

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

MONALLISA ALVES FERREIRA

**EFEITO DO EXTRATO SECO DE CHÁ VERDE E DA  
METFORMINA SOBRE O CONTROLE DOS FATORES DE  
RISCO PARA O DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 EM  
MULHERES COM EXCESSO DE PESO**

Goiânia  
2016

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG E NO BANCO DE TESES DA CAPES**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) e a Capes a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG) e banco de teses Capes, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor (a):	Monallisa Alves Ferreira		
E-mail:	mona-alves@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor:	Sem vínculo empregatício		
Agência de fomento:	Sem financiamento	Sigla:	
País:	Brasil	UF:	GO
		CNPJ:	024.798.661-57
Título:	Efeito do extrato seco de chá verde e da metformina sobre o controle dos fatores de risco para o diabetes mellitus tipo 2 em mulheres com excesso de peso		
Palavras-chave:	Camellia sinensis, metformina, resistência à insulina, obesidade, obesidade abdominal, lipoproteínas de baixa densidade		
Título em outra língua:	Green tea dry extract and metformin effects on the control of risk factors for type 2 diabetes mellitus in overweight women		
Palavras-chave em outra língua:	Camellia sinensis, metformin, insulin resistance, obesity, obesity abdominal, low-density lipoproteins		
Área de concentração:	Nutrição e Saúde		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	26/02/2016		
Programa de Pós-Graduação:	Nutrição e Saúde		
Orientador (a):	Profª Drª Patrícia Borges Botelho		
E-mail:	patriciaborges@ufg.br		
Co-orientadores:*	Prof Dr João Felipe Mota e Profª Drª Maria Luiza Ferreira Stringhini		
E-mails:	jfemota@yahoo.com.br e mluizastring@uol.com.br		

\*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

**3. Informações de acesso ao documento:**

Liberação para disponibilização?<sup>1</sup>       total       parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: \_\_\_\_\_

Outras restrições: \_\_\_\_\_

Liberação para ambos (Capes e BDTD/UFG)       Liberação apenas para BDTD/UFG

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do (s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

*Monallisa Alves Ferreira*

Data: 16/03/2016

<sup>1</sup> Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

MONALLISA ALVES FERREIRA

**EFEITO DO EXTRATO SECO DE CHÁ VERDE E DA  
METFORMINA SOBRE O CONTROLE DOS FATORES DE  
RISCO PARA O DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 EM  
MULHERES COM EXCESSO DE PESO**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do Título de Mestre em Nutrição e Saúde.

**Orientador:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Borges Botelho

**Coorientador (es):**

Prof. Dr. João Felipe Mota

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Luiza Ferreira Stringhini

**Linha de pesquisa:**

Diagnóstico e intervenção nutricional e em saúde

**Financiamento:** Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (Bolsa CAPES 002/2013)

Goiânia  
2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Alves Ferreira, Monallisa

Efeito do extrato seco de chá verde e da metformina sobre o controle dos fatores de risco para o diabetes mellitus tipo 2 em mulheres com excesso de peso [manuscrito] / Monallisa Alves Ferreira. - 2016.

CLI, 151 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Borges Botelho; co-orientador Dr. João Felipe Mota; co-orientador Dr. Maria Luiza Ferreira Stringhini. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Nutrição (Fanut) , Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas.

1. Camellia sinensis. 2. Metformina. 3. Resistência à insulina. 4. Obesidade. 5. Lipoproteínas de baixa densidade. I. Borges Botelho, Patrícia, orient. II. Mota, João Felipe, co-orient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

MONALLISA ALVES FERREIRA

**EFEITO DO EXTRATO SECO DE CHÁ VERDE E DA  
METFORMINA SOBRE O CONTROLE DOS FATORES  
DE RISCO PARA O DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 EM  
MULHERES COM EXCESSO DE PESO**

**Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 16 de fevereiro de 2016, pela  
Banca Examinadora constituída pelos membros:**

Profª Drª Josefina Bressan  
DNS/UFV

Profª Drª Patrícia Borges Botelho  
CAJ/UFG

Profª Drª Patrícia Borges Botelho  
FANUT/UFG (orientador)

**Membros suplentes:**

Profª Drª Maria do Rosário Gondim Peixoto  
FANUT/UFG

Prof. Dr. Gustavo Duarte Pimentel  
FANUT/UFG

*“[...] porque o Senhor teu Deus te há de abençoar em toda a tua colheita, em todo o trabalho das tuas mãos; por isso certamente te alegrarás.”*

Deuteronômio 16:15

## AGRADECIMENTOS

A Deus, porque não há outro colo que me acalme e me capacite para tudo o que me proponho a fazer, desde meu levantar até as mais árduas conquistas como essa.

Aos meus pais, que me prepararam para a vida, me estimulando a crescer sempre. Obrigada pelo apoio, cada um na sua forma de cuidar [e amar]! Eu não chegaria a lugar algum sem vocês.

Àquele que enche meus dias de um turbilhão de sentimentos e que sempre soube me afagar. Você é a parte mais serena de mim, Luis Urias, meu porto seguro. Obrigada por tudo!

Às minhas famílias, natural e adotada! Certamente, vocês fazem parte dessa conquista.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Borges Botelho. O caminho a ser trilhado, eu escolhi. O caminhar foi enriquecido por sua experiência e amizade. Obrigada! O sucesso é nosso!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. João Felipe Mota, por acreditar em nosso estudo e abrilhantá-lo com sua dedicação a todas as orientações que precisei.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Ferreira Stringhini pela ajuda sempre que solicitada!

Ao Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho pela disponibilidade, pelas discussões cheias de conhecimento e pela recepção sempre envolvida com seu bom humor!

À Dr<sup>a</sup>. Estela Muszkat Jatene pela parceria no desenvolvimento do projeto de pesquisa e contribuição no cuidado com os voluntários no decorrer do estudo.

Àquela que não é apenas minha amiga, mas minha parceira de vida. Não é por acaso que estamos juntas nessa, Anna Gomes, “nossos caminhos foram traçados”. Obrigada por participar de tudo e pelo conforto que sinto com seu companheirismo!

Às alunas Ana Paula Morais, Gabrielle Borba e Natália Magalhães, que eu não só tive a honra de conhecer e trabalhar, mas de coorientar. Vocês são umas fofas!

À minha querida Enfermeira Fernanda Araújo, pela ajuda e pelo alto astral que você trouxe à coleta!

Ao Laboratório Rômulo Rocha, pelo auxílio prestado durante as coletas e as análises bioquímicas.

Às voluntárias desse estudo, que se disponibilizaram a comparecer na FANUT durante os três meses de coleta e acreditaram em nosso trabalho.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o efeito do tratamento com o extrato seco de chá verde isolado e/ou combinado com a metformina sobre fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) em indivíduos com excesso de gordura corporal. **Métodos:** Ensaio clínico, randomizado controlado, duplo-cego com duração de 12 semanas, no qual 120 mulheres com excesso de gordura corporal foram distribuídas em um dos quatro grupos de intervenção: Controle (n = 29; 1g de celulose/dia); Chá Verde (n = 32; 1g de extrato de chá verde seco/dia); Metformina (n = 28; 1g de metformina/dia); Chá Verde + Metformina (n = 31; 1g de extrato de chá verde seco + 1 g de metformina/dia). Medidas antropométricas, de composição corporal, perfil lipídico, glicemia e insulinemia de jejum foram avaliadas. **Resultados:** Após 12 semanas de intervenção, o chá verde demonstrou efeito positivo em relação ao controle glicêmico. Em contrapartida, a metformina induziu o aumento de hemoglobina glicada ( $0.048 \pm 0.189\%$ ;  $p = 0.017$ ), a redução do peso corporal ( $-1,318 \pm 0,366$ ,  $p = 0,034$ ) e da massa magra ( $-1,249 \pm 0,310$ ;  $p = 0,009$ ). Somente o chá verde alterou o perfil lipídico reduzindo significativamente o colesterol total e LDL-c. **Conclusão:** O efeito isolado do chá verde foi superior ao da metformina no controle glicêmico e no perfil lipídico. Logo, o extrato seco de chá verde pode ser uma alternativa viável para minimizar o risco de desenvolvimento de DM2 em mulheres com excesso de gordura corporal.

Palavras-chaves: *Camellia sinensis*, metformina, resistência à insulina, obesidade, obesidade abdominal, lipoproteínas de baixa densidade.

## ABSTRACT

### GREEN TEA DRY EXTRACT AND METFORMIN EFFECTS ON THE CONTROL OF RISK FACTORS FOR TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN OVERWEIGHT WOMEN

**Aim:** The aim of this study was to evaluate the effect of dry green tea extract isolated and/or combined with metformin on diabetes type 2 risk factors in women with overweight. **Methods:** A double-blind, placebo-controlled, randomized trial which 120 obese women were randomly assigned in a double-blind manner to 1 of 4 groups: Control (n = 29; 1g of cellulose); Green tea (n = 32; 1g of dry green tea extract); Metformin (n = 28; 1g of metformin); Green tea + Metformin (n = 31; 1g of dry green tea extract + 1g of metformin). Anthropometric measurements, body composition, fasting blood samples were evaluated. **Results:** After 12 weeks, green tea had positive effect on glycemic control. In contrast, the metformin led to an increase of HbA1c concentration ( $0.048 \pm 0.189\%$ ;  $p = 0.017$ ). It also reduced body weight ( $-1.318 \pm 0.366$ ,  $p = 0.034$ ) as well as decreased lean body mass ( $-1.249 \pm 0.310$ ;  $p = 0.009$ ). Regarding the lipid parameters, green tea significantly reduced total cholesterol and LDL-c. **Conclusion:** The isolated action of green tea was superior to metformin on glycemic control and lipid profile. Therefore, green tea dry extract may be a better alternative to treat risk factors to DM2 in overweight women than metformin.

**Keywords:** *Camellia sinensis*, metformin, insulin resistance, obesity, obesity abdominal, low-density lipoproteins.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAMI: Associação para o Avanço da Instrumentação Médica  
ADA: *American Diabetes Association*  
AdipoR1: Receptores de Adiponectina 1;  
AdipoR2: Receptores de Adiponectina 2;  
AGL: Ácidos Graxos Livres  
AHA: Sociedade Americana do Coração  
AMP: Adenosina Monofosfato  
AMPK: Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato  
ATP: Trifosfato De Adenosina  
ATP-sintase: Atividade da Trifosfato de Adenosina Sintase  
BHS: Sociedade Britânica de Hipertensão  
COMT: Catecol-O-Metil-Transferase  
CPK: Creatinofosfoquinase  
DM2: Diabetes *Mellitus* tipo 2  
DXA: Absorciometria Radiológica de Feixe Duplo  
EC: Epicatequina  
ECG: Epicatequina-3-Galato  
EGC: Epigallocatequina  
EGCG: Epigallocatequina-3-Galato  
G6PASE: Glicose-6-Fosfatase  
GLP-1: Peptídeo semelhante ao Glucagon 1  
GLUT-1: Transportador de Glicose 1  
GLUT4: Transportador de Glicose 4  
GT: Grupo de intervenção chá verde  
GTMF: Grupo de intervenção chá verde e metformina  
HOMA-IR: Modelo de avaliação da homeostase para avaliação da resistência à insulina  
Homa  $\beta$ : Modelo de avaliação da homeostase para avaliação da capacidade funcional das células  $\beta$ - pancreáticas  
HPLC: Cromatografia líquida de alta performance  
HPTLC: *Alto desempenho cromatografia em camada delgada*  
IL-6: Interleucina 6

IMC: Índice de Massa Corporal  
IRS-1: Substrato 1 do Receptor de Insulina  
IRS-2: Substrato 2 do Receptor de Insulina  
JNK: c-Jun N-terminal quinase  
LHS : Lipase Hormônio-Sensível  
LPL: Lipase de Lipoproteína  
MAPK : Proteína Quinase Ativada por Mitógeno  
MAPKS: Proteínas Tirosina Quinase Ativada por Mitógenos  
MF: Grupo de intervenção metformina  
NADPH-oxidase: Oxidase Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina;  
NFkB: Fator Nuclear Kappa B;  
NK: células *Natural Killer*  
NTS: Núcleo do Trato Solitário  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
PC: Grupo de intervenção placebo  
*PEPCK*: fosfoenolpiruvato carboxiquinase  
Ppar- $\gamma$ : receptores ativados por proliferador de peroxissoma  $\gamma$   
REBEC: Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos  
ROS: espécies reativas de oxigênio  
SOCS-3: Supressor de Sinalização de Citocinas-3  
SREBP-1c: Proteína de ligação ao elemento regulatório de esteróis  
TG: Triacilgliceróis  
TGO: Transaminase Glutâmico-Oxalacética  
TGP: Transaminase Glutâmico-Pirúvica  
TLR4: Receptor do Tipo Toll 4  
TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$   
UCP-1: Proteína Desacopladora-1  
UFG: Universidade Federal de Goiás  
VLDL: Lipoproteína de Densidade Muito Baixa  
WAT: Tecido Adiposo Branco

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
2.1 EXCESSO DE GORDURA CORPORAL COMO DESENCADEADOR DA RESISTÊNCIA À INSULINA: INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	12
2.2 EXCESSO DE GORDURA CORPORAL COMO DESENCADEADOR DA RESISTÊNCIA À INSULINA: DISLIPIDEMIA E DESCOMPENSAÇÃO DO CONTROLE GLICÊMICO.....	16
2.3 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA CONTROLES DE PESO E GLICÊMICO....	18
2.3.1 <b>Metformina</b> .....	19
2.3.2 <b>Chá verde</b> .....	23
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E CASUÍSTICA .....	30
4.2 LOCAL DE ESTUDO E QUESTÕES ÉTICAS .....	32
4.3 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE CÁPSULAS.....	32
4.4 ACOMPANHAMENTO DOS SINAIS E SINTOMAS APRESENTADOS DURANTE A INTERVENÇÃO.....	33
4.5 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	33
4.6 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR.....	34
4.7 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL.....	34
4.8 AVALIAÇÃO LABORATORIAL.....	35
4.8.1 <b>Perfil lipídico, glicose e insulina</b> .....	35
4.8.2 <b>Índice HOMA (Homeostasis Model Assessment)</b> .....	35
4.8.3 <b>Acompanhamento da atividade renal e hepática</b> .....	36
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38
<b>CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO 1</b> .....	45
<b>CAPÍTULO 3 – ARTIGO CIENTÍFICO 2</b> .....	68
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	109
<b>APÊNDICES</b> .....	110
<b>ANEXOS</b> .....	135

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada um grave problema de saúde pública, em decorrência de sua crescente prevalência. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os casos de obesidade duplicaram nos últimos dez anos, sendo que, no continente americano, um a cada quatro adultos são obesos (WHO, 2014). Estima-se que aproximadamente três milhões de pessoas no mundo morram por complicações decorrentes da obesidade, como hipertensão arterial, infarto agudo do miocárdio e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (WHO, 2014).

Entre os principais fatores que determinam o desenvolvimento do DM2 em indivíduos obesos destacam-se a inflamação e o estresse oxidativo decorrentes do excesso de tecido adiposo, a dislipidemia e as alterações na glicemia. Estudos demonstraram que alterações no estilo de vida, com plano alimentar balanceado e exercícios físicos são efetivas em retardar ou prevenir o DM2 em pacientes obesos por modularem tais fatores (HENRY; CHILTON; GARVEY, 2013). Em alguns casos, a prática clínica abrange também intervenções farmacológicas com antidiabéticos orais, como a metformina (ADA, 2011; DOMECCQ et al., 2011; PERNICOVA; KORBONITS, 2014).

A metformina, um agente biguanida, que auxilia na perda de peso e no controle glicêmico em indivíduos com o diagnóstico de diabetes, também tem sido utilizada para reduzir a incidência de complicações metabólicas em pacientes obesos não diabéticos (DPPRG et al., 2002; MALIN; KASHYAP, 2014). Os mecanismos de ação sugeridos para essa ação envolvem a redução da resistência à insulina, regulação da gliconeogênese hepática e de hormônios relacionados à homeostase da glicose (ANDUJAR-PLATA; PI-SUNYER; LAFERRERE, 2012).

No entanto, ainda não há um consenso sobre a efetividade da prescrição precoce da metformina nessa população (BINNERT, 2003; LEVRI et al., 2005; LIM et al., 2011). Outros estudos afirmam ainda que mudanças nos hábitos de vida, como alimentação equilibrada e exercícios físicos, são tão ou mais efetivos na

adequação do controle glicêmico e fatores associados em comparação à metformina (DPPRG, 2002; O'BRIEN et al., 2015).

Diante dessa perspectiva, estudos que exploram produtos vegetais como opções de tratamentos coadjuvantes às alterações no estilo de vida estão sendo discutidos, como os fitocomplexos presentes na *Camellia sinensis*, popularmente conhecido como chá verde. Os efeitos benéficos do chá verde abrangem o controle da glicemia (CHEN et al., 2009; FUKINO et al., 2008; TAKAHASHI et al., 2014), do perfil lipídico alterado (KIM et al., 2011; ONAKPOYA et al., 2014, ZHENG et al., 2011) e a melhora da composição corporal com redução da gordura corporal (DIEPVENS et al., 2006; RAINS et al., 2012; SNOUSSI et al., 2014). É sugerido ainda que os fitocomplexos desse derivado vegetal possam agir positivamente sobre outros fatores de risco para o DM2, como a inflamação (BYUN et al., 2014; SERBAN et al., 2015) e o estresse oxidativo (BASU et al., 2013; KIM; QUON; KIM, et al., 2014; TSAI et al., 2013).

Embora tenha sido sugerido que o chá verde possua mecanismos análogos ao da metformina no controle da produção e captação de glicose (COLLINS et al., 2007; BANERJEE; GHOSHAL; PARK et al., 2012; PORTER, 2012), não foram encontrados estudos que comparem a ação desses compostos a fim de avaliar se os fitocomplexos dessa planta poderiam substituir a metformina no tratamento da obesidade e prevenção de DM2, minimizando os efeitos colaterais e os custos. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do extrato seco do chá verde e da metformina sobre o controle de fatores de risco envolvidos no desenvolvimento de DM2 em pacientes com excesso de gordura corporal.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 EXCESSO DE GORDURA CORPORAL COMO DESENCADEADOR DA RESISTÊNCIA À INSULINA: INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO

A obesidade é determinada por múltiplos fatores que podem interferir no controle do apetite e na taxa metabólica basal e, conseqüentemente, desencadear um desequilíbrio energético que favorece a deposição de gordura e a expansão do tecido adiposo (QIAN et al., 2013), o qual é dividido em três tipos de acordo com as características e funções dos adipócitos, sendo eles: marrom, bege e branco (GIRALT; VILLARROYA, 2013).

O tecido adiposo marrom (BAT) é um tecido termogênico que utiliza o TG como fonte de energia principalmente na forma de calor (QIAN et al., 2013). Logo está envolvido ativamente na regulação da temperatura corporal e na redução da concentração de TG. Esse processo de produção de calor a partir do TG ocorre por meio da proteína desacopladora-1 (UCP-1), a qual é encontrada na membrana mitocondrial e age durante o ciclo de *Krebs*, inibindo a atividade da trifosfato de adenosina sintase (ATP-sintase) e conseqüentemente, a produção de trifosfato de adenosina (ATP), favorecendo a dissipação de calor (GIRALT; VILLARROYA, 2013).

Os adipócitos do tecido adiposo branco (WAT), por outro lado, são capazes de armazenar e fornecer energia, além da função de secretar as adipocinas, como hormônios e citocinas (MCGOWN; BIRERDINC; YOUNOSSI, 2014). Apesar da usual ausência de UCP-1 nos adipócitos brancos, uma parte do tecido adiposo branco expressa essa proteína e propicia a termogênese, assim como identificado no BAT, formando o terceiro tipo de tecido gorduroso, o bege. Entretanto, diferentemente do BAT, as células beges expressam os genes da UCP-1 somente diante da ação de agonistas do receptor  $\beta$  adrenérgico ou dos receptores ativados por proliferador de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) (HARMS; SEALE, 2013).

O aumento do tecido adiposo, em especial do WAT, culmina na elevação da concentração de citocinas que participam da regulação de processos fisiológicos e metabólicos relacionados ao apetite, ao metabolismo lipídico, a respostas imunológicas e inflamatórias e ao controle glicêmico e vasopressórico (ALI et al., 2013). Essas alterações, portanto, favorecem o desenvolvimento das doenças

cardiovasculares e do DM2 (MCGOWN; BIRERDINC; YOUNOSSI, 2014).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias secretadas pelo tecido adiposo, o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) foi associado à resistência à insulina (STAGAKIS et al., 2012), uma vez que já foi demonstrando que a redução dos níveis de TNF- $\alpha$  em adultos obesos aumentou a sensibilidade ao hormônio hipoglicemiante (PIYA; McTERNAN; KUMAR, 2013). A relação entre o aumento de TNF- $\alpha$  e a resistência à insulina acontece pela indução à fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) em serina, o qual em uma via normal é fosforilado em tirosina, culminando na translocação do transportador de glicose 4 (GLUT-4) para a membrana. Com a redução da fosforilação em tirosina, a sinalização da cascata que envolve a ativação do GLUT-4 é prejudicada, promovendo a resistência à insulina (AL-DAHR; JIFFRI, 2010).

O TNF- $\alpha$  também está envolvido na estimulação da lipase hormônio-sensível (LHS), uma das enzimas que atuam na degradação de triacilgliceróis (TG) durante o processo de lipólise, e na redução da ação da lipase de lipoproteína (LPL), enzima que regula as concentrações de lipídios séricos e a deposição de TG nos adipócitos. Esses efeitos, em conjunto, resultam no aumento de ácidos graxos livres (AGL) na circulação e na consequente diminuição da sinalização dos receptores de insulina, culminando na resistência à própria insulina (CAWTHORN; SETHI, 2008).

Foi observado, ainda, que os macrófagos, aumentados pelo estado inflamatório característico do excesso de gordura corporal, são capazes de infiltrar o tecido adiposo em indivíduos obesos, tornando-se uma fonte local para a produção de TNF- $\alpha$  (BOU et al., 2014; ESSER et al., 2014). Os níveis aumentados de TNF- $\alpha$  estão intimamente relacionados com a expressão de outra citocina, a interleucina-6 (IL-6) (OHASHI et al., 2014).

Assim como o TNF- $\alpha$ , a IL-6 é produzida por macrófagos (FEBBRAIO et al., 2014) e também pelos adipócitos. A secreção da IL-6 nos adipócitos é estimulada pela presença de insulina e catecolaminas, via receptores beta-adrenérgicos (VICENNATI et al., 2002). É sugerido ainda que a IL-6 tenha atividade direta sobre células do sistema imune, como na diferenciação de células B e T e na ativação de macrófagos (HASSAN et al., 2014). Além de estar indiretamente associada à produção hepática de proteínas inflamatórias de fase aguda (LAZAR, 2005) e ativação de células *Natural Killer* (NK) (HASSAN et al., 2014). Logo, a concentração

dessa citocina é diretamente proporcional à massa adiposa aumentada e conseqüentemente, ao estado inflamatório (JUNG; CHOI, 2014).

A IL-6 pode também interferir na síntese de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas e ativar diferentes proteínas quinases envolvidas na inibição da síntese de glicogênio, contribuindo para o desenvolvimento da hiperinsulinemia e síndrome metabólica (PIYA; McTERNAN; KUMAR, 2013).

O TNF- $\alpha$  e a IL-6 estão envolvidos ainda na ação do Supressor de Sinalização de Citocinas-3 (SOCS-3), o qual faz parte de uma família de proteínas (SOCS) participantes de um clássico sistema de *feedback* negativo que regula a sinalização de citocinas (PALANIVEL et al., 2012). Embora os mecanismos não estejam totalmente esclarecidos na literatura, o SOCS-3 está envolvido na regulação da inflamação e na apoptose de adipócitos (LIU et al., 2015).

Os níveis do SOCS-3 são associados, ainda, a prejuízos na sinalização da leptina (LAZAR, 2005), o qual é outro hormônio secretado pelos adipócitos brancos com atividade na neutralização de estímulos alimentares pela ação em receptores no hipotálamo (KLEMPEL et al., 2011). Há uma deficiência na sinalização da leptina na obesidade por ação do SOCS-3 (LINOSSI et al., 2013) e embora obesos apresentem níveis elevados, a ação desse hormônio é ineficiente, sugerindo a resistência à leptina (SAINZ et al., 2015). Liu et al. (2015) sugeriram que o SOCS-3 promove inflamação nos adipócitos por favorecer a expressão do TNF- $\alpha$  e da IL-6 e, simultaneamente, inibir a ação da leptina.

Outro mediador pró-inflamatório da obesidade é a resistina, que também é proporcional à expansão de gordura corporal (KLEMPEL et al., 2011). A resistina é um hormônio secretado principalmente por macrófagos presentes no tecido adiposo (KLEMPEL et al., 2011), com produção regulada pelo TNF- $\alpha$  e IL6 (CODOÑER-FRANCH; ALONSO-IGLESIAS, 2014).

A resistina pode se ligar ao Receptor do tipo toll 4 (TLR4) na membrana celular, ativando o Fator Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) por meio de uma fosforilação induzida pela Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (HSIEH et al., 2014). Esse processo faz com que o NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição sensível ao estresse oxidativo, se desloque para o núcleo celular, favorecendo o aumento da expressão de genes de citocinas inflamatórias (LIU et al., 2006). Dessa forma, há ativação de quinases e a fosforilação de IRS-1 em serina, culminando em um quadro de



resposta de resistência a esse hormônio. As citocinas pró-inflamatórias estão associadas, ainda, à baixa produção de adiponectina. Uma vez que a adiponectina {4} se liga aos AdipoR1 e AdipoR2 é desencadeada a sinalização através da AMPK para a oxidação de ácidos graxos e a inibição da gliconeogênese hepática. A AMPK {5} ativa, ainda, a NADPH-oxidase para gerar ROS que, por sua vez, ativam a translocação de NFkB para o núcleo onde ocorre a transcrição das citocinas inflamatórias (TNF $\alpha$  e IL-6) {6}. Outro hormônio que influencia na condição pró-inflamatória da obesidade é a resistina {7}, que tem capacidade de se ligar ao TLR4 na membrana celular, afetando o complexo NF-kB por meio de uma fosforilação induzida pela MAPKs.

Abreviações: IL-6: interleucina 6; SOCS-3: Supressor de Sinalização de Citocinas-3; IRS-1: Substrato do Receptor de Insulina 1; TNF $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ ; JNK: c-Jun N-terminal quinase; AdipoR1: receptores de adiponectina 1; AdipoR2: receptores de adiponectina 2; AMPK: Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato; NADPH-oxidase: oxidase Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina; ROS: espécies reativas de oxigênio; NFkB: Fator Nuclear Kappa B; TLR4: Toll-Like Receptor 4; MAPKS: Proteínas Tirosina Quinase Ativada por Mitógenos.

Portanto, a secreção de citocinas pelo tecido adiposo propicia um estado pró-inflamatório, que também contribui para o aumento da produção de radicais livres, tornando o ambiente também pró-oxidativo. Por conseguinte, esses elementos favorecem a descompensação dos níveis glicêmicos em indivíduos obesos e o aumento dos AGL pelo processo de lipólise, favorecendo a dislipidemia (ANTUNAPUENTE et al., 2008; ESSER et al., 2014). Desta forma, é válido considerar que a composição corporal pode ser um possível precursor do desarranjo metabólico, sendo, portanto, imprescindível sua avaliação, visando o controle do processo inflamatório e oxidativo, bem como da dislipidemia e da hiperglicemia, situações frequentes entre esses indivíduos.

## 2.2 EXCESSO DE GORDURA CORPORAL COMO DESENCADEADOR DA RESISTÊNCIA À INSULINA: DISLIPIDEMIA E DESCOMPENSAÇÃO DO CONTROLE GLICÊMICO

A secreção e modulação das lipoproteínas abrangem, dentre outros fatores, a atividade da insulina, que é um hormônio anabólico cujos mecanismos de ação envolvem o armazenamento de energia nos hepatócitos e adipócitos. Em um indivíduo saudável, a insulina reduz a taxa de lipólise no tecido adiposo e a secreção de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) por favorecer a redução de AGL no plasma e conseqüentemente, a regulação da concentração de TG (RAMASAMY, 2016). Logo, é sugerido que a resistência à insulina seja a principal condição desencadeante da dislipidemia em obesos (WU; PARHOFER, 2014), sendo que hipertrigliceridemia, baixa concentração de HDL-c e alta de LDL-c menores e mais

densas podem ser detectados anos antes do diagnóstico clínico de DM2 em insulinos resistentes com glicemia ainda em nível normal (LORENZO et al., 2013).

A resistência à insulina ou pré-diabetes é o estado intermediário entre a glicemia normal e o DM2. Os critérios de diagnóstico são glicose de jejum alterada (de 100mg/dL a 125mg/dL) e/ou tolerância à glicose diminuída (de 140mg/dL a 199mg/dL) pelo Teste de Tolerância à Glicose Oral (TTGO) pós-prandial de 2 horas (ADA, 2014).

Em obesos, a resistência à insulina desencadeia alterações no metabolismo glicídico e lipídico, uma vez que a taxa de lipólise não é devidamente controlada por este hormônio, culminando no aumento plasmático de AGL e conseqüentemente, na síntese hepática de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) (JUNG; CHOI, 2014). O VLDL é o principal transportador de TG e pode ser classificado de duas formas de acordo com o tamanho e a quantidade de TG transportada. O VLDL1 é maior e um importante determinante na concentração plasmática de TG e o VLDL2, menor e menos preenchido por TG (ADIELS et al., 2005). Já foi demonstrada a associação de VLDL1 e resistência à insulina avaliada pelo índice HOMA-IR (ARCA; PIGNA; FAVOCCIA, 2012), sendo que a concentração de VLDL1 é maior em insulinos resistentes, enquanto o de, VLDL2 é comparado a indivíduos saudáveis (LORENZO et al., 2013).

O aumento de TG plasmático é associado ainda à redução da HDL-c e ao aumento de LDL-c menores e mais densas, favorecendo a infiltração da LDL-c no espaço subendotelial e, conseqüentemente, contribuem para o aumento da inflamação e do estresse oxidativo (WU; PARHOFER, 2014).

Os AGL também são associados à secreção desregulada de citocinas pró-inflamatórias e ROS, uma vez que participam da expansão da massa adiposa, prejudicam a sinalização dos receptores de insulina, com conseqüente redução na captação glicose e reduzem a expressão de LPL nos tecidos adiposo e esquelético, afetando a atividade hepática, musculoesquelética e cardíaca (JUNG; CHOI, 2014).

Como conseqüência desse processo, o aumento de AGL prejudica a sensibilidade e, portanto, a atividade da insulina (EBBERT; JENSEN, 2013). Em conjunto, esses fatores acarretam prejuízos tanto para as respostas inflamatória e antioxidante, quanto para o metabolismo lipídico e glicêmico, fomentando o risco de desenvolvimento de dislipidemia e resistência à insulina (LORENZO et al., 2013).

Aproximadamente 25% dos indivíduos que apresentam resistência à insulina desenvolvem DM2 e em obesos a progressão é mais rápida, dada a presença de outros fatores de risco, como as dislipidemias (NATHAN et al., 2007). O DM2 está associado ainda ao desenvolvimento de diversas complicações macroangiopáticas (cardiopatia isquêmica, doença vascular periférica e acidente vascular cerebral) e microangiopáticas (retinopatia diabética, nefropatia diabética e neuropatia sensitiva distal) (ADA, 2014).

Assim, o rastreamento, controle e prevenção da resistência à insulina, bem como da dislipidemia em pacientes obesos, são importantes para a redução, não somente da incidência do DM2, mas também de suas complicações metabólicas. Portanto, têm sido propostas diversas opções de tratamento para indivíduos obesos, visando minimizar o risco de desenvolvimento dessas comorbidades metabólicas.

