Boaventura – CRB-8/6179

Vitor Nieri

COMPARAÇÃO ENTRE O CHÁ VERDE EM INFUSÃO E O CHÁ VERDE INCORPORADO EM CRISTAL LÍQUIDO LIOTRÓPICO EM MODELO ANIMAL SUBMETIDO A TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Denise Grotto.

Sorocaba/SP
2021

Vitor Nieri

COMPARAÇÃO ENTRE O CHÁ VERDE EM INFUSÃO E O CHÁ VERDE INCORPORADO EM CRISTAL LÍQUIDO LIOTRÓPICO EM MODELO ANIMAL SUBMETIDO A TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba

Aprovado em: 26/02/2021

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Denise Grotto
Universidade de Sorocaba

Profa. Dra. Juliana Maria Oliveira Souza Reis
Centro Universitário Estácio Juiz de Fora

Prof. Dr. Marcelo Conte
Escola Superior de Educação Física de Jundiaí

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os profissionais de Educação Física que promovem qualidade de vida pelo exercício físico, e que lutam diariamente pelo reconhecimento da importância da sua atuação profissional no cuidado da saúde das pessoas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e através dela, os questionamentos que impulsionam todos os cientistas.

À minha querida orientadora professora Dra Denise Grotto que me acolheu, me inspirou e me motivou a dar esse importante passo na minha vida profissional e pessoal. Serei eternamente grato.

Ao professor Dr Marco Vinícius Chaud um grande amigo que, além de ser o meu maior exemplo do cientista que um dia eu almejo ser, me apresentou a minha querida professora orientadora supracitada.

À minha amada esposa Mariana Meira de Oliveira Nieri que suportou todas as dificuldades desse percurso e a minha filha Bárbara Oliveira Nieri, simplesmente por ser quem é e do jeito que é.

À minha mãe Albani Casoni Godinho Nieri e ao meu pai Roberto Nieri pela construção da base estrutural de quem eu sou hoje.

À minha irmã Cibeli Nieri e ao meu irmão Bruno Nieri por fazerem parte da minha vida.

Ao professor Felipe Teixeira Milano por ser desde a minha graduação, a minha maior referência na educação física, um grande amigo e um exemplo sem o qual eu não teria iniciado a minha trajetória acadêmica.

À Juliana Ferreira de Souza por aceitar o desafio e me acompanhar em grande parte desse projeto.

À Thaisa Borim Pickler por sempre estar disponível e disposta a ajudar.

Um agradecimento especial às minhas colegas Érika Leão Ajala Caetano e Fernanda Gomes Leite pelo grande apoio a todo momento desse projeto. Saibam que sem vocês, grande parte disso não teria acontecido. Vocês terão a minha eterna gratidão.

Á Talita Cristina Mena Segato pelo seu grande apoio no projeto.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma participaram, me inspiraram e me apoiaram durante todo esse percurso. Serei eternamente grato a todos.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”
(Albert Einstein)

RESUMO

O chá verde é, dentre as formas de extração e preparo, a que mais protege os constituintes naturais da planta *Camellia Sinensis*, um potente antioxidante natural. Contudo, após o preparo, sua atividade antioxidante está sujeita a ações de degradação oxidativa. Os sistemas a base de cristal líquido liotrópico (NP-CLL) são sistemas nano-particulados, auto-organizados e bioativos que podem proteger a degradação dos constituintes naturais do chá verde, além de otimizar a sua absorção e ação biológica por possuírem características biomiméticas. O exercício físico (EF) é benéfico a saúde, contudo aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). O treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) é uma modalidade de exercício conhecida pela alta produção de EROs e o consumo de antioxidantes é associado com a neutralização dos seus efeitos deletérios. Contudo, reações adaptativas ao EF são intermediadas por EROs e suprimi-las pode levar a redução de adaptações inerentes ao estímulo do EF. Assim, o objetivo foi avaliar o efeito do chá verde e do NP-CLL veiculando chá verde em modelo animal de exercício HIIT sob os parâmetros bioquímicos, estresse oxidativo, performance e de peso corporal. Três marcas comerciais tiveram sua atividade antioxidante avaliada e a marca com maior potencial foi utilizada para a preparação das NP-CLLs na combinação de monoleína (Myverol 18-99) como fase oleosa, chá como fase aquosa e polaxamer 407 como tensoativo. Ratos machos, Wistar, foram divididos aleatoriamente em 6 grupos: I - Controle; II - Chá verde; III – NP-CLL+Chá verde; IV – Exercício; V – Exercício + Chá verde; VI – Exercício + NP-CLL+Chá verde. Todos os animais que se exercitaram aumentaram a massa muscular e reduziram o ritmo de aumento do ganho de peso corporal em relação ao controle. Os animais do grupo V e do grupo VI ganharam mais massa muscular e condicionamento físico em relação ao grupo IV. Além disso, o grupo III mostrou redução no triglicerídeo e no ritmo de ganho de peso, resultados não encontrados no grupo II. Assim, a suplementação dos animais com chá verde e com NP-CLL+chá verde potencializou a performance, a hipertrofia muscular e a perda de peso dos animais submetidos ao HIIT. As NP-CLL+chá verde resultaram na melhora de parâmetros aos quais o chá verde não obteve efeito. Então, a suplementação de chá verde e de NP-CLL+chá verde não mostrou efeitos negativos em resposta ao HIIT e ainda potencializou os efeitos esperados do exercício. Além disso, a redução do triglicerídeos e no ritmo do ganho de peso encontrados no grupo III são promissores e precisam ser melhor investigados.

Palavras-Chave: Chá verde, Antioxidantes, Cristal Líquido Liotrópico, Treinamento intervalado de alta Intensidade.

ABSTRACT

Among the forms of extraction and preparation, green tea is the one that most protects the natural constituents of the Camellia Sinensis plant, a potent natural antioxidant. However, after preparation, its antioxidant activity is subject to oxidative degradation actions. Lyotropic liquid crystal systems (NP-CLL) are nano-particulate, self-organizing and bioactive systems that can protect the natural constituents of green tea from degradation, in addition to optimizing their absorption and biological action because they have biomimetic characteristics. Physical exercise (PE) is beneficial to health, however increases the production of free radicals. High intensity interval training (HIIT) is an exercise modality known for the high production of reactive oxygen species and the consumption of antioxidants is associated with neutralization of its deleterious effects. However, adaptive reactions to EF are mediated by reactive oxygen species and suppressing them can lead to a reduction in adaptations inherent to the PE stimulus. Thus, the objective was to evaluate the effect of green tea and NP-CLL carrying green tea in an animal model of HIIT exercise under the biochemical, oxidative stress, performance and body mass parameters. Three commercial brands had their antioxidant activity evaluated and the brand with the greatest potential was used for the preparation of NP-CLLs in the combination of monolein (Myverol 18-99) as oil phase, tea as aqueous phase and poloxamer 407 as surfactant. Male Wistar rats were randomly divided into 6 groups: I - Control; II - Green tea; III - NP-CLL + Green tea; IV - Exercise; V - Exercise + Green tea; VI - Exercise + NP-CLL + Green tea. All animals that exercised increased muscle mass and reduced the rate of increase in body weight gain compared to control. In addition, group III showed a reduction in triglycerides and in the rate of body weight gain, results not found in group II. Thus, supplementation of animals with green tea and with NP-CLL + green tea enhanced the performance, muscle hypertrophy and weight loss of animals submitted to HIIT. The NP-CLL + green tea improved parameters which green tea had no effect. So, supplementation of green tea and NP-CLL + green tea did not show any negative effects in response to HIIT and still potentiated the expected effects of exercise. In addition, the reduction in triglycerides and the pace of body weight gain found in group III are promising and need further investigation.

Key words: Green tea, Antioxidants, Lyotropic liquid crystal, High-intensity interval training.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – aminotransferase

AST - aspartato aminotransferase

ATP – Adenosina trifosfato

CAT – Catalase

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

CL – Cristal líquido

CLL – Cristal líquido liotrópico

DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

DTNB - 5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico

ED-XRF - Fluorescência de raios-X por dispersão de energia

EF – Exercício físico

EGCG - Epigalocatequina-3-galato

ER – Espécie reativa

ERN – Espécie reativa de nitrogênio

ERO – Espécie reativa de oxigênio

GSH – Glutationa reduzida

GSHPx – Glutationa peroxidaze

HDL – Lipoproteína de alta intensidade

HIIT – Treinamento intervalado de alta intensidade

LDH – Lactato desdigrogenagem

MDA - Malonaldeído

NP-CLL – Nano partículas de cristal líquido liotrópico

RBC – Contagem total de eritrócitos

RL – Radical livre

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

UNISO – Universidade de Sorocaba

WBC – Contagem total de leucócitos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A planta Camellia Sinensis, o Chá verde e a epigalocatequina-3-galato (EGCG).....13

Figura 2 - Produção de espécies reativas (ER), defesa antioxidante endógena e exógena, sua neutralização e suas consequências em condições de estresse oxidativo.....16

Figura 3 - Suporte de canos utilizados para individualizar a natação dos animais.....28

Figura 4 - Compartimentos individualizados aos quais os animais realizaram o treinamento.....29

Figura 5 - Pesos utilizados, da Esquerda para Direita: 3 g, 5 g, 10 g, 20 g, e bolsa utilizada para atar a carga ao tórax do animal.....30

Figura 6 - Animais dos grupos que não se exercitaram (Grupos I, II e III) em contato com uma lâmina de água.....30

Figura 7 - Evolução do peso dos animais ao longo das semanas.....56

Figura 8 - Avaliação hematológica representada pela média ± DP, sendo WBC (*White blood cells*), RBC (*red blood cells*), HGB (hemoglobina), HCT (hematócrito) e PLT (plaquetas).....57

Figura 9 - Avaliação bioquímica representada pela média ± DP. Em A) está representado o perfil hepático, composto por alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); em B) o perfil renal, com a ureia e creatinina; em C) a concentração de glicose, em D) a atividade da Lactato desidrogenase (LDH) e em E) o perfil lipídico, reportado pelo triglicerídeo, colesterol total e a lipoproteína de alta densidade (HDL).....59

Figura 10 - Análise dos parâmetros do estado redox, sendo catalase (A), glutationa peroxidase (GSH-Px) (B), glutationa reduzida (GSH) (C), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (D).....60

Figura 11 – Imagem histológica e Média ± DP da área das fibras musculares do tríceps sural dos grupos de animais estudados.....60

Figura 12 – Imagem histológica de porções do fígado dos grupos estudados.61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Evolução do treinamento dos animais ao longo das 5 semanas do experimento.....29
Tabela 2 - Evolução do Treinamento ao longo das 5 semanas do experimento (artigo).....52
Tabela 3 - Média ± DP dos saltos dos animais sob treinamento, ao longo das semanas.....58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
2 REVISÃO DE LITERATURA 13
2.1. O Chá Verde 13
2.1.2 Estresse oxidativo, doenças associadas e o chá verde 15
2.1.3 Chá verde, emagrecimento e performance 18
2.2. Cristal líquido liotrópico para veiculação de substâncias 19
2.3. Exercício Físico 20
2.3.2 Exercício intervalado de alta intensidade 22
3 OBJETIVOS 24
3.1 Geral 24
3.2 Específicos 24
4 MATERIAL E MÉTODOS 25
4.1 Delineamento do estudo 25
4.2 Seleção do chá verde e avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* 25
4.3 Análise de fluorescência de raios-X 26
4.4 Preparação, obtenção e avaliação dos cristais líquidos com chá verde 26
4.5 Seleção dos animais e protocolos de estudo 27
4.5.1 Análises hematológicas 31
4.5.2 Análises bioquímicas 31
4.5.3 Marcadores de estresse oxidativo 31
4.5.4 Análises histológicas 32
4.6. Análise estatística 33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
5.1. Parte 1 – Produção e avaliação das NP-CLLs 35
5.2. Parte 2 – Estudo *in vivo* 45
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 70
REFERÊNCIAS 71
ANEXO I – Certificado de aprovação em CEUA-UNISO 78

1 INTRODUÇÃO

O chá é a segunda bebida mais consumida mundialmente depois da água. Os chás da planta *Camellia sinensis* são classificados basicamente em três tipos, os quais são diferenciados pelo beneficiamento das folhas: preto, oolong e verde. O chá verde é o menos processado, com coloração característica e maior preservação dos seus nutrientes (TAHANI; SABZIAN, 2018). Os chás desta planta são ricos em polifenóis, que totalizam 30% do peso das folhas secas; sendo assim o chá verde um potente antioxidante (LAMARÃO; FIALHO, 2009). Contudo, devido aos seus compostos químicos serem instáveis, tanto o chá quanto o extrato ficam expostos a reações, principalmente reações de oxidação, que podem levar a uma redução ou perda do seu efeito.

O cristal líquido (CL) é um estado da matéria compreendido entre o sólido e o líquido. Ele é classificado, principalmente, em termotrópico e liotrópico. Dentre as fases do cristal líquido liotrópico (CLL) derivado das diferentes misturas óleo e água, se encontram a lamelar, hexagonal e cúbica (SILVA, *et al.*, 2017). Os sistemas a base de CL são utilizados como uma alternativa farmacotécnica para veicular substâncias ativas, dando a elas uma maior estabilidade e durabilidade, além de possuírem propriedades biomiméticas (CHAUDHARY, KANNOJIA & MISHRA, 2016), podendo oferecer uma maior biodisponibilidade além de proteção da oxidação dos fenóis presentes no chá.

Há consenso, na comunidade científica, sobre os benefícios preventivos da atividade física regular e da sua influência na promoção de saúde. A Organização Mundial da Saúde (OMS), em sua última recomendação, orienta para adultos um mínimo de 150 minutos de atividade física aeróbia com moderada intensidade, ou 75 minutos de atividade aeróbia com alta intensidade, durante a semana. Tal recomendação auxilia na redução da mortalidade em geral, no tratamento e prevenção de doenças coronarianas, hipertensão arterial, acidente vascular encefálico, síndrome metabólica, câncer de cólon e de mama e depressão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Contudo, o exercício físico pode implicar em maior utilização de macro e micronutrientes, entre eles os nutrientes envolvidos no sistema de defesa antioxidante (PACKER, 1997; LUKASKI, 2004). O exercício é benéfico, porém

quando não são considerados os limites fisiológicos, o nível de treinamento do indivíduo e as fases de adaptação do organismo ao estímulo, a atividade pode trazer problemas ao praticante, como o aumento na produção de radicais livres (RL) e consequente diminuição na reserva antioxidante. Esses RLs, se não neutralizados, podem levar a um processo deletério nas células e tecidos, conhecido como estresse oxidativo (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004). O excesso de RL pode oxidar o DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos (AL-KHARASHI, 2018).

Entre as modalidades de exercício físico, o exercício intervalado de alta intensidade (*HIIT,* sigla do inglês) é caraterizado pela execução de movimentos por curtos períodos com alta intensidade seguidos de períodos curtos de intervalo ou de exercícios de baixa intensidade. Nesse modelo de exercício, a ressíntese de ATP (Adenosina Trifosfato) muscular se dá de forma anaeróbia prioritariamente, em uma velocidade inferior à sua quebra, levando ao comprometimento da contração muscular e consequente perda da eficiência do movimento (MACINNIS; GIBALA, 2017).

O treinamento físico acompanhado de uma baixa ingestão antioxidante representa ao praticante de exercício um estado de maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo (WATSON *et al.*, 2005). Por outro lado, foi proposto que a completa neutralização de RL produzidos durante o exercício pode inibir reações fisiológicas necessárias a adaptações celulares específicas, em resposta ao estresse do exercício (GOMEZ-CABRERA *et al.*, 2005), (LAUER *et al*., 2005). No Brasil, o consumo do chá verde é frequentemente associado a uma dieta saudável e consumido com frequência por praticantes de exercício físico fazendo com que esses praticantes tenham acesso ao efeito antioxidante da planta (DUARTE *et al*., 2014).

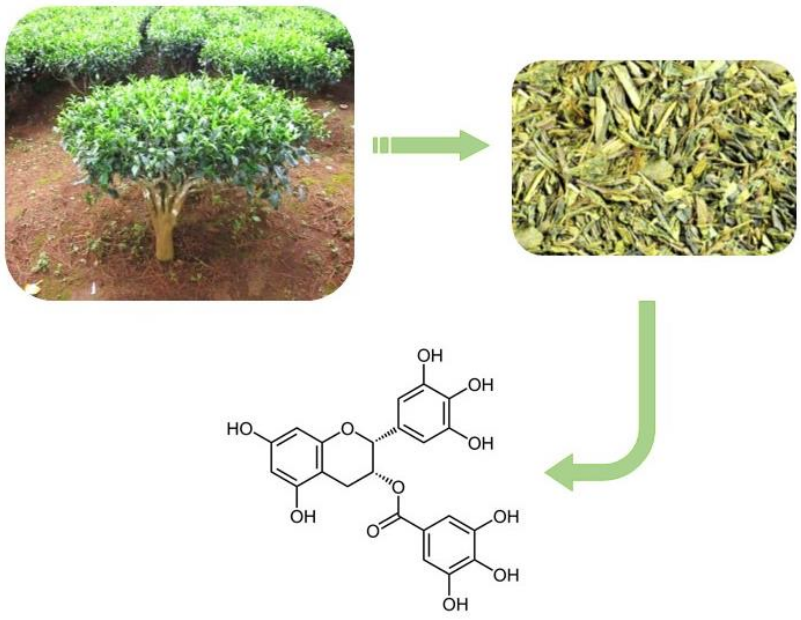
Sendo assim, este trabalho tem dois escopos: o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que protejam os polifenóis do chá verde da oxidação assim como aumentem a sua biodisponibilidade; e a avaliação da importância das espécies reativas de oxigênio (EROs) na adaptação fisiológica natural do organismo frente ao estresse do exercício físico em ratos, quando suplementados com antioxidante. Os resultados dessa pesquisa serão aqui apresentados no formato de artigo científico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Chá Verde

A *Camellia sinensis* é uma planta medicinal de origem chinesa da qual são extraídos vários tipos de chás, que são classificados de acordo com sua coloração. O chá preto, o chá oloong e o chá verde são os principais, alterando a sua coloração de acordo com seu processamento e fermentação, indo do chá preto (o mais fermentado) até o chá verde que é o menos processado, garantindo seu sabor característico e apresentando maior preservação dos seus nutrientes naturais passíveis de oxidação, principalmente os polifenóis (ZHENG *et al.*, 2016). Os polifenóis totalizam cerca de 30% do peso das folhas secas, sendo as catequinas responsáveis por cerca de 70% deles, tornando o chá verde um potente antioxidante natural. Dentre as catequinas, a epigalocatequina-3-galato (EGCG) é a de maior predominância no chá verde (Figura 1), respondendo por 65% do conteúdo total de catequinas do chá (GOPAL *et al.*, 2016), podendo sofrer variações de acordo com as características do solo e clima ao qual a planta foi plantada, tempo de vida na colheita e o processamento das folhas colhidas (DEKANT *et al.*, 2017).

Figura 1: A planta *Camellia sinensis*, o Chá verde extraído de suas folhas e talos e a epigalocatequina-3-galato (EGCG), principal polifenol do chá verde.



Fonte: Elaboração própria

No Brasil, entre as outras formas de apresentação, o chá verde é comercializado principalmente acondicionado em saquinhos de papel de filtro (SAITO *et al*., 2007a, b). Tradicionalmente, o chá verde é consumido através da infusão de suas folhas em água quente. Nos últimos anos o consumo do extrato de chá verde em cápsulas tornou-se popular, mostrando-se uma alternativa prática e rápida para as pessoas que buscam os benefícios do consumo do chá verde (GRUENWALD; BRENDLER; JAENICKE, 2000).

O chá verde possui propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, anticarcinogênicas, anti-hipertensivas, neuroprotetoras, redutoras de colesterol e termogênicas (HAYAT *et al.*, 2015). A ação anti-inflamatória da EGCG foi visualizada em um experimento com camundongos submetidos à obstrução uretral unilateral. A dosagem diária de 5 mg/kg de EGCG foi administrada através de injeção intraperitoneal por 14 dias. Como resultado, observou-se a inibição de respostas inflamatórias, menor presença de macrófagos e a redução da produção de citocinas inflamatórias (WANG *et al.,* 2015). Ratos *Wistar* submetidos a uma dieta hipertensiva (adição diária de 35 mg de cloreto de sódio) por 42 dias, tiveram uma redução na pressão arterial sistólica com a suplementação de 2 e 4 g/kg/dia de chá verde. Além disso, o consumo de 4 g/kg/dia de chá verde reduziu a pressão arterial diastólica (SZULIŃSKA *et al.,* 2017).

Contudo, há estudos também relatando toxicidade hepática em culturas de hepatócitos (SCHMIDT *et al.*, 2005) e *in vivo* (GALATI *et al.,* 2006). Em ensaios clínicos, a maioria dos estudos relatam irritação gástrica, náuseas, diarreias e vômitos quando o chá verde é ofertado em doses altas e/ou por longos períodos (MAZZANTI; DI SOTTO; VITALONE, 2015). De fato, há a associação de valores bioquímicos altos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) quando o seu uso é feito por longos períodos. Porém, os estudos que relacionam o seu consumo à lesão hepática são poucos e seu efeito cessa após a interrupção do consumo do extrato do chá verde (NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2012). Essa hepatoxicicidade não é observada quando o seu consumo é feito de forma tradicional, em infusão (DEKANT *et al.*, 2017).

Não há consenso na literatura quanto à dose máxima recomendada de chá verde. Há uma grande variação de recomendações de uso diário, desde 35 mg/dia (FRANÇA, 2012) até 1.600 mg/dia (BÉLGICA, 2012). Um estudo de desenvolvimento de limite superior de ingestão tolerável concluiu que o consumo de extrato de chá verde de até de 300 mg/dia é considerado seguro (YATES *et al*., 2017, GRUENWALD; BRENDLER; JAENICKE, 2000). Quanto ao chá na forma de bebida, o limite de 704 mg/dia não deve ser extrapolado (HU *et al.,* 2018) sendo que uma xícara de chá verde (250 mL) contém entre 100 a 300 mg de catequinas totais, e entre 50 e 90 mg de cafeína, dependendo do modo de cultivo e extração da planta (ASTILL *et al.*, 2001).

Vale ressaltar que as cápsulas de extrato de chá verde contêm altas concentrações dos princípios ativos do chá, e seu registro como medicamento fitoterápico na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não foi permitido (MOUTINHO, 2017). Apesar da comercialização como fitoterápico ser proibida, algumas empresas conseguiram o registro de uso do chá na categoria de “novos alimentos e novos ingredientes”. Assim, as cápsulas de extrato de chá verde são de fácil acesso à compra, mesmo não havendo consenso quanto à dose diária recomendada.

2.1.2 Estresse oxidativo, doenças associadas e o chá verde

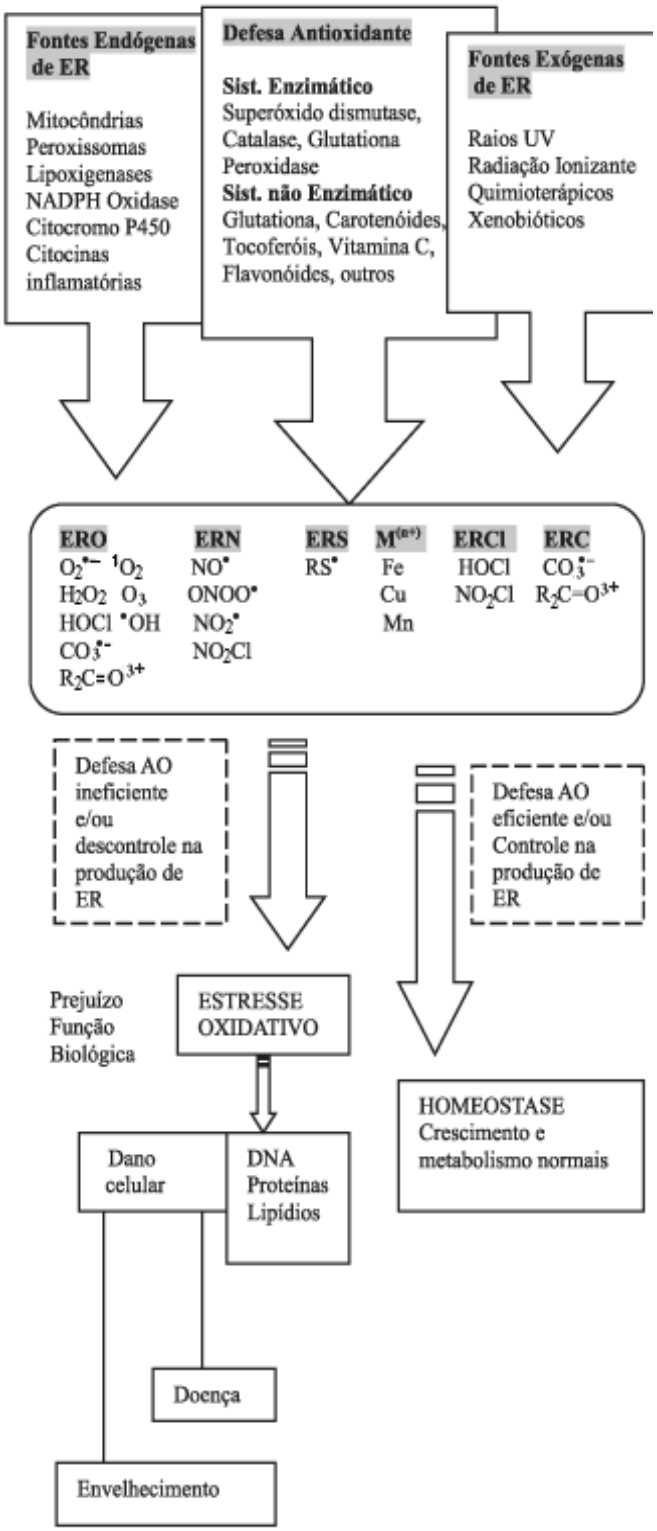
As propriedades antioxidantes do chá verde o colocam na posição de prevenir e até auxiliar no tratamento de várias doenças associadas a produção de espécies reativas (ERs). Entre as ERs, se destacam pela sua maior produção e atuação fisiológica as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) (Figura 2), que podem ser radicalares ou não (VASCONCELOS *et al.*, 2007). As EROs são formas reduzidas de oxigênio, energeticamente mais reativas, que interagem com moléculas próximas, produzindo uma reação em cadeia. Elas são produzidas em condições normais e de estresse, principalmente pela mitocôndria celular. Em condições normais há um equilíbrio entre a produção de ERs e sua neutralização pelos sistemas antioxidantes. Entretanto, em condições de alta produção ou de baixa capacidade de neutralização, se estabelece o quadro de estresse oxidativo (Figura 2) (MARTELLI; NUNES, 2014).

O estresse oxidativo pode causar uma variedade de lesões celulares que vão desde a membrana, podendo chegar ao seu material genético. Ele está direta e indiretamente associado com várias doenças metabólicas como diabetes mellitus, dislipidemias, doenças cardíacas, além de vários tipos de câncer (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A ação do chá verde como antioxidante na prevenção e tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo tem sido amplamente estudada. Resultados mostram que as catequinas do chá verde afetam a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como os Fatores de Crescimento Tumoral (TNF-α) e Interleucina-1 beta (IL-1β). As catequinas atuam inibindo a peroxidação lipídica e são eficientes em reagir contra as EROs (OHISHI *et al.*, 2016).

Embora haja certa controvérsia em relação a atuação do chá verde na prevenção e tratamento da diabetes mellitus do tipo II, a maioria dos estudos mostram uma correlação positiva sobre o consumo e a redução do risco de desenvolver a doença (YANG *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2014). Mulheres com excesso de peso utilizaram o chá verde em comparação à metformina, fármaco hipoglicemiante também utilizado com adjuvante no tratamento e prevenção de complicações associadas à obesidade. O chá verde mostrou eficiência em reduzir a glicemia de jejum, o colesterol total e a lipoproteína de baixa densidade (LDL, *Low Density Lipoprotein)* quando comparado à metformina (ALVES FERREIRA *et al.*, 2017). Em outro estudo duplo cego e cruzado, pacientes com idade entre 21 e 71 anos, suplementados com 250 mg de extrato de chá verde, apresentaram redução no nível de colesterol total e LDL em comparação ao placebo (BATISTA *et al.*, 2009).

Figura 2: Produção de espécies reativas (ER), defesa antioxidante endógena e exógena, sua neutralização e suas consequências em condições de estresse oxidativo.



Fonte: VASCONCELOS *et al.*, 2007

Também há promissoras evidências na literatura sobre o chá verde e a prevenção de vários tipos de câncer (YUAN; SUN; BUTLER, 2011; KHAN; MUKHTAR, 2018). Em revisões sistemáticas e meta-análises, o consumo do chá

verde foi associado com a prevenção de câncer de próstata (GUO *et al.*, 2017), prevenção principalmente da reincidência de câncer de mama (GIANFREDI *et al.*, 2018) e redução do risco de câncer no estômago (HUANG *et al.*, 2017).

2.1.3 Chá verde, emagrecimento e performance

Além de todo o potencial para tratamento e prevenção de doenças, o chá verde tem sido utilizado para controle do peso. Pela sua quantidade de cafeína e de polifenóis, a ele é atribuído um efeito termogênico que eleva o gasto calórico, facilitando a manutenção e até perda de peso (SELLAMI *et al.*, 2018). Em cultura celular tratada com EGCG, esse efeito foi visto através de redução da viabilidade de adipócitos, redução da proliferação de pré-adipócitos, supressão da diferenciação de adipócitos e acúmulo de triglicerídeos, além de estímulo da lipólise e da β-oxidação de ácidos graxos (HUNG *et al.,* 2005), (CHAN *et al.,* 2011).

Em ensaios clínicos, os estudos são controversos. Em um estudo, 240 indivíduos com sobrepeso e acúmulo de gordura visceral foram divididos em 2 grupos e acompanhados por 12 semanas. Eles foram orientados a manter os seus hábitos alimentares, acrescentando a ingestão diária de uma bebida pronta a base de chá verde. O grupo que consumiu 583 mg de catequinas por dia reduziu a gordura corporal, pressão arterial sistólica e o colesterol em comparação ao grupo que consumiu 96 mg de catequinas (NAGAO; HASE; TOKIMITSU, 2007). Já em outro estudo, 60 indivíduos consumiram diariamente cápsulas com 560 mg de EGCG + 280 a 450 mg de cafeína ou placebo e, ao final de 12 semanas não apresentaram diferenças significativas na composição corporal (JANSSENS; HURSEL; WESTERTERP-PLANTENGA, 2015). Apesar dos estudos serem controversos, a combinação de polifenóis com cafeína, desde que o consumo de cafeína não seja habitual, parece promissora e precisa ser mais investigada (SUZUKI *et al.*, 2016).

O suposto efeito das catequinas do chá verde na performance física está diretamente associado ao seu possível efeito de emagrecimento. O consumo de 90 mg de EGCG + 50 mg de cafeína, 3 vezes ao dia, em 10 homens saudáveis, aumentou em 4% o gasto energético em 24 horas quando comparado ao placebo (DULLOO *et al.*, 1999). O maior gasto energético foi associado ao efeito

termogênico e à liberação de catecolaminas que induzem maior mobilização lipídica à sua utilização como substrato energético (WOLFRAM; WANG; THIELECKE, 2006). Essa maior mobilização lipídica oferta ao músculo uma quantidade maior de substrato energético para a construção de ATP, mantendo a execução do exercício de resistência por mais tempo (ICHINOSE *et al.*, 2011; VENABLES *et al.,* 2008). Sendo assim, a maior mobilização de lipídeos está relacionada com o aumento de performance em atividades predominantemente aeróbia e ao emagrecimento.

Em concordância a isso, a suplementação diária de 375 mg de extrato de chá verde em 70 indivíduos com sobrepeso, por 12 semanas, aumentou o gasto energético e a oxidação de lipídeos (CHANTRE; LAIRON, 2002). Em um experimento de dez semanas com camundongos submetidos à natação, a adição de 0,5% de extrato de chá verde sobre a dieta padrão dos animais aumentou em 24% o tempo de exercício até a exaustão, quando comparado aos animais que não foram suplementados com extrato de chá verde. Além disso, o grupo com o chá verde aumentou a β-oxidação no músculo, indicando uma maior mobilização e oxidação de gordura (MURASE *et al.,* 2005). Esses resultados indicam uma associação positiva do consumo de chá verde com uma maior mobilização de gordura e um melhor desempenho em exercícios predominantemente aeróbios.

2.2. Cristal líquido liotrópico para veiculação de substâncias

O CL é um estado da matéria compreendido como intermediário entre o sólido cristalino e o líquido isotrópico. Ele possui tanto propriedades físicas anisotrópicas quanto líquidas isotrópicas. Sua classe é dividida em termotrópico, no qual sua fase de transição depende da variação da temperatura, e liotrópico, dependente da adição de um solvente, além da temperatura (DIERKING; AL-ZANGANA, 2017). Os sistemas de nanopartículas de cristal líquido liotrópico (NP-CLL) são sistemas nano estruturados, auto-organizados, utilizados para a incorporação de substâncias ativas.

As NP-CLL são obtidas pela combinação de moléculas anfifílicas, co-surfactantes e solventes em uma certa concentração a uma certa temperatura. Dentre as fases conhecidas do CLL derivado das diferentes misturas óleo e

água, se encontram a lamelar, a hexagonal e a cúbica. O potencial das NP-CLL, em especial as fases hexagonal e cúbica, tem sido alvo de estudos (CHEN; MA; GUI, 2014).

As estruturas de fases do CL são frequentemente encontradas em animais, plantas e bactérias (DE SOUZA *et al.*, 2017). Assim, as características biomiméticas tornam os sistemas a base de NP-CLL uma importante estratégia para incorporação de substâncias bioativas, dando a elas uma maior estabilidade e durabilidade, se mostrando superiores aos sistemas tradicionais de veiculação (CHAUDHARY, KANNOJIA & MISHRA, 2016). Comparado ao lipossoma tradicional, ao qual permite apenas a incorporação de fármacos hidrofílicos e liberá-lo imediatamente após rompimento de sua membrana, os sistemas a base de NP-CLL podem carrear simultaneamente fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, proteger o fármaco de degradações durante a sua passagem pelo sistema digestório e garantir a sua liberação sustentada (SHEN; DIERKING, 2019).

O interesse no desenvolvimento de tecnologias que protejam os constituintes naturais de plantas da oxidação vem crescendo. Recentemente foi publicado um artigo ao qual foi utilizado NP-CLL preparadas com monooleína + hidrótropo para veiculação de extrato de planta, contendo resveratrol e pemetrexed, fármacos utilizados para tratamento de câncer pulmonar. O grupo concluiu que as NP-CLL + resveratrol + pemetrexed são uma grande promessa para o tratamento de câncer de pulmão (ABDELAZIZ *et al.*, 2019).

Em outro estudo, NP-CLL carregadas com extrato de chá verde foram desenvolvidas, caracterizadas e avaliadas *in vivo* para tratamento de inflamação na pata de roedores. Os resultados mostraram que a emulsão atingiu os mesmos resultados que o controle positivo, tratados com dexametasona, com diminuição significativa do edema após 4 horas da sua utilização, mostrando a eficiência do sistema e da atuação dos antioxidantes presentes no chá verde (SILVA *et al.*, 2017).