### 2.3 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA CONTROLES DE PESO E GLICÊMICO

Segundo a Sociedade Americana de Diabetes (ADA), os profissionais de saúde devem estimular mudanças no estilo de vida como estratégia para desacelerar o surgimento da resistência à insulina em indivíduos obesos (ADA, 2014; ADA, 2009). Nesse sentido, são propostas opções de tratamento coadjuvantes para sustentar as orientações de adoção de medidas saudáveis. Dentre as opções farmacológicas, estudos têm levantado os efeitos benéficos da metformina em relação à melhora de complicações associadas ao excesso de gordura corporal que culmina no desenvolvimento de DM2 (DUCA et al., 2015; MALIN et al., 2014; MASINI et al., 2014).

Por outro lado, opções naturais também são propostas dados os possíveis efeitos colaterais e o alto custo do tratamento farmacológico. Assim, o número de pesquisas que avaliam os efeitos benéficos de alimentos e de extratos vegetais, como o chá verde tem aumentado. É proposto que os fitocomplexos presentes no chá verde possam favorecer mecanismos de ação anti-inflamatório e antioxidante, e, portanto, desempenhar ação benéfica na patogênese do DM2 em obesos por mecanismos similares aos da metformina.

### 2.3.1 Metformina

A metformina, um antidiabético oral comumente utilizado em protocolos clínicos para controle da descompensação glicêmica em pacientes com DM2, é um medicamento da classe dimetilbiguanida, derivado da guanidina, o composto ativo hipoglicemiante da *Galega officinalis* (BAILEY; DAY, 2004). A prescrição da metformina, como opção para tratamento do diabetes, tem sido usada desde os anos 50 e, apesar dos mecanismos de ação ainda não serem totalmente esclarecidos (PERNICOVA; KORBONITS, 2014), é considerada uma droga de primeira linha para o tratamento de DM2 (ADA, 2014).

A recomendação para o uso da metformina se baseia na acessibilidade, na efetividade no controle glicêmico, nos baixos riscos de episódios de hipoglicemia, além dos efeitos benéficos em fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a obesidade (FORETZ et al., 2014; GOLAY, 2008). Tem sido observada a associação do uso de metformina e o controle de peso em pacientes diabéticos (FORETZ; VIOLLET, 2015; GOLAY, 2008). Essa perda de peso foi relacionada ainda com a redução da massa gordurosa de forma independente de alterações no consumo energético em pacientes no início do tratamento (FOWLER, 2007).

Já entre obesos não diabéticos, não há um consenso sobre o efeito na perda de peso decorrente do uso da metformina (GOLAY, 2008), embora, a redução de risco de desenvolvimento de DM2 em indivíduos com excesso de gordura corporal e alterações glicêmicas tenha sido demonstrada em alguns estudos (DPPRG, 2002; HOSTALEK; GWILT; HILDEMANN, 2015). Isso porque as alterações na atividade da tirosina quinase, enzima que fosforila os substratos de receptores de insulina em tirosina e, conseqüentemente, no transporte da glicose são similares em obesos com e sem DM2, sugerindo, portanto, que a metformina possa ser efetiva no tratamento de indivíduos nas duas condições clínicas (SEIFARTH; SCHEHLER; SCHNEIDER, 2013).

Gokcel et al. (2002) demonstraram que com 850 mg por dia, a metformina é uma opção de medicamento efetivo na redução de fatores de risco para DM2 em mulheres obesas. Além da melhora nos parâmetros de controle lipídico e glicêmico, as voluntárias apresentaram redução de 9,9% no Índice de Massa Corporal (IMC) e 8,1% na circunferência da cintura com o uso do biguanida. Outro estudo também com pacientes obesos tratados durante seis meses demonstrou que com 2.500 mg

de metformina por dia foi possível identificar uma perda média de 5,6% do peso corporal. Além disso, foi observado que os indivíduos resistentes à insulina tiveram maior redução do peso em comparação àqueles ainda sensíveis à insulina (SEIFARTH; SCHEHLER; SCHNEIDER, 2013).

Uma recente meta-análise destacou também a metformina como uma droga efetiva, dentre medicamentos comumente relacionadas ao controle de peso, sendo que a média de perda de peso foi de aproximadamente 1 kg por mês (DOMECQ et al., 2015). No entanto, o artigo não especifica as características da população de estudo como, por exemplo, a presença ou não de DM.

Por outro lado, Levri et al. (2005) demonstraram em uma revisão sistemática sobre os efeitos da metformina na perda de peso que não há evidências suficientes para o uso da biguanida no tratamento de indivíduos obesos não diabéticos. Isso porque apenas em dois dos nove estudos foi observado perda de peso significativa no grupo tratado com a metformina em comparação ao placebo. Os autores levantam ainda a necessidade de estudos que possam esclarecer esse resultado clínico.

Embora não haja um consenso quanto ao efeito da metformina sobre o peso corporal em obesos não diabéticos, é sugerido que a possível atuação benéfica da metformina se baseie em um conjunto de mecanismos que incluem alterações nas atividades hepática, muscular (PERNICOVA; KORBONITS, 2014), pancreática (MAIDA et al., 2011) e intestinal (FORETZ; VIOLLET, 2015).

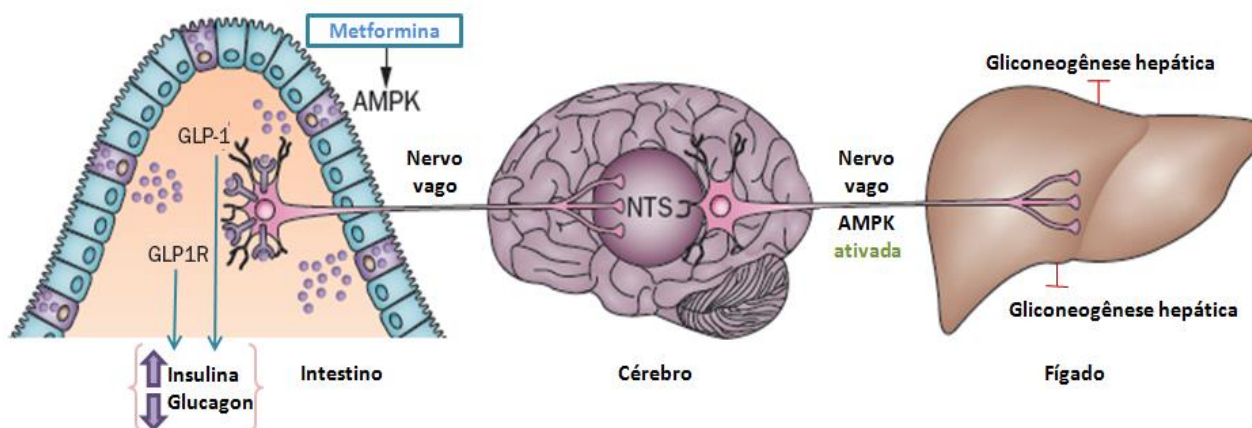
No fígado, a ação hipoglicemiante induzida pela metformina é associada principalmente à supressão da gliconeogênese hepática (FORETZ; VIOLLET, 2015). O mecanismo dessa inibição é atribuído à ativação da via da AMPK, cuja atividade está relacionada ao metabolismo glicêmico e lipídico, regulando positivamente o catabolismo e negativamente, o anabolismo (FORETZ; VIOLLET, 2015). Uma vez ativada pela metformina, a AMPK fosforila enzimas regulatórias envolvidas no controle metabólico nos hepatócitos e no músculo esquelético; e pode ainda regular negativamente a expressão de genes relacionados à gliconeogênese como os codificadores das fosfoenolpiruvato carboxiquinase (*PEPCK*) e a glicose-6-fosfatase (*G6PASE*) (KIM et al., 2008). A metformina pode também induzir o aumento das concentrações da adenosina monofosfato (AMP), o que também ativa a via da AMPK e inibe a frutose 1,6-bifosfatase, a qual é uma enzima chave para gliconeogênese (FORETZ; VIOLLET, 2015).

Outro mecanismo de ação hepática da metformina envolve a melhora da atividade dos receptores de insulina e do substrato 2 do receptor de insulina (IRS-2) (GUNTON et al., 2003), culminando na translocação do transportador de glicose 1 (GLUT-1) até a membrana e no eficiente transporte de glicose para o interior da célula. Esse mecanismo poderia compensar parcialmente a ausência de IRS-1 na tentativa de bloquear a descompensação glicêmica. O IRS-2 também tem relação com a modulação de enzimas lipogênicas como a ácido graxo sintase, além de inibir o fator de transcrição Proteína de Ligação ao Elemento Regulatório de Esteróis (SREBP-1c) (TANIGUCHI; UEKI; KAHN, 2005), levando a redução dos níveis plasmáticos de TG e de VLDL (FOWLER, 2007).

Desta forma, o IRS-1 e o IRS-2 têm papéis complementares na atividade metabólica do fígado, sendo que o efeito do IRS-1 é mais relacionado à glicemia e o IRS-2, ao controle lipídico (RONCERO et al., 2013). Sendo assim, a metformina pode estar associada a mecanismos que envolvem tanto a regulação do metabolismo lipídico quanto ao metabolismo da glicose.

O IRS-1 também pode ser ativado nas células musculares por ação da metformina e, portanto, promover a translocação do GLUT-4 até a membrana, potencializando a captação de glicose pelas células (RICE et al., 2011). É sugerido que a ativação da AMPK esteja relacionada com esse mecanismo, independentemente de insulina (PERNICOVA; KORBONITS, 2014).

A metformina foi ainda associada a mecanismos relacionados à redução da absorção intestinal de glicose (GIANNARELLI et al., 2003), ao aumento da secreção do hormônio Peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e à ativação dos receptores de GLP-1 na inervação aferente do intestino pelo nervo vago (FORETZ; VIOLLET, 2015), culminando no aumento sérico de insulina. Foi sugerido que por esse mecanismo ainda, ocorra a ativação da via intestino-cérebro-fígado que controlaria a produção hepática de glicose. Além disso, a metformina induz a ativação da AMPK na mucosa intestinal, que por sua vez também estimula a secreção de GLP-1 (DUCA et al., 2015) (Figura 2).



**Figura 2.** Metformina reduz a gliconeogênese pelo eixo Intestino - Cérebro - Fígado por meio do nervo vago e ativa a AMPK, favorecendo a secreção de GLP-1 pelos células L. Abreviações: AMPK: Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato; NTS: Núcleo do Trato Solitário; GLP-1: Peptídeo semelhante a glucagon 1  
Fonte: Adaptado de FORETZ e VIOLLET (2015)

No pâncreas, a concentração de GLP-1 também é influenciada pela atividade da metformina, já que a biguanida pode estimular a produção do hormônio nesse tecido e, conseqüentemente, aumentar a concentração plasmática de GLP-1 (MAIDA et al., 2011). Mais uma vez, a secreção de insulina é estimulada e a de glucagon inibida, implicando no efeito metabólico do GLP-1 (PERNICOVA; KORBONITS, 2014).

Embora a metformina apresente benefícios relacionados ao controle do metabolismo glicídico e lipídico, alguns efeitos colaterais são observados com o seu uso. Dentre eles, as desordens digestivas, como diarreia e episódios de vômitos, são as principais queixas relatadas. A metformina é associada ainda à acidose láctica, prejuízos na atividade da vitamina B12 e dos sais biliares. Aproximadamente 30% dos indivíduos em uso contínuo da metformina apresentam efeitos colaterais graves e 5% deles desistem do tratamento (BOUCHOUCHA; UZZAN; COHEN, 2011).

Ainda que o uso de metformina esteja associado ao controle dos fatores de risco para o desenvolvimento de DM2 em obesos ou a efeitos hipoglicemiantes em pacientes já diabéticos, tem sido demonstrado que mudanças nos hábitos de vida, como a atividade física regular ou alimentação balanceada, podem apresentar ação similar ou até mesmo superior.

Os pesquisadores de um estudo realizado pelo Grupo de Pesquisa em Programa de Prevenção de Diabetes da Sociedade Médica de Massachusetts,

Estados Unidos da América (*Diabetes Prevention Program Research Group*), acompanharam, por aproximadamente três anos, 3.234 obesos não diabéticos distribuídos em diferentes grupos de intervenção: A - 1.700 mg de metformina por dia (fracionado em duas cápsulas de 850 mg); ou B - mudanças nos hábitos de vida que envolviam a redução de peso corporal em pelo menos 7% e 150 minutos de exercício físico por semana; ou C - placebo. Foi demonstrado que a mudança de estilo de vida foi mais efetiva em comparação ao uso da metformina, uma vez que no grupo B houve redução de 58% na incidência de DM2 e no grupo A, essa redução foi de 31%, ambos em relação ao grupo placebo (DPPRG, 2002).

Outra pesquisa com indivíduos obesos randomizados em três grupos: A. 1.500 mg de metformina/dia; B. placebo ou C. plano alimentar individual + exercícios físicos + terapia comportamental mostrou em 12 semanas de estudo que o tratamento do grupo C foi mais efetivo na perda de peso e melhora da composição corporal. Embora tenha sido observado melhora na glicemia de jejum no grupo A, o grupo C apresentou concentração média de insulina de jejum e índice HOMA melhores em comparação ao placebo (LIM et al., 2011).

Logo, o que se pode observar é que, apesar dos benefícios da metformina, mudanças no estilo de vida incluindo a atividade física regular e melhora nos hábitos alimentares podem ser mais efetivos contra o DM2 em obesos em relação à metformina. Investiga-se ainda se a inserção de coadjuvantes como alguns derivados vegetais, pode potencializar essa prevenção. Dentre eles, foi proposto que o chá verde seria uma opção em potencial, dadas as sugestivas ações hipoglicemiantes e hipolipemiantes dos fitocomplexos presentes na planta (AHMAD et al., 2015; THIELECKE; BOSCHMANN, 2009).

### **2.3.2 Chá verde**

O chá verde é uma das bebidas não alcoólicas mais consumidas no mundo e é estudada pelos efeitos benéficos na redução do risco e tratamento de muitas doenças, entre elas a obesidade (HSU et al., 2008). O chá proveniente das folhas da planta *Camellia sinensis* é catalogado em três categorias dependendo do processo de fermentação: chás verde, *oolong* e preto. O chá verde não é fermentado e, por isso, mantém a cor de suas folhas, diferente dos chás *oolong* e preto que apresentam a coloração mais escura por passar por esse processo (SENANAYAKE, 2013). Além disso, as quantidades de compostos fenólicos, alcaloides, ácidos

graxos e aminoácidos das folhas são encontradas mais preservadas *in natura* em relação aos estados semi ou fermentados. As condições de cultivo e colheita também são fatores que influenciam na concentração de compostos bioativos da *Camellia sinensis*, especialmente na de flavonoides (ASTILL et al., 2001; SCOPARO et al., 2012).

Outra forma de apresentação do chá verde é o extrato seco obtido pela desidratação ou por meio de uma solução hidroalcolica e encapsulado, o que permite maior conservação dos fitocomplexos (ASTILL et al., 2001; BASU et al., 2013). Em ambas as formas de apresentação, o chá verde tem apresentado propriedades funcionais benéficas para o consumo diário (THIELECKE; BOSCHMANN, 2009). No entanto, alguns pesquisadores têm demonstrado que o extrato seco apresenta efeito superior à infusão em virtude da maior concentração de compostos fenólicos (YANG; LIU, 2013).

Dentre os compostos fenólicos presentes no chá verde destacam-se as catequinas. As quatro principais catequinas são epicatequina (EC), epicatequina-3-galato (ECG), epigalocatequina (EGC) e a mais abundante dentre elas (LIU et al., 2013), a epigalocatequina-3-galato (EGCG) (RAINS et al., 2011). A EGCG corresponde a aproximadamente 40% do total de catequinas (WANG; PROVAN; HELLIWELL, 2000) e tem sido apontada como a mais efetiva na atividade antioxidante característica do chá verde (THIELECKE; BOSCHMANN, 2009).

Outra substância também encontrada na *Camellia sinensis* é a cafeína, um composto termogênico que compreende 2 a 5% do material extraível em água (YANG et al., 2008). Esse teor é semelhante ao encontrado nos grãos de café, que apresentam concentrações superiores a 2% (SENANAYAKE, 2013). Apesar das evidências dos benefícios da cafeína, estudos recentes têm usado como material de estudo o chá verde descafeinado e observado resultados similares ao do chá verde integral (RICHARD et al., 2009; SAE-TAN; ROGERS; LAMBERT, 2015; SANTANA et al., 2015).

Logo, independentemente da forma de apresentação e da composição do chá verde, o que se observa é o aumento do interesse nos benefícios proporcionados pelos bioativos presentes na *Camellia sinensis*, especialmente em relação ao controle da obesidade (AUVICHAYAPAT et al., 2007; MOON et al., 2007; RAINS; SANJIV AGARWAL; MAKI, 2011).

Um dos mecanismos de ação das catequinas do chá verde envolve a inibição

da catecol-O-metil-transferase, uma enzima responsável pela degradação da noradrenalina (CHEN et al., 2005). Como consequência, ocorre um aumento da concentração da noradrenalina, que interage com o  $\beta$ -adrenoreceptor que se acopla à proteína G, promovendo a termogênese no tecido BAT (AUVICHAYAPAT et al., 2007) e consequentemente, modulando o uso de TG como fonte de energia (QIAN et al., 2013).

Com a interação entre noradrenalina e  $\beta$ -adrenoreceptor acoplado à proteína G, o sinal termogênico da noradrenalina é mediado pela adenilato ciclase que, quando ativa, converte parte do trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) em uma reação catalisada pela enzima adenil ciclase. O AMPC ativa a proteínaquinase A (PKA), a qual pode fosforilar proteínas citosólicas estimulando a via lipolítica, e consequentemente, a redução da gordura corporal (COLLINS et al., 2010).

A redução da gordura corporal mediada pelo chá verde também pode ser decorrente da ação das catequinas sobre o tecido adiposo branco (WAT). O WAT tem como função armazenar ácidos graxos em seus citoplasmas na forma de TG (ALI et al., 2013), além de estar correlacionado à intolerância à glicose e à diminuição da sensação de saciedade (COLLINS et al., 2010). As catequinas do chá verde foram associadas ao aumento da capacidade mitocondrial em utilizar a gordura estocada no WAT como fonte de energia e suprimir a adipogênese nesse tecido (KLAUS et al., 2005).

O chá verde também pode estimular maior secreção de hormônios de saciedade, como o GLP-1, contribuindo para o controle da glicemia e a perda de peso (MONTELIUS et al., 2014). Um provável mecanismo seria a ação do GLP-1 em reduzir a apoptose celular e a induzir a proliferação e diferenciação das células  $\beta$ -pancreáticas. Em relação à perda de peso, é sugerida ainda a relação entre a maior produção de GLP-1 induzida pelo chá verde e o retardamento da absorção dos carboidratos das refeições e, portanto, do esvaziamento gástrico, contribuindo para a sensação de saciedade (LIU et al., 2014).

Desta forma, a ação do chá verde sobre a composição corporal em indivíduos obesos têm sido discutida e demonstrada na literatura. Auvichayapat et al. (2008) no observaram redução do percentual de gordura corporal, no peso corporal e na concentração média de leptina sérica em mulheres em uso do chá verde por 12 semanas em comparação ao placebo. Embora todas as voluntárias estivessem

submetidas a uma dieta padrão desenvolvida para a pesquisa, os pesquisadores concluíram que o chá verde foi eficiente na melhora da composição corporal e ainda sugerem que os resultados encontrados se devem ao fato da EGCG ser capaz de aumentar o gasto energético e a oxidação de gordura, reduzindo gordura corporal e, conseqüentemente, a concentração de leptina.

Em uma metanálise, Hursel et al. (2009) investigaram o efeito das catequinas e mix de EGCG + cafeína presentes na *Camellia sinensis* sobre a perda de peso corporal e concluíram que o consumo de chá verde esteve associado à melhora do controle de peso, inclusive na manutenção da perda. Foi identificada nos estudos abordados uma média de 1,31 kg de perda de peso em intervenção média de 12 semanas. No entanto, os autores sugerem haver influência do consumo diário habitual de café nos resultados (HURSEL; VIECHTBAUER; WESTERTERPLANTENGA, 2009).

Em contrapartida, em uma revisão de ensaios clínicos randomizados, Baladia et al. (2014) apontaram que a ingestão de chá verde não teve quaisquer efeitos significativos ou clinicamente relevantes no peso e na composição corporal de adultos entre 18 e 60 anos com sobrepeso ou obesidade. Com isso concluíram que ainda não se pode estabelecer uma recomendação de ingestão de chá verde para redução ou manutenção do peso corporal (BALADIA et al., 2014).

Janssens et al. (2015) investigaram os efeitos do chá verde (>0,56 g/d epigallocatequina-3-galato + 0,28–0,45 g/d cafeína ou placebo) no controle de peso, na redução da absorção de lipídeos proveniente da alimentação e no gasto energético de repouso (GER) em indivíduos caucasianos com IMC entre 18 a 25 kg/m<sup>2</sup> ou >25kg/m<sup>2</sup> que consumiram o chá verde por 12 semanas. Foi constatado que a intervenção não melhorou a composição corporal, GER ou componentes fecais de gordura e de energia.

Portanto, o que se percebe é que ainda não há um consenso na literatura quanto à influência do chá verde sobre redução da gordura corporal por ação dos compostos do chá, embora as publicações científicas que abordem os benefícios do chá verde sobre esse benefício sejam numerosas, sendo necessários mais estudos para sustentar os efeitos benéficos das catequinas sobre a composição corporal.

Outro foco de pesquisas envolvendo as catequinas do chá verde é a sua ação sobre as comorbidades decorrentes da obesidade, dentre elas a resistência à insulina e o desenvolvimento de DM2. É sugerido que a perda de peso esteja

relacionada à melhora da glicemia, uma vez que o excesso de gordura corporal está associado ao aumento do estado inflamatório e oxidativo que desencadeiam mecanismos regulatórios não ordenados (SHOELSON et al., 2007). Considerando que esses mecanismos aumentam o risco de desenvolvimento de resistência à insulina e, posteriormente, de DM2, alguns autores demonstraram o efeito protetor e os mecanismos que envolvem a ação do chá verde sobre o controle da glicemia.

Sundaram et al. (2013) constataram que os constituintes fenólicos do chá verde, principalmente a EGCG, estimulam as células beta pancreáticas a aumentarem a secreção da insulina pós-prandial e, conseqüentemente, favorecem o funcionamento do pâncreas. Já Ueda et al. (2008) observaram que o chá verde induz o aumento da captação de glicose por meio da translocação do GLUT4 nos adipócitos e músculo esquelético. A EGCG ainda pode reduzir a absorção de carboidratos e a produção hepática de glicose (BOGDANSKI et al., 2012).

As catequinas do chá verde podem ainda inibir a diferenciação e proliferação de adipócitos, promover a redução da absorção de gordura (CUNHA et al., 2013; SAE-TAN et al., 2011) e proporcionar uma redução do percentual de gordura corporal, favorecendo o controle das alterações glicêmicas (SNOUSSI et al., 2014).

É sugerido também, que assim como a metformina, o consumo regular do chá verde pode suprimir a gliconeogênese hepática pela via da AMPK e a expressão dos genes relacionados à gliconeogênese, *PEPCK* e *G6PASE*, independente da sinalização de insulina (COLLINS et al., 2007). Outra semelhança com o mecanismo da metformina é a relação com a redução da frutose 1,6-bifosfatase e, conseqüentemente, da gliconeogênese (CSALA et al., 2007).

Em uma meta-análise com 17 ensaios clínicos randomizados em humanos, o chá verde reduziu a concentração de glicemia de jejum e de hemoglobina glicada (HbA1c). No entanto, essa redução ocorreu entre indivíduos com risco de síndrome metabólica, mas não entre indivíduos saudáveis. Os autores discutem ainda que, embora as doses dos estudos abordados variaram entre 208 a 1207 mg EGCG/dia (média: 457 mg EGCG/dia), não foi encontrado influência desse dado nos resultados da análise e que não foi possível determinar a dose ótima de catequinas para uma resposta significativa em relação ao controle glicêmico (LIU et al., 2013).

Entretanto, o consumo de 500 mg de chá verde por dia em ratos por 12 semanas reduziu níveis de glicose em jejum, insulina e TG em relação ao grupo placebo (WU et al., 2004). Em outro ensaio, mas com seres humanos, Jing et al.

(2009) investigaram a associação entre o consumo de chá verde e o risco para o desenvolvimento do DM2 em uma metanálise com pacientes acompanhados por 5 a 18 anos. Os autores observaram que os participantes que bebiam quatro ou mais xícaras de chá por dia tinham risco 20% menor de desenvolver DM2 em comparação com aqueles que beberam menos ou nenhuma xícara por dia.

Por outro lado, não foram observadas alterações benéficas em relação à glicemia de jejum, HbA1c e resistência à insulina em um estudo com indivíduos obesos, tratados por dois meses com 500 mg de chá verde em comparação ao grupo placebo. Por fim, os autores concluíram que são necessárias mais pesquisas para determinar se as catequinas do chá verde são capazes de beneficiar indivíduos obesos reduzindo o risco do desenvolvimento do DM (FUKINO et al., 2005).

Além dos efeitos do chá verde sobre o controle da glicemia, acredita-se que os fitocomplexos da *Camellia sinensis* possam ainda induzir efeitos hipolipidêmicos, por atuar na regulação do metabolismo lipídico (WALTNER-LAW et al., 2002). As catequinas do chá verde podem influenciar a solubilidade micelar, a hidrólise dos lipídios presentes no lúmen (BOGDANSKI et al., 2012), promover a diminuição da absorção lipídica pelo intestino (KOO; NOH, 2007) e atenuar a síntese dos ácidos graxos (WALTNER-LAW et al., 2002).

Uma metanálise que abrangeu 20 estudos cujas doses de intervenção variaram entre 145 a 3.000 mg/dia de extrato de chá verde em obesos não diabéticos evidenciou que o consumo do chá verde reduziu a concentração de colesterol total e da fração LDL-c. Por outro lado, não foram identificadas alterações sobre a concentração da HDL-c e TG (KIM et al., 2011)

Considerando então possíveis resultados positivos do chá verde sobre o controle glicêmico e perfil lipídico; e que a metformina apresenta mecanismos de ação semelhantes (BANERJEE; GHOSHAL; PORTER, 2012; BOGDANSKI et al., 2012; CHEN et al., 2009), este derivado vegetal poderia ser um substituto na prescrição ou um potencializador da ação da metformina como medida preventiva para o DM2.

Diante do exposto, a hipótese do estudo é que o tratamento com extrato seco do chá verde isolado e/ou combinado com a metformina atenua a composição corporal, o perfil lipídico e o controle glicêmico, podendo ser utilizado como alternativa para a diminuição do risco de desenvolvimento de DM2 em pacientes obesos não diabéticos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento de extrato seco de chá verde isolado e/ou combinado com a metformina sobre fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes *mellitus* tipo 2 em indivíduos com excesso de gordura corporal.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do extrato de chá verde isolado e/ou combinado com a metformina sobre:
  - a composição corporal;
  - a concentração de triacilgliceróis, colesterol total e frações;
  - a glicemia de jejum, hemoglobina glicada e insulina;
  - o Modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina (HOMA-IR) e o Modelo de avaliação da homeostase  $\beta$  (Homa  $\beta$ ) que avalia a capacidade funcional das células  $\beta$ - pancreáticas;
  
- Avaliar se existe efeito sinérgico ou antagônico entre o chá verde e metformina sobre composição corporal, perfil lipídico e controle glicêmico.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E CASUÍSTICA

O estudo é um ensaio clínico, randomizado controlado, duplo-cego com duração de 12 semanas. Inicialmente foi realizada uma triagem com 191 mulheres com excesso de peso atendidos pelos ambulatórios de endocrinologia e de nutrição geral do Hospital das Clínicas da UFG com objetivo de selecionar voluntários obesos com alterações glicêmicas e/ou pancreáticas. As informações fornecidas aos voluntários durante o recrutamento foram padronizadas entre os membros da equipe de pesquisa (APÊNDICE A). Para isso, foram aplicados questionários com os fatores de inclusão e exclusão (APÊNDICE B), aferidos o peso e a estatura e realizada a coleta de sangue para análise da concentração de hemoglobina glicada, glicemia e insulinemia de jejum. Por meio desses exames bioquímicos, foi possível avaliar também os índices de alterações pancreáticas sobre o controle glicêmico (HOMAs IR e  $\beta$ ).

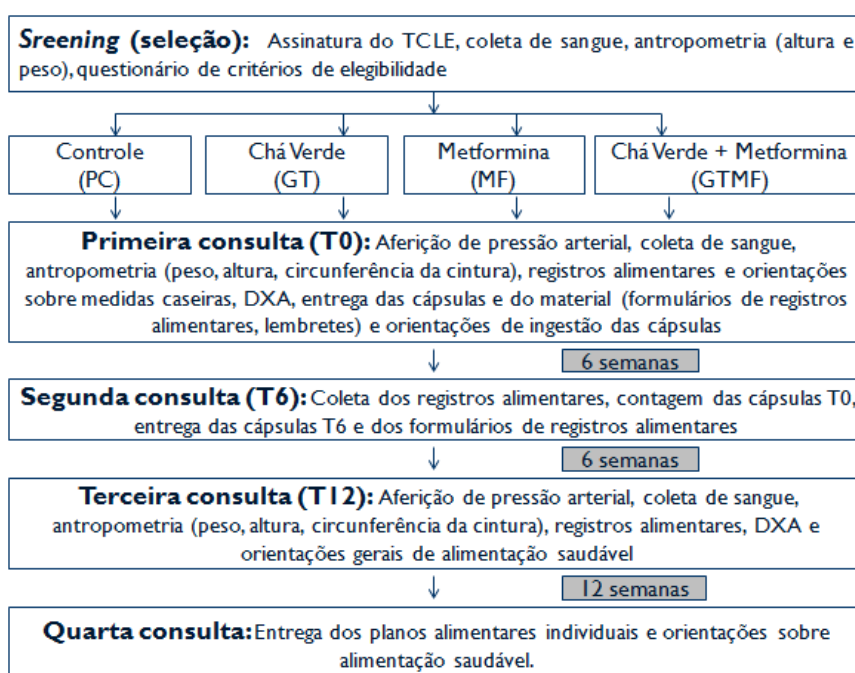
Os critérios de elegibilidade utilizados foram: mulheres com idade entre 20-60 anos, apresentar alterações glicêmicas (glicemia de jejum  $> 100$  mg/dL, hemoglobina glicada  $> 5,7\%$ ) e/ou IMC  $> 28.9$  kg/m<sup>2</sup> ou IMC  $> 27.5$  kg/m<sup>2</sup> e HOMA-IR  $> 3.60$  (STERN et al., 2005). Foram excluídos do estudo os indivíduos que faziam uso de insulina, apresentaram diagnóstico de diabetes, doença renal, hepatopatia, cardiopatias, hipertireoidismo, pacientes em tratamento de controle de peso, gestantes, nutriz e mulheres em terapia de reposição hormonal.

Os indivíduos aptos a participar da pesquisa foram informados por ligações telefônicas (APÊNDICE C) e agendados para a coleta de dados iniciais (T0). Aqueles que aceitaram participar da pesquisa, seguindo o protocolo de acompanhamento, foram randomizados em quatro grupos experimentais, utilizando o método UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1973): **Grupo controle (PC)**, que recebeu quatro cápsulas placebo, compostas por celulose; **Grupo chá verde (GT)**, que consumiu duas cápsulas contendo 500 mg de extrato seco padronizado (50% de polifenóis) e duas de placebo por dia; **Grupo metformina (MF)**, para o qual foi orientado o consumo de duas cápsulas contendo 500 mg de metformina e duas de placebo e o **Grupo chá verde + metformina (GTMF)** que ingeriu quatro cápsulas

por dia, sendo duas de extrato de chá verde (500 mg) e duas de metformina (500 mg) (APÊNDICE D). Os indivíduos foram orientados a consumir uma cápsula de cada antes do café da manhã e outras duas, antes do almoço. Para a randomização foram utilizadas as seguintes variáveis: IMC, glicemia e insulinemia de jejum, índices HOMA-IR e  $\beta$ .