2.3. Exercício Físico

Há consenso na comunidade científica sobre os benefícios da atividade física regular e da sua influência na promoção de saúde. O *American College of*

Sports Medicine (ACSM), em associação com a *Amercian Heart Association* (AHA), em sua última recomendação, preconiza que, além de atividades de manutenção e aumento de massa muscular, um mínimo de 150 minutos de atividade física aeróbia de intensidade moderada por cinco sessões semanais, ou 20 minutos de atividade física aeróbia de alta intensidade por três sessões semanais devem ser feito por adultos saudáveis entre dezoito e sessenta e cinco anos para prevenção de doenças e manutenção da saúde. Combinações entre as intensidades podem ser feitas para atingir o mínimo recomendado (RIEBE *et al.*, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda um mínimo de 150 minutos de atividade física aeróbia com moderada intensidade, ou 75 minutos de atividade aeróbia com alta intensidade durante a semana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Recentemente, frente a pandemia mundial da COVID-19 e da importância da atividade física regular na saúde física e mental, a OMS lançou um guia de exercícios físicos a serem realizados em casa. Esse guia visa o acesso e a manutenção dos benefícios da prática do exercício físico regular durante a pandemia e o isolamento domiciliar (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

De uma forma simplificada, os exercícios podem ser classificados entre contínuo ou intervalado. Contudo, a classificação mais utilizada nos dias atuais tem relação direta quanto à forma a qual se é reconstituído o ATP, pois uma mesma modalidade esportiva pode ser executada das duas maneiras, dependendo da utilização de variáveis do treinamento como intensidade e volume na sessão de exercício. Durante o exercício, a demanda por energia aumenta o ritmo de quebra do ATP muscular, exigindo que haja a sua reposição. Essa reposição pode ser feita de forma aeróbia (na presença de oxigênio) ou anaeróbia (sem a presença do oxigênio) (CAPUTO *et al.,* 2011). Durante o exercício de característica predominantemente aeróbia, a quebra de ATP é feita em um ritmo menor, ofertando tempo suficiente para que o organismo o reconstrua no mesmo ritmo ao qual ele é quebrado. Essa reconstrução acontece na mitocôndria celular utilizando carboidratos, lipídeos e, se necessário, aminoácidos como substratos (VAN LOON *et al.*, 2001). Por característica, os exercícios aeróbios são realizados de leve a moderada intensidade, podendo ser

realizados de forma contínua e possuir longa duração.

A alta velocidade de quebra de ATP em exercícios vigorosos esgota rapidamente os seus estoques e demanda uma alta velocidade de construção do ATP que, por ofertar uma construção mais rápida, é feita prioritariamente de forma anaeróbia. Contudo, o sistema anaeróbio de reconstrução, seja ele alático (ADP + CP + H^+ → ATP + creatina) ou lático (glicogênio + 3 ADP → 2 lactato + 2 H^+ + 3 ATP), tem uma capacidade limitada, levando à interrupção do movimento voluntário após um curto período de exercício. Sendo assim, os exercícios ditos anaeróbios são geralmente realizados de forma intervalada (HARGREAVES; SPRIET, 2018). Essas características são observadas na execução do *HIIT.*

2.3.2 Exercício intervalado de alta intensidade

O *HIIT* (do inglês *High-Intensity Interval Training)* se caracteriza pela execução de movimentos por curtos períodos, com alta intensidade, seguido de períodos curtos de intervalo ou de exercícios de baixa intensidade. É comumente prescrito com exercícios de características aeróbias como esteiras e bicicletas ergométricas (FEITO, 2018), mas também pode ser realizado pela combinação de movimentos corporais, como agachar e saltar, mantendo ciclos de exercícios intensos seguidos por de baixa intensidade ou por curtos períodos de descanso. Nesse modelo de exercício, a ressíntese de ATP ocorre prioritariamente de forma anaeróbia, gerando o aumento do lactato a níveis maiores do que sua capacidade de remoção. O mesmo não acontece quando é feito o exercício de baixa intensidade, em que a concentração de lactato sanguíneo fica próxima aos parâmetros de repouso (GOMES, 2003).

O *HIIT* é um treinamento dinâmico que atrai praticantes que buscam a realização do seu exercício em tempos menores. Efeitos psicológicos positivos podem explicar a sua maior adesão em comparação ao método de treinamento contínuo (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Porém, devido a sua alta intensidade, uma única sessão de *HIIT* altera o estado redox em comparação ao treinamento tradicional (JAMURTAS *et al.*, 2018). Sobre o seu efeito no longo prazo, um estudo comparou o estado redox de ratos submetidos a duas modalidades de exercício. Uma das modalidades era com característica aeróbia e outra com

característica anaeróbia, por dez semanas. Após esse período, o grupo submetido ao treinamento de *HIIT* apresentou redução no *status* pró-oxidante muscular quando comparação ao treinamento tradicional (GROUSSARD *et al.*, 2019).

Sabe-se que o exercício físico produz EROs e há receio na sua possível ação maléfica no organismo. O consumo de antioxidantes é relacionando com a neutralização de reações deletérias causadas por RLs e EROs. Em concordância a isso, um estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo foi realizado com dez homens obesos e sedentários, suplementados com extrato de chá verde. Esses homens foram submetidos ao treinamento de força por quatorze dias. Eles apresentaram uma redução no dano do DNA produzido pelo exercício atribuído a suplementação diária de 500 mg do extrato de chá verde (RAHIMI; FALAHI, 2017). Em um estudo com corredores treinados, suplementados com 980 mg de polifenóis diariamente, a redução dano do DNA foi observada após 4 semanas de treinamento de *HIIT* (JOWKO *et al.*, 2014). Contudo, considerando que as adaptações fisiológicas e o equilíbrio natural no estado redox são naturalmente atingidos após um período de treinamento, e que os antioxidantes possuem o potencial de modular as adaptações do exercício físico de forma positiva ou negativamente (ROTHSCHIILD; BISHOP, 2020), o consumo de antioxidantes pode ser desnecessário.

Uma revisão analisando os efeitos da suplementação de vitamina C e E na performance e no estado redox concluiu que o consumo contínuo desses antioxidantes em dosagens supra-fisiológicos não é recomendado para indivíduos saudáveis que praticam exercícios físicos (NIKOLAIDIS *et al.,* 2012). Isso porque os RLs produzidos em resposta ao estresse do exercício se mostram necessários para as adaptações fisiológicas e celulares específicas e sua supressão resultaria em prejuízo ao aumento do condicionamento físico e consequente adaptação ao treinamento submetido (PETERNELJ; COOMBES, 2011).

Sendo assim, o efeito protetivo da suplementação de antioxidante, além de desnecessário, pode ser prejudicial a melhora fisiológica natural dos sujeitos submetidos a treinamento, principalmente ao *HIIT*, e precisa ser melhor esclarecido.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito do chá verde e das nano partículas de cristal líquido liotrópico (NP-CLL) veiculando chá verde no modelo de exercício de alta intensidade com curta duração, sob os parâmetros bioquímicos, histológicos, de performance, de composição corporal e estado redox.

3.2 Específicos

- Avaliar, *in vitro,* a capacidade antioxidante de diferentes marcas comerciais de chá verde e dos cristais líquidos produzidos com chá verde;

- Desenvolver uma formulação de NP-CLL contendo chá verde, e avaliá-la quanto ao potencial de proteção à oxidação;

- Otimizar o modelo experimental de exercício físico de alta intensidade com curta duração;

- Avaliar o efeito do chá verde e das NP-CLLs contendo chá verde sobre os parâmetros bioquímicos, de estresse oxidativo e histológico em ratos sob exercício físico;

- Comparar os resultados encontrados para o chá verde com os resultados encontrados para as NP-CLLs contendo o chá verde.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo pré-clínico, em que ratos foram avaliados quanto ao seu estado redox em um protocolo de exercício físico com e sem ingestão de chá verde, e com o chá verde veiculado em cristal líquido liotrópico.

4.2 Seleção do chá verde e avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

Três diferentes marcas comerciais de chá verde em sachês contendo apenas folhas e talos de chá verde, posto que a sua associação com outros ingredientes que visam atenuar o sabor adstringente do chá é comum, foram adquiridas em comércios da região para avaliação da capacidade antioxidante. Para o preparo do chá, o conteúdo foi retirado dos seus sachês e as infusões foram preparadas na proporção de 1 g para 75 mL de água filtrada, a uma temperatura de 90º C, por 5 minutos sob agitação (CRUZ *et al.,* 2010).

Para a avaliação da capacidade antioxidante, alíquotas de 250 µL de cada amostra do chá foram adicionadas a 750 µL de solução etanólica (70% v/v) de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) 0,1 mM. A absorbância, em 515 nm, foi medida nos tempos zero, 15, 30, 45 e 60 minutos em espectrofotômetro (MultiSpec-1501, SHIMADZU®). Como controle, 250 µL de etanol 70% foram adicionados a 750 µL de solução de DPPH (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, BERSET, 1995).

A capacidade da substância em sequestrar o radical DPPH foi expressa como percentual de inibição, calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de Inibição} = \frac{Abs^1 - Abs^2}{Abs^1} \times 100$$

Em que: Abs^1 = absorbância do controle

Abs^2 = absorbância da amostra

A amostra que apresentou maior potencial antioxidante foi utilizada para a produção das NP-CLLs e para o experimento *in vivo*.

4.3 Análise de fluorescência de raios-X

As diferentes amostras comerciais de chá verde foram analisadas para a quantificação da presença de metais utilizando fluorescência de raios-X por dispersão de energia (ED-XRF). Como o equipamento realiza a leitura em amostra sólida, alíquotas de 3 g de cada amostra comercial de chá verde foram utilizadas para confecção de pastilhas. Essas pastilhas tinham aproximadamente 3 mm de altura, e foram compactadas utilizando máquina de compressão ajustada para carga de 15 toneladas. Para a calibração do sistema de fluorescência, foram feitos conjuntos de pastilhas contendo concentrações conhecidas para os principais elementos químicos de interesse. As análises de fluorescência foram realizadas usando um sistema com fonte de raios-X portátil com alvo de prata e Detector de Silício Drift (SDD) (Amptek Inc., Bedford, Massachusetts, EUA).

4.4 Preparação, obtenção e avaliação dos cristais líquidos com chá verde

O delineamento experimental do estudo foi realizado em escala laboratorial, no Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia da Universidade de Sorocaba (LaBNUS), situado no Parque Tecnológico de Sorocaba (PTS), com auxílio do Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud e da doutoranda Juliana Souza. As nanopartículas de cristal líquido liotrópico (NP-CLL) com chá verde foram preparadas como descrito por Souza (2017). Resumidamente, os sistemas baseados em emulsão precursores de NP-CLL foram preparados na mistura de monoleína (Myverol 18-99) como fase oleosa, chá verde como fase aquosa e polaxamer 407 (uma substância tensoativa usada em concentração suficiente para aumentar a hidrofilicidade do sistema), abaixo da concentração micelar crítica, na proporção de 53,6:35,7:10,7 m/m, respectivamente.

O chá verde em infusão passou pelo processo de liofilização, sendo posteriormente diluído em água para a incorporação ao sistema. A razão mássica entre lipídeo/chá verde e hidrótropo foi definida previamente por uma superfície de resposta do tipo diagrama pseudoternário. A mistura foi realizada sob aquecimento (50°C) e agitada em banho de ultrassom (frequência de 40

kHz) (Unique, USC-3300. Indaiatuba, Brasil) durante 5 minutos. A formulação foi analisada macroscopicamente e por microscopia de luz polarizada. A avaliação macroscópica foi realizada pela classificação descrita por Silva et al., (2017) em sistemas viscosos com aspecto translúcido ou opaco, líquidos com aspecto translúcido ou opaco e separação de fases. A microscopia de luz polarizada foi utilizada para avaliar a ausência ou presença de anisotropia, formação de lamelas e estruturas de CLL. A análise foi realizada em microscópio (Nikon, Eclipse E800. Tóquio, Japão) com modo polarizado, com contraste em modo ampliado e resolução em alta exposição para ajuste de nitidez e as micrografias foram capturadas com câmera (Nikon, DS-r 1. Tóquio, Japão) com auxílio do Software NIS-Elements.

4.5 Seleção dos animais e protocolos de estudo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Sorocaba (CEUA-Uniso), protocolo nº 152/2019. Após a aprovação, todos os procedimentos seguiram o guia ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) de recomendação para pesquisa envolvendo animais (PERCIE du SERT *et al.,* 2020).

Ratos machos Wistar, pesando entre 160-180g, e com 6 semanas de idade, foram adquiridos da Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio, Paulínia – SP. Um total de 36 animais foram distribuídos de maneira randomizada, utilizando tabela de números aleatórios, em 6 grupos (n = 6 por grupo):

Grupo I – Controle;

Grupo II - Chá verde (via gavagem);

Grupo III – NP-CLL veiculando chá verde (via gavagem);

Grupo IV – Exercício;

Grupo V – Exercício + Chá verde (via gavagem);

Grupo VI – Exercício + NP-CLL veiculando chá verde (via gavagem).

Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Laboratório de Pesquisa Toxicológica (Lapetox-Uniso), em gaiolas ventiladas, aclimatadas e forradas com maravalha, seguindo as normas de bem-estar animal. A temperatura e o ciclo claro/escuro foram controlados automaticamente

em 22 ± 2°C e 12 h, respectivamente. Os animais receberam ração e água *ad libitum*.

Para a execução do experimento, um dispositivo foi construído com seis canos de 200 mm por 60 cm de altura sobre um suporte metálico telado. Esse suporte foi usado para colocar e retirar os animais da água, ao mesmo tempo (figura 3). Assim, o grupo todo se exercitava nas mesmas condições.

Figura 3: Suporte de canos utilizados para individualizar a natação dos animais.

Fonte: Elaboração própria.

Esse suporte era colocado e retirado de uma cuba de inox, com água aquecida a 31 ± 1º C. A profundidade era suficiente para cobrir o corpo todo do animal na posição ereta, em compartimentos individualizados no qual os animais se exercitaram (figura 4).

Previamente ao treinamento, os animais foram submetidos a uma semana de adaptação à água por quatro dias consecutivos, com aumento gradativo de carga até o percentil proposto. Após a adaptação, os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento intervalado de alta intensidade adaptado de SILVA (1999), alterando a sobrecarga sobre o peso corporal do animal de 50% para 25%, a frequência média de sessões de treinamento semanal de 5 para 3 e o número de sequências de 10 para de 5 a 8 por sessão. Os exercícios ocorreram ao longo de 5 semanas, com uma média de 3 sessões semanais (tabela 1). Durante o exercício, foi contabilizado a quantidade de saltos individuais de cada animal, e depois feita a análise dentro de cada grupo.

Figura 4: Compartimentos individualizados aos quais os animais realizaram o treinamento.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 1: Evolução do treinamento dos animais ao longo das 5 semanas do experimento.

Semana	Sessões Semanais	Séries	Tempo Exercício	Tempo Intervalo
1	3	5	30''	1'
2	4	5	30''	1'
3	3	6	30''	1'
4	3	7	30''	1'
5	2	8	30''	1'

Fonte: Elaboração própria.

Os animais executaram de 5 a 8 séries de 30 segundos de nado seguido de salto forçado, com um intervalo de 1 minuto de descanso entre as séries. Houve adição de 25% (± 3 gramas) de sobrecarga sobre o peso total do animal. Os pesos foram colocados em uma bolsa de lycra produzida com fecho em velcro, e atada ao tórax do animal (figura 5).

O peso do animal foi aferido semanalmente, para correção da adição da carga, ao longo do experimento. As administrações via gavagem de chá verde (2 mL), NP-CLL (0,35 g da emulsão diluídos logo antes da administração em 2

mL de água filtrada) ou água filtrada (2 mL) foram dadas nos mesmos dias do exercício físico. Os animais que não estavam em grupos de exercício (Grupos I, II e III) tiveram contato com uma lâmina de água pelo mesmo tempo que os animais em exercício (figura 6). Já os grupos que não recebiam chá ou NP-CLL veiculando chá receberam água via gavagem nos mesmos dias e horários (9:30h ± 30 min) que os outros grupos.

Figura 5: Pesos utilizados, da Esquerda para Direita: 3 g, 5 g, 10 g, 20 g, e bolsa utilizada para atar a carga ao tórax do animal.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 6: Animais dos grupos que não se exercitaram (Grupos I, II e III) em contato com uma lâmina de água.

Fonte: Elaboração própria.

Ao final do experimento, animais foram eutanasiados com sobredose intraperitoneal de anestésico quetamina (100 mg/kg) e relaxante muscular xilazina (6 mg/kg). O sangue foi coletado através da veia porta ou do ventrículo em dois tubos: com anticoagulante EDTA e sem anticoagulante. O sangue no tubo com EDTA foi utilizado para análises de estresse oxidativo e marcadores hematológicos; o soro (tubo sem anticoagulante) foi utilizado para as análises bioquímicas. Porções do fígado e o tríceps sural esquerdo foram coletados para a análise histológica.

4.5.1 Análises hematológicas

As amostras de sangue total foram analisadas utilizando equipamento automatizado Sysmex XS-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Foram avaliadas as contagens de células vermelhas (RBC – *Red Blood Cells)*, células brancas (WBC – *White Blood Cells)*, plaquetas, e a concentração de hemoglobina e porcentagem de hematócrito. Todas as análises seguiram protocolo do fabricante.

4.5.2 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no soro dos animais, utilizando kits comerciais da Roche Diagnóstica® e Bioclin® no equipamento Sysmex XS-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Os parâmetros analisados em soro foram: colesterol total, triglicerídeo, glicose, creatinina, aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), lactato desidrogenagem (LDH). Os testes bioquímicos seguem as especificações do fabricante.

4.5.3 Marcadores de estresse oxidativo

A determinação da GSH foi realizada pela quantificação dos tióis totais, baseada no método de Ellman (1959). Para isso, 150 µL do sangue foram hemolisado com 100 µl de Triton X-100 a 10% e precipitado com 100 µL de TCA 30%. As amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes foram diluídos em tampão fostato de potássio. Os grupamentos tiólicos das amostras reagiram com 5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando um complexo amarelo, que foi lido em comprimento em espectrofotômetro (MultiSpec-1501, SHIMADZU®)

em 412 nm. Os resultados foram expressos em µmol/mL sangue.

A atividade da enzima antioxidante GSH-Px foi determinada em sangue total, baseada na oxidação do NADPH. O sangue foi diluído em uma solução contendo glutationa reduzida, glutationa redutase, NADPH, azida sódica e reagiu com 70 µL de H_2O_2. A atividade da GSH-Px foi monitorada por dois minutos, em 340 nm (PAGLIA, VALENTINE, 1967). Pela medida do decaimento da absorbância do NADPH foi possível determinar a atividade da GSH-Px, que é proporcional ao consumo de NADPH. Os dados foram expressos em µmolNADPH/min/g Hemoglobina.

O método para avaliação da atividade da catalase (CAT) baseia-se na decomposição do H_2O_2 pela enzima, ao longo de três minutos, monitorado em espectrofotômetro a 240 nm. Uma alíquota de 20 µL de sangue total foi diluída em tampão fosfato de potássio e 70 µL de H_2O_2 foi adicionado, dando início à reação. Uma constante de variação (κ), relacionada com a Hb, auxiliou na expressão dos valores da atividade no sangue (κ/g Hemoglobina) (AEBI, 1984).

A peroxidação lipídica, no plasma, foi avaliada pela concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), adaptada da metodologia de Ohkawa, Ohishi, Yagi (1979). Alíquotas de plasma (150 µL) foram misturadas a 50 µL de NaOH e incubados a 60 ºC por trinta minutos. Após, 500 µL de H_3PO_4 foram acrescentados, além de 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS), e as amostras levadas ao banho 80 ºC por uma hora. Os lipídeos peroxidados, e dentre eles o malondialdeido (MDA), reagiram com o TBA, formando um composto rosa, que foi lido em espectrofotômetro a 532 nm. Uma curva de calibração utilizando o MDA como padrão foi construída para avaliação da concentração de TBARS.

4.5.4 Análises histológicas

Para análise histológica, foram coletadas porções do fígado e o tríceps sural esquerdo dos animais. Os órgãos foram coletados e mantidos em formalina tamponada 10% por 24h. Ao fim deste tempo, as amostras foram lavadas com água, *overnight*. Após esse período de lavagem, as amostras foram deixadas em etanol 70%, até o momento do processamento.

Finalizando a etapa de fixação, o processamento dos tecidos foi realizado

no equipamento automatizado Processador Automático de Tecidos PT12 (O Patologista®). As peças foram emblocadas em parafina histológica. Os cortes histológicos dos fígados e do tríceps sural foram realizados em micrótomo rotativo-manual (O Patologista® MR 2014) com quatro micrômetros de espessura. A seguir, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, e montadas com resina histológica (TOLOSA *et al.,* 2003).

No fígado foi observado se há desordenamento, sinais de inflamação e hipertrofia dos hepatócitos. A análise do tríceps sural foi feita através da seleção aleatória de dez fibras musculares por animal de cada grupo, para determinação de hipertrofia muscular (Axio Lab.A1, ZEISS®).

4.6. Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. O teste ANOVA uma via foi aplicado para comparação entre as marcas comerciais de chá, bem como entre os grupos estudados. De acordo com a distribuição dos resultados, foram realizados os testes de seguimento Tukey (para as marcas de chá) ou Duncan (para os grupos experimentais), para verificação de diferenças. A análise estatística do número de saltos foi realizada observando a evolução de cada grupo ao longo das semanas. Valores de $p<0.05$ foram considerados significantes. Os resultados foram analisados com o auxílio dos programas Statistica® 8.0 e Graph Pad Prism® 5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo e a discussão dessa dissertação estão apresentados no formato de artigo científico, seguindo as “Orientações para apresentação de dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba”. Assim, as seções Resultados e Discussão encontram-se agrupadas em dois artigos científicos (Parte 1 e Parte 2).

O primeiro artigo, já publicado, descreve a produção e seleção da melhor marca de chá verde. O artigo foi publicado em 2020 no *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 3, p. 14529-14538 (DOI: https://doi.org/10.34117/bjdv6n3-355), e encontra-se na Parte 1. O segundo artigo, relacionado ao estudo pré-clínico, está em processo de submissão no *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, e segue formato definido pela revista.

5.1. Parte 1 – Produção e avaliação das NP-CLLs

Brazilian Journal of Development

Efeito protetivo de formulação de cristal líquido liotrópico na oxidação do chá verde

Protective effect of lyotropic liquid crystal formulation on green tea oxidation

DOI:10.34117/bjdv6n3-355
Recebimento dos originais: 06/03/2020
Aceitação para publicação: 24/03/2020

Vitor Nieri
Mestrando em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de Sorocaba
Universidade de Sorocaba
Rodovia Raposo Tavares, km 92.5, Sorocaba, SP
E-mail: vitornieri@bol.com.br

Juliana Ferreira de Souza
Doutoranda em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de Sorocaba
Universidade de Sorocaba
Rodovia Raposo Tavares, km 92.5, Sorocaba, SP
E-mail: julianafsz@yahoo.com.br

Marco V. Chaud
Doutor em Fármacos e Medicamentos pela Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Universidade de Sorocaba
Rodovia Raposo Tavares, km 92.5, Sorocaba, SP
E-mail: marco.chaud@prof.uniso.br

Denise Grotto
Doutora em Ciências pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo
Universidade de Sorocaba
Rodovia Raposo Tavares, km 92.5, Sorocaba, SP
E-mail: denise.grotto@prof.uniso.br

RESUMO
O chá verde é um potente antioxidante natural. Porém, após a preparação pode sofrer reações de degradação oxidativa. Os Cristais líquidos liotrópicos (CLL) são sistemas de base lipídica auto-organizados, biomiméticos, transportadores de fármacos e capazes garantir estabilidade química de compostos bioativos em solução. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante do chá verde em infusão e do chá verde incorporado aos CLL. O potencial antioxidante de três amostras comerciais de chá verde apresentadas na forma de sachê foi avaliado através do método de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). A amostra selecionada foi aquela com maior atividade antioxidante e serviu para preparação do CLL. A formação de CLL no formato cruz de malta, típico de sistemas quirais do tipo

lamelar α (Lα), foi confirmada por microscopia óptica com luz polarizada. Posteriormente o CLL contendo chá verde foi avaliado quanto à manutenção da capacidade antioxidante, pelo método DPPH, |1, 7 e 14 dias após o preparo. No dia 1, o CLL contendo chá verde mostrou baixo potencial antioxidante quando comparado ao chá verde. Sugere-se que o tempo de 1 dia após a obtenção do CLL não tenha sido suficiente para a auto-organização do sistema. Já no 7° dia após a preparação, o CLL com chá verde apresentou potencial antioxidante semelhante ao chá em infusão. No 14° dia de armazenamento, a atividade antioxidante se apresentou baixa, não mantendo a conservação antioxidante do chá verde. Assim, conclui-se que os CLLs são sistemas importantes para a veiculação do chá verde, podendo ser utilizados inclusive como protetores antioxidantes de alimentos, protegendo da oxidação por até 7 dias.

Palavras-Chave: Chá Verde, Cristal Líquido Liotrópico, Antioxidantes, Embalagens Ativas

ABSTRACT

Green tea is a potent natural antioxidant. However, after its preparation, it can undergo oxidation process. Lyotropic Liquid Crystal (LLC) are self-organized lipid-based systems, biomimetic, drugs carriers and they can guarantee chemical stability of bioactive compounds in solution. Therefore, the present work aimed to evaluate the antioxidant activity of infused green tea and the LLC-based system containing green tea. The antioxidant activity of three commercial samples of green tea in sachets was analyzed using 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) assay. The sample with the highest antioxidant activity was used in LLC formulation. The Maltese cross, typical of chiral lamellar type α (L α) systems was confirmed by optical microscopy with polarized light. Subsequently, the LLC containing green tea were evaluated for maintenance of antioxidant capacity, using the DPPH method, 1, 7 and 14 days after preparation. On day 1, LLC containing green tea showed a lower antioxidant activity compared to green tea. We suggest that one day has not been sufficient for the self-organization of the system. On the other hand, on the 7th day after preparation, LLC with green tea showed similar antioxidant activity to green tea infusion. On the 14th day of storage, the antioxidant activity decreased, not maintaining the antioxidant conservation of the green tea. Thus, the LLC are important systems for the delivery of green tea and they can be used as antioxidant protector in foods, protecting from oxidation for up to 7 days.

Keywords: Green Tea, Lyotropic Liquid Crystal, Antioxidants, Active Food Packaging

1 INTRODUÇÃO

O chá é a segunda bebida mais consumida mundialmente depois da água. O chá verde é a forma de obtenção que mais preserva os nutrientes da planta *Camellia Sinensis* (TAHANI; SABZIAN, 2018). No Brasil, o chá verde é comercializado principalmente acondicionado em saquinhos de papel de filtro (sachê). Os flavonóides e as catequinas são os principais componentes químicos terapêuticos da planta *Camellia sinensis*. Esses compostos são potentes antioxidantes; entretanto após o seu preparo, essas substâncias estão sujeitas à oxidação que pode levar a perda ou redução do seu potencial antioxidante (SANTOS & SILVA, 2017).

Novas linhas de pesquisa têm surgido com o intuito de que as embalagens não só protejam, mas também interajam e forneçam vantagens ao produto acondicionado em seu interior. Elas são chamadas de embalagens ativas. Dentre as principais técnicas já aplicadas comercialmente se encontram as que absorvem oxigênio, etileno, umidade e odor, e aquelas que emitem dióxido de carbono, agentes antimicrobianos, aromas e antioxidantes. As embalagens ativas com potencial antioxidante visam proteger o produto da oxidação ao reagirem a radicais livres e peróxidos, estendendo assim a seu tempo de prateleira (SANTANA; MACHADO; SILVA; NUNES *et al.*, 2013).

O cristal líquido (CL) é um estado da matéria compreendido entre o sólido e o líquido. A classe de CL é dividida em termotrópico ou liotrópico. As razões para o interesse nos CLLs incluem as propriedades biomiméticas, biocompatíveis e biodegradáveis, adequada ao encapsulamento de agentes hidrofílicos e/ou lipofílicos. A principal vantagem dos CLL em relação a outros sistemas carreadores de fármaco de base lipídica é capacidade de favorecer a atividade em níveis moleculares. Além das propriedades biofarmacêuticas, a presença de bicamadas lipídicas quirais do tipo lamelar (Lα) apresenta efeito protetor químico em fármacos passíveis de oxidação, hidrólise, racemização e outros tipos de degradação química (CHAUD; RIOS; ALVES DOS SANTOS; TORQUETI DE BARROS *et al.*, 2020). Estruturalmente, as nanopartículas de cristal líquido liotrópica CLL (CLL-NP), são sistemas auto organizado, podendo apresentar estruturas moleculares no formato lamelar, hexagonal ou cúbica, e podendo os dois últimos formatos apresentarem conformações reversas. As CLL-NP tem sido utilizada para incorporação de substâncias bioativas com maior estabilidade físico, química e biológica (DE SOUZA; PONTES; ALVES; AMARAL *et al.*, 2017).

O chá verde é um potente antioxidante natural (OHISHI; GOTO; MONIRA; ISEMURA *et al.*, 2016), porém após a preparação os componentes bioativos do chá estão sujeitos a oxidação, e consequentemente redução do potencial antioxidante. Os sistemas a base de CLL-NP apresentam marcante proteção antioxidante quando o ativo está fase aquosa (hilo) das estruturas no formato de cruz de malta. Assim, esse trabalho teve por objetivo incorporar o chá verde em CLL-NP e avaliar o potencial antioxidante nos tempos 1, 7 e 14 dias.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 SELEÇÃO DO CHÁ VERDE E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Amostras de três diferentes marcas comerciais popularmente utilizadas de chá verde, em sachês, foram adquiridas em supermercados locais. As amostras provenientes de três

diferentes produtores foram avaliadas quanto a sua capacidade antioxidante. Para a preparação do chá, o pó da planta foi retirado dos seus respectivos sachês e as infusões foram preparadas em água filtrada na proporção de 1 :75 m: v na temperatura de 90 ± 2 °C. O aquecimento do meio foi mantido por 5 min. (VERA-CRUZ; NUNES; MENDONÇA; CHAVES *et al.*, 2010).

Alíquotas de 250 µL de cada chá foram adicionadas a 750 µL de solução etanólica (70 % v/v) de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) 0,-1 mM. A absorbância, em 515 nm, foi medida nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos. Como controle, 250 µL de etanol 70 % foram adicionados a 750 µL de solução de DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

A capacidade do chá verde em sequestrar o radical DPPH foi expressa como percentual de inibição, calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de Inibição} = \frac{Abs^1 - Abs^2}{Abs^1} \times 100$$

Em que: Abs^1 = absorbância do controle

Abs^2 = absorbância da amostra

A marca que resultou no maior potencial antioxidante foi utilizada para a incorporação no sistema a base de CLL-NP.

2.2 OBTENÇÃO DO CLL E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

As CLL-NP utilizadas para veicular o chá verde foram preparadas como descrito por Souza (2017). Resumidamente, os sistemas baseados em emulsão precursores de CLL foram preparados com Monoleína (fase oleosa), Chá Verde (fase aquosa) e Poloxamer 407 abaixo da concentração micelar crítica na proporção de 10:30:60 m/m, respectivamente. As misturas foram realizadas sob aquecimento (50 °C) e agitada em banho de ultrassom, ajustado para frequência de 40 kHz (Unique, USC-3300. Indaiatuba, Brasil) durante 5 minutos.

A microscopia óptica com luz polarizada (TOA25. Topcon, Tóquio. Japão) foi utilizada para avaliar a ausência ou presença de anisotropia, formação de sistemas lamelares e CLL-NP. A microscopia foi realizada no modo polarizado, com contraste em modo ampliado e resolução para alta exposição para ajuste de nitidez, com magnificação de 100x. As micrografias foram capturadas com câmera digital (Eurekam 3.0. Bel, STM-PRO-T Led., Brasil) e registradas com auxílio do Software Bel View.

Brazilian Journal of Development

A emulsão foi armazenada a 8 ± 2° C, e a atividade antioxidante foi analisada no 1°, 7° e 14° dia após a preparação da CLL-NP. O chá verde incorporado ao sistema precursor CLL-NP era 3,3 vezes mais concentrado que o chá verde utilizado na seleção das amostras.

Para a análise da atividade antioxidante, 0,5 g da emulsão foram diluídos em 1 mL de etanol e, deste preparado, alíquotas de 250 µL foram utilizadas para o teste com DPPH, conforme descrito anteriormente.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. ANOVA uma via seguido de Tukey teste foram utilizados para verificar diferenças entre os tempos estudados e entre o chá e a formulação. Valores de $p<0.05$ foram considerados significantes. Os resultados foram analisados com o auxílio dos programas Statistica® 8.0 e Graph Pad Prism®5.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

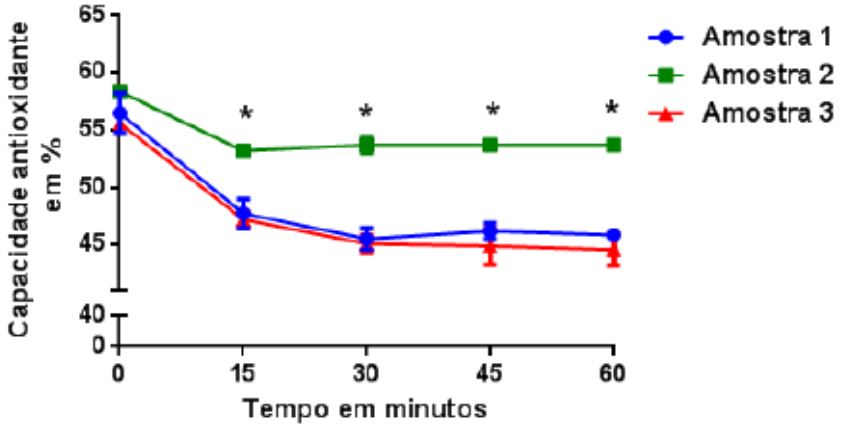
As três diferentes amostras comerciais de chá verde em infusão estão apresentadas na figura 1. Apesar de o trabalho não objetivar a caracterização das amostras de chás comerciais, foi possível visualizar a diferença na coloração da infusão da amostra 2 (verde forte) em relação à coloração das amostras 1 e 3 (amarronzada), indicando possivelmente a presença de outro componente, que não o chá verde.

Figura 1 - Preparo das infusões das amostras 1, 2 e 3 de chá verde.

Quanto à capacidade antioxidante, os resultados das três amostras de chá verde, pelo método de DPPH, estão apresentados na Figura 2.

Brazilian Journal of Development

Figura 2 - Potencial antioxidante de 3 amostras comerciais de chá verde. *p<0.05.



A amostra número 2 mostrou capacidade antioxidante significativamente maior ($p>0.01$) comparada às amostras 1 e 3 em todos os tempos avaliados. Além disso, a capacidade antioxidante do chá da amostra comercial 2 manteve-se estável até 60 minutos, com T_0 de 58,3 ± 0,2 % e T_{60} de 53,7 ± 0,1 %. As amostras 1 e 3 não diferiam estatisticamente entre si ($p>0.05$). Assim, a amostra 2 foi selecionada para a incorporação ao sistema a base de CLL, uma vez que, além da maior atividade antioxidante, demonstrou coloração compatível com o produto derivado da *Camellia sinensis*.

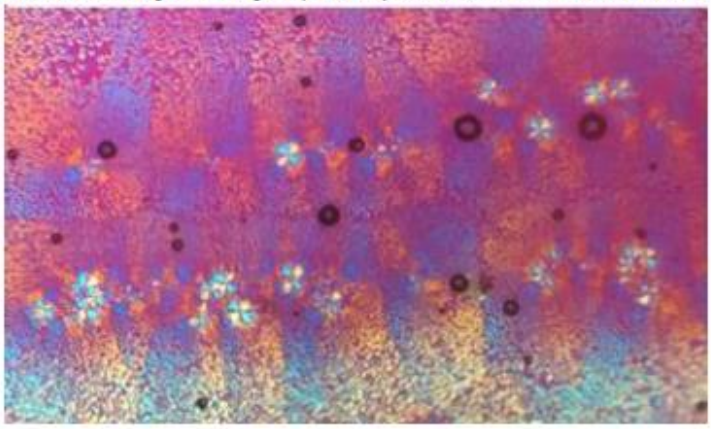
Em uma análise de amostras comercias, Pimentel-Souza *et al.*, 2012, compararam a composição, tempo de infusão e capacidade antioxidante de 2 marcas de chá verde em saches cultivadas no Brasil. Concluíram que o tempo de 6 minutos de infusão, sendo esse o maior tempo avaliado em neste trabalho, é o que o que mais apresentou atividade antioxidante e que, entre as amostras avaliadas, houve diferença estatística na capacidade antioxidante em 3 dos 2 tempos de infusão analisados, quando comparando a amostra 1 com a 2 ($p<0.05$). Também foi analisado a presença de materiais estranhos encontrando apenas variação estatística na umidade e nas cinzas totais, estando as duas marcas em conformidade com a legislação vigente.