O material de intervenção foi manipulado e encapsulado em uma farmácia magistral. Segundo o laudo fornecido pela empresa, o extrato seco de chá verde foi extraído com o solvente etanol e analisado por cromatografia em camada fina de alta performance (*High Performance Thin Layer Chromatography* - HPTLC) (ANEXO C). A metformina, por sua vez, foi quantificada pelo método cromatografia líquida de alta eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography* - HPLC) (ANEXO D) e a celulose pelo método colorimétrico (ANEXO E).

Foram realizadas coletas de sangue e avaliação da composição corporal no início e no final da intervenção (T0 e T12 semanas) a fim de avaliar as possíveis mudanças na glicemia e no perfil lipídico em função do tratamento com o chá verde e/ou metformina. O delineamento experimental do estudo clínico encontra-se esquematizado na Figura 3. Os voluntários foram orientados a manter, durante as 12 semanas de estudos, os hábitos de vida, incluindo alimentação e prática de exercícios físicos e, portanto, a não iniciar nenhum programa de perda de peso. Os indivíduos poderiam abandonar a pesquisa em qualquer etapa, caso assim desejassem.



### **Figura 3. Delineamento experimental**

#### **4.2 LOCAL DE ESTUDO E QUESTÕES ÉTICAS**

Atendendo à legislação nacional vigente, no que se refere às normas de pesquisas com seres humanos, definidas pelo Conselho Nacional de Saúde (CNS), Resolução 466/2012, o projeto deste estudo foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), aprovado em maio de 2014, (Número do parecer: 636.652; Número CAAE: 29272214.5.0000.5078). O projeto também foi cadastrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC) (Número do registro: RBR-4bdwxs).

Os pacientes voluntários foram orientados sobre a pesquisa e aqueles que manifestaram concordância em participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE E) conforme a Resolução 466/2012 sobre “Pesquisas envolvendo seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde”. Foi assegurado ao paciente à confidencialidade das informações obtidas e o retorno dos resultados das análises e esclarecido que os resultados finais do projeto serão publicados na literatura científica.

#### **4.3 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE CÁPSULAS**

Ao receberem as cápsulas, os indivíduos foram orientados em relação ao protocolo diário de ingestão e acompanhamento (APÊNDICE F, APÊNDICE G, APÊNDICE H). Para controle de consumo, foi solicitado aos voluntários que levassem para os retornos (T6 e T12) as embalagens para monitoramento da ingestão correta das cápsulas. Além disso, foram realizadas ligações e envio de mensagens de texto semanais para destacar a importância do consumo correto (APÊNDICE I).

#### 4.4 ACOMPANHAMENTO DOS SINAIS E SINTOMAS APRESENTADOS DURANTE A INTERVENÇÃO

Os efeitos colaterais foram avaliados durante o estudo por pesquisadores que também não tinham conhecimento sobre o material de intervenção de cada paciente.

Os efeitos e sinais observados pelos voluntários foram registrados da forma como referiam (“*sic*”) e depois classificados em categorias (melhora intestinal, maior disposição, alterações na cor e odor da urina, aumento da sensação de saciedade, aumento da ingestão hídrica, episódios diarreicos, náuseas, cefaleia, pirose, xerostomia e outros).

#### 4.5 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

A avaliação antropométrica foi realizada em T0 e T12 (Figura 3). As medidas de peso corporal e estatura foram aferidas pelos antropometristas da equipe previamente capacitados e de acordo com os procedimentos descritos por Heyward e Stolyk (2000). Para avaliação do peso corporal e estatura foi utilizada a balança antropométrica digital (Filizola<sup>®</sup>, Brasil), com precisão de 0,1 kg para peso e 0,1 cm para estatura, para o posterior cálculo do IMC.

A circunferência da cintura foi mensurada com fita milimétrica inextensível e inelástica, com precisão de 0,1 cm. A medida foi realizada no ponto médio entre o último arco intercostal e a crista ilíaca (HEYWARD; STOLYK, 2000).

Os valores de massa livre de gordura (MLG) e o percentual de gordura corpórea (%G) foram avaliados no Laboratório de Avaliação Nutricional da Faculdade de Nutrição da UFG, utilizando o método de absorciometria radiológica de feixe duplo (DXA) em equipamento modelo DPX NT. Os participantes foram orientados a não realizar exames que incluíam o uso de contraste ou procedimento radioativo pelo menos uma semana antes. Para a avaliação, os indivíduos utilizaram roupas leves e estavam isentos de qualquer acessório ou objeto de metal. O posicionamento no equipamento foi feito de modo que a linha sagital demarcada nessa área passasse sob o centro do crânio, da coluna vertebral, da pelve e membros inferiores (ISCD, 2007).

Os dados foram registrados no Formulário de Anamnese Nutricional (APÊNDICE J) conforme Instrutivo de padronização de preenchimento de dados (APÊNDICE K).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR

A ingestão alimentar dos indivíduos foi avaliada por meio de sete registros alimentares (APÊNDICE L), contemplando cinco dias da semana e dois de final de semana (FISBERG et al., 2005), conforme padronizado pelo Instrutivo de preenchimento (APÊNDICE M). Os pacientes foram treinados com os formulários (APÊNDICE N) e medidas caseiras pela equipe de pesquisa (APÊNDICE O). Os dados dietéticos obtidos em medidas caseiras foram analisados utilizando o programa de análise nutricional Nutriquant® (São Paulo, Brasil).

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

Apenas para controle, a pressão arterial foi aferida segundo as recomendações da Sociedade Americana do Coração (*American Heart Association*) (AHA, 2005), com o aparelho semiautomático (Medidor de Pressão Digital Semi - Automático de Braço Master BP3ABO - Aprovado pelo Inmetro: G-Tech - cód. 12376), validado pelos protocolos estabelecidos na literatura pela Associação para o Avanço da Instrumentação Médica (AAMI) e Sociedade Britânica de Hipertensão (BHS).

O indivíduo foi orientado a permanecer sentado, em repouso por pelo menos cinco minutos em ambiente calmo e instruído a não conversar durante a medida. Em seguida, foi posicionado de forma a que as pernas estivessem descruzadas, pés apoiados no chão, dorso recostado na cadeira e relaxado. O braço foi posicionado na altura do coração (nível do ponto médio do esterno ou quarto espaço intercostal), livre de roupas, apoiado, com a palma da mão voltada para cima e o cotovelo ligeiramente fletido.

A aferição foi realizada em ambos os braços de modo a identificar o de maior pressão arterial, em qual foi realizado duplicata. Foi adotada como valor de pressão

arterial a média das duas últimas medidas no braço que apresentou o valor mais alto de pressão arterial. Os dados foram anotados na Ficha de Checagem de Fases de T0/T12 (APÊNDICE P).

#### 4.8 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

A avaliação laboratorial foi realizada em T0 e T12 (Figura 3). Foram coletadas amostras de sangue de veia periférica após jejum de 12 horas, no período da manhã. Os indivíduos foram orientados a não realizar exercícios físicos vigorosos 24 horas e/ou ingerir álcool 72 horas antes da coleta. Aqueles que não seguiram as orientações foram reagendados para a coleta de sangue e demais exames.

##### 4.8.1 Perfil lipídico, glicose e insulina

As concentrações de colesterol total ( $< 200$  mg/dl), HDL-c ( $> 40$  mg/dl), triacilgliceróis ( $< 150$  mg/dl) e a glicemia de jejum ( $< 100$  mg/dl) foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico; a hemoglobina glicada ( $< 5,7\%$ ), pelo método turbidimetria e insulina ( $< 30$   $\mu$ IU/mL), por quimioluminescência. As análises foram feitas no analisador automático Miura 2000 (Kovalent<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil) e avaliados de acordo com os valores de referência do *kit* destinado para cada análise.

A concentração de VLDL-c foi calculada segundo a fórmula de Friedewald,  $VLDL = TG \times 0,2$ , assim como a de LDL-c, onde para valores de triacilgliceróis  $< 400$ mg/dL,  $LDL = CT - HDL - TG/5$  (FRIEDEWAL; LEVY; FREDERICKSON, 1972), sendo que foram considerados inadequados valores de VLDL  $> 30$  mg/dl e LDL  $> 100$  mg/dl.

##### 4.8.2 Índice HOMA

A partir dos valores de glicose e insulina em jejum foram calculados os Índices HOMA-IR para avaliação da resistência a insulina e HOMA- $\beta$  para avaliar a capacidade funcional das células beta pancreáticas, utilizando as fórmulas e valores de referência de Matthews et al. (1985) (Figura 4).

**HOMA-IR<sup>1</sup> (≤ 3,4)**

$$\text{Glicemia jejum} \times 0,0555 \times \text{Insulina jejum} / 22,5$$

**HOMA  $\beta^2$  (1,67 -7,5)**

$$(20 \times \text{Insulina jejum}) / (\text{Glicemia jejum} \times 0,0555) - 3,5$$

**Figura 4.** Cálculo e valores de referência para dados de Modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina<sup>1</sup> e Modelo de avaliação da homeostase  $\beta^2$

#### 4.8.3 Acompanhamento da atividade renal e hepática

Para avaliação da toxicidade renal e hepática, foram monitoradas as concentrações de Creatinofosfoquinase (CPK) por meio da reação com Acetilcisteína (N-acetil-L-cisteína); de Creatinina, da Transaminase Glutâmico-Oxalacética (TGO) e da Transaminase Glutâmico-Pirúvica (TGP), analisados segundo método de Colorimetria de Ponto Final.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análises e gráficos foram feitos utilizando-se o software R versão 3.1.1. A partir dos dados originais, foram obtidas estimativas para os parâmetros apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Para a verificação de normalidade, as variáveis foram submetidas à análise de variância e os resíduos avaliados pelo Teste de Lilliefors.

Foi aplicada uma regressão de modelo fatorial  $2^2$  que permite avaliar a influência de cada material de intervenção sobre as variáveis analisadas. Foi designado a metformina como primeiro fator e o chá verde, como segundo, sendo que ambos foram analisados sob duas formas, na presença e na ausência dos fatores. Os efeitos isolados e a interação entre eles foram avaliados como médias e comparadas por ANOVA, segundo o modelo:  $Y_{ijkl} = \mu + g_i + m_j + c_k + (mc)_{jk} + \varepsilon_{ijkl}$ , onde  $y$  = resposta,  $\mu$  = a constante,  $g_i$  = efeito fixo do pareamento ( $g_{pi}$ ),  $m_j$  = contribuição da metformina para a resposta,  $c_k$  = contribuição do chá verde para a resposta,  $(mc)_{jk}$  = contribuição da interação entre metformina e chá verde para a resposta,  $\varepsilon$  = erro associado à estimativa dos coeficientes. Assim, por esta análise, é

possível determinar o efeito dos compostos sobre os biomarcadores abordados na ausência de chá verde - **Chá 0** (grupos placebo e/ou metformina) e presença de chá verde - **Chá 1** (grupos chá verde e/ou chá verde + metformina) ou na ausência de metformina - **Met 0** (grupos placebo e/ou chá verde) e na presença de metformina - **Met 1** (grupos metformina e/ou chá verde + metformina) e ainda é possível identificar a interação destes compostos. Para todas as análises foi adotado nível de significância como  $p < 5\%$ .

As variáveis de consumo foram corrigidas por meio da regressão para ajuste segundo o consumo calórico médio de cada etapa do estudo (T0 e T12) (WILLETT; HOWE; KUSHI, 1997).

Para descrição dos dados de sinais e sintomas utilizou-se análise de prevalência, expressas em porcentagem segundo o grupo de intervenção e o total de indivíduos do estudo.

## REFERÊNCIAS

ADA. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes - 2011. Position Statement. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 33, p.11s-61s, 2011.

ADIELS, M.; BOREN, J.; CASLAKE, M. J.; STEWART, P.; SORO, A.; WESTERBACK J.; WENNERBERG, B.; OLOFSSON, S. O.; PACKARD, C.; TASKINEN, M. R. Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis Vascular Biology**, Dallas, v. 25, n.8, p. 1697 - 1703, 2005.

AHA. AMERICAN HEART ASSOCIATION. **Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals part 1: blood pressure measurement in humans a statement for professionals from the subcommittee of professional and public education of the American Heart Association council on high blood pressure research**. Dallas, 2005. Disponível em: <<http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier3023366>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

AHMAD, R.S.; BUTT, M. S.; SULTAN, M. T.; MUSHTAQ, Z.; AHMAD, S. Preventive role of green tea catechins from obesity and related disorders especially hypercholesterolemia and hyperglycemia. **Journal of Translational Medicine**, Qatar, v. 13, n. 79, p. 2-9, 2015.

ANDUJAR-PLATA, P.; PI-SUNYER, X.; LAFERRERE, B. Metformin effects revisited. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Edinburgh, v. 95, n. 1, p. 1-9, 2012.

ARCA, M.; PIGNA, G.; FAVOCCIA, C. Mechanisms of diabetic dyslipidemia: relevance for atherogenesis. **Current Vascular Pharmacology**, Nova Iorque, v. 10, n. 6, p. 684-686, 2012.

ASTILL, C.; BIRCH, M. R.; DACOMBE, C.; HUMPHREY, P. G.; MARTIN, P. T. Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 11, p. 5340-5347, 2001.

AUVICHAYAPAT, P.; PRAPOCHANUNG, M.; TUNKAMNERDTHAI, O.; SRIPANIDKULCHAI, B. O.; AUVICHAYAPAT, N.; THINKHAMROP, B.; KUNHASURA, S.; WONGPRATOOM, S.; SINAWAT, S.; HONGPRAPAS, P. Effectiveness of green tea on weight reduction in obese Thais: A randomized, controlled trial. **Physiology and Behavior**, Elmsford, v. 93, n. 3, p. 486-491, 2008.

BANERJEE, S.; GHOSHAL, S.; PORTER, T.D. Phosphorylation of hepatic AMP-activated protein kinase and liver kinase B1 is increased after a single oral dose of green tea extract to mice. **Nutrition Research**, Nova Iorque, v. 32, n. 12, p. 985-990, 2012.

BANO, G. Glucose homeostasis, diabetes and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, Oxford, v. 27, n.5, p. 715-726, 2013.

BASU, A.; BETTS, N. M.; MULUGETA, A.; TONG, C.; NEWMAN, E.; LYONS, T. J. Green tea supplementation increases glutathione and plasma antioxidant capacity in adults with the metabolic syndrome. **Nutrition Research**, Nova Iorque, v. 33, n. 3, p. 180-187, 2013.

BINNERT, C.; SEEMATTER, G.; TAPPY, L.; GIUSTI, V. Effect of metformin on insulin sensitivity and insulin secretion in female obese patients with normal glucose tolerance. **Diabetes and Metabolism**, Paris, v.29, n. 2, p. 125-132, 2003.

BOGDANSKI, P.; SULIBURSKA, J.; SZULINSKA M.; STEPIEN M.; PUPEK-MUSIALIK, D.; JABLECKA, A. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. **Nutrition Research**, Nova Iorque, v.32, n. 6, p. 421-427, 2012.

BONDIA-PONS, I.; RYAN, L.; MARTINEZ, J. A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Pamplona, v, 145, n. 12, p. 701-711, 2012.

BOUCHOUCHA, M.; UZZAN, B.; COHEN, R. Metformin and digestive disorders. **Diabetes and Metabolism**, Paris, v. 37, n. 2, p. 90-96, 2011.

BYUN, J. K.; YOON, B. Y.; JHUN, J. Y.; OH, H. J.; KIM, E. K.; MIN, J. K.; CHO, M. L. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates both obesity and autoinflammatory arthritis aggravated by obesity by altering the balance among CD4+ T-cell subsets. **Immunology Letters**, Amsterdã, v. 157, n. 1-2, p. 51-59, 2014.

CHEN, N.; BEZZINA, R.; HINCH, E.; LEWANDOWSKI, P. A.; CAMERON-SMITH, D.; MATHAI, M. L.; JOIS, M.; SINCLAIR, A. J.; BEGG, D. P.; WARK, J. D.; WEISINGER, H. S.; WEISINGER, R. S. Green tea, black tea, and epigallocatechin modify body composition, improve glucose tolerance, and differentially alter metabolic gene expression in rats fed a high-fat diet. **Nutrition Research**, Nova Iorque, v. 29, n. 11, p. 784-793, 2009.

COLLINS, Q.F.; LIU, H.Y.; PI, J.; LIU, Z.; QUON, M. J.; CAO, W. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis through 5'-AMP-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 41, p. 30143-30149, 2007.

CSALA, M.; MARGITTAI, E.; SENESI, S.; GAMBERUCCI, A.; BÁNHEGYI, G.; MANDL, J.; BENEDETTI, A. Inhibition of hepatic glucose 6-phosphatase system by the green tea flavanol epigallocatechin gallate. **Febs Letters**, Amsterdã, v. 581, n. 8, p. 1693-1698, 2007.

CUNHA, C. A.; LIRA, F. S.; ROSA NETO, J. C.; PIMENTEL, G. D.; SOUZA, G. I.; SILVA, C. M.; SOUZA, C. T.; RIBEIRO, E. B.; SAWAYA, A. C.; OLLER, NASCIMENTO, C. M.; RODRIGUES, B.; OLIVEIRA CARVALHO, P.; OYAMA, L. M. Green tea extract supplementation induces the lipolytic pathway, attenuates obesity, and reduces low-grade inflammation in mice fed a high-fat diet. **Mediators of Inflammation**, Nova Iorque, v. 2013, n. 3, p. 1-8, 2013.

DIEPVENS, K.; KOVACS, E. M.; VOGELS, N.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Metabolic effects of green tea and of phases of weight loss. **Physiology and Behavior**, Elmsford, v. 87, n. 1, p. 185-191, 2006.

DOMECQ, J. P.; PRUTSKY, G.; LEPPIN, A.; SONBOL, M. B.; et al. Drugs commonly associated with weight change: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Philadelphia, v.100, n. 2, p. 363–370, 2015.

DPPRG. Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **The New England Journal of Medicine**, Nova Iorque, v. 346, n. 6, p. 393 - 403, 2002.

EBBERT, J. O.; JENSEN, M. D. Fat depots, free fatty acids and dyslipidemia. **Nutrients**, Basel, v. 5, n. 2, p. 408-508, 2013.

FISBERG, R.M., STALER, B., MARCHIONI, D.M.L., MARTINI, L.A. **Inquéritos Alimentares: métodos e bases científicas**. Barueri: Manole, 2005. 334p.

FONTBONNE, A.; DIOUF, I.; BACCARA-DINET, M.; ESCHWEGE, E.; CHARLES, M. A. Effects of 1-year treatment with metformin on metabolic and cardiovascular risk factors in non-diabetic upper-body obese subjects with mild glucose anomalies: a post-hoc analysis of the BIGPRO1 trial. **Diabetes and Metabolism**, Paris, v.35, n. 5, p. 385-391, 2009.

FORETZ., M.; VIOLLET, B. Metformin takes a new route to clinical efficacy. **Endocrinology**, Baltimore, v. 11, n. 7 p. 390-392, 2015.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVI, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, Nova Iorque, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

FUKINO, Y.; SHIMBO, M.; AOKI, N.; OKUBO, T.; ISO, H. Randomized controlled trial for an effect of green tea consumption on insulin resistance and inflammation markers. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 51, n. 5, p. 335-342, 2005.

FUKINO, Y.; IKEDA, I.; AOKI, N.; ISO, H. Randomized controlled trial for an effect of green tea-extract powder supplementation on glucose abnormalities. **European Journal of Clinical Nutrition**, Londres, v. 62, n. 8, p. 953-960, 2008.

GIANNARELLI, R.; ARAGONA, M.; COPPELLI, A.; DEL PRATO, S. Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. **Diabetes Metabolism**, Paris, v.29, Suppl. 6, p. 28-35, 2003.

GIRALT, M.; VILLARROYA, F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? **Endocrinology**, Baltimore, v. 154, n. 9, p. 2992-3000, 2013.

GOLAY, A. Metformin and body weight. **International Journal of Obesity**, Londres, v. 32, n.1, p. 61-72, 2008.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature Medicine**, Nova Iorque, v. 19, n. 10, p.1252-1263, 2013.

HENRY, R. R.; CHILTON, R.; GARVEY, W. T. New options for the treatment of obesity and type 2 diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and Its Complications**, Nova Iorque, v. 27, n. 5; p. 508–518, 2013.

HEYWARD, V. H.; STOLYK, L. M. **Avaliação da composição corporal aplicada**. 1 ed. Barueri: São Paulo, 2000.

HSU, C. H.; TSAI, T. H.; KAO, Y. H.; HWANG, K. C.; TSENG, T. Y.; CHOU, P. Effect of green tea extract on obese women: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Clinical Nutrition**, Edinburgh, v. 27, n. 3, p. 363-370, 2008.

ISCD. INTERNATIONAL SOCIETY FOR BONE DENSITOMETRY. **Body composition course**. Middletown, 2007. 81 p. Disponível em: <<http://www.iscd.org/education/cmece-live-courses/body-composition/>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

JUNG, U. J.; CHOI, M. S. Obesity and Its Metabolic Complications: The role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, n. 4, p. 6184-6223, 2014.

KIM, A.; BARONE, M. K.; AVINO, D.; WANG, F.; COLEMAN, C. I.; PHUNG, O. J. Green tea catechins decrease total and low-density lipoprotein cholesterol: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 111, n. 1, p. 1720-1729, 2011.

KIM, H. S.; QUON, M. J.; KIM, J. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. **Redox Biology**, Larchmont, v. 10, n. 2; p. 187–195, 2014.

KOO, S. I.; NOH, S. K. Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 18, n. 3, p. 179-183, 2007.

LEVRI, K. M.; SLAYMAKER, E.; LAST, A.; YEH, J.; FERENC, J.; D'AMICO, F.; WILSON, S. A. Metformin as treatment for overweight and obese adults: a systematic review. **Annals of Family Medicine**, Leawood, v. 3, n. 5, p. 457-461, 2005.

LIM, S. S.; NORMAN, R. J.; CLIFTON, P. M.; NOAKES, M. The effect of comprehensive lifestyle intervention or metformin on obesity in young women. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, Milão, v. 21, n. 4, p. 261-268, 2011.

LIU, C. Y.; HUANG, C. J.; HUANG, L. H.; CHEN, I. J.; CHIU, J. P.; HSU, C. H. Effects of green tea extract on insulin resistance and glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes and lipid abnormalities: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled trial. **Plos One**, São Francisco, v. 8, n. 4, p. 587-597, 2013.

LORENZO, C.; HARTNETT, S.; HANLEY, A. J.; REWERS, M. J.; WAGENKNECHT, L. E.; KARTER, A. J.; HAFFNER, S. M. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance have distinct lipoprotein and apolipoprotein changes: the insulin resistance atherosclerosis study. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Philadelphia, v. 98, n. 4, p. 1622-1630, 2013.

MALIN, S. K; KASHYAP, S. R. Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**. Londres, v. 21, n. 5, p. 323-329, 2014.

MATTHEWS, D. R.; HOSKER, J. P.; RUDENSKI, A. S.; NAYLOR, B. A.; TREACHER, D. F.; TURNER, R. C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, Berlim, v. 28, n. 7, p. 412-419, 1985.

MCGOWN, C.; BIRERDINC, A.; YOUNOSSI, Z. M. Adipose tissue as an endocrine organ. **Clinics in Liver Disease**, Philadelphia, v. 18, n. 1, p. 41-58, 2014.

MONTELIUS, C.; ERLANDSSON, D.; VITIJA, E.; STENBLOM, E. L.; EGECIOGLU, E.; ERLANSON-ALBERTSSON, C. Body weight loss, reduced urge for palatable food and increased release of GLP-1 through daily supplementation with green-plant membranes for three months in overweight women. **Appetite**, Londres, v. 81, p. 295-304, 2014.

ONAKPOVA, I.; SPENCER, E.; HENEGHAN, C.; THOMPSON, M. The effect of green tea on blood pressure and lipid profile: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, Milão, v. 24, n. 8, p. 823-836, 2014.

PARK, C. S.; BANG, B. R.; KWON, H. S.; MOON, K. A.; KIM, T. B.; LEE, K. Y.; MOON, H. B.; CHO, Y. S. Metformin reduces airway inflammation and remodeling via activation of AMP-activated protein kinase. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 84, n.2, p.1660-1670, 2012.

PERNICOVA, I.; KORBONITS, M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. **Endocrinology**, Baltimore, v. 10, p. 143 -156, 2014.

RAINS, T. M.; AGARWAL, S.; MAKI, K. C. Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2011.

RAMASAMY, I. Update on the molecular biology of dyslipidemias. **International Journal of Clinical Chemistry and Medical Biochemistry**, Amsterdã, v. 454, n. 15, p. 143–185, 2016.

RICE, S.; PELLATT, L. J.; BRYAN, S. J.; WHITEHEAD, S. A.; MASON, H. D. Action of metformin on the insulin-signaling pathway and on glucose transport in human granulosa cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Philadelphia, v.96, n. 3, p. 427-435, 2011.

RONCERO, I.; ALVAREZ, E.; ACOSTA, C.; SANZ, C.; BARRIO, P.; HURTADO-CARNEIRO, V.; BURKS, D.; BLÁZQUEZ E. Insulin-receptor substrate-2 (IRS-2) is required for maintaining glucokinase and glucokinase regulatory protein expression in mouse liver. **Plos One**, São Francisco, v. 8, n.4, p. 587-597, 2013.

SALPETER, S. R.; NICHOLAS, S. B.; KAHN, J. A.; SALPETER, E. E. Meta-analysis: Metformin Treatment in Persons at Riskfor Diabetes Mellitus. **The American Journal of Medicine**, Nova Iorque, v. 121, n. 2, p. 149-157, 2008.

SEIFARTH, C.; SCHEHLER, B.; SCHNEIDER, H. J. Effectiveness of metformin on weight loss in non-diabetic individuals with obesity. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, Heidelberg, v. 121, n. 1, p. 27-31, 2013.

SENANAYAKE, S. P. J. N. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review. **Journal of Functional Foods**. Oxford, v. 5, n. 2, p. 1529-1541.

SERBAN, C.; SAHEBKAR, A.; ANTAL, D.; URSONIU, S.; BANACH, M. Effects of supplementation with green tea catechins on plasma C-reactive protein concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrition**, Burbank, v. 31, n. 9, p. 1061-1070, 2015.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. São Francisco, W.H. Freeman, 573p, 1973.

SNOUSSI, C.; DUCROC, R.; HAMD AOUI, M. H.; ABAIDI, H.; CLUZEAUD, F.; NAZARET, C.; LE GALL, M.; BADO, A. Green tea decoction improves glucose tolerance and reduces weight gain of rats fed normal and high-fat diet. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 25, n. 5, p. 557-564, 2014.

STERN, S.E.; WILLIAMS, K.; FERRANNINI, E. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. **Diabetes**, Nova Iorque, v. 54, n. 2, p. 333-339, 2005.

TAKAHASHI, M.; MIYASHITA, M.; BAE, S. R.; KIM, H. K.; WAKISAKA, T.; MATSUI, Y. TAKEHITA, M.; YASUNAGA, K. Acute ingestion of catechin-rich green tea improves postprandial glucose status and increases serum thioredoxin concentrations in postmenopausal women. **British Journal of Nutrition**, Londres, v. 112, n. 9, p. 1542-1550, 2014.

TANIGUCHI, C. M.; UEKI, K.; KAHN, R. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. **Journal of Clinical Investigation**, Nova Iorque, v. 115, n. 3, p. 718-727, 2005.

TAI, C. F.; HSU, Y. W.; TING, H. C.; HUANG, C. F.; YEN, C. C. The in vivo antioxidant and antifibrotic properties of green tea (*Camellia sinensis Theaceae*). **Food Chemistry**, Barking, v. 136, n. 3-4, p. 1337- 1344, 2013.

WALTNER-LAW, M.E.; WANG, X. L.; LAW, B.K.; HALL, R.K.; NAWANO, M.; GRANNER, D .K. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 38, p. 34933-34940, 2002.

WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Green tea catechins, caffeine and body-weight regulation. **Physiology and Behavior**, Elmsford, v. 100, n. 1, p. 42-46, 2010.

WHO.WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Reducing Risks, Promoting Healthy Life**. Geneva, 2002. 230p. Disponível em: <<http://www.who.int/whr/2002/whr02.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

WHO.WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics. Part III Global Health indicators**. Geneve, 2014. 175p. Disponível em:

<[http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/WHS2014\\_Part3.pdp](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/WHS2014_Part3.pdp)>. Acesso em: 11 set. 2014.

WILLETT, W. C.; HOWE, G. R.; KUSHI, L. H. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 65, Suppl. 4, p. 1220-1228, 1997.

YANG, H. Y.; YANG, S. C.; CHAO, J. C.; CHEN, J. R. Beneficial effects of catechin-rich green tea and insulin on the body composition of overweight adults. **British Journal of Nutrition**, Londres, v. 107, n. 5, p. 749-754, 2012.

## CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1

As instruções aos autores para submissão de manuscritos no primeiro periódico ao qual este artigo será submetido estão apresentadas no Anexo A.

### **Green tea extract improves lipid profile and attenuates glycemic control more effectively than metformin in overweight women: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial**

#### **ABSTRACT**

**Background & Aims:** Green tea and metformin may be used as adjuvants in the treatment and prevention of obesity complications. However, studies comparing the actions of green tea and metformin in overweight women have not yet been reported. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of dry green tea extract isolated and/or combined with metformin on type 2 diabetes risk factors in overweight women. **Methods:** A total of 120 obese women were randomly assigned in a double-blind manner to 1 of 4 groups taking daily capsules for 12 weeks as follows: Control (n = 29; 1 g of cellulose); Green tea (n = 32; 1 g of dry green tea extract); Metformin (n = 28; 1 g of metformin); and Green tea + Metformin (n = 31; 1 g of dry green tea extract + 1 g of metformin). Anthropometric measurements, body composition, and fasting blood samples were evaluated. **Results:** After 12 weeks, green tea had positive effect on glycemic control. In contrast, metformin led to an increase in HbA1c concentration ( $0.048 \pm 0.189\%$ ;  $p = 0.017$ ). Additionally, metformin reduced body weight ( $-1.318 \pm 0.366$  kg;  $p = 0.034$ ) and decreased lean body mass ( $-1.249 \pm 0.310$ ;  $p = 0.009$ ). Regarding the lipid parameters, green tea significantly reduced total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol (LDL)-c. **Conclusion:** The isolated action of green tea was superior to metformin on glycemic control and the lipid profile. Therefore, dry green tea

extract may be a better alternative in treating DM2 risk factors in overweight women than metformin.

*Keywords:* *Camellia sinensis*, metformin, insulin resistance, obesity, abdominal fat, Lipoproteins LDL.

## 1. Introduction

According to World Health Organization (WHO), the incidence of obesity has doubled in the last ten years, and in the Americas, approximately one in four adults is obese (WHO, 2014). Obesity is correlated with disturbances in pancreatic islets, uncompensated glycaemic control and impaired glucose tolerance (BANO, 2013), all of which increase the risk of developing type 2 diabetes mellitus (DM2) (GRUNDY, 2012).

Studies show that lifestyle changes are effective in delaying or preventing DM2 in obese subjects (HENRY; CHILTON; GARVEY, 2013). In some cases, the clinical approach includes pharmacological interventions with oral antidiabetic agents such as metformin.

Metformin aids in weight loss and insulin-resistance control in individuals diagnosed with diabetes, and has also been used in non-diabetic obese patients to minimize DM2 risk (ADA, 2011; DPPRG, 2002; PERNICOVA; KORBONITS, 2014; SALPETER et al, 2008). Nonetheless, in a cross-over study with non-diabetic obese women, metformin did not improve blood glucose as expected (BINNERT, 2003).

Other studies reported that lifestyle changes are equally or more effective in treating abnormal glucose levels when compared to metformin (DPPRG, 2002; LIM et al, 2011). Furthermore, side effects related to regular use of metformin, such as diarrhoea and vomiting episodes, may lead to a clinical decision to discontinue treatment (BOUCHOUCHA et al., 2011). Additionally, the cost-effectiveness of long-term early pharmacologic treatment of overweight individuals who have not been diagnosed with pre-diabetes or type 2 diabetes is questionable (LEVRI et al., 2005).

Among the options for prevention and treatment of obesity complications, green tea has been shown to possess similar actions to metformin in the control of glucose production and uptake (BANERJEE; GHOSHAL; PORTER, 2012; PARK et al., 2012). The benefits of

green tea are widely demonstrated and discussed in the literature. Green tea benefits glycemic control (ROGHANI et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2014), reduces body fat (SNOUSSI et al., 2014; WESTERTERP-PLANTENGA et al., 2010) and improves other risk factors for type 2 diabetes, including chronic inflammation (BYUN et al., 2014; SERBAN et al., 2015), oxidative stress (BASU et al., 2013; KIM et al., 2014) and an altered lipid profile (BOGDANSKI et al., 2012; ONAKPOYA et al., 2014).

To our knowledge, studies comparing the isolate or synergic effects of metformin and green tea on body composition and risk factors for DM2 are not available. Thus, this double-blind, placebo-controlled, randomized trial was conducted in overweight women to assess the effects of a green tea extract with or without metformin on body composition, lipid profile, and insulin resistance.

## **2. Methods**

### *2.1 Materials*

Green tea was extracted using ethanol and analysed using high performance thin layer chromatography (HPTLC). Subsequently, the extract was manipulated and encapsulated in a specialized laboratory (Nathupharmus<sup>®</sup>, GO, Brazil). Each green tea capsule contained 500 mg of *Camellia sinensis* leaves extract, which included 275 mg of polyphenols, including catechins. Metformin was quantified using high-performance liquid chromatography (HPLC) method, and the colorimetric method was used to quantify cellulose, which served as the placebo in our study. Each capsule contained 500 mg of metformin or cellulose microcrystalline.

The capsules had same appearance in all groups. An independent research group not involved in the study was responsible for administering the supplements according to the

randomization protocol; thus, investigators and participants were blinded. The blinding code was provided to investigators after the statistical analyses were completed.

## 2.2 Subjects

Initially, 191 women were evaluated for insulin resistance through the following biochemical tests: glycated haemoglobin, fasting glucose and insulin, and the homeostasis model assessment - HOMA - IR and  $\beta$ . Moreover, a questionnaire containing the exclusion criteria for this study was completed by each subject. Exclusion criteria were as follows: currently using insulin; clinical diagnosis of diabetes, kidney disease, liver disease, heart disease, or hyperthyroidism; women who were being treated for weight control; pregnant or nursing; and menopausal women with or without hormone replacement.

Inclusion criteria were as follows: women aged 20-60 years with abnormal glucose concentrations evaluated by fasting blood glucose ( $> 100$  mg/dl) or glycated haemoglobin ( $\geq 5,7\%$ ) and/or BMI  $> 28.9$  kg/m<sup>2</sup> and/or BMI  $> 27.5$  kg/m<sup>2</sup> and HOMA-IR  $> 3.60$  (STERN et al., 2005).

## 2.3 Study design and diet intake

The 12-week study was randomized, double-blind, placebo-controlled and performed in accordance with principles of Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice. Ethical approval was obtained from Ethics Committee of Federal University of Goias (reference number 636.652). The study was registered at ensaiosclinicos.gov.br (Clinical trial RBR-4bdwxs). All participants gave written informed consent to participate in this study after being informed both orally and in writing. Participants were randomized through UPGMA method (SNEATH; SOKAL, 1973) into four groups as follows: **Placebo (PC)**, 4 capsules containing microcrystalline cellulose/day; **Green tea (GT)**, 2 capsules containing dry extract of green tea

+ 2 capsules containing placebo/day; **Metformin (MF)**, 2 capsules containing metformin + 2 capsules containing placebo/day; **Green Tea + Metformin (GTMF)**, 2 capsules containing dry extract of green tea + 2 capsules/day containing metformin. Participants were instructed to consume two capsules before breakfast and two capsules before lunch and to maintain their life habits during the 12-week intervention, including diet and physical exercise.

Adherence to treatment was assessed by weekly phone calls to participants and by counting the number of capsules in packs during their return to laboratory.

During the study, dietary intake was assessed using a 7-day food record questionnaire. The record consisted of five week days and a two-day weekend. Records were subsequently corrected by research team to assure dietetic information (FISBERG et al., 2005) was complete and accurate. Dietary caloric intake and macronutrient values were analysed using Nutri quanti<sup>®</sup> (2011, São Paulo, SP, Brazil).

#### *2.4 Side effects reported during the intervention*

Participants reported side effects that were classified into different categories as follows: gastrointestinal, welfare, colour and odour of urine, fullness feeling, fluid intake, diarrhoea, nausea, headache, heartburn, dry mouth, and other.

#### *2.5 Anthropometric measurements and body composition*

All measurements were performed by the same operator who followed standard procedures. The height of the subjects was measured during the selection phase to the nearest 0.5 cm with a stadiometer (Model Standard, Sanny<sup>®</sup>). Weight was measured after voiding, with participants wearing light clothing to the nearest 0.1 kg on a digital scale (Filizola, Brazil). Waist circumference was measured on undressed subjects at the midpoint between the lower margin of the last palpable rib and the top of the iliac crest.

DXA assessments of fat mass (FM), lean mass (LM) and body fat percentage were conducted using a General Electric Lunar Prodigy scanner (DPX NT, GE©) with Encore 2011 software (version 13.60, GE Healthcare). The coefficient of variation (CV) for the DXA tests of LM and FM were 0.75% and 1.03%, respectively.

## *2.6 Biochemical analysis*

Blood samples from a peripheral vein were collected in the morning after a 12-h fast. Total cholesterol, HDL-c, triglycerides and fasting glucose were analysed using the enzymatic colorimetric method; glycated haemoglobin by turbidimetry; and fasting insulin concentration by chemiluminescence (Miura 2000, Kovalent<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil). Low density lipoprotein cholesterol (LDL-c) and very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-c) were calculated according to the Friedewald et al. (1972) equation. HOMA-IR and HOMA- $\beta$  were calculated to evaluate insulin resistance and functional capacity of pancreatic beta cells, respectively (MATTHEWS et al., 1985).

Renal and hepatic toxicity were monitored through concentrations of creatine phosphokinase (CPK) that were analysed using the N-acetyl-L-cysteine reaction; creatinine, glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) were analysed using the colorimetric method Full Stop (Architect c8000, Abbott Diagnostics<sup>®</sup>, Illinois, USA).

## *2.7 Statistics*

Data were expressed as the means  $\pm$  standard error (se). The means were adjusted using the method of least squares. The net change of the intervention was calculated by the difference between the values observed before and after intervention. Dietary variables were

adjusted according to the average calorie consumption at each stage of the study using the residual method (WILLETT; HOWE; KUSHI, 1997).

Initially, all data were checked according to the normality Lilliefors test. A significance level of 5% ( $p < 0.05$ ) was adopted to reject the null hypothesis. Then, a  $2^2$  factorial design was applied to identify the significance of each factor on the biomarker response; the first factor ( $x_1$ ) was designed as the use of metformin, while green tea extract supplementation was designed as the second factor ( $x_2$ ), and both were analysed using two levels (0 = absence and 1 = presence). The significance of the main effects ( $x_1$  and  $x_2$ ) as well as the interaction ( $x_1$  vs.  $x_2$ ) was calculated using ANOVA, and results were expressed in the form of bar charts. The bars represented the standardized effect estimate (net change) correspondent to the coefficients of linear regression:  $Y_{ijkl} = \mu + g_i + m_j + c_k + (mc)_{jk} + \varepsilon_{ijkl}$ , where  $y$  = response,  $\mu$  = constant,  $g_i$  = fixed effect of the pairing group,  $m_j$  = metformin contribution to the response,  $c_k$  = green tea extract contribution to the response,  $(mc)_{jk}$  = contribution to the response due to the interaction between metformin and green tea extract, and  $\varepsilon_{ijkl}$  = the error associated with the observations. Through this analysis, the interaction of the compounds was identified, and the effects on biomarkers were determined as follows: in the absence of green tea – Tea 0 (placebo and/or metformin) and in the presence of green tea – Tea 1 (green tea and or green tea + metformin), or in the absence of metformin – Met 0 (placebo and/or green tea) and in the presence of metformin – Met 1 (metformin and/or green tea + metformin). The statistical analyses were performed using software R versão 3.1.1.

### 3. Results

#### 3.1 Characteristics of volunteers

Although a total of 196 women were enrolled, 153 subjects matched the study inclusion criteria, and 120 agreed to participate in the study. Subsequently, subjects were randomly assigned to 1 of 4 interventions (Figure 1). A total of 32 women withdrew during the intervention: 14 for personal reasons, 9 for lack of contact, and 9 for capsules inadequate intake. As a result, 88 participants completed the study (Figure 1). At baseline, all groups were homogeneous, except for age in the GT group ( $p = 0.0494$ , Supplementary Table 1).

### *3.2 Energy and macronutrient intake*

Energy and macronutrient intake are shown in Table 1. We observed a greater increase of protein intake in the absence of green tea (tea 0) and metformin (met 0). However, no differences were observed between groups.

### *3.3 Body composition*

The effects of green tea supplementation on body composition outcomes were not observed (Table 2). In contrast, isolated metformin reduced weight ( $-1.318 \pm 0.366$ ;  $p = 0.034$ ), BMI ( $-0.460 \pm 0.153$ ;  $p = 0.016$ ) and LM ( $-1.249 \pm 0.310$ ;  $p = 0.009$ ) (Table 2).

### *3.4 Glycemic control*

When the difference within groups was analysed, a significant reduction in fasting glucose ( $-4.427 \text{ mg/dL} \pm 2.001$ ;  $p = 0.031$ ) (data not shown) was observed in the GT group. However, when the regression analysis was applied, green tea showed a tendency to reduce fasting glucose ( $-2.289 \text{ mg/dL} \pm 1.543$ ;  $p = 0.085$ ) (Table 2). In contrast, isolated metformin increased the glycated haemoglobin concentration ( $0.048 \pm 0.189$ ;  $p = 0.017$ ) (Table 2).

Metformin was not effective in reducing blood glucose in nondiabetic overweight women; moreover, when associated with green tea extract, metformin presented a tendency to

inhibit the glucose-lowering effect of green tea ( $p = 0.070$ ) (Figure 2). A similar behaviour was observed in Homa- $\beta$  ( $p = 0.054$ ) (Figure 3). Neither intervention presented effects on insulin or iHOMA-IR.

### *3.5 Lipid profile*

Metformin did not change the lipid profile; however, the green tea extract reduced total cholesterol ( $-11.467 \text{ mg/dL} \pm 3.711$ ;  $p = 0.047$ ) and LDL-c ( $-5.031 \text{ mg/dL} \pm 3.819$ ;  $p = 0.024$ ) (Table 2).

### *3.6 Hepatic and renal toxicity*

Green tea and metformin did not culminate in acute liver or kidney toxicity. Metformin decreased creatinine concentration at the end of the study ( $-0.023 \text{ mg/dL} \pm 0.008$ ;  $p = 0.009$ ). Moreover, an attenuation in this marker was observed by the interaction of green tea and metformin ( $-0.049 \text{ mg/dL} \pm 0.012$ ;  $p = 0.000$ ). The interaction was also positive for CPK ( $-13.928 \text{ mg/dL}$ ;  $p = 0.045$ ) (Table 2).

### *3.7 Signs and symptoms reported by volunteers during the intervention*

The symptoms most frequently reported among subjects that received green tea and metformin were intestinal improvement (13% and 17%, respectively) and an increase in the feeling of being full (13% and 13%, respectively). In the metformin group, episodes of diarrhoea were frequently reported (17%). When both treatments were combined, in addition to the symptoms related to the single use of each compound, other changes observed included the colour and odour of urine (21%), welfare (16%), increased fluid intake (16%) nausea (16%) and xerostomia (21%) (Table 3).

#### 4. Discussion

To our knowledge, this was the first double-blind, placebo-controlled, randomized trial involving humans that investigated the effect of green tea isolated and/or combined with metformin on glycemic control, body composition and lipid profile, all of which are considered risk factors for insulin resistance and DM2.

We found that isolated green tea supplementation for 12 weeks showed a trend in reducing fasting glucose, although according to the analysis within groups, a significant decrease was observed. Additionally, green tea reduced total cholesterol and LDL-c. Interestingly, metformin did not have a positive effect on glycemic control or the lipid profile, and even increased glycated haemoglobin. Regarding the anthropometric measurements and body composition parameters, metformin reduced body weight because of a reduction in lean body mass.

Green tea and metformin share a similar mechanism in the activation of the protein kinase route, which is activated by AMP5 '(AMPK) (PARK et al, 2012; BANERJEE; GHOSHAL; PORTER, 2012). This pathway is associated with the modulation of glucose and lipid metabolism (ZHANG, ZHOU LI, 2009). AMPK is related to the translocation of GLUT-4 and consequently with the improvement of glucose uptake into the intracellular medium (McGEE et al., 2008), which may explain the trend for decreasing fasting blood glucose in individuals supplemented only with green tea. Although metformin has also been linked to activation of the AMPK pathway (DUCA et al, 2015; MILLER et al, 2013) and inhibition of hepatic gluconeogenesis in previous studies (FORETZ; VIOLLET 2015), metformin did not change glucose concentrations in this study.

Corroborating our findings, a meta-analysis of 22 studies showed that green tea supplementation for at least 12 weeks reduced fasting blood glucose levels. Only a trend in

the hypoglycaemic effect of green tea was noted in the 12-week study. Therefore, we believe that extending the period of intervention would result in a more significant outcome. Similar to our study, the meta-analysis did not show changes in fasting insulin concentration, glycated haemoglobin or in HOMA-IR (ZHENG et al., 2013).

Surprisingly, metformin intervention increased HbA1c and had no effect on insulin concentrations. Defronzo & Abdul-Ghani (2011) suggested that initially a reduction in HbA1c levels is observed; however, a progressive increase in HbA1c ensues without a defined mechanism to explain this increase.

Although it was not observed in our study, the attenuation of the progressive failure of pancreatic  $\beta$  cells has been shown previously (MASINI et al., 2014). In our study, green tea and metformin showed a similar effect on HOMA- $\beta$  and a null effect when administered together ( $p = 0.054$ ). The effect on insulin secretion by green tea has been demonstrated in other studies (KANEKO et al., 2015; LI et al., 2006). A possible suggested mechanism of action involves the activation of AMPK (SUNDARAM et al., 2013). Another protective mechanism of green tea on the pancreatic islets involves the inhibition of cytokine infiltration in the pancreas. Metformin, as well as green tea, can activate AMPK and modulate the secretion of insulin by pancreatic  $\beta$  cells. Thus, our hypothesis is that when metformin and green tea are administered together, one compound nullifies the effect of the other (Figure 3) because they act on the same signalling pathway.

Regarding lipids, green tea decreased total cholesterol and LDL-c. Similar results were observed by Zheng et al. (2011) in a meta-analysis of 14 studies in nondiabetic adults. Mechanisms of action are found in the literature to explain this effect as a reduction in intestinal cholesterol absorption (KOO NOH, 2007), decreased hepatic production of cholesterol (KIM et al., 2011) and modulation of LDL-c receptors in the liver (BURSILL; ROACH, 2007).

A previous study also discussed the increased effect of green tea catechins on fat oxidation, also through hepatic AMPK activity (MURASE et al., 2009); however, in our study, green tea did not result in weight or FM loss. Some studies have presented opposite outcomes (AUVICHAYAPAT et al., 2008; RICHARD et al., 2009; CHEN et al., 2015), while other authors reported similar results to the present study (JANSSENS et al., 2015; JURGENS et al., 2012). Therefore, a consensus has yet to be reached in the scientific community regarding the use of green tea as an adjuvant in weight reduction treatment. Possible explanations for these results may involve the limitations of this trial, which include control of caffeine intake and ethnicity. Epigallocatechin gallate (EGCG), a polyphenol in green tea, has been shown to be more effective in Asians because this population has a polymorphism in the catechol O-methyltransferase (COMT) allele (HURSEL et al., 2009), and they also have a higher abdominal fat mass than Caucasians (WULAN; WESTERTERP; PLASQUI, 2010).

In contrast, this study showed that metformin caused significant weight loss, which corroborates the findings in other studies in non-diabetic obese individuals (GLUECK et al., 2001; GOLAY, 2008). However, in relation to body composition, metformin reduced LM and did not change FM. A possible relationship between metformin and muscle mass reduction was demonstrated in a culture of muscle cells in which the association between metformin and the expression of the Muscle RING-finger gene protein-1 (MuRF1) was observed. This protein belongs to the family of E3 ubiquitin ligases and induces autophagic cell death (KRAWIEC et al., 2007).

In summary, 12 weeks of green tea supplementation resulted in an improvement in the lipid profile and glycemic control in study participants. In contrast, the isolated use of metformin was not effective for glycemic control and resulted in a reduction in lean body mass. Therefore, dry extract of green tea may be a better alternative to reduce DM2 risk

factors in overweight women than metformin. Future long-term research should be developed to investigate the reason for antagonism between metformin and green tea on glycemic control.

**Conflict of interest**

None of the authors have any conflicts of interest.

**Acknowledgements**

We would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarships.

## REFERENCES

- ADA. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes - 2011. Position Statement. *Diabetes care* 2011;33:11s-61s
- Auvichayapat P, PrapoChanung M, Tunkamnerdthai O, et al. Effectiveness of green tea on weight reduction in obese Thais: A randomized, controlled trial. *Physiol Behav* 2008;93:486-491
- Banerjee S, Ghoshal S, Porter TD. Phosphorylation of hepatic AMP-activated protein kinase and liver kinase B1 is increased after a single oral dose of green tea extract to mice. *Nutr Res* 2012;32:985-990
- Bano G. Glucose homeostasis, diabetes and obesity. *Diabetes, Obesity and Metab* 2013;27:715-726.
- Basu A, Betts NM, Mulugeta A, et al. Green tea supplementation increases glutathione and plasma antioxidant capacity in adults with the metabolic syndrome. *Nutr Res* 2013; 33:180-187.
- Bogdanski P, Suliburska J, Szulinska M, et al. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutr Res* 2012;32:421-427.
- Bouchoucha M, Uzzan B, Cohen R. Metformin and digestive disorders. *Diabetes Metab* 2011;37:90-96.
- Bursill CA, Roach PD. A green tea catechin extract upregulates the hepatic low-density lipoprotein receptor in rats. *Lipids* 2007;42:621-627.
- Byun JK, Yoon BY, Jhun JY, et al. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates both obesity and autoinflammatory arthritis aggravated by obesity by altering the balance among CD4+ T-cell subsets. *Immunol Lett* 2014;157:51-59.
- Chen IJ, Liu CY, Chiu JP, et al. Therapeutic effect of high-dose green tea extract on weight reduction: A randomized, double-blind, placebo-controlled Clin trial. *Clinl Nutr* 2015: published online May 12. DOI:10.1016/j.clnu.2015.05.003)
- DeFronzo RA, Abdul-Ghani MA. Preservation of  $\beta$ -cell function: the key to diabetes prevention. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2354-2366.
- DPPRG. Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002;346:393-403.
- Duca FA, Cote CD, Rasmussen BA, et al. Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. *Nat Med* 2015;21:506-511.
- Foretz M, Viollet B. Metformin takes a new route to Clin efficacy. *Endocrinol* 2015;11:390-392.

Friedewald WT, Levi RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.

Glueck CJ, Fontaine RN, Wang P, et al. Metformin reduces weight, centripetal obesity, insulin, leptin, and low-density lipoprotein cholesterol in nondiabetic, morbidly obese subjects with body mass index greater than 30. *Metab: Clin Exp* 2001;50:856-861.

Golay A. Metformin and body weight. *International J of Obesity* 2008;32:61-72.

Grundey SM. Pre-Diabetes, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Risk. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:635-643.

Henry RR, Chilton R, Garvey WT. New options for the treatment of obesity and type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2013;27:508-518.

Hursel R, Viechtbauer W, Westerterp-Plantenga MS. The effects of green tea on weight loss and weight maintenance: a meta-analysis. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:956-961.

Janssens PL, Hursel R, Westerterp-Plantenga MS. Long-term green tea extract supplementation does not affect fat absorption, resting energy expenditure, and body composition in adults. *J Nutr* 2015;145:864-870.

Jurgens TM, Whelan AM, Killian L, et al. Green tea for weight loss and weight maintenance in overweight or obese adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;12:232-239.

Kaneko YK, Takii M, Kojima Y, et al. Structure-dependent inhibitory effects of green tea catechins on insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells. *Biol Pharm Bull* 2015;38:476-481.

Kim A, Barone MK, Avino D, et al. Green tea catechins decrease total and low-density lipoprotein cholesterol: a systematic review and meta-analysis. *J Am Diet Assoc* 2011;111:1720-1729.

Kim HS, Quon MJ, Kim J. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol* 2014;10:187-195.

Koo SI, Noh SK. Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *J Nutr Biochem* 2007;18:179-183.

Krawiec BJ, Nystrom GJ, Frost RA, et al. AMP activated protein kinase agonists increase mRNA content of the muscle-specific ubiquitin ligases MAFbx and MuRF1 in C2C12 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292:1555-1567.

Levri KM, Slaymaker E, Last A, et al. Metformin as treatment for overweight and obese adults: a systematic review. *Ann Fam Med* 2005;3:457-461.

Li C, Allen A, Kwagh J, et al. Green tea polyphenols modulate insulin secretion by inhibiting glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 2006;281:10214-10221.

- Lim SS, Norman RJ, Clifton PM, et al. The effect of comprehensive lifestyle intervention or metformin on obesity in young women. *Nutr, Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:261-268.
- Masini, M, Anello, M, Bugliani, et al. Prevention by metformin of alterations induced by chronic exposure to high glucose in human islet beta cells is associated with preserved ATP/ADP ratio. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;104:163-170.
- Matthews, DR, Hosker, JP, Rudenski, AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-419.
- McGee SL, Van-Denderen BJ, Howlitt KF, et al. AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes* 2008;57:860-867.
- Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, et al. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* 2013;494:256-260.
- Murase T, Misawa K, Haramizu S, et al. Catechin-induced activation of the LKB1/AMP-activated protein kinase pathway. *Biochem Pharmacol* 2009;78:78-84.
- Onakpoya I, Spencer E, Heneghan C, Thompson M. The effect of green tea on blood pressure and lipid profile: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014;24:823-836.
- Park CS, Bang BR, Kwon HS, et al. Metformin reduces airway inflammation and remodeling via activation of AMP-activated protein kinase. *Biochem Pharmacol* 2012;84:1660-1670.
- Pernicova I, Korbonits M. Metformin-mode of action and Clin implications for diabetes and cancer. *Endocrinol* 2014;10:143-156
- Richard D, Kefi K, Barbe U, Poli A, Bausero P, Visioli F. Weight and plasma lipid control by decaffeinated green tea. *Pharmacol Res* 2009;59:351-354.
- Roghani M, Baluchnejadmojarad T. Hypoglycemic and hypolipidemic effect and antioxidant activity of chronic epigallocatechin-gallate in streptozotocin-diabetic rats. *Pathophysiology* 2010;17:55-59.
- Salpeter SR, Nicholas SB, Kahn JA, Salpeter EE. Meta-analysis: Metformin Treatment in Persons at Risk for Diabetes Mellitus. *Am J Med* 2008;121:149-157.
- Serban C, Sahebkar A, Antal D, Ursoniu S, Banach M. Effects of supplementation with green tea catechins on plasma C-reactive protein concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr* 2015;31:1061-1070
- Sneath PHA, Sokal RR. *Numerical Taxonomy*. San Francisco: W.H. Freeman; 1973.
- Snoussi C, Ducroc R, Hamdaoui MH, et al. Green tea decoction improves glucose tolerance and reduces weight gain of rats fed normal and high-fat diet. *J Nutr Biochem* 2014;25:557-564.

Stern SE, Williams K, Ferrannini E. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. *Diabetes* 2005;54:333-339.

Sundaram R, Naresh R, Shanthi P, et al. Modulatory effect of green tea extract on hepatic key enzymes of glucose Metab in streptozotocin and high fat diet induced diabetic rats. *Phytomedicine* 2013;20:577-584.

Takahashi M, Miyashita M, Bae SR, et al. Acute ingestion of catechin-rich green tea improves postprandial glucose status and increases serum thioredoxin concentrations in postmenopausal women. *Br J Nutr* 2014;112:1542-1550.

Westerterp-Plantenga MS. Green tea catechins caffeine and body-weight regulation. *Physiol Behav* 2010;100:42-46.

WHO. World Health Organization. World Health Statistics. Part III Global Health indicators. Geneva 2014. (Accessed Sep 11, 2014, at [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/ENWHS2014\\_Part3.pdf](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/ENWHS2014_Part3.pdf)).

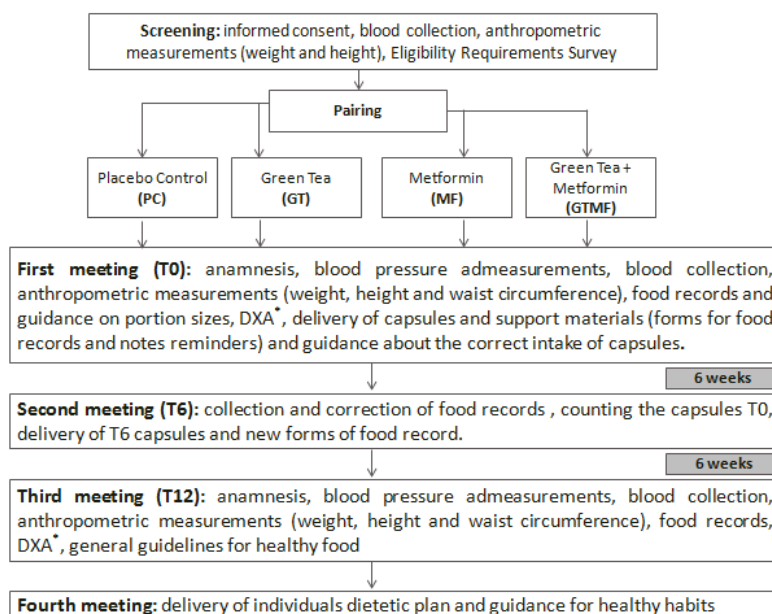
Willett WC, Howe GR, Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1220-1228.

Wulan SN, Westerterp KR, Plasqui G. Ethnic differences in body composition and the associated metabolic profile: a comparative study between Asians and Caucasians. *Maturitas* 2010;65:315-319.

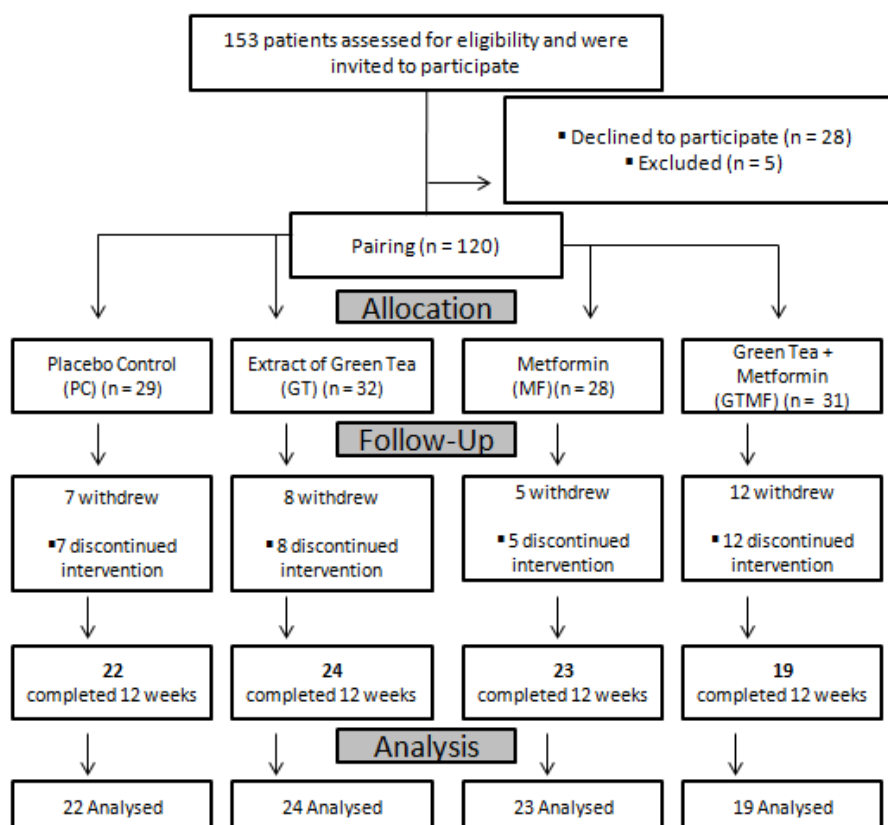
Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 2009;9:407-416.

Zheng XX, Xu YL, Li SH, et al. Green tea intake lowers fasting serum total and LDL cholesterol in adults: a meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2011;94:601-610.

Zheng XX, Xu YL, Li SH, et al. Effects of green tea catechins with or without caffeine on glycemic control in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2013;97:750-762.



**Supplementary Figure 1.** Experimental design



**Figure 1.** Participant flow through the study. Values are expressed as the number of participants.

**Supplementary Table 1.** Baseline characteristics of participants.

<b>Characteristics</b>	<b>Placebo (n = 22)</b>	<b>Green Tea (n = 24)</b>	<b>Metformin (n = 23)</b>	<b>Green tea + Metformin (n = 19)</b>
Age (years)	42.40 ± 1.90	39.26 ± 2.41*	41.30 ± 1.96	40.2 ± 2.02
Weight (kg)	88.10 ± 1.72	84.08 ± 1.74	86.71 ± 1.80	89.02 ± 1.89
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	35.69 ± 0.62	34.60 ± 0.65	35.39 ± 0.67	35.96 ± 0.70
Waist circumference (cm)	103.68 ± 1.45	102.06 ± 1.57	102.61 ± 1.58	102.35 ± 1.72
Lean mass (kg)	42.62 ± 0.91	40.81 ± 0.93	43.02 ± 0.95	42.48 ± 0.99
Fat mass (kg)	40.75 ± 1.12	39.39 ± 1.18	39.79 ± 1.21	42.05 ± 1.27
Fasting glucose (mg/dL)	90.54 ± 2.01	90.60 ± 2.10	89.11 ± 2.17	91.14 ± 2.41
HbA1c (%)	6.00 ± 0.21	5.38 ± 0.22	5.32 ± 0.22	5.62 ± 0.24
Insulin (mg/dL)	12.92 ± 1.03	14.08 ± 1.07	12.27 ± 1.08	12.10 ± 1.21
iHOMA-IR	2.87 ± 0.25	3.16 ± 0.25	2.68 ± 0.26	2.65 ± 0.31
iHOMA-β	194.44 ± 19.55	196.36 ± 20.65	202.52 ± 20.73	190.03 ± 22.44
Total cholesterol (mg/dl)	197.50 ± 7.38	201.21 ± 7.67	183.80 ± 7.96	196.31 ± 8.34
HDL-c (mg/dL)	44.81 ± 2.16	48.24 ± 2.25	45.60 ± 2.34	47.36 ± 2.45
LDL-c (mg/dL)	119.50 ± 6.02	125.26 ± 6.09	111.19 ± 6.33	124.61 ± 6.63
VLDL-c(mg/dL)	29.46 ± 2.47	27.94 ± 2.57	27.87 ± 2.66	25.38 ± 2.79
Triglycerides (mg/dL)	147.28 ± 12.33	139.37 ± 12.83	139.63 ± 13.31	126.67 ± 13.95

Data expressed in mean ± standard error (se). Means were adjusted by the method of least squares. \*p < 0.05. BMI: Body Mass Index; HbA1c: glycated hemoglobin; iHOMA-IR: Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance index; RSMM: Relative Skeletal Muscle Mass; iHoma-β: Homeostasis Model Assessment-β index.

**Table 1.** Influence of the isolated effect of green tea, metformin and its interaction on energy and macronutrient intake.