Em um estudo mais abrangente, (SOUSA; TAVEIRA, 2011) analisaram 30 lotes de chá verde, encontrando em 22 deles a presença de materiais estranhos como caules. O caule não contém as mesmas substancias presentes nas folhas, podendo reduzir o potencial antioxidante desses chás em comparação ao chá da folha da planta.

A confirmação da obtenção da CLL-NP na presença de chá verde se deu pela presença

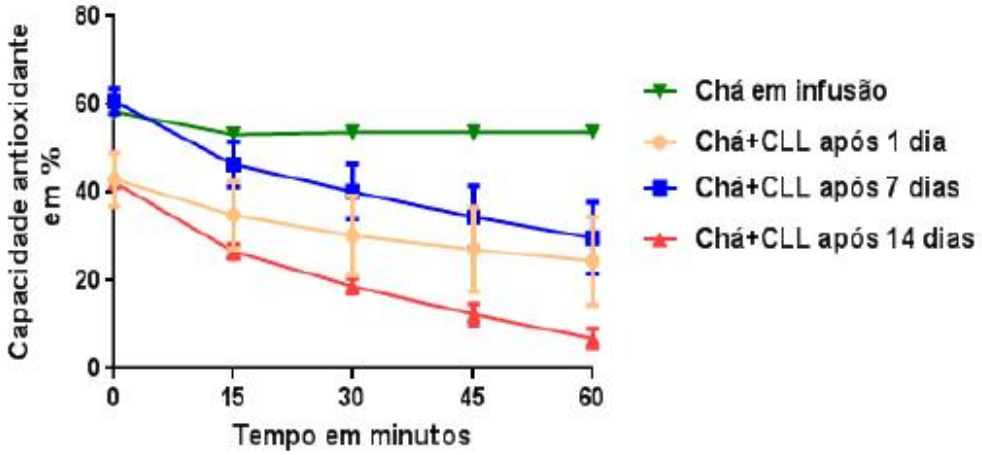
dos CLL no formato de cruz de malta, com estruturas lamelares do tipo Lα, caracterizadas pelo contraste dos brilhos em tons azul e amarelo (Figura 3). A presença de bolhas de ar acumuladas na preparação da lâmina aparecem na imagem na forma esférica com bordas escuras (Figura 3).

Figura 3 - Fotomicrografia óptica obtida por microscopia com luz polarizada do sistema lamelar quiral (Lα) e nanopartículas de cristal líquido liotrópico (CLL-NP) obtidos com infusão de chá verde 91:75 m:v.



Os resultados da atividade antioxidante das CLLs-NP com chá verde, após diferentes tempos de armazenamento, estão apresentados na Figura 4.

Figura 4 - Capacidade antioxidante do chá verde em infusão (pós-preparo) e das CLL-NP contendo chá verde após 1, 7 e 14 dias de armazenamento



Brazilian Journal of Development

No T_0 do teste de DPPH, a capacidade antioxidante do chá em infusão foi semelhante, estatisticamente, ao chá incorporado ao CLL após 7 dias de armazenamento ($p=0.803$), demonstrando proteção da sua oxidação. Tal fato também ocorreu no T_{15} ($p=0.110$) e no T_{30} ($p=0.061$). A partir do T_{45}, diferenças estatísticas na capacidade antioxidante foram observadas. Entretanto, apesar dessa diferença ter ocorrido ao final do teste, pode-se afirmar que o CLL se apresentou como um sistema promissor para proteção da oxidação dos antioxidantes do chá verde em até 7 dias de armazenamento. Um sistema com CLL-NP utilizando água ultrapura como fase aquosa, sem incorporação de chá verde, também foi produzido, a fim de verificar se o próprio sistema possui atividade antioxidante. A capacidade antioxidante obtida foi de 7,2 ± 3,5%, resultado não significativo; ou seja, o sistema, de modo isolado, não possui atividade antioxidante.

Em um estudo de desenvolvimento e caracterização seguido de ensaio *in vivo*, Bento da Silva *et al.*, 2017, incorporaram extrato glicólico de chá verde com óleo de abacate a um sistema de CLL, para utilização epitelial visando sua ação anti-inflamatória em um edema na pata de roedores. Observaram a formação de CL na fase cúbica e os seu efeito anti-inflamatório foi estatisticamente igual ao fármaco utilizado para tratamento no controle positivo, reduzindo significativamente o edema após 4 horas de aplicação. Isso nos permite associar que a proteção da oxidação foi proporcionada pela emulsão.

Por outro lado, neste trabalho o tempo de armazenamento de 1 dia não se mostrou estável. Desde o T_0 até o T_{60} a capacidade antioxidante do chá verde incorporado ao CLL foi significativamente menor ($p<0.01$) que a atividade antioxidante do chá verde em infusão.

O sistema baseado em emulsão apresentou o formato de cruz de malta por auto-organização mediada pelas concentrações de monoleína, poloxamer P407 e chá verde, resultando em CLL-NP no formato de cruz de malta em sistema Lα quiral. A análise dos resultados sugere que a completa auto-organização lamelar ocorre após o 1° dia de preparação do CLL-NP. No sétimo dia após a preparação da formulação, os CLL-NP preparados com infusão de chá-verde apresentaram o tempo ótimo de atividade antioxidante, fato que não foi mantido no 14° dia, indicando sua oxidação. Contudo, como as formulações de CLL-NP apresentam elevado potencial de energia livre em permanente transição, os resultados de atividade antioxidante pelo método DPPH devem ser confrontados com resultados de estudos *in vivo*.

Brazilian Journal of Development

4 CONCLUSÃO

Sistema de base lipídica preparados com chá verde obtido por infusão deram origem a um sistema lamelar quiral e CLL-NP no formato de cruz de malta. A atividade antioxidante determinada pelo método DPPH mostra a incorporação de compostos ativos e a liberação dos mesmos durante o processo de avaliação. Os resultados devem ser confrontados com estudos *in vivo* para análise mais conclusiva sobre estabilidade da formulação, seja pelas propriedades intrínsecas dos CLL e características biomiméticas associadas a atividade específica em meio biológico para um nível celular.

O sistema se mostrou eficiente quanto à proteção da oxidação natural ao qual o chá está sujeito após o seu preparo quando armazenado por até 7 dias, podendo ser incorporado em embalagens ativas visando o aumento de vida útil do produto. Como o CLL apresenta propriedades biomiméticas, pode potencializar o efeito da substância ou do produto incorporado ao seu sistema. Sendo assim, torna-se interessante analisar o seu potencial *in vivo* em novos experimentos.

REFERÊNCIAS

BENTO DA SILVA, P.; FIORAMONTI CALIXTO, M. G.; OSHIRO JÚNIOR, A. J.; BOMBARDELLI, L. R. *et al.* Structural Features and the Anti-Inflammatory Effect of Green Tea Extract-Loaded Liquid Crystalline Systems Intended for Skin Delivery. **Polymers**, 9, n. 1, 2017.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, 28, n. 1, p. 25-30, 1995/01/01/ 1995.

CHAUD, M. V.; RIOS, A. C.; ALVES DOS SANTOS, C.; TORQUETI DE BARROS, C. *et al.* Chapter 19 - Nanostructure self-assembly for direct nose-to-brain drug delivery: a novel approach for cryptococcal meningitis. *In*: RAI, M. e ABD-ELSALAM, K. A. (Ed.). **Nanomycotoxicology**: Academic Press, 2020. p. 449-480.

DE SOUZA, J. F.; PONTES, K. D.; ALVES, T. F.; AMARAL, V. A. *et al.* Spotlight on Biomimetic Systems Based on Lyotropic Liquid Crystal. **Molecules**, 22, n. 3, Mar 7 2017.

OHISHI, T.; GOTO, S.; MONIRA, P.; ISEMURA, M. *et al.* Anti-inflammatory Action of Green Tea. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem**, 15, n. 2, p. 74-90, 2016.

PIMENTEL-SOUZA, J. D. R.; SOUZA, D. S.; GUALBERTO, N. C.; RAMALHO, S. A. *et al.* Qualidade funcional da infusão do chá verde comercial. **Revista de Nutrição**, 25, p. 753-763, 2012.

SANTANA, M. C. C. B. D.; MACHADO, B. A. S.; SILVA, T. D. N. D.; NUNES, I. L. *et al.* Incorporação de urucum como aditivo antioxidante em embalagens biodegradáveis a base de quitosana. **Ciência Rural**, 43, p. 544-550, 2013.

SOUSA, F.; TAVEIRA, C. Avaliação da qualidade de amostras de Camellia sinensis (L.) kuntze (chá-verde) comercializadas no Distrito Federal. 13, 02/07 2011.

TAHANI, B.; SABZIAN, R. Effect of Camellia sinensis plant on decreasing the level of halitosis: A systematic review. **Dent Res J (Isfahan)**, 15, n. 6, p. 379-384, Nov-Dec 2018.

VERA-CRUZ, M.; NUNES, E.; MENDONÇA, L.; CHAVES, É. *et al.* Efeito do chá verde (Camelia sinensis) em ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 46, p. 407-413, 10/01 2010.

5.2. Parte 2 – Estudo *in vivo*

Green tea compared to green tea loaded in lyotropic liquid crystal: effects on performance, physical conditioning and body mass in a high-intensity interval training pre-clinical study.

Vitor Nieri[1], Juliana Ferreira de Souza[2], Talita Cristina Mena Segato[1], Érika Leão Ajala Caetano[1], Fernanda Gomes Leite[1], Marco Vinícius Chaud[2], Denise Grotto[1]*

1 Laboratório de Pesquisa Toxicológica (Lapetox), University of Sorocaba, UNISO, Sorocaba, SP, Brazil.

2 Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia da Universidade de Sorocaba (LaBNUS), University of Sorocaba, UNISO, Sorocaba, SP, Brazil.

*Corresponding author:

Denise Grotto

Graduate Program in Pharmaceutical Sciences

University of Sorocaba,

Rodovia Raposo Tavares Km 92.5, CEP. 18023-000, Sorocaba, SP, Brazil;

Tel.: +55 15 2101 7104; Fax: +55 15 2101 7000

denise.grotto@prof.uniso.br

Abstract

Background

Green tea (GT) is a natural antioxidant, susceptible to oxidation after preparation. Lyotropic liquid crystal (LLC) are nanostructured, self-assembly, biomimetic systems used to incorporate bioactive compounds, such as GT, protecting them from oxidation and enhancing its biological activity. High-intensity interval training (HIIT) is a workout modality that enhances reactive oxygen species production, which may induce oxidative stress. The exogenous antioxidant may interfere in physiological adaptations process exercise-mediated. Therefore, this research aimed to compare the effects of GT and GT loaded in LLC in animals submitted to HIIT.

Methods

Three commercial samples of GT in sachets were analyzed for chemical elements. Monoolein, GT in infusion and Poloxamer 407 were incorporated to obtain the system based on Nanoparticles LLC (NP-LLC). Healthy male rats were randomized into 6 groups (n=6/group): Control (C), GT, NP-LLC, Exercise (Ex), GT+Ex, NP-LLC+Ex. Animals from Ex groups practiced HIIT for 5 weeks, 3 times/week. Hematological, biochemical, redox status, performance, body weight and histological parameters were evaluated. Data were expressed as mean ± SD. Statistical analyses were performed using a One-Way ANOVA. Values less than 0.05 ($p<0.05$) were considered statistically significant.

Results

Commercial samples of green tea showed the presence of toxic metals. Groups Ex, GT+Ex, NP-LLC and NP-LLC+Ex showed reduction in the body weight gain rate compared to C ($p<0.05$). GT+Ex and NP-LLC+Ex showed a greater exercise

performance compared to Ex ($p<0.05$). The NP-LLC and Ex groups had reduced triglycerides compared to C ($p<0.05$). GT+Ex and NP-LLC+Ex showed more muscle hypertrophy concerning Ex group ($p<0.05$).

Conclusion

Both GT and GT loaded in NP-LLC supplementation improved the physical conditioning, the muscular mass gain and reduced the body weight gain rate in groups practicing HIIT. Besides, GT loaded in NP-LLC consumption, even without exercise, showed promising effects, interesting to be further investigated.

Keywords: Green Tea; Catechins; Epigallocatechin-3-gallate; Lyotropic Liquid Crystals; High-intensity Interval Training; Antioxidants; Muscle Hypertrophy; Performance.

Introduction

Camellia sinensis is a plant responsible for the infuse of three mainly varieties of tea: Green tea (GT), black tea and oolong tea. They are differentiated by the extraction process of the leaves and stems. Among the teas from *Camellia sinensis*, the GT is the least handled, preserving its characteristic color and nutrients (1). GT is rich in polyphenols, and catechins account for more than 70% of them. Epigallocatechin-3-gallate is the most prevalent catechin in GT, responsible for 65% of the total catechin content of the tea (2). It is a potent natural antioxidant. However, GT in infusion is subject to oxidation after preparation (3).

Liquid crystal (LC) is a state of matter between the crystalline solid and the isotropic liquid. The LC state is divided into thermotropic, dependent of temperature variation, and lyotropic, dependent of a solvent in addition to the temperature (4). Systems based on Nanoparticles Lyotropic Liquid Crystal (NP-LLC) have attracted attention due to their ability to incorporate bioactive components in oil or water (5). In addition, LC structures are often found in animals, plants and bacteria (6) showing biomimetic characteristics that make NP-LLC an important strategy for incorporating bioactive substances. That incorporation increases stability and durability of bioactive compounds (7), being able to protect tea from oxidation, e.g., as demonstrated in previous publication (8). Moreover, this system of drug delivery was never studied before to GT tea, and it can enhance the antioxidant potential of phenol present in GT, which we intended to evaluate in this study.

High-intensity interval training (HIIT) is a type of training characterized by the execution of intense movements for short periods, followed by short periods of

interval or low intensity exercises (9). Physical exercise can increase the production of reactive oxygen species (ROS) and there is a concern of the possible harmful effects in the body.

Antioxidant consumption is related to the neutralization of harmful reaction induced by ROS. However, it is not clear if exogenous antioxidants can also suppress or reduce biological adaptations stimulated by exercise (10),(11). ROS produced in response to the stress from exercise could be necessary for specific physiological and cellular adaptations as proliferator-activated receptor-c coactivator (PGC1-α) and mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathways activation which may result in mitochondrial biogenesis and muscle hypertrophy (12). So, ROS suppression could result in loss physical conditioning and consequent adaptation to the training (13), (14), (15).

With that doubt in mind, we aimed to reach two topics: i) evaluate the physiological adaptation to the stress of physical exercise in rats supplemented with antioxidants; ii) compare the effects of GT in infusion and GT loaded in NP-LLC, which is a new formulation able to increase the GT bioavailability, on performance, physical conditioning and biochemical parameters in animals practicing HIIT for 5 weeks.

Methods

GT and NP-LLC preparation

Three different commercial brands of GT in sachets were purchased from local markets (Sorocaba, São Paulo State, Brazil) and analyzed in a previous research from our group, to assess their antioxidant potential (8). The sample with the best antioxidant potential was used in this study. To prepare the infusion, the GT

powdered was removed from its sachets and 1 g of herb was diluted to 75 mL of filtered water, at a temperature of 90º C, for 5 minutes (16). To NP-LLC preparation, the infusion of GT passed through freeze-drying followed by dilution in ultrapure water, before being used to obtain the nanostructured system.

NP-LLC was prepared according to Nieri et al., 2020 (8), with some changes: oil, water and surfactant mixture changed from 10:30:60 m/m to 53.6/35.7/10.7 m/m, respectively. These adjustments were made to standardize the concentration of GT in infusion and GT loaded in NP-LLC to be administrated *in vivo*. The emulsion-based precursor system of NP-LLC was prepared with monoolein (Myverol 18-99) as oily phase, GT as aqueous phase (after same tea preparation followed by freeze-drying and dilution in ultrapure water), and Poloxamer 407 as surfactant. The mixture was carried out under heating (50 ºC) and it was stirred in an ultrasound bath at 40 kHz frequency (Unique, USC-3300. Indaiatuba, Brazil) for 5 minutes.

The formulation was analyzed macroscopically and microscopically by polarized light microscopy. The macroscopic evaluation was performed according to Silva et al., (2017) (17) in viscous systems with translucent or opaque aspect, liquids with translucent or opaque aspect and phase separation. Polarized light microscopy was used to assess the absence or presence of anisotropy, lamella formation and morphology of LLC. The analysis was performed under a microscope (Nikon, Eclipse E800. Tokyo, Japan) at polarized mode, with contrast in enlarged mode and high exposure resolution adjustment and the micrographs were captured with a camera (Nikon, DS-r 1. Tokyo, Japan) with the aid of NIS-Elements Software. The emulsion was stored at 4 °C up to fifteen days.

Ethics and animal care

This research was approved by the Ethics Committee of the University of Sorocaba (CEUA-Uniso), Protocol nº 15/2019. A total of 36 male Wistar rats weighing between 160-180g, with 6 weeks old, were purchased from Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio, Paulínia – SP, and 10 days were given to them to acclimatation in the housing facility. All procedures followed the recommendation ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guide for research involving animals (18). Animals were housed in ventilated, acclimatized, and shavings-lined cages. The temperature and light/dark cycle were automatically controlled at 22 ± 2 °C and 12 h, respectively. Animals received food and water *ad libitum*. The experiments started ten days after animals acclimated.

Pre-clinical experimental design

The rats were randomly distributed, using a table of random numbers, in 6 groups (n = 6/group): Group I – Control (C); Group II – Green tea (GT); Group III – GT loaded in Nanoparticle Lyotropic Liquid Crystal (NP-LLC); Group IV – Exercise (Ex); Group V – Exercise + Green tea (Ex+GT); Group VI – Exercise + GT loaded in NP-LLC (GT-NP-LLC+Ex).

For in vivo administration, 2 mL of GT and 0.35 g of NP-LLC diluted in 2 mL of filtered water, were given by gavage on the same days of exercise. The preparation and dilution were performed to match the concentration of infused GT administered to the animals.

HIIT training protocol

Animals from Ex groups were subjected to a week of adaptation to water, with gradual increase in load up to the proposed percentile. After adaptation, animals were submitted to HIIT with low density training protocol, for 5 weeks (Table 1). An addition of 25% (± 3 g) of overload on the total wight of the animal were attached to the animal's chest through a lycra pouch. Animals performed 5 to 8 series of 30 s of forced swimming followed by jump to breath, with an interval of 1 min of rest among series. The exercises were performed in a vat of water, at 31 ± 1º C, with sufficient depth to cover the entire body of the animal in upright position.

Table 1: Training evolution over the 5 weeks of the experiment, considering the three exercise groups.

Week	Sessions	Series	Time	Break
1	3	5	30''	1'
2	4	5	30''	1'
3	3	6	30''	1'
4	3	7	30''	1'
5	2	8	30''	1'

To calculate the load up, animals had their body weight measured weekly. Aiming to standardize the training sessions and time, a device was manufactured with 6 tubes 20 cm diameter X 60 cm high, on screened metal support. This support was used to place and remove animals from the water at the same time from the same group. The number of hops of each animal was counted.

At the end of the experiment, all animals were euthanized with intraperitoneal overdose of anesthetic ketamine (100 mg/kg) and muscle relaxant xylazine (6

mg/kg). Blood was collected through the ventricle in two tubes: one with EDTA anticoagulant and another one without anticoagulant. Blood in EDTA tube was used for analysis of oxidative stress and hematological markers; serum (tube without anticoagulant) was used for biochemical analyzes. Portions of the liver and the left gastrocnemius were collected for histological analysis.

Hematological and Biochemical Analysis

Red blood cell counts (RBC), white blood cells (WBC), platelets (PLT), hemoglobin concentration (HGB) and hematocrit percentage (HCT) were analyzed in total blood using automated Sysmex XS-1000i equipment (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

Biochemical analyzes were performed using commercial kits from Roche Diagnóstica®. The parameters analyzed in serum were: total cholesterol, high density lipoproteins (HDL), triglycerides, glucose, creatinine, urea, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), lactate dehydrogenation (LDH). All analyzes followed the manufacturer's protocol.

Redox state analyses

For total thiols (represented by reduced glutathione - GSH), 150 µL of the whole blood was hemolyzed and precipitated. The samples were centrifuged and the supernatants were diluted in potassium phosphate buffer. Thiolic groups of the samples reacted with 5-5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), forming a yellow complex, which was read in spectrophotometer (MultiSpec-1501, SHIMADZU®) at 412 nm (20). The results were expressed in µmol/mL blood.

Glutathione peroxidase (GSH-Px) activity was determined based on the oxidation

of NADPH (21). Blood was diluted in solution containing reduced glutathione, glutathione reductase, NADPH, sodium azide, reacting with 70 µL of H_2O_2. GSH-Px activity was monitored for two minutes at 340 nm. GSH-Px activity is proportional to the consumption of NADPH. The data were expressed in µmol NADPH/min/g Hemoglobin.

Catalase (CAT) activity is based on the decomposition of H_2O_2 by the enzyme, over three minutes, monitored at 240 nm. An aliquot of 20 µL of whole blood was diluted in potassium phosphate buffer and 70 µL of H_2O_2 was added, initiating the reaction. A variation constant (κ), related to Hb, helped in the expression of activity values in the blood (κ/g Hemoglobin) (22).

Plasma lipid peroxidation was evaluated by the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), adapted from Ohkawa, Ohishi, Yagi (23). Plasma aliquots (150 µL) were hydrolyzed in alkaline pH at 60 ºC for thirty minutes. Afterwards, H_3PO_4 and thiobarbituric acid (TBA) were added, and the samples were bathed at 80 ºC for one hour. Peroxidated lipids, and among them malondialdehyde (MDA), reacted with TBA, forming a blushing compound, read at 532 nm. Calibration curve using MDA as standard was constructed to assess the concentration of TBARS.

Histological Analysis

Portions of the liver and the left gastrocnemius were collected. The samples were kept in 10% buffered formalin for 24 hours. So, samples were washed with water, overnight, and then they were left in 70% ethanol, until processing. At the end of the fixation step, the tissue processing was carried out using the automated tissue processor PT12 (O Pathologist®). The fragments were embedded in histological

paraffin. Histological sections of the livers and gastrocnemius were performed using a rotary-manual microtome (O Patologista® MR 2014) with 4 µm thick. Then, the slides were stained with hematoxylin and eosin, and mounted with histological resin (24). Signs of inflammation and disorder or hypertrophy of hepatocytes were considered to observe in liver. The gastrocnemius analysis was made through area calculation, to measure muscle hypertrophy. A random selection of ten muscles fibers per animal in each group were analyzed, totaling 60 fibers per group.

Statistical analysis

Sample size calculation was performed using the formula:

$$n = 1 + [2 (z\alpha + z\beta)2 \times (s/d)2]$$

in which α is 0.05, the achieve power β is 90%. A standard deviation (s) of 10 and differences (d) of 20% among groups in the body mass would be of clinical importance. Thus, we would require 6 animals/group and a total of 36 animals. For each test, the experimental unit was an individual animal.

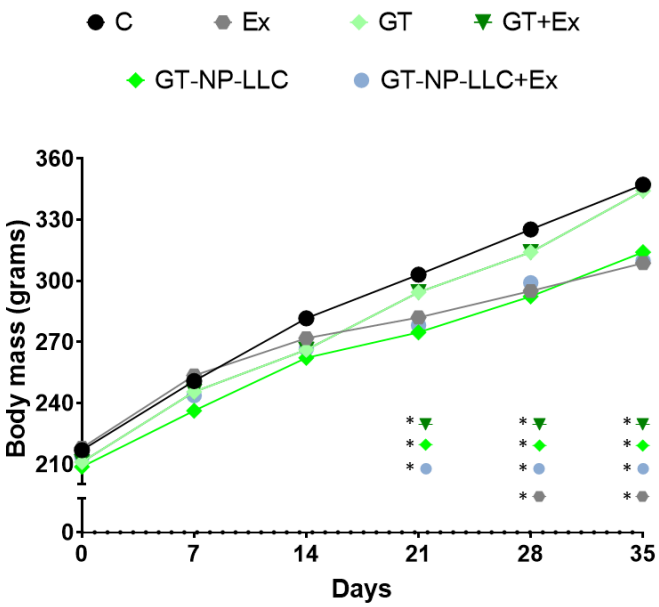
Data were expressed as mean ± standard deviation (SD), and they were tested for homoscedasticity by Bartlett test. The one-way ANOVA test was applied for comparison among the groups of animals studied. According to the distribution of results, Duncan follow-up tests were performed to check for differences. Repeated-measures ANOVA was used for number of jumps and weight gain, observing the evolution of each group over the weeks. Probability values less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered as statistically significant. All data were performed using Statistica® 8.0 and Graph Pad Prism® 5 softwares.

Results

Body weight and physical conditioning of the animals

The animals body mass is reported in Figure 1. Initially, animals had similar weight, showing success in randomizing the groups. After the second week of training, there was a decrease in body weight gain in the GT+Ex and GT-NP-LLC groups (not statistically significant, but important, with p= 0.062 and 0.075, respectively), compared to C. After three weeks, these trends became significant differences and the GT-NP-LLC+Ex group also showed significant reduction in body weight gain. At the end of the fourth week of intervention, the Ex group showed significant difference compared to C, too. At the end of the fifth week, the differences pointed out from the third and fourth week remained. GT alone did not present differences compared to control.

Figure 1: Evolution of the animals' body mass over the weeks



Note: Mean. *p<0.05 when compared to Control

Regarding physical training, the number of jumps per animal was counted in all days of exercise. The average of jumps within each group, per week, is reported

in Table 2. The jump was also used as indicator of physiological adaptations to exercise. Over the weeks, and especially in the last week, there was a significant increase in the number of jumps in all groups under exercise.

Table 2: Mean ± SD of the jumps of the animals under training, over the weeks.

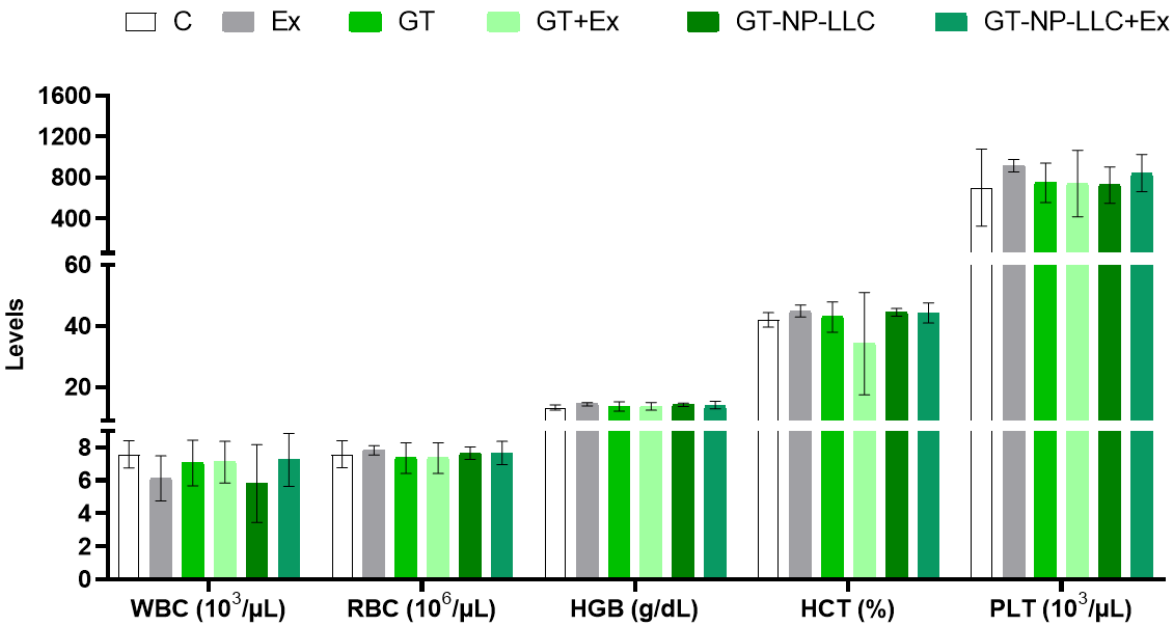
Nº Jumps	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5
Ex	18.5 ± 7.7	25.0 ± 8.3	26.2 ± 7.0*	32.3 ± 14.5*	43.6 ± 16.0*
GT+Ex	18.9 ± 16.3	28.1 ± 16.6	29.2 ± 22.6	30.3 ± 18.0	41.2 ± 29.6[a]
GT-NP-LLC+Ex	19.2 ± 11.3	26.6 ± 13.7	27.7 ± 11.2	30.5 ± 13.2[b]	46.2 ± 27.4[b]

*p<0.05 when compared to week 1 of the same group. [a]p<0.05 compared to week 1 of the GT+Ex group. [b]p<0.05 compared to week 1 of GT-NP-LLC+Ex group.

Hematological and Biochemical Analysis

Hematological parameters are reported in Figure 2. There were no significant differences in the comparison among groups, demonstrating safety for the use of NP-LLC.

Figure 2: Hematological parameters reported by Mean± SD.

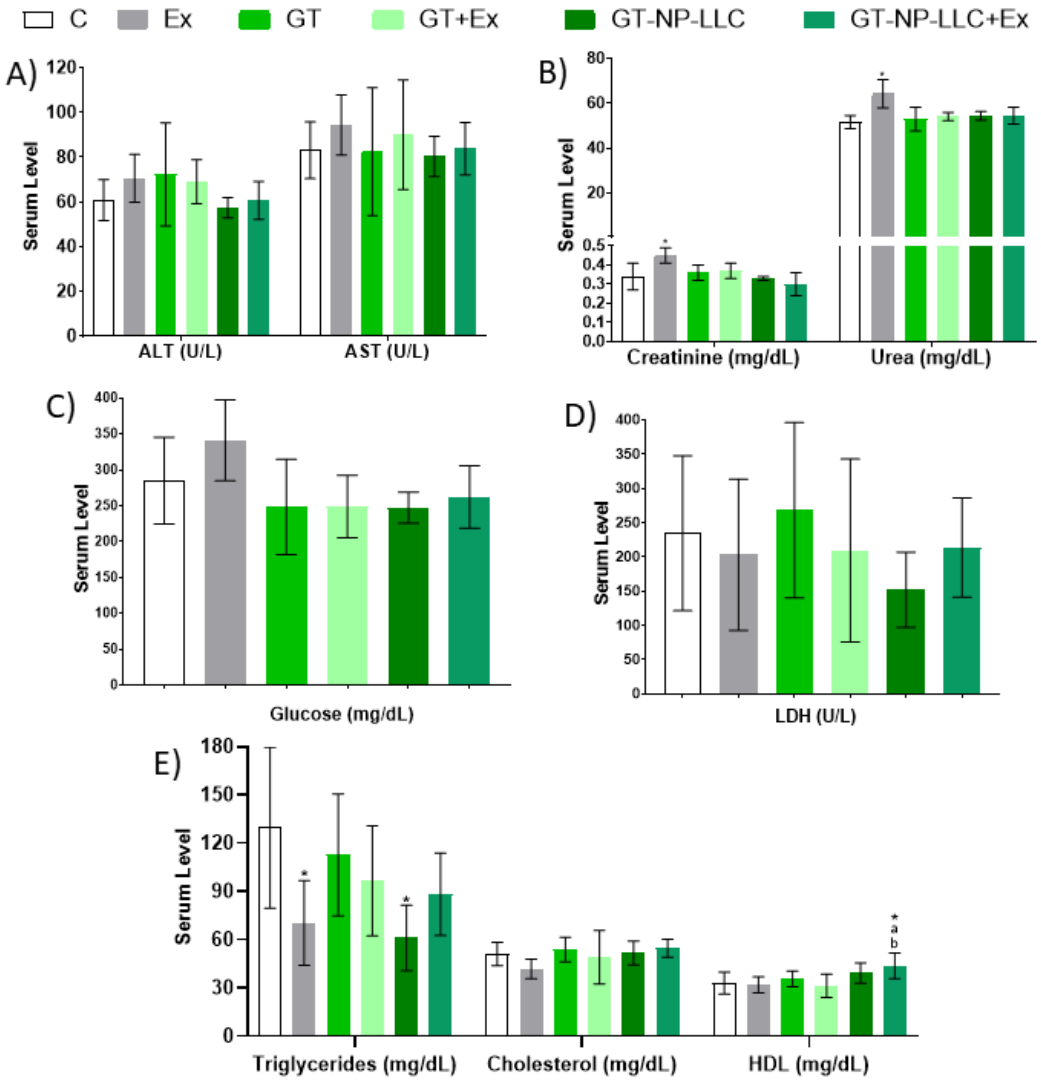


Note: WBC (White blood cells), RBC (Red blood cells), HGB (Hemoglobin), HCT (Hematrocrit), PLT (Platelets).

Biochemical biomarkers are shown in Figure 3. There was a significant increase in creatinine and urea in the Ex group, a decrease in triglycerides levels in Ex and GT-NP-LLC compared to the C and also an increase in HDL levels in GT-NP-LLC+Ex.

Figure 3: Biochemical evaluation. A) Liver profile; B) Renal profile; C) Glucose concentration; D) Lactate dehydrogenase (LDH) activity and in E) Lipid profile.

Note: Data reported by mean ± SD. Liver profile is represented by alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST); Renal profile is represented by creatinine and urea; Lipid profile is reported by triglyceride, total cholesterol and high-density lipoprotein (HDL).



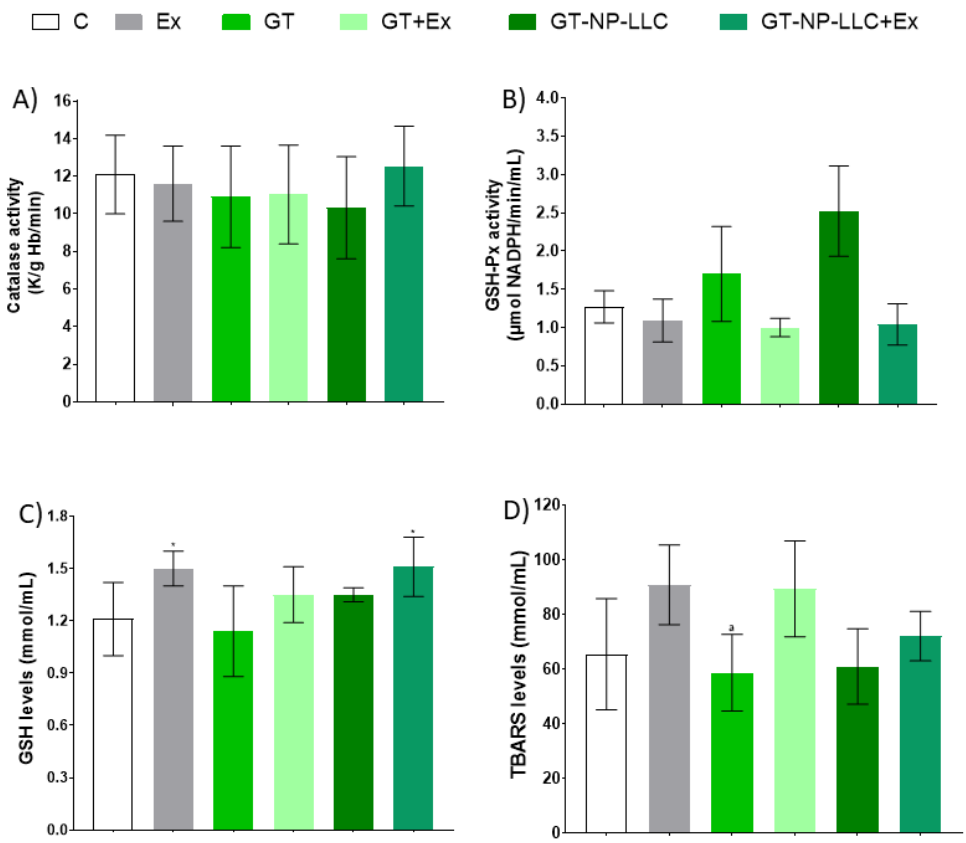
Note: *p<0.05 compared to C, [a]p<0.05 compared to Ex, [b]p<0.05 compared to GT+Ex.