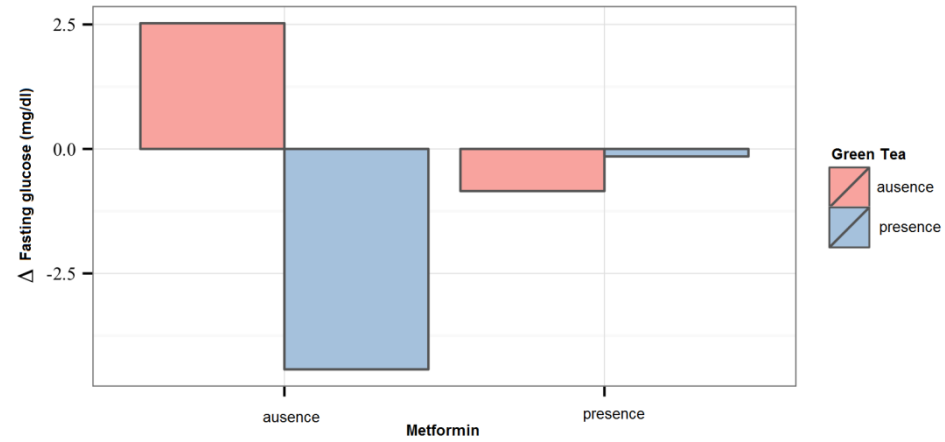
Variables	Green tea			Metformin			p Interaction
	<i>tea 0</i>	<i>tea 1</i>	<i>p</i>	<i>met 0</i>	<i>met 1</i>	<i>p</i>	
<b>Calories (kcal)</b>	-40.110	-85.344	0.883	18.886	-144.340	0.266	0.096
<b>Protein (g)</b>	19.342	0.235	<b>0.016</b>	18.112	1.464	<b>0.019</b>	0.310
<b>Lipids (g)</b>	1.562	-2.343	0.222	0.997	-1.779	0.356	0.397
<b>Carbohydrates (g)</b>	-20.565	-1.195	0.082	-20.326	-1.434	0.068	0.532
<b>Fibers (g)</b>	2.529	4.713	0.246	2.488	4.754	0.213	0.192

Tea 0: groups receiving only metformin and/or placebo. Tea 1: group receiving green tea extract supplementation alone + group receiving green tea extract and metformin combined. Met 0: groups receiving green tea extract alone and/or placebo. Met 1: group receiving metformin alone + group receiving green tea extract and metformin combined. p-interaction: p-value for interaction when there was combined use of the products.

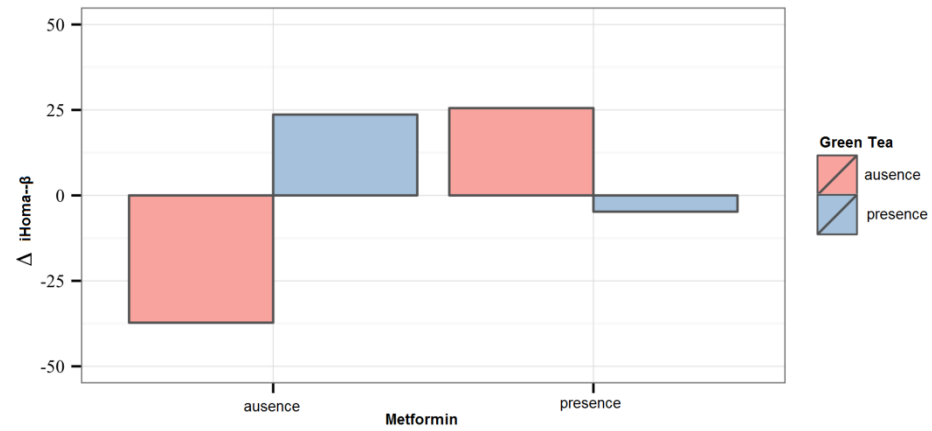
**Table 2.** Influence of the isolated effect of green tea, metformin and its interaction on type 2 diabetes risk factors.

Variables	Green tea			Metformin			Interaction	p Interaction
	<i>tea 0</i>	<i>tea 1</i>	<i>p</i>	<i>met 0</i>	<i>met 1</i>	<i>p</i>		
Weight (kg)	-1.167	-0.463	0.096	-0.312	-1.318	<b>0.034</b>	-1.081	0.632
Waist circumference (cm)	-0.959	-1.138	0.881	-0.705	-1.391	0.347	-1.985	0.155
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	-0.349	-0.086	0.136	0.025	-0.460	<b>0.016</b>	-0.386	0.573
Lean mass (kg)	-0.854	-0.587	0.400	-0.192	-1.249	<b>0.009</b>	-0.948	0.413
Fat Mass (kg)	-0.497	0.173	0.127	-0.237	-0.087	0.690	-0.097	0.140
Fasting glucose (mg/dL)	0.839	-2.289	0.085	-0.952	-0.499	0.935	<b>-0.151</b>	<b>0.070</b>
Glycated hemoglobin (%)	-0.317	-0.152	0.615	-0.516	0.048	<b>0.017</b>	-0.033	0.181
Insulin (mg/dL)	-1.104	-0.731	0.750	-0.812	-1.024	0.839	-0.572	0.657
iHOMA-IR	-0.193	-0.240	0.835	-0.196	-0.237	0.828	-0.154	0.457
iHOMA $\beta$	-5.853	9.441	0.452	-6.799	10.387	0.360	<b>-4.763</b>	<b>0.054</b>
Total cholesterol (mg/dl)	-1.545	-11.467	<b>0.047</b>	-6.534	-6.478	0.936	-13.882	0.327
HDL-c (mg/dL)	-3.570	-5.187	0.218	-4.981	-3.776	0.414	-3.772	0.251
LDL-c (mg/dL)	5.987	-5.031	<b>0.024</b>	-2.669	3.626	0.205	-2.375	0.847
VLDL-c (mg/dL)	-4.665	-1.885	0.151	-2.916	-3.634	0.706	-1.908	0.733
Triglycerides (mg/dL)	-23.341	-9.274	0.143	-14.531	-18.085	0.706	-9.321	0.723
GOT (U/L)	0.268	0.320	0.979	0.081	0.506	0.656	0.861	0.520
GOT (U/L)	2.475	2.516	0.995	1.963	3.027	0.432	2.991	0.935
Creatinine (mg/dL)	-0.005	-0.009	0.957	0.009	-0.023	<b>0.009</b>	<b>-0.049</b>	<b>0.000</b>
CPK (U/L)	-5.243	-3.605	0.528	-0.565	-8.283	0.258	<b>-13.927</b>	<b>0.045</b>

Tea 0: groups receiving only metformin and/or placebo. Tea 1: group receiving green tea extract supplementation alone + group receiving green tea extract and metformin combined. Met 0: groups receiving green tea extract alone and/or placebo. Met 1: group receiving metformin alone + group receiving green tea extract and metformin combined. p-interaction: p-value for interaction when there was combined use of the products. BMI: Body Mass Index; RSMM: Relative Skeletal Muscle Mass; iHOMA-IR: Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance index; iHoma- $\beta$ : Homeostasis Model Assessment- $\beta$  index; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; VLDL: very low density lipoprotein; GOT: Glutamic Oxaloacetic Transaminase; TGP: Glutamic Pyruvic Transaminase; CPK: Creatine phosphokinase.



**Figure 2.** Interaction between green tea and metformin on fasting glucose ( $p = 0.07$ )



**Figure 3.** Interaction between green tea and metformin on iHoma -  $\beta$  ( $p = 0.054$ )

**Table 3.** Side effects reported by participants across the study.

<b>Effect</b>	<b>Total (n = 88)</b>	<b>Placebo (n = 22)</b>	<b>Green tea (n = 24)</b>	<b>Metformina (n = 23)</b>	<b>Green tea + Metformin (n = 19)</b>
Intestinal improvement	15 (17%)	4 (18%)	3 (13%)	4 (17%)	4 (21%)
Welfare	7 (8%)	1 (5%)	2 (8%)	1 (4%)	3 (16%)
Changes in the color and odor of urine	7 (8%)	2 (9%)	-	1 (4%)	4 (21%)
Increased fullness feelings	12 (14%)	1 (5%)	3 (13%)	3 (13%)	5 (26%)
Increased fluid intake	4 (5%)	1 (5%)	-	-	3 (16%)
Diarrheal episodes	10 (11%)	-	1 (4%)	4 (17%)	5 (26%)
Nauseas	6 (7%)	-	1 (4%)	2 (9%)	3 (16%)
Headache	3 (3%)	1 (5%)	1 (4%)	-	1 (5%)
Heartburn	2 (2%)	-	-	1 (4%)	1 (5%)
Xerostomia	9 (10%)	2 (9%)	1(4%)	2 (9%)	4 (21%)
Others	2(2%)	1 (5%)	-	-	1 (5%)

Variables presented as prevalence into each group of intervention (%).

## CAPÍTULO 3 – ARTIGO 2

As instruções aos autores para submissão de manuscritos no primeiro periódico ao qual este artigo será submetido estão apresentadas no Anexo B.

### *Lead Article*

1 **THERAPEUTIC POTENTIAL OF GREEN TEA ON RISK FACTORS FOR TYPE 2**

2 **DIABETES IN OBESE ADULTS - A REVIEW**

3 Monallisa A. Ferreira<sup>1</sup>; Débora M. Silva<sup>1</sup>; Alcides C. de Moraes Jr<sup>1</sup>; João Felipe Mota<sup>1</sup>;

4 Patrícia B. Botelho<sup>1</sup>

5

6 <sup>1</sup>Laboratory of Research in Clinical Nutrition and Sports (Labince), Nutrition Faculty, Federal  
7 University of Goiás (UFG), Goiania, Goiás, Brazil.

8 Correspondence: PB Botelho, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás,

9 Goiânia, Brazil, Rua 227 Qd. 68s/n - Setor Leste Universitário, Goiânia, GO, Brazil, CEP

10 74.605-080. E-mail: patriciaborges@ufg.br. Phone: +55-62-3209-6270.

11 *Abstract.*

12 Green tea has been associated with positive effects in the treatment of obesity and other

13 associated comorbidities such as type 2 diabetes (T2DM). These benefits are thought to be

14 related to the anti-inflammatory and antioxidant effects of green tea and to the reduction in

15 body fat percentage exhibited by its bioactive compounds. The predominant active

16 compounds in green tea are flavonoid monomers known as catechins, in particular

17 epigallocatechin-3-gallate, which is the most abundant and most effective catechin in

18 metabolic care, particularly among obese patients. The objective of this review was to

19 investigate the effects of green tea on body composition, oxidative stress, inflammation, and

20 insulin resistance, risk factors for the development of T2DM, in obese individuals and the  
21 mechanisms that underlie the modulatory actions of green tea compounds on these risk  
22 factors. Although green tea has therapeutic potential in the treatment of obese individuals, the  
23 findings of this review demonstrate the need for a greater number of well designed studies to  
24 confirm the positive effects of green tea, especially regarding the modulation of obesity.

25 *Key words.* obesity, diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic diseases, *Camellia*  
26 *sinensis*

27 *Running title:* Green tea and risk factors for diabetes

28

## 29 INTRODUCTION

30 Obesity is characterized by a positive energy balance that results in excess body fat  
31 due to hyperplasia and/or hypertrophy of adipocytes<sup>1</sup> and is related to complex interactions  
32 between genetic, behavioral and environmental factors.<sup>2</sup> Obesity is the fifth highest cause of  
33 death in the world<sup>3</sup> and is associated with pathologic conditions, such as insulin resistance and  
34 type 2 diabetes (T2DM), because of increased fat tissue, a metabolically active endocrine  
35 organ that secretes a large number of cytokines such as interleukins 6 and 1 (IL-6 and IL-1),  
36 Tumoral Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and reactive oxygen species (ROS).<sup>4-9</sup>

37 Strategies proposed to avoid, delay or treat obesity and T2DM include changes in  
38 lifestyle, particularly ones related to eating habits, such as treatment with phytoterapics and  
39 functional foods (e.g., green tea).<sup>10</sup> Produced from the leaves of the *Camellia sinensis*, green  
40 tea has been associated with hypoglycemic, anti-inflammatory, antioxidant and thermogenic  
41 properties due the presence of polyphenols in its composition, especially epigallocatechin-3-  
42 gallate.<sup>1-14</sup>

43 However, the effects of green tea supplementation on risk of T2DM have been  
44 controversial because of the form of administration, concentration of bioactive compounds  
45 and the presence or absence of caffeine. Therefore, this review will describe the effects of  
46 green tea on risk factors for T2DM regarding obesity, inflammation, oxidative stress, body  
47 composition and insulin resistance with careful attention given to study design, variations that  
48 have contributed to the current lack of consensus. In addition, it will discuss how these risk  
49 factors may be modulated by the action of the catechins and other phenols present in green  
50 tea.

## 51 METHODS

52 A literature review was performed using the electronic database Medline (via PubMed) and  
53 Science Direct and the following studies were selected: systematic reviews, meta-analysis, in

54 vitro studies, research on animal models, and clinical trials published in journals with an  
55 impact factor (according to the *Journal of Citation Reports*)  $\geq 1.5$ . The search terms were  
56 selected by consulting medical subject headings and were as follows: green tea, *Camellia*  
57 *sinensis*, antioxidant, body composition, oxidative stress, inflammation, glucose, diabetes and  
58 obesity. The Boolean operators “and,” “or,” and “and not” were used to combine the search  
59 terms. As a result of the search, 9 *in vitro* studies, 18 studies with animal models, and 25  
60 clinical trials were selected. In addition to these studies, the present review includes the  
61 citations of 49 articles that were used to define the scientific terms and discusses the results  
62 and the action mechanisms involved with the effects of green tea.

### 63 **GREEN TEA: COMPOSITION AND PRESENTATION**

64 An estimate 2.5 million tons of *Camellia sinensis* leaves are produced every year  
65 worldwide. They are consumed in different forms, mostly in Asia, North Africa, Europe and  
66 the US.<sup>15</sup> Regular consumption of green tea has been associated with antioxidant, anti-  
67 inflammatory, anti-atherosclerotic, anti-diabetic and anti-mutagenic properties.<sup>12</sup>

68 Green tea is composed of 3.5% caffeine, 6.5% lignin, 1.5% organic acids, 1-5.5% free  
69 amino acids, 0.5% chlorophyll and numerous flavor compounds (69% to 85%).<sup>16</sup> The main  
70 polyphenols found in green tea are catechins<sup>17</sup>, which represent 25% to 35% of the plant dry  
71 weight.<sup>18</sup>

72 The four main catechins in green tea are epicatechin (EC), epicatechin-3-gallate  
73 (ECG), epigallocatechin (EGC), and epigallocatechin-3-gallate (EGCG), which is the most  
74 abundant<sup>15,17</sup> (Figure 1). The EGCGs represent approximately 40% of the catechins<sup>19</sup> and have  
75 been shown to be the most effective catechin in producing antioxidant properties of green  
76 tea.<sup>20</sup>

77 Another bioactive compound found in *Camellia sinensis* is caffeine, which comprises  
78 approximately 2% to 5% of the substances extracted in the water when making tea.<sup>21</sup> In

79 general, this quantity is greater than coffee beans, which can be above 2%.<sup>22</sup> This elevated  
80 quantity of caffeine is also associated with an increase in energy expenditure and in  
81 thermogenic action, which can be beneficial in T2DM prevention.<sup>23</sup>

82           Some factors have been shown to influence the concentration of catechins and  
83 caffeine in the leaves of green tea, such as the fermentation process, farming and form of  
84 presentation. Depending on the fermentation process, the tea from the leaves of the *Camellia*  
85 *sinensis* can be grouped into three categories: green tea, *oolong* tea and black tea. Green tea is  
86 not fermented and, for that reason, maintains the color of its leaves. In addition, the quantity  
87 of phenols, alkaloids, fatty acids and amino acids in green tea leaves are more preserved than  
88 in the semi-fermented or fermented plants. On other hand, *oolong* tea and black tea have a  
89 darker coloring because they undergo the fermentation process.<sup>24, 25</sup> The soil, temperature and  
90 the farming and harvesting conditions can also influence the concentration of bioactive  
91 compounds in the *Camellia sinensis*, especially regarding flavonoids.<sup>26</sup>

92           The way in which green tea is prepared also affects the preservation of its functional  
93 proprieties. For that reason, it is recommended to heat water until just before ebullition and to  
94 cover the infusion for 2 to 3 minutes. This preparation process inactivates the enzyme  
95 polyphenol oxidase, which is responsible for the oxidation process.<sup>27</sup>

96           Green tea can also be presented as a dehydrated and encapsulated extract. This extract  
97 has a higher concentration of the active compounds of green tea, such as EGCG.<sup>11</sup> Some  
98 researchers have demonstrated that green tea extract has superior effects due to its higher  
99 concentration of phenolic compounds, greater stability and sustained release.<sup>28</sup> However,  
100 there are limitations to the therapeutic use of green tea extracts in mitigating risk factors for  
101 T2DM that must be addressed, such as the instability of the pH and the gastric content,  
102 bioavailability and autoxidation reactions.<sup>29</sup> Some studies have intended to minimize these  
103 effects and proposed developing lipid carriers in the encapsulating process to protect bioactive

104 compounds, specifically, catechins.<sup>30</sup> This suggests that encapsulation may influence the  
105 action of catechins in green tea, and this should be considered when analyzing the results of  
106 trials.

107 Other aspects that should be considered in preserving the properties of green tea are  
108 extraction time, temperature, solvent-to-sample ratio, the number of repeat extractions of the  
109 sample, the type of solvent used to extract the compounds and the decaffeination process.<sup>31</sup>  
110 Different solvent systems can be used to extract the catechins, for example water, acetone,  
111 ethyl acetate, methanol, ethanol or a mixture of solvents. The best solvent choice is  
112 determined by the properties of the phenolic components.<sup>32</sup> Regarding green tea, a high yield  
113 of phenolics can be extracted from the leaves using water.<sup>33,34</sup> To selectively separate caffeine  
114 from fresh green tea without affecting the quality of catechins, the best solvent has been  
115 shown to be supercritical CO<sub>2</sub>.<sup>34,35</sup>

116 Therefore, we emphasize the importance of considering these factors for the choice of  
117 green tea form presentation in order to keep the stability as much as possible of the above-  
118 mentioned compounds. It is also important to consider these factors to analyze clinical trials  
119 results once there has been interest in the benefits and effectiveness of the bioactive  
120 compounds of *Camellia sinensis* as preventive and therapeutic options for hyperglycemia in  
121 obese individuals. Accordingly, there have been a large number of scientific publications  
122 addressing the relationship between the consumption of green tea and body composition,  
123 oxidative stress, glucose metabolism and other T2DM risk factors.

### 124 3.1 GREEN TEA AND BODY COMPOSITION

125 Among the various benefits of green tea, a great amount of attention has been given to  
126 its use in fat loss treatment.<sup>17,36-38</sup> Green tea catechins can inhibit catechol-O-  
127 methyltransferase (COMT), an enzyme responsible for the degradation of noradrenalin.<sup>39</sup>  
128 Consequently, there is an increase in the concentration of noradrenalin that interacts with  $\beta$ -

129 adrenoceptor, which binds to protein G, promoting thermogenesis in brown adipose tissue  
130 (BAT).<sup>36,40</sup> BAT is a thermogenic tissue that modulates the use of triglycerides (TG) as an  
131 energy source, particularly in the form of heat<sup>41</sup> and is thus actively involved in body  
132 temperature regulation.

133         When noradrenalin interacts with a  $\beta$ -adrenoceptor that has bound to protein G, the  
134 noradrenalin thermogenic signal is mediated by adenylatecyclase. Once activated, the  
135 adenylatecyclase converts adenosine triphosphate (ATP) into cyclic adenosine  
136 monophosphate (AMPc) through a reaction catalyzed by the enzyme adenylyl cyclase. AMPc  
137 then activates protein kinase (PKA), which phosphorylates cytosolic proteins, thus stimulating  
138 the lipolytic route (Figure 2). Consequently, this results in a reduction in body fat  
139 percentage.<sup>40</sup>

140         Moreover, green tea can also act on white adipose tissue (WAT), which is elevated in  
141 obesity, stores fatty acids in its cytoplasm in the form of TG<sup>42</sup> and is related to glucose  
142 intolerance and the reduction in the sensation of satiety.<sup>40</sup> Klaus et al.<sup>43</sup> observed that green  
143 tea induces the capacity of mitochondria to use the fat stored in WAT as an energy source and  
144 to impair tissue adipogenesis. Although these action mechanisms are well established, there  
145 are many conflicting data in the literature (Table 1), regarding the action of green tea on body  
146 composition.

147         Auvichayapat et al.<sup>36</sup> observed individuals supplemented with 750 mg of green tea  
148 extract for 12 weeks and found a reduction in body fat percentage and a decrease in body  
149 weight (-3.3 kg). They also found a reduction in serum leptin concentration in the group  
150 treated with green tea compared with a placebo group. The authors suggested that this may  
151 be because EGCG can increase energy expenditure and fat oxidation, reducing body fat  
152 percentage and thus leptin concentration. In addition, other researchers believe that the  
153 polyphenols in green tea can induce hypolipidemic effects, suppressing the synthesis of

154 fatty acids.<sup>44,45</sup>

155 In a meta-analysis, Hursel et al.<sup>46</sup> investigated the effects of catechins and an EGCG +  
156 caffeine mix on body weight loss. They found that green tea consumption improved body  
157 weight control, including weight loss maintenance. In the included studies, a body weight loss  
158 of 1.31 kg was identified after 12-week interventions. Nonetheless, the authors suggested a  
159 possible influence of daily coffee consumption as well as an interaction between ethnicity and  
160 caffeine, both of which may influence the action of green tea catechins.

161 The role of caffeine in the benefits provided by green tea has also been studied by the  
162 scientific community because caffeine is present in *Camellia sinensis*. Caffeine inhibits  
163 phosphodiesterase, an enzyme responsible for AMPc degradation (Figure 2), leading to the  
164 increase of AMPc, which is the second intra-cellular messenger in the thermogenesis  
165 mediated by noradrenaline. The interaction between catechins and caffeine from green tea  
166 results in an increase and prolonged effect of noradrenaline in thermogenesis, contributing to  
167 body weight reduction.<sup>37,47</sup>

168 In a meta-analysis of randomized clinic trials, Phung et al.<sup>38</sup> evaluated the effects of  
169 green tea catechins with and without caffeine on anthropometric variables. Fifteen studies  
170 were analyzed and the results showed that the green tea catechins with caffeine resulted in a  
171 significant reduction in body mass index, body weight and waist circumference when  
172 compared to the groups without caffeine.

173 In the same meta-analysis, studies that evaluated isolated catechins without the  
174 administration of caffeine did not show benefits in any of the analyzed anthropometric  
175 variables when compared to the control group. The authors concluded that the administration  
176 of catechins in conjunction with caffeine was more efficient in decreasing body mass index,  
177 body weight and waist circumference.<sup>38</sup>

178 Apart from some evidence regarding the benefits of catechins with caffeine, recent

179 studies have used decaffeinated green tea and observed similar results to the studies using  
180 whole green tea composition.<sup>48-50</sup> Sae-tan et al.<sup>51</sup> demonstrated that decaffeinated green tea  
181 and exercise (GTE + Ex) influenced the gene activities associated with the conversion of  
182 WAT to brown fat-like adipose tissue (BLAT) in obese rats and therefore caused changes in  
183 body composition. BLAT contains a greater quantity of mitochondria when compared to  
184 WAT and is highly responsive to the AMP cycle, resulting in the similar use of stocked TG  
185 for energy production as BAT.<sup>52</sup>

186         Decaffeinated green tea supplementation also demonstrated positive results in regards  
187 to weight control in another randomized 8-week study with obese rats that were divided into 4  
188 groups: normolipidic diets with and without EGCG (50 mg/kg/day) and hyperlipidic diets  
189 with and without EGCG (50 mg/kg/day). The rats supplemented with EGCG, independent of  
190 the type of diet, presented significant weight loss compared with the respective placebo  
191 groups ( $p < 0.01$ ).<sup>49</sup>

192         Chen et al.<sup>53</sup> also demonstrated positive results in body composition with decaffeinated  
193 green tea. After 12 weeks, green tea supplementation in obese women resulted in decreased  
194 body weight, waist circumference, and also in the total cholesterol and LDL concentration.  
195 The authors suggested that the mechanism involved in attenuation of obesity may be  
196 associated with the inhibition of ghrelin and increased adiponectin levels.

197         Although there are numerous scientific publications that address the positive action of  
198 green tea on body composition, there is still no consensus regarding the benefit of green tea  
199 supplementation. In a meta-analysis, Baladia et al.<sup>54</sup> noted that the ingestion of green tea did  
200 not have any significant or clinically relevant effects on body weight or body composition in  
201 301 overweight or obese adults between 18 and 60 years of age. They concluded that it was  
202 still not possible to recommend green tea for body weight reduction and maintenance.

203 Janssens et al.<sup>55</sup> investigated the effects of green tea (>0.56 g/day of EGCG + 0.28–  
204 0.45 g/day of caffeine or placebo) on body weight control, resting energy expenditure and lipid  
205 absorption in Caucasian patients who consumed green tea for 12 weeks. In contrast to other  
206 studies, the authors found that the intervention did not improve the variables studied.

207 A point of discussion in the scientific community, and one that may have influenced  
208 the contradictory results found by Janssens et al.<sup>55</sup> compared to other studies, is the role of  
209 ethnicity. Asians have been shown to present greater proportions of android adiposity  
210 compared to gynoid adiposity and consequently greater abdominal fat percentage and  
211 increased hepatic fat components than Caucasians.<sup>56</sup> It is possible that many of the studies  
212 showing positive EGCG action results have been conducted among Asian  
213 populations,<sup>24,36,46,53,57</sup> suggesting that intra-abdominal fat may be a determinant of the action  
214 of green tea on body composition.

215 Previous studies have investigated ethnic differences regarding the effect of green tea  
216 catechins on body composition improvement. Hursel et al.<sup>46</sup> showed, in a meta-analysis, a  
217 greater weight loss in Asians (1.51 kg) compared with Caucasians (0.82 kg) when exposed to  
218 green tea supplementation. Although this difference was not statistically significant, the  
219 authors highlighted the importance of considering ethnicity when analyzing the results of  
220 studies with green tea.<sup>46</sup>

221 While the properties of green tea in regards to body composition have received much  
222 attention, more studies are still necessary to support the beneficial effects of catechins, as well  
223 as to determine the true influence of ethnicity and of the composition of green tea. We also  
224 found that the mean intervention time was 12 weeks although the results are not yet  
225 conclusive. Besides that, to our knowledge, there are not studies comparing different time  
226 intervention neither green tea presentation form used as supplementation.

## 227 3.2 GREEN TEA AND INFLAMMATION

228           The anti-inflammatory effects of green tea have been presented in the literature (Table  
229 2) and are primarily based on the suppression of the inflammatory route mediated by nuclear  
230 factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ b).<sup>62</sup> EGCG blocks the phosphorylation of the nuclear factor of kappa light  
231 polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (I $\kappa$ B- $\alpha$ ) through I $\kappa$ B kinase (IKK) and  
232 consequently inhibits NF- $\kappa$ B, reducing the transcription of the inflammatory cytokines TNF- $\alpha$   
233 and IL-6.<sup>63,64</sup> Cunha et al.<sup>65</sup> observed a reduction in the levels of pro-inflammatory cytokines  
234 in rats with a diet rich in fat that were supplemented with 400 mg of green tea extract/kg of  
235 body weight/day. After 8 weeks of the intervention, there was a reduction in the levels of  
236 TNF- $\alpha$  as well as in pro-inflammatory signaling involving TLR4.

237           The effects of green tea on TNF- $\alpha$  have also been shown in studies with humans.  
238 Obese and hypertensive subjects supplemented with 379 mg of green tea extract for 3 months  
239 presented a significant reduction in the levels of TNF- $\alpha$  and C-reactive protein (CRP).<sup>12</sup> CRP,  
240 which is synthesized primarily in the hepatocytes, is involved in the inflammatory cascade by  
241 way of inducing the secretion of IL-6.<sup>66</sup> Another study with subjects with metabolic syndrome  
242 found that a supplement of green tea extract and infusion for 8 weeks resulted in a reduction  
243 in CRP concentration but not in adiponectin, IL-6 or IL-1.<sup>67</sup> Although green tea has been  
244 shown to have a positive effect on the reduction of IL-6 expression in the Okuda et al.<sup>68</sup> study,  
245 there is no consensus about its action on CRP plasma concentration.<sup>69</sup>

246           A study on the relationship between adiponectin and green tea in obese rats showed no  
247 positive effects of EGCG supplementation with a high fat diet for 8 weeks. While there was a  
248 reduction in adiponectin levels, green tea was not able to maintain or increase the amount of  
249 adiponectin.<sup>68</sup> However, Tian et al.<sup>70</sup> found that green tea was able to significantly maintain  
250 the concentration of adiponectin in rats. The authors suggested that EGCG was able to  
251 modulate the activity of *peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$* , an important

252 adiponectin transcription regulator. They also observed that green tea polyphenols were  
253 associated with the suppression of weight gain induced by a diet rich in fat.

254 Another anti-inflammatory modulation effect of green tea involves the suppression of  
255 resistin mRNA. One study found that 20 and 100  $\mu$ M of EGCG inhibited resistin mRNA  
256 levels by 35% and 50%, respectively.<sup>71</sup> This reduction in mRNA levels occurred because the  
257 presence of EGCG reduced the resistin mRNA life span from 12 to 3 hours. The authors also  
258 claimed that EGCG was associated with resistin mRNA stability and that the modulation  
259 route was independent of protein synthesis. These mechanisms partially explain the anti-  
260 inflammatory effects that green tea may provide and could explain both its anti-obesity and its  
261 anti-diabetic effects. Resistin can also induce the expression of SOCS-3, which inhibits the  
262 signaling of insulin and is associated with insulin resistance, especially in obese individuals  
263 with hyperglycemic alterations.<sup>72</sup>

264 However, studies evaluating green tea supplementation and the action of SOCS-3 are  
265 scarce. Possible activity routes have been proposed but still require scientific investigation to  
266 support its action mechanisms. Hasumura et al.<sup>73</sup> showed that green tea extract reduced the  
267 expression of SOCS-3 and improved adiposity outcomes in zebra fish. Therefore, it is  
268 believed that because EGCG suppresses resistin mRNA levels, the expression of SOCS-3 is  
269 also reduced. However, more studies are necessary to confirm this mechanism of action.

270 Although the inflammatory condition has been shown to be closely connected with  
271 excessive adiposity and green tea is believed to generate beneficial effects because it induces  
272 an anti-inflammatory chain of events, we highlight the importance and need for more studies  
273 to validate these ideas, given the limited literature on this area.

### 274 3.3 GREEN TEA AND OXIDATIVE STRESS

275           Antioxidants of exogenous origin, such as the polyphenols present in *Camellia*  
276 *sinensis*, maintain body antioxidant capacity through the interaction with radical species and  
277 the induction of endogenous antioxidant enzymes to prevent metabolic losses that could be  
278 caused by an increase in free radicals.<sup>75</sup> Moskaug et al.<sup>76</sup> suggested that a diet rich in  
279 polyphenols is associated with an improvement in the regulation of the intra-cellular synthesis  
280 of glutathione and glutathione peroxidase and a reduction in mitochondrial oxidative stress.

281           In general, the types of tea derived from *Camellia sinensis* can be ranked according to  
282 their antioxidant activity in descending order: green tea, *oolong* tea, and then black tea.  
283 However, environment factors such as soil, climate, season and farming technology can  
284 influence this order and consequently, the antioxidant capacity.<sup>77</sup>

285           The antioxidant properties of green tea polyphenols originate from their chemical  
286 structure; they consist of aromatic rings and hydroxyl groups that bind to free radicals, thus  
287 neutralizing them.<sup>78</sup> Catechins, a type of polyphenol found in green tea, are able to rapidly  
288 reduce free radicals through inhibition of lipid peroxidation, activation of antioxidant  
289 enzymes,<sup>79</sup> chelation of metallic ions, inhibition of redox-sensitive transcription factors and  
290 reduction in pro-oxidant enzyme mechanisms<sup>78</sup>.