Besides the statistically significant differences, in triglycerides the GT-NP-LLC+Ex group tended to decrease when compared to C (p=0.07). A tendency towards its reduction was also found in total cholesterol levels in Ex compared to GT (p=0.066) and GT-NP-LLC+Ex (p=0.0554).

Oxidative stress

Redox parameters are shown in Figure 4. In addition to the significant differences pointed in the GSH and TBARS graphics, there is a trend to increase TBARS levels in Ex compared to C (p=0.099), and in GT+Ex compared to GT (p=0.052).

Figure 4: Redox state. Catalase (A), Glutathione Peroxidase (GSH-Px) (B), Reduced Glutathione (GSH) (C), Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) (D).

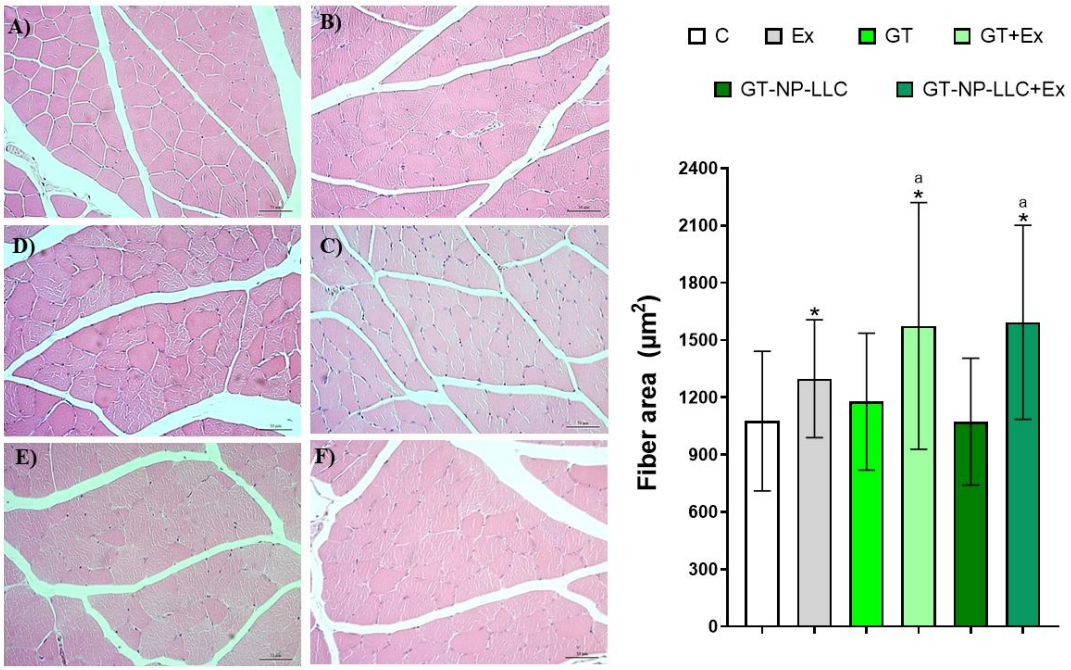


Note: mean ± SD *p<0.05 compared to C, [a]p<0.05 compared to Ex.

Histological analyzes

Fiber size of the gastrocnemius was analyzed to quantify the muscle mass gain of the animals practicing HIIT. All the Ex groups showed increase in the diameter of the gastrocnemius muscle fibers compared to C. In addition, the GT+Ex and GT-NP-LLC+Ex groups showed a significantly higher muscle gain compared to Ex group (Figure 5).

Figure 5: Gastrocnemius photomicrography in H&E in Control (A), Green tea (GT) (B), GT loaded in Nanoparticles of lyotropic liquid crystal (NP-LLC) (C), Exercise (D), GT+Ex (E), GT-NP-LLC+Ex (F), and fiber muscle size of the muscle fiber area.

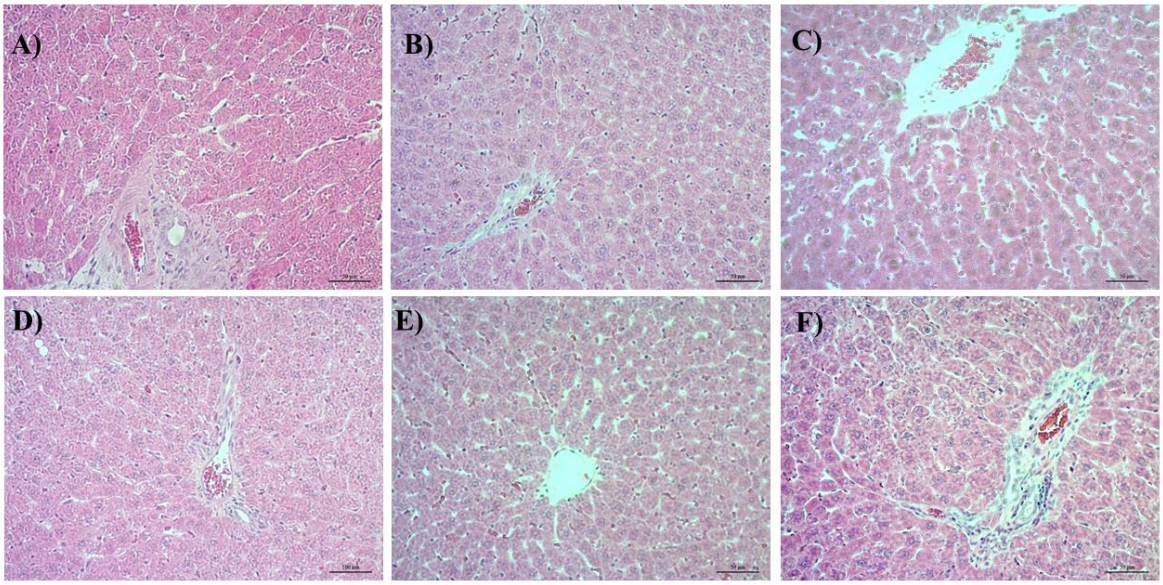


Note: mean ± SD *p<0.05 compared to C, [a]p<0.05 compared to Ex.

Histological analysis (Figure 6) of the liver was performed to check liver integrity, especially for GT consumption, which has potential hepatotoxic effect in excess. Since the NP-LLC carrying GT is a new drug delivery system, its impacts in liver are still unknown, histology guarantees the assessment of GT loaded in NP-LLC

non-toxicity. The findings showed that supplementation of GT or GT loaded in NP-LLC did not cause hepatocyte disorder or hypertrophy, nor did it show signs of inflammation that could indicate hepatotoxicity.

Figure 6: Liver photomicrography in H&E in Control (A), Green tea (GT) (B), GT loaded in Nanoparticles of lyotropic liquid crystal (NP-LLC) (C), Exercise (D), GT+Ex (E), GT-NP-LLC+Ex (F).



Discussion

The pre-clinical study, the administration of GT or GT loaded in NP-LLC anticipated and potentiated the delay in weight gain in groups practicing exercise. This result agrees with an 8 week-clinical study, carried out with 30 overweight women, engaged in aerobic predominance training, for three weekly sessions. The clinical study showed that daily consumption of 500 mg of GT extract potentiated the weight loss achieved by exercise, in addition to reducing pro-inflammatory markers and increasing the expression of adiponectin (24). In another study, 48 overweight men enduring HIIT for 3 weekly sessions,

supplemented daily with 750 mg GT extract, obtained reduction in body fat after 12 weeks of intervention, compared to control (25).

In both studies cited, GT by itself did not induce weight loss, corroborating our findings. However, in our study, GT loaded in NP-LLC was able to delay body weight gain, as well as reducing triglycerides and increasing HDL levels, without the stimulus of exercise. Once GT loaded in NP-LLC is an original formulation, there are no reports to compare. However, it is noteworthy that NP-LLC system was an important technological strategy for incorporating GT, improving the stability, and augmenting the bioavailability of active compounds from GT.

Regarding the proposed exercise model, when animals could not stand with their nose above the water surface, they went to the bottom and jumped to the top with their back paws to breath. As they improved physical conditioning, they tried to keep swimming at the water surface. In general, there was progress in the physical performance of animals, although this evolution was directly associated with GT or GT loaded in NP-LLC supplementations. There was progressive increase in the number of series performed over the weeks, so an increase in the number of jumps was expected. However, groups that were supplemented (GT+Ex and GT-NP-LLC+Ex) had slower progressive increase throughout experiment compared with the Ex group. The explanation is that better conditioned animals kept their heads above the water surface, swimming, and jumping less times throughout the series.

Concerning redox status, it is known that ROS have an important role in the physiological adaptations stimulated by physical exercise and antioxidants consumption can scavenge them (11) (26). It is not yet clear whether antioxidant supplementation inhibits and delays the adaptations of physical exercise (27).

However, in the present study, GT consumption potentiated the animals' performance. In addition, muscle hypertrophy is an important indication of physiological adaptation to training stimulus (28) and an increase in the diameter of the gastrocnemius muscle fibers was observed, being significantly greater in the groups receiving GT or GT loaded in NP-LLC when compared to Ex group.

Increased GSH levels in the Ex group compared to C, combined with the increase lipid peroxidation trend in the same group shows us the endogenous production of antioxidants in face of exercise stress; this is a natural adaptation of the organism (29). The increase in GSH might be related to its protective effect and to the reduction of lipoperoxidation, indicating endogenous natural protection of the physiological antioxidant system. A study with CrossFit practitioners supplemented with 500 mg of GT extract, showed that after six weeks, the supplementation decreased lipid peroxidation and raised total antioxidant capacity compared to placebo (30). In addition, CrossFit groups showed an increase in plasma uric acid concentration. In our study, the Ex group showed an increase in creatinine and urea rates compared to C. These findings agree with a study using low volume HIIT and can be justified due to the higher formation of adenosine monophosphate during the practice of HIIT, which forms uric acid due to hypoxanthine activation (31).

The reduction in lipid peroxidation in the GT group when compared to Ex, combined with the maintenance of GSH in concentrations similar to C may be associated with the antioxidant effect from GT in view of the endogenous action of antioxidants. Furthermore, neither the GSH nor the lipid peroxidation of the supplemented groups increased, which may suggest the antioxidants present in GT and in GT loaded in NP-LLC were efficient in protecting from lipid

peroxidation, without the need to increase endogenous production of antioxidants.

Despite all positive results, our study has some limitations. The weight of the animals was not considered to calculate the GT and GT-NP-LLC doses during the experiment. Moreover, the HIIT protocol was probably not enough to induce severe ROS production, inducing oxidative stress which could achieve different results. Thus, the NP-LLC with GT is a new formulation becoming hard to discuss properly the results found in this investigation.

Conclusion

Green tea is a potent natural antioxidant and its incorporation into the NP-LLC system has shown be an important strategy to protect GT active compounds from redox reactions, in addition to increasing its action *in vivo.* It is not yet clear whether the use of antioxidants is beneficial or disadvantageous to the physiological adaptations in physical exercise. Nevertheless, in the present study, the supplementation with both GT and GT-NP-LLC improves the physical conditioning, increased the muscular mass, and reduced the progression of the body weight gain of the groups submitted to HIIT. Advantageously, GT-NP-LLC itself decreased body mass and triglycerides, suggesting promised further investigation.

Abbreviations

GT: Green tea

LLC: Lyotropic liquid crystal

HIIT: High-intensity interval training

ROS: Reactive oxygen species

C: Control

Ex: Exercise

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

NP-LLC: Nanoparticles of lyotropic liquid crystal

PGC1-α: Proliferator-activated receptor-c coactivator

RBC: Red blood cell

WBC: White blood cell

PLT: Platelets

HGB: Hemoglobin

HCT: Hematocrit

HDL: High density lipoproteins

AST: Aspartate transaminase

ALT: Alanine transaminase

LDH: Lactate dehydrogenation

GSH: Reduced glutathione

GSH-Px: Glutathione peroxidase

CAT: Catalase

TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances

Declarations

Consent for publication:

Not applicable.

Availability of data and materials:

Data and publication materials are available from the corresponding author

on reasonable request.

Competing interests:

The authors declare that they have no competing interests.

Funding:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial and private sectors.

Acknowledgments:

The authors gratefully thank Thaisa Borim Pickler for the technical support, and Higher Education Improvement Coordination (CAPS) for the scholarship.

Contributions

VN Conceptualization, methodology, investigation and writing - Original Draft; JFS methodology; TCMS methodology, investigation; ELAC methodology, investigation; FGL methodology, investigation; MVC methodology, writing - Review & Editing; DG Project administration, supervision and writing - Review & Editing. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Tahani B, Sabzian R. Effect of Camellia sinensis plant on decreasing the level of halitosis: A systematic review. Dent Res J (Isfahan). 2018;15(6):379-84.
2. Gopal J, Muthu M, Paul D, Kim D-H, Chun S. Bactericidal activity of green tea extracts: the importance of catechin containing nano particles. Scientific reports. 2016;6:19710-.

3. Braud L, Peyre L, de Sousa G, Armand M, Rahmani R, Maixent J-M. Effect of Brewing Duration on the Antioxidant and Hepatoprotective Abilities of Tea Phenolic and Alkaloid Compounds in a t-BHP Oxidative Stress-Induced Rat Hepatocyte Model. Molecules (Basel, Switzerland). 2015;20(8):14985-5002.

4. Dierking I, Al-Zangana S. Lyotropic Liquid Crystal Phases from Anisotropic Nanomaterials. Nanomaterials. 2017;7(10).

5. Wang X, Zhang Y, Gui S, Huang J, Cao J, Li Z, et al. Characterization of Lipid-Based Lyotropic Liquid Crystal and Effects of Guest Molecules on Its Microstructure: a Systematic Review. AAPS PharmSciTech. 2018;19(5):2023-40.

6. de Souza JF, Pontes KD, Alves TF, Amaral VA, Rebelo MA, Hausen MA, et al. Spotlight on Biomimetic Systems Based on Lyotropic Liquid Crystal. Molecules. 2017;22(3).

7. Kamal Kumar C, Pooja K, Nidhi M. Liquid Crystal Systems in Drug Delivery. In: Raj KK, Anil KS, Rajesh Kumar K, editors. Novel Approaches for Drug Delivery. Hershey, PA, USA: IGI Global; 2017. p. 217-43.

8. Nieri V, De Souza F, Juliana, Chaud V, Marco, Grotto D. EFEITO PROTETIVO DE FORMULAÇÃO DE CRISTAL LÍQUIDO LIOTRÓPICO NA OXIDAÇÃO DO CHÁ VERDE. Brazillian Journal of Development2020. p. 14529-38.

9. Feito Y, Heinrich KM, Butcher SJ, Poston WSC. High-Intensity Functional Training (HIFT): Definition and Research Implications for Improved Fitness. Sports (Basel, Switzerland). 2018;6(3):76.

10. Martinez-Ferran M, Sanchis-Gomar F, Lavie CJ, Lippi G, Pareja-Galeano H. Do Antioxidant Vitamins Prevent Exercise-Induced Muscle Damage? A Systematic Review. Antioxidants (Basel). 2020;9(5).

11. Merry TL, Ristow M. Do antioxidant supplements interfere with skeletal muscle adaptation to exercise training? The Journal of physiology. 2016;594(18):5135-47.

12. Higgins MR, Izadi A, Kaviani M. Antioxidants and Exercise Performance: With a Focus on Vitamin E and C Supplementation. International journal of environmental research and public health. 2020;17(22):8452.

13. Peternelj T, Coombes J. Antioxidant Supplementation during Exercise Training: Beneficial or Detrimental? Sports medicine (Auckland, NZ). 2011;41:1043-69.

14. Pastor R, Tur JA. Antioxidant Supplementation and Adaptive Response to Training: A Systematic Review. Curr Pharm Des. 2019;25(16):1889-912.

15. Morrison D, Hughes J, Della Gatta PA, Mason S, Lamon S, Russell AP, et al. Vitamin C and E supplementation prevents some of the cellular adaptations to endurance-training in humans. Free Radic Biol Med. 2015;89:852-62.

16. Vera-Cruz M, Nunes E, Mendonça L, Chaves É, Fernandes M. Efeito do chá verde (Camelia sinensis) em ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2010;46:407-13.

17. Bento da Silva P, Fioramonti Calixto GM, Oshiro Júnior JA, Bombardelli RLÁ, Fonseca-Santos B, Rodero CF, et al. Structural Features and the Anti-Inflammatory Effect of Green Tea Extract-Loaded Liquid Crystalline Systems Intended for Skin Delivery. Polymers. 2017;9(1):30.

18. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. PLOS Biology. 2020;18(7):e3000410.

19. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Archives of biochemistry and biophysics. 1959;82(1):70-7.

20. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 1967;70(1):158-69.

21. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984;105:121-6.

22. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979;95(2):351-8.

23. Tolosa EMCd. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. In: Behmer OA, editor. 2ª ed. São Paulo: Manole; 2003.

24. Bagheri R, Rashidlamir A, Ashtary-Larky D, Wong A, Alipour M, Motevalli MS, et al. Does green tea extract enhance the anti-inflammatory effects of exercise on fat loss? Br J Clin Pharmacol. 2020;86(4):753-62.

25. Gahreman D, Heydari M, Boutcher Y, Freund J, Boutcher S. The Effect of Green Tea Ingestion and Interval Sprinting Exercise on the Body Composition of Overweight Males: A Randomized Trial. Nutrients. 2016;8(8):510.
26. Di Meo S, Venditti P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. Oxidative medicine and cellular longevity. 2020;2020:9829176-.
27. Mankowski RT, Anton SD, Buford TW, Leeuwenburgh C. Dietary Antioxidants as Modifiers of Physiologic Adaptations to Exercise. Medicine and science in sports and exercise. 2015;47(9):1857-68.
28. Wackerhage H, Schoenfeld BJ, Hamilton DL, Lehti M, Hulmi JJ. Stimuli and sensors that initiate skeletal muscle hypertrophy following resistance exercise. J Appl Physiol (1985). 2019;126(1):30-43.
29. Gomez-Cabrera MC, Salvador-Pascual A, Cabo H, Ferrando B, Viña J. Redox modulation of mitochondriogenesis in exercise. Does antioxidant supplementation blunt the benefits of exercise training? Free Radic Biol Med. 2015;86:37-46.
30. Sadowska-Krępa E, Domaszewski P, Pokora I, Żebrowska A, Gdańska A, Podgórski T. Effects of medium-term green tea extract supplementation combined with CrossFit workout on blood antioxidant status and serum brain-derived neurotrophic factor in young men: a pilot study. Journal of the International Society of Sports Nutrition. 2019;16(1):13-.
31. Jamurtas AZ, Fatouros IG, Deli CK, Georgakouli K, Poulios A, Draganidis D, et al. The Effects of Acute Low-Volume HIIT and Aerobic Exercise on Leukocyte Count and Redox Status. J Sports Sci Med. 2018;17(3):501-8.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O chá verde é um potente antioxidante natural que após o preparo está sujeito a oxidação. As diferentes marcas comerciais de chá verde analisadas apresentaram uma grande variação no seu potencial antioxidante, tornando a escolha da marca um importante fator ao se consumir o chá verde. A incorporação do chá verde nos sistemas a base de NP-CLL mostrou ser uma importante estratégia para protegê-lo de reações de oxirredução, além de possuir um grande potencial de ação *in vivo* a ser investigado, pelas suas características biomiméticas. A suplementação de chá verde e de NP-CLL com chá verde potencializou a melhora do condicionamento físico, aumentou a massa muscular e reduziu o ritmo do ganho de peso dos grupos submetidos ao HIIT de baixa densidade. Além disso, os efeitos da NP-CLL com chá na composição corporal e nas análises bioquímicas, sem o estímulo do exercício, são promissores e precisam se melhor investigados.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v.105, p.121-126, 1984.

ABDELAZIZ, H. M.; ELZOGHBY, A. O.; HELMY, M. W.; SAMAHA, M. W. *et al.* Liquid crystalline assembly for potential combinatorial chemo-herbal drug delivery to lung cancer cells. **International journal of nanomedicine**, 14, p. 499-517, 2019.

ALVES FERREIRA, M.; OLIVEIRA GOMES, A. P.; GUIMARÃES DE MORAES, A. P.; FERREIRA STRINGHINI, M. L. *et al.* Green tea extract outperforms metformin in lipid profile and glycaemic control in overweight women: A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. **Clin Nutr ESPEN**, 22, p. 1-6, Dec 2017.

ASTILL, C.; BIRCH, M. R.; DACOMBE, C.; HUMPHREY, P. G. *et al.* Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. **J Agric Food Chem**, 49, n. 11, p. 5340-5347, Nov 2001.

BATISTA, G. D. A. P.; CUNHA, C. L. P. D.; SCARTEZINI, M.; VON DER HEYDE, R. *et al.* Estudo prospectivo, duplo cego e cruzado da Camellia sinensis (chá verde) nas dislipidemias. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 93, p. 128-134, 2009.

BÉLGICA, Royal Decree amending the Royal Decree of 29 August 1997 concerning the manufacture and trade in foods from plants or from plant preparations, **Belgian Ministry of Health**, 2012.

BENTO DA SILVA, P.; FIORAMONTI CALIXTO, M. G.; OSHIRO JÚNIOR, A. J.; BOMBARDELLI, L. R. *et al.* Structural Features and the Anti-Inflammatory Effect of Green Tea Extract-Loaded Liquid Crystalline Systems Intended for Skin Delivery. **Polymers**, 9, n. 1, 2017.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C.L.W.T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology,** v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CAPUTO, F.; OLIVEIRA, M.; GRECO, C.; DENADAI, B. Exercício aeróbio: Aspectos bioenergéticos, ajustes fisiológicos, fadiga e índices de desempenho. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, 11, 01/01 2011.

CHAN, C. Y.; WEI, L.; CASTRO-MUÑOZLEDO, F.; KOO, W. L. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks 3T3-L1 adipose conversion by inhibition of cell proliferation and suppression of adipose phenotype expression. **Life Sci**, 89, n. 21-22, p. 779-785, Nov 21 2011.

CHANTRE, P.; LAIRON, D. Recent findings of green tea extract AR25 (Exolise) and its activity for the treatment of obesity. **Phytomedicine**, 9, n. 1, p. 3-8, Jan 2002.

CHAUDHARY, K. K.; POOJA, K.; MISHRA, N. **Novel Approaches for drug Delivery, Chapter: Liquid Crystal Systems in Drug Delivery**, USA, Publisher: IGI Global, 2016.

CHEN, Y.; MA, P.; GUI, S. Cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery systems. **Biomed Res Int**, 2014, p. 815981, 2014.

CRUZ, V., M. et al. Efeito do chá verde (*Camelia sinensis*) em ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.46, p. 407-413, 2010.

DE SOUZA, J. F.; PONTES, K. D.; ALVES, T. F.; AMARAL, V. A. *et al.* Spotlight on Biomimetic Systems Based on Lyotropic Liquid Crystal. **Molecules**, 22, n. 3, Mar 7 2017.

DEKANT, W.; FUJII, K.; SHIBATA, E.; MORITA, O. *et al.* Safety assessment of green tea based beverages and dried green tea extracts as nutritional supplements. **Toxicol Lett**, 277, p. 104-108, Aug 5 2017.

DIERKING, I.; AL-ZANGANA, S. Lyotropic Liquid Crystal Phases from Anisotropic Nanomaterials. **Nanomaterials**, 7, n. 10, 2017.

DULLOO, A. G.; DURET, C.; ROHRER, D.; GIRARDIER, L. *et al.* Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. **Am J Clin Nutr**, 70, n. 6, p. 1040-1045, Dec 1999.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

FEITO, Y. et al. High-Intensity Functional Training (HIFT): Definition and Research Implications for Improved Fitness. **Sports (Basel, Switzerland)**, v. 6, n.3, p. 76, 2018.

FRANÇA, Order Laying Down the List of Plants, Other than Mushrooms, Authorised in Food Supplements and Their Conditions of Use. Number EFIC 1233000A, **French Ministry of Economy and Finance**, 2012. Disponível em: https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=LEGITEXT000029255041&dateTexte=20140624.

GALATI, G.; LIN, A.; SULTAN, A. M.; O'BRIEN, P. J. Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. **Free Radic Biol Med**, 40, n. 4, p. 570-580, Feb 15 2006.

GIANFREDI, V.; NUCCI, D.; ABALSAMO, A.; ACITO, M. *et al.* Green Tea Consumption and Risk of Breast Cancer and Recurrence-A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. **Nutrients**, 10, n. 12, Dec 3 2018.

GOMES, A.L.M.; DANTAS, E.H.M., CAMERON, L.C. Respostas fisiológicas e mecânicas do treinamento intervalado, de alta intensidade, de distâncias curtas a longas em atletas de natação. **Fitness & Performance Journal**, v.2, n.2, p.75-80, 2003.

GOMEZ-CABRERA, M.-C.; BORRÁS, C.; PALLARDÓ, F. V.; SASTRE, J. *et al.* Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. **The Journal of Physiology**, 567, n. 1, p. 113-120, 2005/08/01 2005.

GOPAL, J.; MUTHU, M.; PAUL, D.; KIM, D.-H. *et al.* Bactericidal activity of green tea extracts: the importance of catechin containing nano particles. **Scientific reports**, 6, p. 19710-19710, 2016.

GROUSSARD, C.; MAILLARD, F.; VAZEILLE, E.; BARNICH, N. *et al.* Tissue-Specific Oxidative Stress Modulation by Exercise: A Comparison between MICT and HIIT in an Obese Rat Model. **Oxid Med Cell Longev**, 2019, p. 1965364, 2019.

GRUENWALD, J., BRENDLER, T., JAENICKE, C. **PDR for Herbal Medicines**. 2nd ed. Montvale, NJ: Medical Economics Company, Inc.; 2000.

GUO, Y.; ZHI, F.; CHEN, P.; ZHAO, K. *et al.* Green tea and the risk of prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, 96, n. 13, p. e6426, Mar 2017.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol,** v. 42, n. 2, p. 231-255, 2004.

HARGREAVES, M.; SPRIET, L. L. Exercise Metabolism: Fuels for the Fire. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 8, n. 8, Aug 1 2018.

HAYAT, K.; IQBAL, H.; MALIK, U.; BILAL, U. *et al.* Tea and its consumption: benefits and risks. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 55, n. 7, p. 939-954, 2015.

HU, J.; WEBSTER, D.; CAO, J.; SHAO, A. The safety of green tea and green tea extract consumption in adults - Results of a systematic review. **Regul Toxicol Pharmacol**, 95, p. 412-433, Jun 2018.

HUANG, Y.; CHEN, H.; ZHOU, L.; LI, G. *et al.* Association between green tea intake and risk of gastric cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis of observational studies. **Public Health Nutr**, 20, n. 17, p. 3183-3192, Dec 2017.

HUNG, P. F.; WU, B. T.; CHEN, H. C.; CHEN, Y. H. *et al.* Antimitogenic effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes depends on the ERK and Cdk2 pathways. **Am J Physiol Cell Physiol**, 288, n. 5, p. C1094-1108, May 2005.

ICHINOSE, T.; NOMURA, S.; SOMEYA, Y.; AKIMOTO, S. *et al.* Effect of endurance training supplemented with green tea extract on substrate metabolism during exercise in humans. **Scand J Med Sci Sports**, 21, n. 4, p. 598-605, Aug 2011.

JAMURTAS, A. Z.; FATOUROS, I. G.; DELI, C. K.; GEORGAKOULI, K. *et al.* The Effects of Acute Low-Volume HIIT and Aerobic Exercise on Leukocyte Count and Redox Status. **J Sports Sci Med**, 17, n. 3, p. 501-508, Sep 2018.

JANSSENS, P. L.; HURSEL, R.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Long-term green tea extract supplementation does not affect fat absorption, resting energy expenditure, and body composition in adults. **J Nutr**, 145, n. 5, p. 864-870, May 2015.

JOWKO, E.; DŁUGOŁĘCKA, B.; MAKARUK, B.; CIEŚLIŃSKI, I. The effect of green tea extract supplementation on exercise-induced oxidative stress parameters in male sprinters. **European journal of nutrition**, 54, 08/14 2014.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea Polyphenols in Promotion of Human Health. **Nutrients**, 11, n. 1, p. 39, 2018.

LAMARÃO, R. D. C.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Revista de Nutrição**, 22, p. 257-269, 2009.

LAUER, N. et al. Critical involvement of hydrogen peroxide in exercise-induced up-regulation of endothelial NO synthase. Cardiovasc. Res, v. 65, p. 254-262, 2005.

MACINNIS, M. J.; GIBALA, M. J. Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. **J Physiol**, 595, n. 9, p. 2915-2930, May 1 2017.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, 66, p. 54-57, 2014.

MAZZANTI, G.; DI SOTTO, A.; VITALONE, A. Hepatotoxicity of green tea: an update. **Arch Toxicol**, 89, n. 8, p. 1175-1191, Aug 2015.

MURASE, T.; HARAMIZU, S.; SHIMOTOYODOME, A.; NAGASAWA, A. *et al.* Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 288, n. 3, p. R708-R715, 2005/03/01 2005.

NAGAO, T.; HASE, T.; TOKIMITSU, I. A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. **Obesity (Silver Spring)**, 15, n. 6, p. 1473-1483, Jun 2007.

NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. **LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury**. Bethesda (MD), 2012. Available in livertox.nih.gov.

NIKOLAIDIS, M. G.; KERKSICK, C. M.; LAMPRECHT, M.; MCANULTY, S. R. Does Vitamin C and E Supplementation Impair the Favorable Adaptations of Regular Exercise? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2012, p. 707941, 2012/08/13 2012.

OHISHI, T.; GOTO, S.; MONIRA, P.; ISEMURA, M. *et al.* Anti-inflammatory Action of Green Tea. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem**, 15, n. 2, p. 74-90, 2016.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, 95, n. 2, p. 351-358, Jun 1979.

OLIVEIRA, B. R. R.; SANTOS, T. M.; KILPATRICK, M.; PIRES, F. O. *et al.* Affective and enjoyment responses in high intensity interval training and continuous training: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, 13, n. 6, p. e0197124, 2018.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxide. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine,** v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PERCIE DU SERT, N.; HURST, V.; AHLUWALIA, A.; ALAM, S. *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **PLOS Biology**, 18, n. 7, p. e3000410, 2020.

PETERNELJ, T.; COOMBES, J. Antioxidant Supplementation during Exercise Training: Beneficial or Detrimental? **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, 41, p. 1043-1069, 12/01 2011.

RAHIMI, R.; FALAHI, Z. Effect of Green Tea Extract on Exercise-Induced Oxidative Stress in Obese Men: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study. **Asian Journal of Sports Medicine**, In Press, 06/24 2017.

RIEBE, D.; EHRMAN, J. K.; LIGUORI, G.; MAGAL. American College of Sports Medicine, **ACSM's guidelines for exercise testing and prescription**, 2018.

ROTHSCHILD, J. A.; BISHOP, D. J. Effects of Dietary Supplements on Adaptations to Endurance Training. **Sports Med**, 50, n. 1, p. 25-53, Jan 2020.

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

SCHMIDT, M.; SCHMITZ, H. J.; BAUMGART, A.; GUÉDON, D. *et al.* Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. **Food Chem Toxicol**, 43, n. 2, p. 307-314, Feb 2005.

SELLAMI, M.; SLIMENI, O.; POKRYWKA, A.; KUVACIC, G. *et al.* Herbal medicine for sports: a review. **J Int Soc Sports Nutr**, 15, p. 14, 2018.

SHEN, Y.; DIERKING, I. Perspectives in Liquid-Crystal-Aided Nanotechnology and Nanoscience. **Applied Sciences**, 9, n. 12, 2019.

SUZUKI, T.; PERVIN, M.; GOTO, S.; ISEMURA, M. *et al.* Beneficial Effects of Tea and the Green Tea Catechin Epigallocatechin-3-gallate on Obesity. **Molecules**, 21, n. 10, Sep 29 2016.

SZULIŃSKA, M.; STĘPIEŃ, M.; KRĘGIELSKA-NAROŻNA, M.; SULIBURSKA, J. *et al.* Effects of green tea supplementation on inflammation markers, antioxidant status and blood pressure in NaCl-induced hypertensive rat model. **Food & nutrition research**, 61, n. 1, p. 1295525-1295525, 2017.

TAHANI, B.; SABZIAN, R. Effect of Camellia sinensis plant on decreasing the level of halitosis: A systematic review. **Dent Res J (Isfahan)**, 15, n. 6, p. 379-384, Nov-Dec 2018.

TOLOSA, E. M et al. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2° ed. São Paulo: Manole, 2003.

VAN LOON, L. J.; GREENHAFF, P. L.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; SARIS, W. H. *et al.* The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. **J Physiol**, 536, n. Pt 1, p. 295-304, Oct 1 2001.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. D. F.; MANFREDINI, V. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 30, p. 1323-1338, 2007.

VENABLES, M. C.; HULSTON, C. J.; COX, H. R.; JEUKENDRUP, A. E. Green tea extract ingestion, fat oxidation, and glucose tolerance in healthy humans. **Am J Clin Nutr**, 87, n. 3, p. 778-784, Mar 2008.

WANG, Y.; WANG, B.; DU, F.; SU, X. *et al.* Epigallocatechin-3-gallate attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal interstitial fibrosis in

mice. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, 63, n. 4, p. 270-279, 2015.

WATSON, T. A.; CALLISTER, R.; TAYLOR, R. D.; SIBBRITT, D. W. *et al.* Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise. **Med Sci Sports Exerc**, 37, n. 1, p. 63-71, Jan 2005.

WOLFRAM, S.; WANG, Y.; THIELECKE, F. Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. **Mol Nutr Food Res**, 50, n. 2, p. 176-187, Feb 2006.
World Health Organization. **Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials**.

World Health Organization. **Global Recommendations on Physical Activity for Health**. Geneva, 2020. Disponível em: https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/technical-guidance/stay-physically-active-during-self-quarantine.

World Health Organization. Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. *In*: **WHO Guidelines on Physical Activity and Sedentary Behaviour**. Geneva: World Health Organization
© World Health Organization 2020., 2020.

YANG, J.; MAO, Q. X.; XU, H. X.; MA, X. *et al.* Tea consumption and risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis update. **BMJ Open**, 4, n. 7, p. e005632, Jul 22 2014.

YANG, W. S.; WANG, W. Y.; FAN, W. Y.; DENG, Q. *et al.* Tea consumption and risk of type 2 diabetes: a dose-response meta-analysis of cohort studies. **Br J Nutr**, 111, n. 8, p. 1329-1339, Apr 28 2014.

YATES, A. A.; ERDMAN, J. W., JR.; SHAO, A.; DOLAN, L. C. *et al.* Bioactive nutrients - Time for tolerable upper intake levels to address safety. **Regul Toxicol Pharmacol**, 84, p. 94-101, Mar 2017.

YUAN, J.-M.; SUN, C.; BUTLER, L. M. Tea and cancer prevention: epidemiological studies. **Pharmacological research**, 64, n. 2, p. 123-135, 2011.

ZHENG, X. Q.; LI, Q. S.; XIANG, L. P.; LIANG, Y. R. Recent Advances in Volatiles of Teas. **Molecules**, 21, n. 3, p. 338, Mar 11 2016.

ANEXO I – Certificado de aprovação em CEUA-UNISO

UNIVERSIDADE DE SOROCABA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA–UNISO

PARECER

Protocolo nº 152/2019
Interessado (a): Denise Grotto
Orientador (a): o mesmo
Título do Projeto: Avaliação antioxidante do chá verde e um sistema de cristal líquido liotrópico com chá verde em modelo animal com exercício físico de alta intensidade

Apresentado à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA para análise, segundo a Lei No. 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, foi considerado:

[X] **APROVADO**.

[ ] **APROVADO com RECOMENDAÇÃO**, devendo o proponente encaminhar as modificações sugeridas em anexo para complementação do protocolo;

[ ] **COM PENDÊNCIA**, devendo o proponente readequar os itens do protocolo;

[ ] **REPROVADO**

Manifestação do Parecerista:

Nome: Denise Grotto

Coordenador da CEUA-Uniso

Assinatura:

Data: 14/03/2019

* Encaminhar cópia deste parecer para o e-mail ceua@uniso.br e original assinado para a Seção Técnica Acadêmica