291           Although the bioavailability of catechins is lower in infusion drinks, which represent  
292 the realistic integration of green tea into one's diet, studies show that plasma antioxidant  
293 capacity increases within an hour of its ingestion.<sup>80,81</sup> Furthermore, the functional activity of  
294 green tea has been found to be synergistic with ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol actions,  
295 potentiating the antioxidant function.<sup>82</sup>

296           To compare the effects of green tea polyphenols in different presentation form on  
297 postprandial plasma antioxidants, a randomized crossover study was conducted with 30  
298 healthy subjects. The subjects were randomly divided into three groups (green tea infusion,

299 black tea and green tea extract groups). Flavonoid absorption was found to be most efficient  
300 when administered in capsules, inducing a small but significant increase in plasma antioxidant  
301 activity.<sup>28</sup>

302 The antioxidant action of green tea phenolic compounds was thus potentiated in  
303 encapsulated extracts,<sup>28</sup> possibly due to the greater concentration of bioactive compounds and  
304 the diminished loss of phenolic compounds in the intervention material during treatment.  
305 Although capsules have been suggested to have a greater effect than other forms of green tea,  
306 the availability of *Camellia sinensis* compounds in tea has still demonstrated beneficial effects  
307 and positive action on oxidative stress.

308 Basu et al.<sup>11</sup> showed in a study with 35 adults clinically diagnosed with metabolic  
309 syndrome that both green tea infusion (GTL) (4 cups/day) and green tea extract (GTE)  
310 resulted in significant benefits, including increases in both glutathione serum concentration  
311 and plasma antioxidant capacity for both treatments after 8 weeks of supplementation. The  
312 authors also highlighted that the total amount of catechins in the infusion (928 mg/4 cups)  
313 was greater than the amount in the extract (870 mg/2 capsules), which was contrary to the  
314 concentration of EGCG (GTL: 440 mg; GTE: 460 mg). However, changes in serum levels of  
315 antioxidant vitamins and glutathione peroxidase and catalase enzyme activity were not  
316 observed.

317 Another study evaluated the effect of beverages rich in phenolic compounds, such as  
318 green tea, on antioxidant activity and found positive results for GTL. The subjects were  
319 divided into 5 groups (placebo, green tea, black tea, red wine without alcohol and white wine  
320 without alcohol). The authors observed that the plasma antioxidant capacity increased 30  
321 minutes after ingesting GTL and that both red wine (an established antioxidant) and green tea  
322 were efficient in protecting LDL from oxidation.<sup>83</sup>

323 On the other hand, Ellinger et al.<sup>84</sup> found limited evidence of improvements in

324 antioxidant activity and lipid peroxidation when consuming 0.6 to 1.5 L of green tea per day.  
325 The authors analyzed 31 green tea interventional studies that evaluated the effects of green tea  
326 on plasma total antioxidant capacity, DNA damage and lipid and protein oxidation. They  
327 found that favorable effects were more frequent in subjects whose oxidative stress had been  
328 induced, such as smokers and athletes. Others studies evaluating green tea and its antioxidant  
329 effects are shown in Table 3.

330 A large number of the studies conducted with obese subjects have found positive  
331 results regarding the reduced risk of chronic diseases because of green tea potential  
332 antioxidant effects. Of note, capsule supplementation is currently considered to be the most  
333 effective method because it has shown to result in better compound absorption. While there is  
334 evidence of the positive effects of green tea on oxidative stress, the form green tea is  
335 presented in, and consequently the preservation of phenolics compounds, has a role in the  
336 obtained results.

### 337 3.4 GREEN TEA, GLUCOSE METABOLISM AND INSULIN RESISTANCE

338           When blood glucose levels rise, the pancreas controls the resulting hyperglycemia by  
339 releasing insulin from the beta cells. Reduced levels of glucose result in reduced levels of  
340 insulin secretion and glycogenolysis reduction.<sup>89</sup>

341           Based on this process, the ability of green tea to control glucose in individuals with  
342 metabolic syndrome has been shown. Green tea phenolic constituents are able to stimulate  
343 pancreatic beta cells to increase post-prandial insulin, consequently improving pancreas  
344 action.<sup>90</sup>

345           Furthermore, *in vitro* studies have illustrated that EGCG acts by inhibiting the  
346 proliferation and differentiation of adipocytes and increasing glucose reception by the cells  
347 through AMPk activation (Figure 3). This mechanism is analogous to the one used by  
348 hypoglycemic drugs such as metformin.<sup>61, 91</sup>

349           Liu et al.<sup>15</sup> investigated these findings in a meta-analysis and found that the ingestion  
350 of green tea significantly reduced fasting glycemic levels and glycated hemoglobin (HbA1c).  
351 However, this reduction occurred in subjects at risk of metabolic syndrome, not in healthy  
352 subjects. This study also suggests that green tea polyphenols are able to increase adipocytes  
353 and skeletal muscle capacity to collect glucose through GLUT4 translocation. However, it is  
354 still not possible to calculate the exact dose of catechins to achieve a significant response.

355           Wu et al.<sup>92</sup> evaluated the effect of green tea supplementation on glucose tolerance and  
356 insulin sensitivity in rats for 12 weeks. The results demonstrated that the green tea  
357 supplemented group had lower concentrations of fasting glucose, insulin and triglycerides  
358 than the control group. In a meta-analysis with humans, Jing et al.<sup>93</sup> investigated the  
359 association between green tea consumption and the risk of developing T2DM. They observed  
360 that participants who ingested four or more cups of tea per day had a 20% lower risk of  
361 T2DM than participants who ingested less or none.

362           On the other hand, Hsu et al.<sup>61</sup> showed in regards to glycemic control in a randomized,  
363 double-blind study with obese participants who were supplemented for 12 weeks. The green  
364 tea group (1,200 mg/day) showed a reduction in body weight (0.15 kg), but there was no  
365 significant difference in the body weight, BMI reduction or glucose parameters compared to  
366 the placebo group.<sup>61</sup> These findings indicate the need for more research to determine if green  
367 tea catechins are capable of providing clinical benefit to obese, nondiabetic individuals.

368           An analysis of the studies indicates a positive effect of green tea on glycemic control.  
369 Nonetheless, the studies were performed with different samples and dosages. Moreover, some  
370 authors (Table 4) did not find significant results in supplemented obese subjects, while others  
371 only found significant results in subjects with a high risk of developing T2DM or in animals  
372 with T2DM.

373           Considering the diverse and sometimes controversial results among the studies that  
374 evaluated green tea action on glucose metabolism (Table 4), long term clinical trials are  
375 necessary to specifically evaluate the effects of green tea on glucose control and insulin  
376 sensitivity in diabetic and non-diabetic individuals. These sorts of trials would help determine  
377 the optimal timing for a prescription of green tea and the populations that would most benefit  
378 from its use.

## 379 GREEN TEA TOXICITY

380 Green tea catechins are broadly studied because of the association between their  
381 consumption and the protective effect on body composition, glycemia inflammatory and  
382 oxidative states. However, high doses (10 to 29 mg/kg/day) of green tea have been associated  
383 with hepatotoxicity due to increasing alanine aminotransferase (ALT) and bilirubin levels in  
384 humans.<sup>99</sup>

385 One study identified an increase in ALT and 85% reduction in life expectancy in rats  
386 that had been supplemented with 1,500 mg/kg of EGCG in a single dose per day. This  
387 elevation in ALT levels has also been identified in a different group of rats supplemented with  
388 two daily doses of 750 mg/kg of EGCG. An increase in lipid peroxidation and intra-hepatic  
389 oxidative stress was also observed in addition to an increase in IL-6 and monocyte  
390 chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the plasma.<sup>100</sup>

391 Mazzanti et al.<sup>100</sup> hypothesized that some of the findings related to the use of green tea  
392 may be associated with gender, as the majority of the cases showing hepatic changes due to  
393 increased levels of EGCG occurred in women. In contrast, a 12-week study with a high dose  
394 supplementation of green tea (856.8 mg/day of EGCG;  $\cong$  11.27 mg/kg of EGCG) in 115 obese  
395 women demonstrated significantly positive results in body composition and in LDL  
396 cholesterol with no reports of adverse or side effects.<sup>53</sup> A high dose of polyphenols from green  
397 tea (714 mg/day; mg/kg data not available in the article) for three weeks in overweight men  
398 did not improve biomarkers for cardiovascular disease or HDL, but was safe and had no  
399 reported adverse effects.<sup>101</sup> Therefore, the doses normally used in studies (208 to 900 mg of  
400 catechins) were not sufficient to result in toxicity.

401 Reports of toxicity in the literature are few despite the large number of published  
402 studies about green tea. Therefore, more studies on hepatic changes resulting from the use  
403 green tea supplements are needed, as supplements are associated with higher quantities of

404 polyphenols in the plasma and tissues compared to green tea infusions. It is important to note  
405 that the use of green tea as a therapeutic supplement should not be used indiscriminately or  
406 without medical guidance to minimize any potential adverse effects.

407

## 408 CONCLUSION

409           The ability of green tea polyphenols to mitigate inflammation and oxidative stress  
410 biomarkers related to insulin resistance in the presence of obesity has been reported in  
411 interventional studies in animals, humans and *in vitro*. It is believed that the benefits of green  
412 tea are related to its anti-inflammatory, antioxidant effects and to its impact on body fat  
413 reduction.

414           As there are some factors that are still not fully understood, this review can only  
415 tentatively state that green tea supplementation is effective in the treatment of obese patients  
416 with glycemic alterations as well as in preventing T2DM. In this review, we identified several  
417 issues regarding the use of green tea in the treatment of obesity that require further  
418 clarification. These issues include questions concerning the body composition of the target  
419 population and determining if abdominal adiposity influences the actions of green tea; the  
420 presentation form and green tea composition; a safe dosage that achieves beneficial  
421 antioxidant and anti-inflammatory effects in the prevention and treatment of insulin  
422 resistance; and the minimal intervention duration necessary to achieve positive results. Well-  
423 controlled studies with a longer duration and a greater number of subjects may further the  
424 understanding of the protective aspects of green tea supplementation in obese individuals.

425           While there is still no consensus regarding the effectiveness of green tea for all risk  
426 factors for T2DM, the action mechanisms of its active compounds were suggested in studies  
427 conducted mainly in animals, highlighting: an inhibition mechanism for catechol-O-  
428 methyltransferase, an increase in fatty acid oxidation, activation of AMPK and suppression of  
429 lipogenic enzymes. Therefore, despite the limitations of the presented studies, this review  
430 showed a strong trend toward the therapeutic potential of green tea and demonstrated its  
431 effects on oxidative stress and obesity.

432

433 **ACKNOWLEDGEMENTS**

434 Author contributions

435 M. A. F. developed the idea and manuscript structure for the review, undertook the literature  
436 search, and wrote the manuscript; D. M. S. developed the initial idea for the review,  
437 collaborated on the literature search and designed the illustrations; A. C. M. J. developed the  
438 manuscript structure and commented critically on the manuscript drafts; J. F. M. commented  
439 critically on the manuscript drafts; P. B. B. developed the initial idea for the review,  
440 developed the manuscript structure, co-supervised the literature search, commented critically  
441 on the manuscript drafts, and is corresponding author.

442 Funding and sponsorship

443 CAPES supported this work.

444 Declaration of interest

445 The authors declare no conflicts of interest.

446 **REFERENCES**

- 447 1. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines  
448 and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and  
449 nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2014;15:6184-6223.
- 450 2. Brown RE, Kuk JL. Consequences of obesity and weight loss: a devil's advocate  
451 position. *Obes Rev.* 2015;16:77-87
- 452 3. World Health organization. Global Health Risks: Mortality and Burden of Disease  
453 Attributable to Selected Major Risks. Geneva: WHO; 2009.
- 454 4. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, et al. Inflammation as a link between obesity,  
455 metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;105:141-150.
- 456 5. Shetty GK, Economides PA, Horton ES, et al. Circulating Adiponectin and Resistin  
457 Levels in Relation to Metabolic Factors, Inflammatory Markers, and Vascular Reactivity in  
458 Diabetic Patients and Subjects at Risk for Diabetes. *Diabetes Care.* 2004;27:2450–2457.
- 459 6. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance.  
460 *Gastroenterology.* 2007;132:2169-2180.
- 461 7. Hasnain SZ, Borg DJ, Harcourt BE, et al. Glycemic control in diabetes is restored by  
462 therapeutic manipulation of cytokines that regulate beta cell stress. *Nat Med.* 2014:1417-26.
- 463 8. Lazar MA. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science.* 2005;307:373-375.
- 464 9. Pérez-Matute P, Zulet MA, Martínez JA. Reactive species and diabetes: counteracting  
465 oxidative stress to improve health. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9:771-779.
- 466 10. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *J Am Diet Assoc.*  
467 2009;109:735-746.

- 468 11. Basu A, Betts NM, Mulugeta A, et al. Green tea supplementation increases glutathione  
469 and plasma antioxidant capacity in adults with the metabolic syndrome. *Nutr Res.*  
470 2013;33:180-187.
- 471 12. Bogdanski P, Suliburska J, Szulinska M, et al. Green tea extract reduces blood  
472 pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated  
473 with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutr Res.* 2012;32:421-427.
- 474 13. Onakpoya I, Spencer E, Heneghan C, et al. The effect of green tea on blood pressure  
475 and lipid profile: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Nutr*  
476 *Metab Cardiovasc Dis.* 2014;24:823-836.
- 477 14. Kim HS, Quon MJ, Kim JA. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond  
478 antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate.  
479 *Redox Biol.* 2014;2:187-195.
- 480 15. Liu K, Zhou R, Wang B, et al. Effect of green tea on glucose control and insulin  
481 sensitivity: a meta-analysis of 17 randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2013;98:340-  
482 348.
- 483 16. Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev*  
484 *Med.* 1992;21:334-350.
- 485 17. Rains TM, Agarwal S, Maki KC. Antiobesity effects of green tea catechins: a  
486 mechanistic review. *J Nutr Biochem.* 2011;22:1-7.
- 487 18. Abdel-Rahman A, Anyangwe N, Carlacci L, et al. The safety and regulation of natural  
488 products used as foods and food ingredients. *Toxicol Sci.* 2011;123:333-348.
- 489 19. Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Tea flavonoids: their functions, utilisation and  
490 analysis. *Trends Food Sci Tech.* 2000;11:152-160.

- 491 20. Thielecke F, Boschmann M. The potential role of green tea catechins in the prevention  
492 of the metabolic syndrome - a review. *Phytochemistry*. 2009;70:11-24.
- 493 21. Yang CS, Ju J, Lu G, et al. Cancer prevention by tea and tea polyphenols. *Asia Pacific*  
494 *J Clin Nutr*. 2008;17:245-248.
- 495 22. Chu DC, Juneja LR. General composition of green tea and its infusion. In T.  
496 Yamamoto, L. R. Juneja, D.-C. Chu and M. Kim (Eds). *Chemistry and applications of green*  
497 *tea*, p. 13-22. Boca Raton: CRC Press. 1997.
- 498 23. Zheng XX, Xu YL, Li SH, et al. Effects of green tea catechins with or without caffeine  
499 on glycemic control in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin*  
500 *Nutr*. 2013;97:750-762.
- 501 24. Wang H, Wen Y, Du Y, et al. Effects of catechin enriched green tea on body  
502 composition. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18:773-779.
- 503 25. Senanayake N. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food  
504 applications – A review. *J Funct Foods*. 2013;5:1529-1541.
- 505 26. Scoparo CT, de Souza LM, Dartora N, et al. Analysis of *Camellia sinensis* green and  
506 black teas via ultra high performance liquid chromatography assisted by liquid-liquid partition  
507 and two-dimensional liquid chromatography (size exclusion × reversed phase). *J Chromatogr*  
508 *A*. 2012;1222:29-37.
- 509 27. Mckay DL, Blumberg JB. The Role of Tea in Human Health: An Update. *J Am Coll*  
510 *Nutr*. 2002;21:1–13.
- 511 28. Henning SM, Niu Y, Lee NH, et al. Bioavailability and antioxidant activity of tea  
512 flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *Am J*  
513 *Clin Nutr*. 2004;80:1558-1564.

- 514 29. Chanchal D, Swarnlata S. Novel approaches in herbal cosmetics. *J Cosmet Dermatol.*  
515 2008;7:89–95.
- 516 30. Cortés-Rojas DF, Souza CRF, Oliveira WP. Encapsulation of eugenol rich clove  
517 extract in solid lipid carriers. *J Food Eng.* 2014;127:34-42.
- 518 31. Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, et al. Phenolic-compound-  
519 extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules.* 2010;15:8813-8826.
- 520 32. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic  
521 compounds. *Molecules.* 2013;18:2328-2375.
- 522 33. Nkhili E, Tomao V, El Hajji H, et al. Microwave-assisted water extraction of green tea  
523 polyphenols. *Phytochem Anal.* 2009;20:408-415.
- 524 34. Perva-Uzunalić A, Škerget M, Knez Z, et al. Extraction of active ingredients from  
525 green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food*  
526 *Chem.* 2006;96:597-605.
- 527 35. Kim YD, Park KG, Lee YS, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through  
528 AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP.  
529 *Diabetes.* 2008;57:306-314.
- 530 36. Auvichayapat P, Prapochanung M, Tunkamnerdthai O, et al. Effectiveness of green  
531 tea on weight reduction in obese Thais: A randomized, controlled trial. *Physiol Behav.*  
532 2008;93:486-491.
- 533 37. Moon HS, Lee HG, Choi YJ, et al. Proposed mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-  
534 gallate for anti-obesity. *Chem Biol Interact.* 2007;167:85-98.

- 535 38. Phung OJ, Baker WL, Matthews LJ, et al. Effect of green tea catechins with or without  
536 caffeine on anthropometric measures: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.*  
537 2010;91:73-81.
- 538 39. Chen D, Wang CY, Lambert JD, et al. Inhibition of human liver catechol-O-  
539 methyltransferase by tea catechins and their metabolites: structure-activity relationship and  
540 molecular-modeling studies. *Biochem Pharmacol.* 2005;69:1523-1531.
- 541 40. Collins S, Yehuda-Shnaidman E, Wang H. Positive and negative control of Ucp1 gene  
542 transcription and the role of  $\beta$ -adrenergic signaling networks. *Int J Obes (Lond).* 2010;34:28-  
543 33.
- 544 41. Qian SW, Tang Y, Li X, et al. BMP4-mediated brown fat-like changes in white  
545 adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA.*  
546 2013;110:E798-807.
- 547 42. Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, et al. Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol.*  
548 2013;92:229-236.
- 549 43. Klaus S, Pültz S, Thöne-Reineke C, et al. Epigallocatechin gallate attenuates diet-  
550 induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int J*  
551 *Obes (Lond).* 2005;29:615-623.
- 552 44. Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, et al. Epigallocatechin gallate, a constituent of  
553 green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem.* 2002;277:34933-34940.
- 554 45. Li T, Liu J, Zhang X, et al. Antidiabetic activity of lipophilic (-)-epigallocatechin-3-  
555 gallate derivative under its role of alpha-glucosidase inhibition. *Biomed Pharmacother.*  
556 2007;61:91-96.

- 557 46. Hursel R, Viechtbauer W, Westerterp-Plantenga MS. The effects of green tea on  
558 weight loss and weight maintenance: a meta-analysis. *Int J Obes (Lond)*. 2009;33:956-961.
- 559 47. Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L, et al. Green tea and thermogenesis: interactions  
560 between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int J Obes Relat Metab*  
561 *Disord*. 2000;24:252-258.
- 562 48. Richard D, Kefi K, Barbe U, et al. Weight and plasma lipid control by decaffeinated  
563 green tea. *Pharmacol Res*. 2009;59:351-354.
- 564 49. Santana A, Santamarina A, Souza G, et al. Decaffeinated green tea extract rich in  
565 epigallocatechin-3-gallate improves insulin resistance and metabolic profiles in normolipidic  
566 diet-but not high-fat diet-fed mice. *J Nutr Biochem*. 2015;26:893-902.
- 567 50. Ihm SH, Jang SW, Kim OR, et al. Decaffeinated green tea extract improves hypertension  
568 and insulin resistance in a rat model of metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2012;224:377-  
569 383.
- 570 51. Sae-Tan S, Rogers CJ, Lambert JD. Decaffeinated Green Tea and Voluntary Exercise  
571 Induce Gene Changes Related to Beige Adipocyte Formation in High Fat-Fed Obese Mice. *J*  
572 *Funct Foods*. 2015;14:210-214.
- 573 52. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the  
574 new brown? *Genes Dev*. 2013;27:234-250.
- 575 53. Chen IJ, Liu CY, Chiu JP, et al. Therapeutic effect of high-dose green tea extract on  
576 weight reduction: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clin Nutr*.  
577 2015;S0261-S5614:1-8.

- 578 54. Baladia E.; Basulto J, Manera M, et al. Efecto del consumo de té verde o extractos de  
579 té verde en el peso y en la composición corporal; revisión sistemática y meta análisis. *Nutr*  
580 *Hosp.* 2014;29:479-490.
- 581 55. Janssens PL, Hursel R, Westerterp-Plantenga MS. Long-term green tea extract  
582 supplementation does not affect fat absorption, resting energy expenditure, and body  
583 composition in adults. *J Nutr.* 2015;145:864-870.
- 584 56. Wulan SN, Westerterp KR, Plasqui G. Ethnic differences in body composition and the  
585 associated metabolic profile: a comparative study between Asians and Caucasians. *Maturitas.*  
586 2010;65:315-319.
- 587 57. Zhang Y, Yu Y, Li X, et al. Effects of catechin-enriched green tea beverage on  
588 visceral fat loss in adults with a high proportion of visceral fat: A double-blind, placebo-  
589 controlled, randomized trial. *J Funct Foods.* 2012;4:315-322.
- 590 58. Shen CL, Cao JJ, Dagda RY, et al. Green tea polyphenols benefits body composition  
591 and improves bone quality in long-term high-fat diet-induced obese rats. *Nutr Res.*  
592 2012;32:448-457.
- 593 59. Kovacs EM, Lejeune MP, Nijs I, et al. Effects of green tea on weight maintenance  
594 after body-weight loss. *Br J Nutr.* 2004;91:431-437.
- 595 60. Nagao T, Hase T, Tokimitsu I. A green tea extract high in catechins reduces body fat  
596 and cardiovascular risks in humans. *Obesity (Silver Spring).* 2007;15:1473-1483.
- 597 61. Hsu CH, Tsai TH, Kao YH, et al. Effect of green tea extract on obese women: a  
598 randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clin Nutr.* 2008;27:363-370.
- 599 62. Ravindranath NH, Ravindranath MH. Green tea catechins suppress NF-kB-mediated  
600 inflammatory responses: relevance to nutritional management of inflammation. *Br J Nutr.*  
601 2011;105:1715–1717.

- 602 63. Yang F, Oz HS, Barve S. The Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate  
603 Blocks Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation by Inhibiting I $\kappa$ B Kinase Activity in the Intestinal  
604 Epithelial Cell Line IEC-6. *Mol Pharmacol*. 2001;60:528–533.
- 605 64. Nam NH. Naturally occurring NF- $\kappa$ B inhibitors. *Mini Rev Med Chem*.  
606 2006;6:945-951.
- 607 65. Cunha CA, Lira FS, Rosa Neto JC, et al. Green tea extract supplementation induces  
608 the lipolytic pathway, attenuates obesity, and reduces low-grade inflammation in mice fed a  
609 high-fat diet. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:635470.
- 610 66. Abeywardena MY, Leifert WR, Warnes KE, et al. Cardiovascular biology of  
611 interleukin-6. *Curr Pharm Des*. 2009;15:1809-1821.
- 612 67. Basu A, Du M, Sanchez K, et al. Green tea minimally affects biomarkers of  
613 inflammation in obese subjects with metabolic syndrome. *Nutrition*. 2011;27:206-213.
- 614 68. Okuda MH, Zemdegs JC, de Santana AA, et al. Green tea extract improves high fat  
615 diet-induced hypothalamic inflammation, without affecting the serotonergic system. *J Nutr*  
616 *Biochem*. 2014;25:1084-1089.
- 617 69. Serban C, Sahebkar A, Antal D, et al. Effects of supplementation with green tea  
618 catechins on plasma C-reactive protein concentrations: A systematic review and meta-analysis  
619 of randomized controlled trials. *Nutrition*. 2015;31:1061-1071.
- 620 70. Tian C, Ye X, Zhang R, et al. Green tea polyphenols reduced fat deposits in high fat-  
621 fed rats via erk1/2-PPAR $\gamma$ -adiponectin pathway. *PLoS One*. 2013;8:e53796.
- 622 71. Liu HS, Chen YH, Hung PF, et al. Inhibitory effect of green tea (-)-epigallocatechin  
623 gallate on resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes depends on the ERK pathway. *Am J*  
624 *Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290:273-281.

- 625 72. Stepan CM, Wang J, Whiteman EL, et al. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell*  
626 *Biol.* 2005;25:1569-1575.
- 627 73. Hasumura T, Shimada Y, Kuroyanagi J, et al. Green tea extract suppresses adiposity  
628 and affects the expression of lipid metabolism genes in diet-induced obese zebrafish. *Nutr*  
629 *Metab (Lond).* 2012;9:73.
- 630 74. Sone T, Kuriyama S, Nakaya N, et al. Randomized controlled trial for an effect of  
631 catechin-enriched green tea consumption on adiponectin and cardiovascular disease risk  
632 factors. *Food Nutr Res.* 2011;55:8326.
- 633 75. Morris CD, Carson S. Routine vitamin supplementation to prevent cardiovascular  
634 disease: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern*  
635 *Med.* 2003;139:56-70.
- 636 76. Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad MC, et al. Polyphenols and glutathione synthesis  
637 regulation. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:277S-283S.
- 638 77. Carloni P, Tiano L, Padella L, et al. Antioxidant activity of white, green and black tea  
639 obtained from the same tea cultivar. *Food Res Int.* 2003;53:900–908.
- 640 78. Velayutham P, Babu A, Liu D. Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An  
641 Update. *Curr Med Chem.* 2008;15:1840–1850.
- 642 79. Tsai CF, Hsu YW, Ting HC, et al. The in vivo antioxidant and antifibrotic properties  
643 of green tea (*Camellia sinensis*, Theaceae). *Food Chem.* 2013;136:1337-1344.
- 644 80. Ho CK, Siu-wai C, Siu PM, et al. Genoprotection and genotoxicity of green tea  
645 (*Camellia sinensis*): Are they two sides of the same redox coin? *Redox Rep.* 2013;18:150-  
646 154.

- 647 81. Del rio D, Calani L, Scazzina F, et al. Bioavailability of catechins from ready-to-drink  
648 tea. *Nutrition*. 2010;26(5):528-533.
- 649 82. Murakami M, Yamaguchi T, Takamura H, et al. Effects of Ascorbic Acid and  $\alpha$ -  
650 Tocopherol on Antioxidant Activity of Polyphenolic Compounds. *J Food Sci*. 2003;68:1622-  
651 1625.
- 652 83. Serafini M, Laranjinha JA, Almeida LM, et al. Inhibition of human LDL lipid  
653 peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity  
654 in humans. *J Nutr Biochem*. 2000;11:585-590.
- 655 84. Ellinger S, Müller N, Stehle P, et al. Consumption of green tea or green tea products:  
656 is there an evidence for antioxidant effects from controlled interventional studies?  
657 *Phytomedicine*. 2011;18:903-915.
- 658 85. Li Q, Zhao H, Zhao M, et al. Chronic green tea catechins administration prevents  
659 oxidative stress-related brain aging in C57BL/6J mice. *Brain Res*. 2010;1353:28-35.
- 660 86. Yan J, Zhao Y, Suo S, et al. Green tea catechins ameliorate adipose insulin resistance  
661 by improving oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2012;52:1648-1657.
- 662 87. Newsome BJ, Petriello MC, Han SG, et al. Green tea diet decreases PCB 126-induced  
663 oxidative stress in mice by up-regulating antioxidant enzymes. *J Nutr Biochem*. 2014;25:126-  
664 135.
- 665 88. Camargo A, Daguer D, Barbosa DS. Green tea exerts antioxidant action in vitro and  
666 its consumption increases total serum antioxidant potential in normal and dyslipidemic  
667 subjects. *Nutr Res*. 2006;26:626-631.

- 668 89. Bryans JA, Judd PA, Ellis PR. The effect of consuming instant black tea on  
669 postprandial plasma glucose and insulin concentrations in healthy humans. *J Am Coll Nutr.*  
670 2007;26:471-477.
- 671 90. Sundaram R, Naresh R, Shanthi P, et al. Modulatory effect of green tea extract on  
672 hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin and high fat diet induced  
673 diabetic rats. *Phytomedicine.* 2013;20:577-584.
- 674 91. Banerjee S, Ghoshal S, Porter TD. Phosphorylation of hepatic AMP-activated protein  
675 kinase and liver kinase B1 is increased after a single oral dose of green tea extract to mice.  
676 *Nutr Res.* 2012;32:985-990.
- 677 92. Wu LY, Juan CC, Ho LT, et al. Effect of green tea supplementation on insulin  
678 sensitivity in Sprague-Dawley rats. *J Agric Food Chem.* 2004;52:643-648.
- 679 93. Jing Y, Han G, Hu Y, et al. Tea consumption and risk of type 2 diabetes: a meta-  
680 analysis of cohort studies. *J Gen Intern Med.* 2009;24:557-562.
- 681 94. Gan L, Meng ZJ, Xiong RB, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate  
682 ameliorates insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease mice. *Acta Pharmacol Sin.*  
683 2015;36:597-605.
- 684 95. Fukino Y, Shimbo M, Aoki N, et al. Randomized controlled trial for an effect of green  
685 tea consumption on insulin resistance and inflammation markers. *J Nutr Sci Vitaminol*  
686 (Tokyo). 2005;51:335-342.
- 687 96. Hill AM, Coates AM, Buckley JD, et al. Can EGCG reduce abdominal fat in obese  
688 subjects? *J Am Coll Nutr.* 2007;26:396S-402S.
- 689 97. Brown AL, Lane J, Coverly J, Stocks J, Jackson S, Stephen A, Bluck L, Coward A,  
690 Hendrickx H. Effects of dietary supplementation with the green tea polyphenol

- 691 epigallocatechin-3-gallate on insulin resistance and associated metabolic risk factors:  
692 randomized controlled trial. *Br J Nutr.* 2009;101:886-894
- 693 98. Suliburska J, Bogdanski P, Szulinska M, et al. Effects of green tea supplementation on  
694 elements, total antioxidants, lipids, and glucose values in the serum of obese patients. *Biol*  
695 *Trace Elem Res.* 2012;149:315-322.
- 696 99. Mazzanti G, Menniti-Ippolito F, Moro PA, et al. Hepatotoxicity from green tea: a  
697 review of the literature and two unpublished cases. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009;65:331-341.
- 698 100. Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea  
699 polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys.* 2010;501:65-72.
- 700 101. Frank J, George TW, Logde JK. Daily consumption of an aqueous green tea extract  
701 supplement does not impair liver function or alter cardiovascular disease risk biomarkers in  
702 healthy men. *J Nutr.* 2009;139:58-62.

703 **Table 1.** Experimental studies evaluating the effects of green tea on body composition

References	Type of study	Population	Dosage	Length of study	Main results
<i>Animal studies</i>					
Shen et al. (2012) <sup>58</sup>	Randomized	36 rats (3 mo old)	GT1: 464 mg EGCG/1000 mg GTE (0.5% of HF) PG: distilled water	16 wks	GT1: ↓Fat mass, leptin and proinflammatory cytokines
Santana et al. (2015) <sup>49</sup>	Randomized	26 mice (1 mo old)	GT1: 50 mg EGCG /kg/day + HFD GT2: 50 mg EGCG /kg/day + CD DG: water + HFD PG: water + CD	8 wks	GT1: gained less BW compared to DG GT2: ↓ 16% BW vs. Pg
<i>Human studies</i>					
Kovacset al. (2004) <sup>59</sup>	Randomized double-blind	104 healthy subjects BMI 25 a 35 kg/m <sup>2</sup>	GT1: 450 mg of GTE (323 mg of EGCG + 104 mg of caffeine) PG: n.r.	4 wks	No significant differences between groups
Nagao et al. (2007) <sup>60</sup>	Randomized double-blind	240 healthy subjects BMI 24 to 30 kg/m <sup>2</sup>	GT1: 582.8 mg of catechins and 72.3 mg of caffeine/day CG: 96.3 mg catechins and 75 mg of caffeine/day	12 wks	GT1: BW, BMI, % BF, fat mass, LDL cholesterol and systolic blood pressure attenuated
Auvichayapatet al. (2008) <sup>36</sup>	Randomized	60 subjects BMI > 25 kg/m <sup>2</sup>	GT1: 750 mg of GTE PG: cellulose	12 wks	GT1: ↓3.3 kg BW and leptin levels
Hsu et al. (2008) <sup>61</sup>	Randomized double-blind	68 women BMI > 27 kg/m <sup>2</sup>	GT1: 1200 mg of GTE (7 mg of caffeine + 96 mg of catechins) PG: cellulose	12 wks	GT1: ↓BW and %BF
Wang et al. (2010) <sup>24</sup>	Randomized placebo-controlled	182 moderately overweight subjects	GT1: 458 mg catechins + 104 mg caffeine GT2: 468 mg catechins + 126 mg caffeine GT3: 88 mg catechins + 198 mg caffeine PG: 30 mg catechins+ 10 mg caffeine	12 wks	GT1: ↓ 0.6% in %BF GT2: ↓0.7 kg in total body fat GT3: ↓ 5.6 cm <sup>2</sup> of intra-abdominal fat area, 1.9 cm of WC and 1.2 kg of BW
Zhang et al. (2012) <sup>57</sup>	Randomized double-blind	104 subjects BMI ≥ 40 kg/m <sup>2</sup>	GT1: 609.3 mg of GTE catechins + 68.mg of caffeine PG: 86.2 mg of GTE catechins + 40.4 mg of caffeine	12 wks	GT1: ↓visceral fat
Janssens et al. (2015) <sup>55</sup>	Randomized placebo-controlled	60 subjects	G1: >560 mg/day of EGCG + 280–450 mg/day of caffeine	12 wks	No significant differences between groups

Chen et al. (2015) <sup>53</sup>	Randomized double-blind	115 women	PG: n.r. GT1: 1500 mg of DGTE/day (857 mg EGCG) PG: cellulose	12 wks	GT1: ↓BW, BMI and WC
-------------------------------------	-------------------------	-----------	--	--------	----------------------

704 ↓: decreased; GTE: green tea extract; DGTE: decaffeinated green tea extract; EGCG: epigallocatechin-3-gallate; GT1: green tea extract group (dose 1); GT2: green tea extract  
705 group (dose 2); GT3: green tea extract group (dose 3); PG: Placebo Group; n.r.: not reported; DG: group treated by diet; BF: body fat; BMI: Body Mass Index; BW: Body  
706 weight; WC: waist circumference; wks: weeks; HFD: High Fat Diet; CD: Control Diet.

707 **Table 2.** Experimental studies evaluating the effects of green tea on inflammatory state

References	Type of study	Population	Dosage	Length of study	Main results
<i>Animal studies</i>					
Cunha et al. (2013) <sup>65</sup>	Randomized	24 male rats (8 weeks old)	GT1: 400 mg GTE/kg/day PG: water	8 wks	GT1: ↓ TNF- $\alpha$ , TLR4, MyD88 and TRAF6
Tian et al. (2013) <sup>70</sup>	Randomized	30 Wistar rats	GT1: 800 mg GTE/L water GT2: 1.600 mg GTE/L water GT3: 3.200 mg GTE/L water PG: water	26 wks	All groups supplemented with GTE prevented fat rich induced diet obesity through the regulation of adiponectin levels
Okuda et al. (2014) <sup>68</sup>	Semi-randomized	Swiss male rat (4 weeks old)	GT1: 4% soy oil + GTE (50 mg/kg/day) PG: 4% soy oil GT2: 4% Soy oil + 31.2% lard + GTE (50 mg/kg/day) PG2: 4% soy oil + 31.2% lard	8 wks	GT2: regulated TLR4, I $\kappa$ B- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B e IL-6 levels
<i>Human studies</i>					
Basu et al. (2011) <sup>67</sup>	Randomized blind	single 35 obese subjects	GT1: 110 mg of EGCG GI1: 230 mg of EGCG PG: water	8 wks	No significant differences on inflammatory biomarkers or adiponectin
Sone et al. (2011) <sup>74</sup>	Randomized	51 apparently healthy subjects	GT1: 400 mg/day GT2: 100 mg/day		No significant differences in the adiponectin levels
Bogdanski et al. (2012) <sup>12</sup>	Randomized double blind	56 subjects BMI > 30kg/m <sup>2</sup>	GT1: 379 mg of GTE (208 mg of EGCG) PG: cellulose	12 wks	GT1: ↓TNF- $\alpha$ and PCR levels vs. PG

708 ↓: decreased; GTE: green tea extract; EGCG: epigallocatechin-3-gallate; GT1: green tea extract group (dose 1); GI1: Green tea infusion (dose 1); GT2: green tea extract group  
709 (dose 2); GT3: green tea extract group (dose 3) PG: Placebo Group; n.r.: not shown in the paper; TNF- $\alpha$ : Tumoral Necrosis Factor, TLR4: Toll like receptor-4, MyD88:  
710 adapter molecule myeloid differentiation factor 88; TRAF6: TNF receptor-associated factor 6; wks: weeks.  
711

712 **Table3.** Experimental studies evaluating green tea and its antioxidant effects

References	Type of study	Population	Dosage	Length of study	Main results
<i>Animal studies</i>					
Li et al. (2010) <sup>85</sup>	Randomized	C57BL/6J mice (14 mo old)	GT1: 80 mg GT/kg/day PG: water	8 wks	GT1: ↓ the activation of NF-kB and prevented the decrease in total SOD and GPx activities
Yan et al. (2012) <sup>86</sup>	Randomized	Obese KK-ay mice (8 wks old)	GT1: 20 mg GTE/kg/day-fed+chow diet (50% EGCG) GT2: 20 mg GTE/kg/day-fed HFD (50% EGCG) DG: Vehicle-fed+HFD group PG: Vehicle-fed	4 wks	GTE improved adipose insulin resistance and ROS scavenging functions
Tsai et al. (2013) <sup>79</sup>	Randomized	Male ICR mice	GT1: 125 mg/kg GT2: 625 mg/kg GT3: 1.250 mg/kg PG: water PG: control diet (10% kcal as fat) + vehicle	8 wks	GT1: ↑ the activities of CAT, GPX and GPr in the liver and ↓ TBARS levels
Newsome et al. (2014) <sup>87</sup>	Randomized	40 C57BL/6 mice (8 wks of age)	GT1: control diet + 1% GTE + vehicle DG: control+PCB 126 GT2: control+1% GTE+PCB 126	12 wks	GT2: ↑ mRNA of SO, GSr, NQO1 and GST
<i>Human studies</i>					
Henning et al. (2004) <sup>28</sup>	Randomized crossover	30 healthy subjects	GT1: 386.5 mg catechins/day GI1: 679 mg catechins/day BT: 496.5 mg catechins/day PG: 45 mL of milk	3 wks (3 x 3)	GT1: ↑ plasma antioxidant activity and flavonoid absorption was more efficient
Camargo et al. (2006) <sup>88</sup>	Randomized	68 individuals	GI1: 600 mg GT/day to hypercholesterolemic subjects PG: 600 mg GT/day to normolipidemic individuals	4 wks	GI1 and PG: ↑ increased the total serum antioxidant potential
Basu et al. (2013) <sup>11</sup>	Randomized Single-blinded	35 adults with at least 3 features of the MS*	GI1: 4 cups GT/day (440 mg EGCG + 9 mg caffeine) GT1: 2 capsules + 4 cups water/day (460 mg EGCG + 3,6 mg caffeine)	8 wks	GI1 and GT1: ↑ plasma antioxidant capacity and whole blood glutathione vs. PG. No changes in carotenoids,

PG: 4 cups water/day

tocopherols or in the GPX and  
CAT activities

---

713 ↑: increased; ↓: decreased; GTE: green tea extract; EGCG: epigallocatechin-3-gallate; GT1: green tea extract group (dose 1); GI1: Green tea infusion (dose 1); GT2: green tea  
714 extract group (dose 2); GT3: green tea extract group (dose 3); PG: Placebo Group; BT: black tea; DG: group treated by diet; n.r.: not shown in the paper; MS: Metabolic  
715 Syndrome; SOD: superoxide dismutase; GPx: glutathione peroxidase; NFkB: nuclear factor-kappa B; ROS: reactive oxidative specie; CAT: catalase; TBARS: Thiobarbituric  
716 Acid-Reactive Substances; GPr: glutathione reductase  
717

718 **Table4.** Experimental studies evaluating green tea effects on glucose metabolism and action on glycemic changes

References	Type of study	Population	Dosage	Length of study	Main results
<i>Animal studies</i>					
Wu et al. (2004) <sup>92</sup>	Randomized	Male Sprague-Dawley rats	GT1: 500 mg GTE/day PG: water	12 wks	GT1: ↓ fasting glucose and insulin levels vs. PG
Ihm et al. (2012) <sup>50</sup>	Randomized	20 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats	GT1: 25 mg Decaffeinated-GTE/kg/day PG: saline water	16 wks	GT1: ↓fasting/postprandial 2h glucose and insulin levels
Gan et al. (2015) <sup>94</sup>	Randomized	Mice	GT1: 10 mg EGCG/kg/day GT2: 20 mg EGCG/kg/day GT3: 40 mg EGCG/kg/day PG: n. r.	4wks	EGCG dose-dependently improves insulin resistance in mice not only by ↓BW but also through ↑ insulin clearance by hepatic insulin-degrading enzyme
Santana et al. (2015) <sup>49</sup>	Randomized	26 Swiss mice (30 days age)	GI1: 50 mg EGCG /kg/day PG: water	24 wks	GI1: ↓ 16% of BW and 32% of TG levels vs. PG, and ↑ AMPK and hormone-sensitive lipase phosphorylation and ↓TNF-α levels
<i>Human studies</i>					
Fukino et al. (2005) <sup>95</sup>	Randomized	66 obese	GT1: 747 mg catechins/day PG: 469 mg catechins/day	8 wks	No significant differences between groups
Hill et al. (2007) <sup>96</sup>	Randomized	38 overweight and obese	GT1: 300 mg EGCG/day* PG: lactose	12 wks	GT1: ↓ glucose in subjects with impaired glucose tolerance
Hsu et al. (2008) <sup>61</sup>	Randomized double-blind	78 obese women	GT1: 378 mg EGCG/day PG: cellulose	12 wks	GT1: ↓LDL and TG and ↑ in HDL, but no positive results in fasting glucose
Brown et al. (2009) <sup>97</sup>	Randomized	88 overweight or obese male subjects	GT1: 800 mg of EGCG/day PG: Lactose	8 wks	No effect on insulin sensitivity, insulin secretion or glucose tolerance or other metabolic risk factors
Suliburska et al. (2012) <sup>98</sup>	Randomized double blind	46 obese	GT1: 208 mg EGCG/day PG: cellulose	12 wks	GT1: ↓glucose levels and ↑ HDL

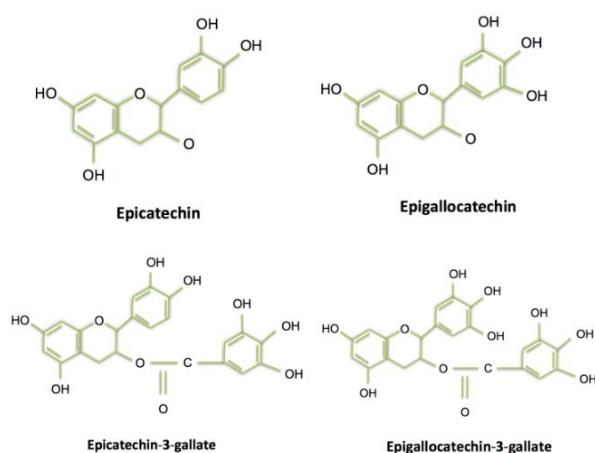
719 \*Decaffeinated green tea extract

720 ↑: increased; ↓: decreased; GTE: green tea extract; EGCG: epigallocatechin-3-gallate; GT1: green tea extract group (dose 1); GT2: green tea extract group (dose 2); GT3: green tea extract group (dose 3); PG: Placebo Group; EGCG: epigallocatechin-3-gallate; LDL: low density lipoprotein; TG: triglycerides; NADPH: nicotinamide adenine

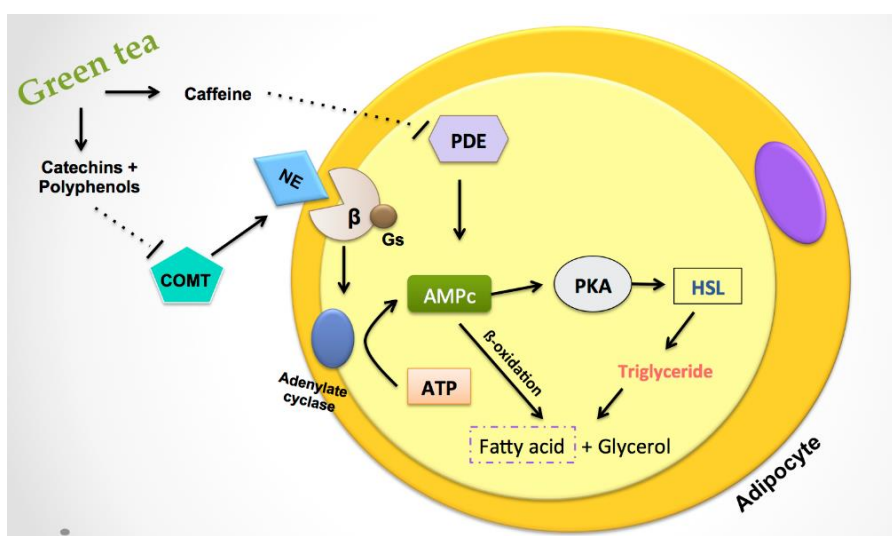
721

722 dinucleotide phosphate-oxidase; eNOS: Endothelial Nitric Oxide Synthase; BW: Body Weight; TG: triglycerides; AMPK: AMP-activated protein kinase; TNF- $\alpha$ : Tumor  
723 Necrosis Factor  $\alpha$ ; wks: weeks.

## Figure legends



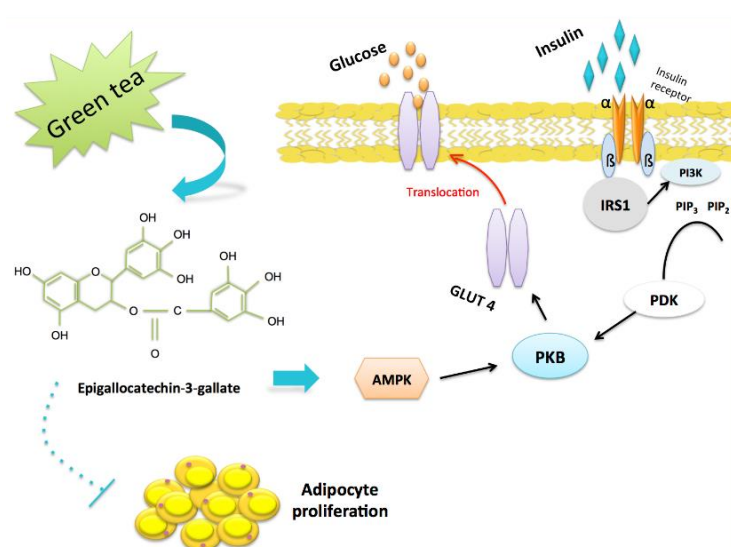
**Figure 1.**The most abundant catechins in *Camellia sinensis*



**Figure 2.**Polyphenols, caffeine and stimulation of the lipolytic route. The catechins and polyphenols present in green tea can inhibit COMT, an enzyme that degrades NA. The inhibition of COMT promotes an increase in the effects of noradrenalin. In turn, NA binds to the  $\beta$ -adrenoreceptor, which stimulates adenylatecyclase when activated. Adenylatecyclase is an enzyme that is responsible for converting ATP into AMPc that activates PKA, which stimulates the HSL. In the adipocytes, HSL degrades triglycerides into fatty acids and glycerol. The PDE degrades AMPc and inhibits lipolysis. In this sense, caffeine, another

compound present in green tea, acts as an inhibitor of PDE, thus intensifying PKA function and activating the lipolytic route.

*Abbreviations:* COMT, catechol-O-methyltransferase; NA, noradrenalin; ATP, adenosine triphosphate; AMPc, cyclic adenosine monophosphate; PKA, protein kinase; HSL, hormone-sensitive lipase; PDE, enzyme phosphodiesterase.



**Figure 3. Mechanism of epigallocatechin-3-gallate action on glucose and adipocyte metabolism.** Epigallocatechin-3-gallate, the most abundant catechin in green tea, inhibits adipocyte proliferation and differentiation and increases glucose uptake by the cells through the activation of AMPK, which in turn activates PKB and promotes the translocation of GLUT4 to the plasmatic membrane.

*Abbreviations:* AMPK, protein kinase by AMP; PKB, protein kinase B; GLUT4, glucose transporter 4.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, as políticas de saúde pública têm dado ênfase no aspecto preventivo, principalmente em relação à obesidade e suas comorbidades, incentivando as pessoas a buscarem na alimentação, incluindo os fitoterápicos, a melhora da qualidade de vida.

Já é bem estabelecida a estreita relação entre obesidade, pré-diabetes e risco aumentado para DM2 e doenças cardiovasculares. A obesidade, além de aumentar a resposta pró-inflamatória, contribui também para o aumento do estresse oxidativo, criando um ambiente favorável à oxidação de LDL-c, ao aumento de TG e à resistência a ação da insulina. Essa foi a ideia que despertou o interesse pelo tema abordado nessa dissertação e que estimulou essa equipe de pesquisa a investigar como o chá verde, um fitoterápico natural, poderia se comportar na presença ou na ausência da metformina em relação aos fatores de risco para DM2. Ressaltamos que esse estudo se trata de uma investigação inédita sobre os efeitos desses compostos em indivíduos obesos sem DM2.

Por meio desse estudo, verificamos que o chá verde apresentou efeito superior ao da metformina no controle da glicemia e da LDL-c; e sinérgico em relação à composição corporal, podendo ser uma alternativa viável para o controle de alguns fatores de risco importantes para o desenvolvimento de DM2.

Estes resultados nos estimulam a continuar as investigações acerca do efeito do chá verde sobre outros marcadores metabólicos, como o metabolismo de ácidos graxos, estado inflamatório e estresse oxidativo.

No entanto, é importante que novas pesquisas sejam realizadas com amostras maiores por um período mais longo de tratamento e em ambos os sexos. Acreditamos que com tratamentos mais longos seria possível verificar mudanças mais expressivas na composição corporal. É importante também que se realize estudos que avaliem qual a dose-resposta para se obter resultados relevantes nos fatores de risco para o desenvolvimento de DM2.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A – Padronização das informações dadas aos voluntários durante o recrutamento (*Sreening*)

### Recrutamento de voluntários

Objetivo: Recrutar voluntários obesos para a pesquisa sobre os efeitos do chá verde e metformina.

Meta: 200 pacientes obesos para assegurar o tamanho amostral pretendido (140).

Abordagem: A idéia do recrutamento deve abordar uma linguagem de fácil entendimento e que esclareça o que será realizado durante a pesquisa.

"Bom dia/Boa tarde,

Meu nome é ....., sou estudante do curso de nutrição da UFG. Estamos com um projeto muito interessante sobre chá verde. Sabemos que o chá verde é muito conhecido e consumido no mundo todo, porém muitas pessoas o ingerem e não sabem o quanto ele faz bem a saúde. Ele auxilia na perda e no controle do peso, pode combater e controlar as altas taxas de açúcar e gordura no sangue. Por isso estamos desenvolvendo este trabalho, para descobrirmos mais sobre o chá verde e seus efeitos no nosso organismo. Precisamos de pessoas para participar dessa pesquisa. Com essa pesquisa conheceremos melhor os efeitos do chá verde na saúde e isso possibilitará tratar melhor as pessoas com excesso de peso e complicações na saúde. A pesquisa tem duração de 3 meses e teremos apenas 3 encontros para avaliação nutricional e para a realização de exames que nos permita conhecer como o seu organismo está reagindo às cápsulas. Nossos encontros serão na segunda quinzena de agosto, na segunda quinzena de setembro, na segunda quinzena de setembro e no começo de dezembro em datas e horários que fiquem melhor para você. Disponibilizaremos resultados do acompanhamento para você, forneceremos um lanche delicioso a cada encontro e alguns brindes que te ajude a ter uma vida mais saudável. Mas para ajudarmos as pessoas com nossos resultados, precisamos da sua participação na pesquisa."

**Caso aceite participar preciso lhe fazer algumas perguntas para avaliar se você tem o perfil que precisamos para a pesquisa.**

1. "Qual é o seu peso e sua altura? (para avaliação do IMC  $<25\text{kg/m}^2$ )
2. Você tem diabetes?
3. Você tem algum problema renal, no fígado, na tireóide ou no coração?
4. Você faz reposição hormonal?

Ótimo! Você poderá participar!" Muito obrigada e em breve entraremos em contato novamente com o senhor (a).

**Caso o indivíduo apresente algum desses fatores, ele não poderá participar da fase de seleção.**

"Desculpa, mas por o senhor (a) apresentar \_\_\_\_\_ não será possível participar. Mas de qualquer forma agradeço sua atenção."

**ATENÇÃO:** Devemos nos atentar ao tom de voz e nos preparar para as possíveis recusas.

## APÊNDICE B – Formulário de *Screening*



### Screening

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

#### Coleta de sangue

( ) Glicemia de jejum    ( ) Hemoglobina glicada    ( ) Insulinemia

#### Antropometria

Peso: \_\_\_\_\_

Altura: \_\_\_\_\_

<b>Crítérios de pesquisa</b>	<b>SIM</b>	<b>NÃO</b>
Uso de antidiabéticos orais		
Diabetes Mellitus		
Doença renal		
Doença hepática		
Cardiopatía		
Distúrbios na tireóide (hipertireoidismo/doença de graves)		
Acompanhamento nutricional/Controle de peso		
Gestante ou nutriz		
Reposição hormonal		
Câncer		
Idade superior a 60 anos ou inferior a 20 anos.		

#### Assinatura do TCLE:

( ) Sim                    ( ) Não

## APÊNDICE C – Padronização das informações dadas aos voluntários para o início da intervenção (T0)

### Agendamento T0

11/09 a 25/09

- Etapas do T0
  - Coleta de sangue
    - “para analisar a gordura e açúcar no sangue.”
  - Antropometria (peso, altura e circunferência da cintura)
    - “para confirmar as primeiras medidas e acompanhar a cintura.”
  - Anamnese e R24h
    - “registros do consumo alimentar para acompanharmos a relação dos alimentos e da suplementação.”
  - DEXA
    - “aparelho que nos permite acompanhar certinho a quantidade de gordura e músculo que você tem no corpo.”
  - Entrega das cápsulas, registros alimentares e orientações (128 unidades)
    - “entrega do que será levado para casa: a suplementação, as dicas de como fazer até nosso próximo encontro e os formulários para escrever o que consumiu. Tudo isso será explicado no dia que a gente marcar.”
- Prazo de aproximadamente 2 horas para finalização de todas as etapas
- Jejum de 12 horas
- Registro alimentar do que consumiu no dia anterior ao agendado
  - tipo de alimento e quantidade
- Confirmar a grafia dos nomes e os dados de cadastro
  - coletar a data de nascimento dos pacientes com ! na data de aniversário
- Marcar a data: no máximo 13/dia entre 11/09 a 25/09, a partir das 6:30h.
- Confirmar se elas têm meu telefone (8240-2021)
- Perguntar se elas têm **whatsapp**.

### IMPORTANTE

! Cordialidade e educação

! **Esclarecer que a partir de agora a participação de cada uma delas é muito importante** e vamos trabalhar para que elas cheguem até o final da pesquisa. Cada perda que teremos agora implica além de tudo, em perda de investimento e de respostas incompletas para os exames delas e para a pesquisa.



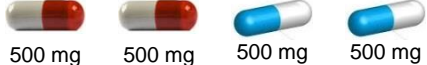

! Teremos esse encontro e apenas mais dois. O próximo será rápido e não haverá coleta de sangue. Apenas o último será como esse, com coleta e medidas para compararmos o início e o fim da pesquisa.

! Local da coleta será no mesmo lugar do primeiro encontro

! Temos atestados de comparecimento para quem precisar

! Ligaremos na véspera para lembrá-las do encontro

**APÊNDICE D – Esquematização da distribuição das cápsulas por fase de estudo (T0; T12)**

<p><b>Grupo Chá verde (dose/dia/paciente)</b></p>	<p><b>Grupo Metformina (dose/dia/por paciente)</b></p>	<p><b>Grupo Chá Verde + Metformina (dose/dia/paciente)</b></p>	<p><b>Grupo placebo (2 cápsulas/dia/paciente)</b></p>
 <p>250 mg    250 mg    500 mg    500 mg</p> <p><b>Total:</b> 1g de chá verde distribuído em 2 cápsulas e 2 cápsulas de placebo por dia.</p> <p><b>Logo:</b> 4 cápsulas x 32 pacientes x 45 dias = <b>5.760 cápsulas</b> para os primeiros 45 dias de estudo (1ª fase)*, sendo 2.880 cápsulas de cor vermelha contendo 250mg de placebo em cada e <b>2.880 cápsulas</b> de cor azul contendo 500mg de extrato de chá verde em cada.</p>	 <p>5000 mg    500 mg    250 mg    250 mg</p> <p><b>Total:</b> 1g de metformina distribuído em 2 cápsulas e 2 cápsulas de placebo por dia.</p> <p><b>Logo:</b> 4 cápsulas x 32 pacientes x 45 dias = <b>5.760 cápsulas</b> para os primeiros 45 dias de estudo (1ª fase)*, sendo 2.880 cápsulas de cor vermelha contendo 500mg de metformina em cada e <b>2.880 cápsulas</b> de cor azul contendo 250mg de placebo em cada.</p>	 <p>500 mg    500 mg    500 mg    500 mg</p> <p><b>Total:</b> 1g de metformina distribuídos em 2 cápsulas e 1g de chá verde distribuídos em 2 cápsulas por dia, totalizando 4 cápsulas por dia.</p> <p><b>Logo:</b> 2 cápsulas x 32 pacientes x 45 dias = <b>2.880 cápsulas</b> de cor vermelha contendo 500mg de metformina e 2 cápsulas x 32 pacientes x 45 dias = <b>2.880 cápsulas</b> de cor azul contendo 500mg de extrato de chá verde.</p>	 <p>250 mg    250 mg    250 mg    250 mg</p> <p><b>Total:</b> 4 cápsulas com conteúdo placebo por dia.</p> <p><b>Logo:</b> 4 cápsulas x 32 pacientes x 45 dias = <b>5.760 cápsulas</b> para os primeiros 45 dias de estudo (1ª fase)* sendo 2.880 cápsulas de cor azul contendo 250mg de placebo em cada e 2.880 cápsulas de cor vermelha contendo 250mg de placebo em cada.</p>

**Obs<sub>1</sub>:** As cores das cápsulas devem ser as mesmas para todos os grupos, logo duas cápsulas serão vermelhas e as outras duas azuis. No pote de cada paciente deve conter: 90 cápsulas azuis e 90 cápsulas vermelhas dos respectivos compostos de acordo com o grupo ao qual pertence.

**Obs<sub>2</sub>:** A quantidade de chá verde está em 1g/dia/paciente para assegurarmos a quantidade de compostos fenólicos oferecidos por dia para cada paciente de acordo com o que foi publicado recentemente nas revistas científicas de alto fator de impacto. Calculamos em cima de no mínimo 80% de compostos fenólicos. Concluímos que quanto maior a quantidade de compostos fenólicos consumidos por dia, melhores foram os resultados dos estudos.

**Obs<sub>3</sub>:** O esquema se repete para a segunda fase do estudo (T6).

## APÊNDICE E – Termo de consentimento livre e esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – ESTUDO CLÍNICO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), em uma pesquisa. Meu nome é Patrícia Borges Botelho, sou nutricionista e pesquisadora responsável desse estudo em Nutrição. Após ler com atenção este documento você será esclarecido (a) sobre as informações a seguir. No caso de aceitar fazer parte do estudo, assine todas as folhas e ao final deste documento, que está em duas vias. Este documento também será assinado por mim. Uma das vias é sua e a outra é minha. Em caso de recusa ou de desistência, você não será penalizado(a) de forma alguma.

Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato a cobrar com os pesquisadores responsáveis, Patrícia Borges Botelho e Monalisa Alves Ferreira (62) 3209-6270 (ramal 205), Endereço: Rua 227 Qd. 68 s/nº - Setor Leste Universitário - Goiânia - Goiás - Brasil - CEP: 74.605-08. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, no endereço 1ª Avenida S/Nº Setor Leste Universitário, Unidade de Pesquisa Clínica, 2º andar.

#### **INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ PRECISA SABER SOBRE A PESQUISA:**

**Título do projeto:** “Efeito do extrato de chá verde e metformina sobre a resistência à insulina em indivíduos obesos com pré-diabetes”

A obesidade é uma doença grave caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal e que está relacionada com alterações no açúcar do sangue e o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 uma vez que prejudica a ação do hormônio insulina no organismo e favorece o aumento da quantidade de açúcar no sangue.

O tratamento adequado é essencial para evitar que a obesidade traga esses problemas de saúde. Os médicos e nutricionistas recomendam nestes casos mudanças de estilo de vida, objetivando o controle do açúcar no sangue. Mas, em alguns casos, é necessário potencializar o tratamento por meio da prescrição de medicamentos como metformina e fitoterápicos como o chá verde.

Diante disso, o objetivo deste estudo será avaliar o efeito da associação do extrato do chá verde e da metformina sobre a quantidade de açúcar no sangue.

Você será informado de cada passo do estudo, que são:  
Em um primeiro momento, você será informado de todas as etapas do estudo e em caso de aceitar participar do estudo dará o seu livre consentimento. Poderão participar da pesquisa as pessoas que estiverem com excesso de peso e tenha idade entre 20 e 60 anos e apresentem resistência a insulina. Você não poderá participar do estudo se não realizar todas as avaliações, se estiver com IMC inferior a 25 kg/m<sup>2</sup>, se for portador de doenças imunes ou estiver em uso de medicamentos imunossupressores, caso tenha problemas no coração, fígado, rim ou tireóide e consuma de suplementos nutricionais ou use insulina.

Após a assinatura do Termo de consentimento Livre e Esclarecido, realizaremos também a coleta de sangue a fim de realizar alguns exames laboratoriais para verificar se você atende aos critérios exigidos para o estudo. Para

isso será necessário que você realize jejum de 12 horas e evite exercícios físicos vigorosos 24 horas antes e/ou ingestão de álcool 72 horas antes da coleta. Após esses exames você será informado se continuará nas próximas etapas da pesquisa ou não.

### **1. Primeira consulta:**

Os seguintes dados serão coletados na primeira consulta:

- Coleta de dados socioeconômicos e estilo de vida: Entrevista que ocorrerá na Clínica escola da Faculdade de Nutrição da UFG, por aproximadamente 20 minutos. São informações sobre dados pessoais, renda da família, prática de exercício físico, histórias de doenças na família e outras perguntas sobre estilo de vida. Você tem direito de não responder as perguntas que possam trazer constrangimentos de qualquer natureza.

- Avaliação do consumo alimentar com o recordatório de 24h em que você relatará todos os alimentos consumidos durante o dia anterior, bem como as quantidades e horários das refeições. Com isso, poderemos conhecer um pouco mais sobre sua alimentação.

- Avaliação do estado nutricional :

Peso e altura: Você deverá retirar os sapatos, se posicionar no centro da balança em posição ereta;

Circunferência da cintura: será posicionada uma fita em sua cintura para medição da circunferência. Esse procedimento será repetido duas vezes.

Avaliação da composição corporal: Você deverá utilizar roupas leves e estar isentos de qualquer acessório ou objeto de metal. Será orientado a deitar-se sobre uma maca por onde percorrerá o equipamento de emissão do raio X, cuja imagem será codificada em

tela de computador. Trata-se de um método de diagnóstico por imagem, com baixa radiação e não invasivo e que permite avaliar o seu percentual de gordura corporal.

- Coleta de sangue:

Realizaremos também a coleta de sangue a fim de verificar alguns exames laboratoriais no início do acompanhamento e após três meses. Para isso será necessário que você realize jejum de 12 horas e evite exercícios físicos vigorosos 24 horas antes e/ou ingestão de álcool 72 horas antes da coleta.

- Aferição da pressão arterial

- Distribuição das cápsulas:

Vocês poderão receber cápsulas de chá verde, de metformina ou de placebo as quais deverão ser ingeridas diariamente durante os 3 meses de estudos. Durante este período, pedimos que mantenham os hábitos alimentares apresentados no início do estudo.

**2 Segunda consulta:** Após 45 dias, você deverá retornar a Clínica Escola da Faculdade de Nutrição para receber as cápsulas para os 45 dias restantes e realizarmos o seu acompanhamento.

**3 Terceira consulta:** Após 45 dias da segunda consulta, você deverá retornar a Clínica Escola da Faculdade de Nutrição e serão realizados os mesmos procedimentos da primeira consulta.

**4 Quarta consulta:** Após 45 dias da terceira consulta, você deverá retornar a Clínica Escola da Faculdade de nutrição para receber os resultados dos seus exames e as devidas orientações nutricionais.

Desta forma, teremos quatro encontros a cada 45 dias.

### **RESSARCIMENTO**

Não será realizado nenhum tipo de pagamento para a participação nesta pesquisa.

### **DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS**

Os resultados desta pesquisa serão divulgados das seguintes maneiras:

- Retorno dos resultados dos exames de sangue e da avaliação nutricional aos pacientes por meio de consultas individuais.
- Publicação em artigos científicos de revistas internacionais e nacionais;
- Divulgação da dissertação de mestrado no site do Mestrado em Nutrição e Saúde da UFG. No entanto, todas as informações coletadas nesse estudo são confidenciais e somente os pesquisadores terão acesso aos dados e os mesmos serão divulgados de forma conjunta, sem citar nomes dos participantes.

### **DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS**

Sua participação será limitada a responder o questionário, preencher o recordatório de 24h e se submeter à coleta de sangue feita por enfermeiras e à avaliação nutricional que será realizada por nutricionistas. Portanto, o risco é mínimo e somente associado ao desconforto da coleta de sangue (inchaço e rubor) e a um possível constrangimento durante a entrevista. Mas como foi dito anteriormente, você pode se recusar a responder qualquer uma das perguntas sem que isto lhe traga qualquer prejuízo. Não foram identificados riscos relacionados ao consumo de chá verde em pesquisas anteriores, exceto para pacientes com problemas na tireóide. A metformina é contra-indicada para insuficiência renal, hepática, cardíaca, pulmonar e acidose grave.

### **BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS**

Ao final do estudo você receberá os resultados dos exames bioquímicos, a avaliação da sua composição corporal, bem como orientações nutricionais. Além disso, este estudo permitirá esclarecer se o chá verde é capaz de controlar os níveis de glicose (açúcar) no sangue e reduzir o risco de pacientes obesos desenvolverem diabetes mellitus tipo 2 o que poderá contribuir para a melhora do tratamento dado a este tipo de paciente.

### **ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE A GARANTIA DO SUJEITO DA PESQUISA**

- 1- Todos os participantes terão acesso, a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas;
- 2- Os dados coletados serão usados nesta pesquisa e o material biológico não utilizado será descartado, seguindo todos os critérios de segurança para descarte de material biológico.

- 3- Os participantes também terão liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto lhe cause nenhum prejuízo.
- 4- Todos os resultados obtidos serão confidenciais, sigilosos e privativos. Também é garantido o acesso irrestrito dos voluntários aos resultados do estudo, tendo eles a opção de tomar ou não conhecimento dessas informações.
- 5- Dados individuais, resultados de exames somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e não será permitido o acesso de terceiros.
- 6- Caso ocorra algum dano a saúde decorrente da pesquisa, os voluntários serão indenizados pela instituição.
- 7- Todos os voluntários estarão protegidos contra qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva, uma vez que todos os resultados serão confidenciais.
- 8- A pesquisa será imediatamente interrompida se for percebido algum risco ou dano à saúde do participante da pesquisa, conseqüente à mesma, não previsto no termo de consentimento.

Nome e assinatura do pesquisador:

---

### **CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA**

Eu, \_\_\_\_\_, RG/CPF/nº de prontuário/ nº de matrícula \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Efeito do extrato de chá verde e metformina sobre a resistência à insulina em indivíduos obesos com pré-diabetes”, como sujeito. Fui devidamente informada e esclarecida pelas pesquisadoras sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do meu acompanhamento.

Local e data \_\_\_\_\_

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável:

---

Assinatura Dactiloscópica:



Nome e assinatura do Pesquisador Responsável

---

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE F – Orientações iniciais dadas aos pacientes no material entregue (T0)

### Orientações

(Etapa T0)

Nome: \_\_\_\_\_

Olá! A partir de agora você está participando da pesquisa do chá verde e metformina. Estamos muito felizes com a sua participação e cuidaremos de você durante os três meses do estudo. Essa cartilha é uma forma de estarmos no seu dia-a-dia, tirando as dúvidas que talvez apareçam enquanto você estiver em casa. Vamos lá?



1. Estamos trabalhando muito para termos bons resultados. Por isso é muito importante que você nos ajude em casa, seguindo nossas orientações e em caso de dúvidas, **nos ligue (8240-2021)**.

2. Você receberá 2 potinhos, sendo que em cada um há 90 cápsulas vermelhas e no outro, 90 cápsulas azuis. **Você deverá tomar 2 cápsulas vermelhas e duas azuis por dia todos os dias: 1 vermelha e 1 azul, 5 minutos antes do café da manhã e 1 vermelha e 1 azul, 5 minutos antes do almoço!** É muito importante que siga essa orientação!

3. Se você se esquecer de tomar em algum horário (por favor, não esqueça!), pode tomar duas cápsulas de cada cor juntas (duas azuis e duas vermelhas). Mas não faça disso um hábito! O ideal é não esquecer nenhum horário!

4. Coloque o lembrete que te entregamos em um lugar visível para que você se lembre todos os dias. É legal também colocar lembretes dos horários no celular.

5. As cápsulas foram produzidas em um laboratório de confiança certificado pelos órgãos de vigilância sanitária com garantia do produto. Ou seja, o que você está consumindo é de qualidade!

6. Se você notar alguma coisa diferente no seu corpo ou não se sentir bem, entre em contato conosco. Lembre-se que na equipe da pesquisa temos uma médica para te atender, caso seja necessário!

7. Conserve os potinhos em temperatura ambiente (entre 15 e 30 °C) e o proteja da umidade.

8. **Não se esqueça de que as cápsulas são apenas suas!** Não divida com ninguém! Para estudarmos os efeitos dos compostos presentes nelas, precisamos que você consuma sozinha todas as cápsulas dos potinhos. Além disso, esses produtos não devem ser consumidos sem acompanhamento médico e nutricional. Você está sendo acompanhado, mas seus familiares não. Por isso, não se esqueça, apenas você deve consumi-lo!

9. Na data agendada para seu retorno, vamos querer te ver de novo! Avaliaremos suas medidas mais uma vez e te entregaremos o restante das cápsulas.

10. No nosso próximo encontro, leve os potinhos mesmo que estejam vazios. **E não se esqueça de preencher o REGISTRO ALIMENTAR.** Essa é outra parte fundamental para o seu correto acompanhamento.

11. Se você achar mais fácil, pode tirar suas dúvidas por mensagem ou whatsapp.

12. As cápsulas devem ser mantidas longe do alcance de crianças.

**APÊNDICE G** – Lembrete do horário de ingestão das cápsulas dadas aos pacientes no material entregue (T0; T6)



Você já tomou suas cápsulas hoje?

**Não se esqueça!**

1 azul e 1 vermelha 5 minutos antes do café da manhã

**e**

1 azul e 1 vermelha 5 minutos antes do almoço



Você já tomou suas cápsulas hoje?

**Não se esqueça!**

1 azul e 1 vermelha 5 minutos antes do café da manhã

**e**

1 azul e 1 vermelha 5 minutos antes do almoço



Você já tomou suas cápsulas hoje?

**Não se esqueça!**

1 azul e 1 vermelha 5 minutos antes do café da manhã

**e**

1 azul e 1 vermelha 5 minutos antes do almoço



Você já tomou suas cápsulas hoje?

**Não se esqueça!**

1 azul e 1 vermelha 5 minutos antes do café da manhã

**e**

1 azul e 1 vermelha 5 minutos antes do almoço

## APÊNDICE H – Lembretes do agendamento para a entrega da segunda metade das cápsulas dados aos pacientes no material entregue (T0; T6)

### Projeto Chá Verde

**Endereço:** Faculdade de Nutrição UFG, Clínica  
Escola - Rua 227 Qd.68 s/nº - Setor Leste  
Universitário, Goiânia-GO.  
**Telefone (Monalisa):** 8240.2021  
**Email:** mona-alves@hotmail.com

**Próxima Consulta:**

**Data:** \_\_\_\_\_ **Hora:** \_\_\_\_\_

*Os avisos de cancelamento devem ser comunicados com uma antecedência mínima de 48 horas. Obrigada!*

### Projeto Chá Verde

**Endereço:** Faculdade de Nutrição UFG, Clínica  
Escola - Rua 227 Qd.68 s/nº - Setor Leste  
Universitário, Goiânia-GO.  
**Telefone (Monalisa):** 8240.2021  
**Email:** mona-alves@hotmail.com

**Próxima Consulta:**

**Data:** \_\_\_\_\_ **Hora:** \_\_\_\_\_

*Os avisos de cancelamento devem ser comunicados com uma antecedência mínima de 48 horas. Obrigada!*

### Projeto Chá Verde

**Endereço:** Faculdade de Nutrição UFG, Clínica  
Escola - Rua 227 Qd.68 s/nº - Setor Leste  
Universitário, Goiânia-GO.  
**Telefone (Monalisa):** 8240.2021  
**Email:** mona-alves@hotmail.com

**Próxima Consulta:**

**Data:** \_\_\_\_\_ **Hora:** \_\_\_\_\_

*Os avisos de cancelamento devem ser comunicados com uma antecedência mínima de 48 horas. Obrigada!*

### Projeto Chá Verde

**Endereço:** Faculdade de Nutrição UFG, Clínica  
Escola - Rua 227 Qd.68 s/nº - Setor Leste  
Universitário, Goiânia-GO.  
**Telefone (Monalisa):** 8240.2021  
**Email:** mona-alves@hotmail.com

**Próxima Consulta:**

**Data:** \_\_\_\_\_ **Hora:** \_\_\_\_\_

*Os avisos de cancelamento devem ser comunicados com uma antecedência mínima de 48 horas. Obrigada!*

**APÊNDICE I – Formulário de acompanhamento de ingestão das cápsulas por contato telefônico**



**CONTROLE DE INGESTÃO DO MATERIAL DE INTERVENÇÃO**

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ N° de prontuário: \_\_\_\_\_ N° de ordem: \_\_\_\_\_  
 Nome: \_\_\_\_\_

<b>Controle</b>	<b>Qtde entregue</b>	<b>Qtde no controle</b>
T0		
T6		
T12		

<b>Data de ligação</b>	<b>Observações</b>

## APÊNDICE J– Anamnese nutricional



### ANAMNESE NUTRICIONAL

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ N° de prontuário: \_\_\_\_\_ N° de ordem: \_\_\_\_\_

Nome completo: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos

Sexo: 1 ( ) F 2 ( ) M

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone para contato: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Renda familiar (mensal): \_\_\_\_\_ Número de pessoas: \_\_\_\_\_

1- Você tem casos na família de alguma das seguintes patologias?

- ( ) diabetes ( ) hipertensão ( ) doenças cardiovasculares  
 ( ) câncer ( ) obesidade ( ) derrame ( ) nenhuma  
 ( ) outra \_\_\_\_\_

2- Você fuma? ( ) não, ex-fumante? \_\_\_\_\_  
 cessou o fumo há quanto tempo? \_\_\_\_\_  
 quantos cigarros por dia? \_\_\_\_\_  
 ( ) sim, quantos cigarros por dia? \_\_\_\_\_

3- Consome bebidas alcoólicas?

- ( ) Sim ( ) Não  
 ( ) cerveja ( ) vinho ( ) destilados  
 ( ) 1-3x/mês ( ) 1-2x/sem ( ) 3-5x/sem ( ) diariamente  
 Quando bebe, consome quantas doses? \_\_\_\_\_

4- Ingestão hídrica (obs.: copo americano tem 200 mL)

- ( ) < 500 mL/dia ( ) 500 mL-1 L/dia ( ) 1-2 L/dia ( ) > 2 L/dia

5- Tipo de gordura mais utilizada na cocção dos alimentos

- ( ) óleo vegetal ( ) banha de porco  
 ( ) azeite outros \_\_\_\_\_

Quantidade de gordura/mês \_\_\_\_\_

Quantidade de sal/mês \_\_\_\_\_

Quantidade de açúcar/mês \_\_\_\_\_

6- Como é o seu funcionamento intestinal?

- ( ) regular ( ) irregular  
 ( ) normal ( ) diarreia ( ) constipação  
 Quantas vezes por dia/semana? \_\_\_\_\_

7- Apresenta problemas gastrointestinais?

- ( ) sim ( ) não  
 ( ) náusea ( ) vômito ( ) epigastralgia ( ) pirose

8- Você pratica alguma atividade física?

- ( ) Sim ( ) Não  
 ( ) diariamente ( ) 4-5x/semana ( ) 2-3x/semana  
 ( ) ≤1h ( ) 1-2h ( ) ≥ 2h

9- Você ingere algum tipo de medicamento e/ou suplemento? Quais?

- ( ) anti-hipertensivos ( ) antianêmicos ( ) expectorantes  
 ( ) hipoglicemiantes ( ) anticoagulantes ( ) broncodilatadores  
 ( ) diuréticos ( ) antidepressivos ( ) antiácidos  
 ( ) hipolipidêmicos ( ) antialérgicos ( ) laxativos  
 ( ) antiarrítmicos ( ) analgésicos ( ) antidiarreicos  
 ( ) Outros \_\_\_\_\_

10- Você possui o hábito de consumir o chá verde?

- ( ) Não ( ) Sim, Se sim  
 ( ) Na forma de sachê ( ) Na forma de cápsula

Quantidade diária \_\_\_\_\_

### **Antropometria**

<b>Medidas</b>	<b>T0</b>	<b>Classificação I</b>	<b>T12</b>	<b>Classificação II</b>
Peso (kg)				
Altura (m)				
CC (cm)				
IMC (kg/m <sup>2</sup> )				
Hora da última refeição				

**APÊNDICE K**– Instruções para preenchimento da anamnese nutricional

**Data:** data da entrevista (dd/mm/aa)

**Nº de Prontuário:** número do prontuário do paciente

**Nº de ordem:** código do paciente no banco de dados (serão adicionados ao final de cada dia de coleta de acordo com a sequencia e o grupo)

**Nome Completo:** nome completo do paciente

**Data de nascimento:** data de nascimento do paciente no modelo dd/mm/aaaa

**Idade:** idade do paciente

**Sexo:** assinalar 1F se o paciente for do sexo feminino ou 2 M se o paciente for do sexo masculino

**Endereço:** Preencher com o endereço residencial do paciente (logradouro, complemento, setor)

**Telefone para contato:** telefone de contato do paciente (coletar o máximo de números para contato, inclusive para recados)

**E-mail:** e-mail do paciente, caso não tenha preencher “não usa”

**Renda familiar:** Valor da renda mensal da família

**Número de pessoas:** Números de pessoas que compõe a família que mora na casa

**1- Você tem casos na família de alguma das seguintes patologias?** Assinalar as patologias que o paciente referir, caso relate não existir, assinalar “NENHUMA”

**2- Você fuma?** Assinalar sim caso o paciente confirme e perguntar quantos cigarros por dia ele usualmente fuma. Em caso do paciente negar o hábito, questionar se ele já fumou. Se sim, anotar há quanto tempo (meses, anos) ele cessou o fumo e quantos cigarros fumava por dia.

**3- Consume bebidas alcoólicas?** Assinalar sim ou não, e em caso afirmativo, perguntar qual tipo de bebida costuma consumir, marcar dentre as opções, frequência de consumo e a quantidade de dose de cada bebida (cerveja: 1 lata de 350 ml; vinho: 1 taça de 300 ml; destilados: 1 copo americano cheio 300 ml)

**4- Ingestão hídrica:** Perguntar a quantidade diária de consumo de água em copos americanos (200 ml) ou garrafas comerciais (500 ml). Converter para litro (s) e assinalar dentre as opções

**5- Tipo de gordura mais utilizada na cocção dos alimentos:** Assinalar se o consumo é maior de óleo vegetal, banha, azeite ou outros tipos, caso seja outros escrever qual. Caso haja mais de um tipo, marcar quantos forem e destacar o de maior consumo

**Quantidade de gordura/mês:** Perguntar a quantidade de gordura utilizada na residência mensalmente. No caso de óleo e azeite quantas embalagens, no caso da banha tentar estimar a quantidade em litros. Anotar quantos forem os tipos de gordura usadas.

**Quantidade de sal/mês:** Perguntar quantos pacotes (1 kg) de sal utilizados na residência mensalmente ou a cada quantos meses se utiliza um pacote

**Quantidade de açúcar/mês:** Perguntar quantos pacotes (5 kg) de açúcar utilizados na residência mensalmente ou a cada quantos meses se utiliza um pacote

**6- Como é seu funcionamento intestinal?** Assinalar “regular” caso haja uma frequência, do contrário marcar “irregular”. Se a frequência for inferior a 1 vez a cada 3 dias, considerar “constipação”, se for superior e o paciente negar incomodo ao evacuar, assinalar “normal”, caso a consistência relatada seja líquida ou amolecidas há pelo menos 14 dias, “diarreia”. Abaixo descrever quantas vezes no dia ou semanalmente especificando.

**7 - Apresenta problemas gastrointestinais?** Considerar náusea, vômito, dores no estômago (epigastria) ou pirose (“queimação”) caso ocorram episódios pelo menos 2 vezes por semana

**8- Você pratica alguma atividade física?** Assinalar sim caso o paciente confirme e não caso o paciente negue. Considerar como afirmativo, atividades com pelo menos 30 minutos de duração por 3 ou mais dias da semana. Em caso afirmativo, marcar a frequência e duração.

**9- Você ingere algum tipo de medicamento e/ou suplemento? Quais?** Em caso afirmativo, assinalar o tipo de medicamento e/ou suplemento

**10- Você possui o hábito de consumir o chá verde?** Assinalar sim caso o paciente confirme consumir chá verde pelo menos uma vez por mês e não caso o paciente negue. Em caso afirmativo, assinalar a forma de consumo sachê ou cápsula e a quantidade diária.

### **Antropometria**

**Peso:** anotar a média da duplicata do peso aferido. Caso a diferença entre as medidas seja superior a 500 gramas, reiniciar a aferição.

**Altura:** anotar a média da duplicata da altura aferido. Caso a diferença entre as medidas seja superior a 1 cm, reiniciar a aferição.

**CC:** Para realizar a medida da circunferência da cintura o indivíduo deve estar de pé, ereto, com abdômen relaxado ao final da expiração normal e com os braços soltos ao longo do corpo e preferencialmente sem roupa na região a ser medida. A fita métrica deve ser colocada sem fazer pressão, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. Caso seja difícil a visualização, medir em plano horizontal ao nível da cintura natural. Como última opção, padronizar dois dedos acima da cicatriz umbilical para posicionar a fita.

**IMC (kg/m<sup>2</sup>):** É obtido através do peso dividido pela altura (em metros) ao quadrado.

**Hora da última refeição:** Anotar o horário da última refeição do dia anterior à coleta de sangue (hh:mm).

**T0:** Medidas coletadas no início da pesquisa.

**T12:** Medidas coletadas ao final dos 90 dias após o início da pesquisa.

**IMC (classificação):** Para adultos de 18 aos 59 anos utilizar WHO (1997), a partir dos 60 anos utilizar Lipschitz (1994).

**Tabela1.** Classificação de IMC de 18 a 59 anos.

<b>Estado nutricional</b>	<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>
Magreza grau III	<16,0
Magreza grau II	16,0 – 16,99
Magreza grau I	17,0 – 18,49
Eurófico	18,5 – 24,99
Pré-obesidade	25,0 – 29,99
Obesidade I	30,0 – 34,99
Obesidade II	35,0 – 39,99
Obesidade III	>40,0

Fonte: WHO,1997.

### **CC Classificação:**

**Tabela 3.** Classificação do risco de morbidades para adultos segundo CC.

<b>Sexo</b>	<b>Risco aumentado</b>	<b>Risco muito aumentado</b>
Homens	94 a 102 cm	> 102 cm
Mulheres	80 a 88 cm	> 88 cm

Fonte: WHO, 1998.

**Classificação I e II:** De acordo com os valores obtidos das variáveis antropométricas avaliar com os valores recomendado para o sexo e faixa etária de acordo com a literatura.

**APÊNDICE L - Formulário de Registro Alimentar****REGISTRO ALIMENTAR**

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ dia da semana: \_\_\_\_\_ 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ( ) 5 ( ) 6 ( ) 7 ( )

<b>HORÁRIO</b>	<b>ALIMENTOS/QUANTIDADE</b>
<b>Beliscos</b>	
<b>Água</b>	

**APÊNDICE M**– Instruções para preenchimento do formulário de Registro Alimentar

**REGISTRO ALIMENTAR**

**Paciente:** Nome completo do paciente

**Data:** colocar a data do preenchimento do recordatório (dd/mm/aa) e o dia da semana correspondente (SEG, TER, QUA, QUI, SEX, SAB, DOM)

**Dia 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12:** Assinalar qual o dia do registro conforme tabela 5.

**Tabela 5.** Esquema de coleta de registros alimentares

<b>Dia</b>	<b>Registro</b>
1	1 dia antes de T0
2	3 dias antes de T6
3	2 dias antes de T6
4	1 dia antes de T6
5	3 dias antes de T12
6	2 dias antes de T12
7	1 dia antes de T12

**Horário:** Anotar o horário que é realizado a refeição (hh:mm)

**Alimentos:** Anotar os nomes dos alimentos que consumiu. Se for uma preparação elaborada (ex. galinhada, fricassê de frango) deve especificar cada ingrediente utilizado.

**Medida Caseira:** Utilizar as colheres que foram utilizadas (café, chá, sobremesa, sopa, servir, arroz, concha), o tamanho (servir média ou grande; arroz média ou grande; concha pequena, média ou grande), e a quantidade (rasa ou cheia). A abreviatura será preenchida pelo pesquisador.

**Tabela 4.** Abreviaturas para medidas caseiras.

<b>Abreviatura</b>	<b>Medida Caseira</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Medida Caseira</b>
Bp	bola pequena	Fp	fatia pequena
Bg	bola grande	Ff	fatia fina
CADn	copo americano duplo nivelado	Fm	fatia média
CADr	copo americano duplo raso	Fg	fatia grande
CADch	copo americano duplo cheio	FOP	folha pequena
CAn	copo americano nivelado	FOM	folha média
CAr	copo americano raso	FOg	folha grande
CAch	copo americano cheio	PEp	pedaço pequeno
CARr	colher de arroz rasa	PEm	pedaço médio
CARch	colher de arroz cheia	PEg	pedaço grande

CCch	colher de café cheia	PICr	pires de café raso
CCDr	copo de café descartável raso	PICch	pires de café cheio
CCHn	colher de chá nivelada	PICHr	pires de chá raso
CCHr	colher de chá rasa	PICHch	pires de chá cheio
CCHch	colher de chá cheia	POp	porção pequena
CCr	colher de café rasa	POm	porção média
COpch	concha pequena cheia	POg	porção grande
COMch	concha média cheia	PRFr	prato fundo raso
COgr	concha grande rasa	PRFch	prato fundo cheio
COgch	concha grande cheia	PRRr	prato raso raso
CSn	colher de sopa nivelada	PRRch	prato raso cheio
CSr	colher de sopa rasa	PRSOR	prato de sobremesa raso
CSch	colher de sopa cheia	U	unidade
CSOn	colher de sobremesa nivelada	Up	unidade pequena
CSOr	colher de sobremesa rasa	Um	unidade média
CSOch	colher de sobremesa cheia	Ug	unidade grande
Epr	escumadeira pequena rasa	XCr	xícara de café rasa
Epch	escumadeira pequena cheia	XCch	xícara de café cheia
Em	escumadeira média	XCHr	xícara de chá rasa
Eg	escumadeira grande	XCHch	xícara de chá cheia

**QTDE:** Quantidade em gramas, analisados segundo as medidas caseiras utilizando o programa de análise nutricional Nutriquant® (São Paulo, Brasil)

**APÊNDICE N – Modelo de preenchimento do Registro Alimentar para treinamento dos pacientes**

Nome: **Fulana de Beltrano**

Data: 30/09/2014 dia da semana: terça-feira 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ( ) 5 ( ) 6 ( ) 7 ( )

<b>HORÁRIO</b>	<b>ALIMENTOS/QUANTIDADE</b>
<b>8:15</b>	1 pão francês grande com 1 ponta de faca de margarina 2 pães de queijo pequeno 3 bolachas de maisena 1 xícara pequena de café com açúcar
<b>9:00</b>	2 iogurtes de morango
<b>11:00</b>	3 balinhas de hortelã
<b>12:00</b>	salada (2 folhas pequenas de alface, 3 rodela de tomate, 2 colheres de sopa de cenoura ralada) 2 coxas de frango frito 1 pedaço médio de carne de porco cozida 3 colheres de sopa de purê de batata (com ½ fatia de queijo mussarela em cima) 3 colheres de servir de arroz com açafrão 1 concha média de feijão preto com bacon e lingüiça 2 copos plásticos (200 ml) de coca cola 2 colheres de sopa de mousse de chocolate 1 bola grande de sorvete de creme
<b>14:30</b>	3 colheres de sopa de salada de fruta (mamão, banana, maçã, manga, morango em cubos pequenos) com 1 bola pequena de sorvete de creme
<b>16:00</b>	1 copo americano de leite integral com café com açúcar 2 biscoitos de queijo 1 salgado assado tipo americano (presunto, mussarela, molho de tomate)
<b>22:00</b>	1 sanduíche “pit dog” (pão para hambúrguer, 2 hambúrguers, 1 ovo frito, folha de alface, 1 rodela de tomate, 2 salsichas, 1 rodela de abacaxi e 2 saches de catchup) 1 lata de fanta uva 1 pirulito de tutti-frutti
<b>Beliscos</b>	2 bolachas de sal 1 colher de sopa de açaí com banana e mel
<b>Água</b>	3 copos americanos

**APÊNDICE O** – Medidas caseiras utilizadas para treinamento dos pacientes sobre o preenchimento dos registros alimentares



**APÊNDICE P – Ficha de Checagem de Fases de T0/T12**

**Etapa**  
**T0 ( ) T12 ( )**

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

<b>ETAPA</b>	<b>RESPONSÁVEL</b>	<b>Observações</b>
Coleta de sangue		
Antropometria		
Anamnese		
Recordatório de 24h		
DEXA		
Cápsulas e orientações		

**Pressão Arterial:**

1. \_\_\_\_\_ 2. \_\_\_\_\_ 3. \_\_\_\_\_ 4. \_\_\_\_\_

Média: \_\_\_\_\_

**ANEXOS**

## ANEXO A – Instruções aos autores do periódico *Clinical Nutrition*



### CLINICAL NUTRITION

Official Journal of ESPEN, The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism

#### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

- **Description**
- **Audience**
- **Impact Factor**
- **Abstracting and Indexing**
- **Editorial Board**
- **Guide for Authors**



ISSN: 0261-5614

#### Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

**To find out more, please visit the Preparation section below.**

#### Easy Submission Process

The Editorial Office has implemented an **Easy Submission Process**. We only ask you that with initial submission the manuscripts are double-spaced (including references, tables, and figure legends) and lines are numbered continuously, beginning in the title page and thus every line has a unique number (Microsoft WORD: /Page Layout>Line Numbers).

All required items below need to be completed in formatting prior to final acceptance of a manuscript.

**Full Length Articles.** Should not contain more than 30 references and should be organized in the following successive sections and manuscript preparation and format information above to be followed: Title Page, Abstract (Background & Aims - Methods - Results - Conclusions). Introduction, Materials and Methods (including statistical considerations and ethical statement), Results, Discussion, Acknowledgements, Statement of Authorship, Conflict of Interest Statement and Funding sources, References; Figure and Table Legends. The Introduction should be limited to 1.5 pages and the Discussion to 4 pages (1200 words).

**Review Article.** Should not contain more than 50 references and contain at least 2 Figures and 2 Tables to summarize the most important data and/or concepts.

**(Inter)national Guidelines.** Can be submitted after consultation with the Editorial Office ([espenjournals@espen.org](mailto:espenjournals@espen.org)).

**ESPEN Guidelines.** Are submitted in collaboration with the Editorial Office ([espenjournals@espen.org](mailto:espenjournals@espen.org)).

**ESPEN Endorsed Recommendations.** Are submitted in collaboration with the Editorial Office ([espenjournals@espen.org](mailto:espenjournals@espen.org)).

**Letter to the Editor.** Is considered for publication provided it does not contain material that has been submitted or published elsewhere. The text, not including references, must not exceed 450 words. The letter must have no more than five references and one figure or small table and should not be signed by more than three authors. When a letter refers to an article recently

published in Clinical Nutrition, the opportunity for reply will be given to the authors of the original article. Such a reply will be published along with the letter. Start the letter with "Dear Editor".

**Editorial.** Are submitted by members of the Editorial Board.

**Short Communications.** Should not contain more than 10 references and organized as Full Length Articles. Maximum 1500 words.

**Opinion Papers.** Should not contain more than 30 references and organized as Full Length articles.

**Educational Papers.** Should not contain more than 30 references and organized as Full Length articles and contain at least 2 Figures and 2 Tables to summarize the most important data and/or concepts.

**Invited Editorial.** Is by invitation from the Editor-in-Chief.

**Randomized Controlled Trials.** Should not contain more than 30 references and organized as Full Length Articles. All Randomized controlled Trials submitted for publication in Clinical Nutrition should include a completed Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) 2010 checklist. Please refer to the CONSORT statement website at <http://www.consort-statement.org> for more information. The checklist can also be downloaded from here. You will be asked to upload this completed checklist at the time of submission and this file is mandatory for submission. Clinical Nutrition and e-SPEN Journal have adopted the proposal from the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) which require, as a condition of consideration for publication of clinical trials, registration in a public trials registry. Clinical trials are defined as "biomedical or health related studies in human beings that follow a defined protocol." In addition to intervention studies, this definition encompasses observational, prevention, quality of life, diagnostic, and screening trials ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Any clinical trial for which subject recruitment began after July 1, 2008 must be registered in one of the five ICMJE-approved public trials registries (i.e., [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), [www.isrctn.org](http://www.isrctn.org), [www.umin.ac.jp](http://www.umin.ac.jp), [www.trialregister.nl](http://www.trialregister.nl)). Is this study appropriately registered? If so, please report the study ID number and the website where the clinical trial is registered on the title page of the paper. If the study is not registered, authors must do so before the submitted paper will be considered for peer-review. If the study began before July 1, 2008, the initial recruitment date should be reported in the appropriate place in the Materials Methods section. Clinical Nutrition and e-SPEN Journal require prospective registration of all trials.

### Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/clnosp/>.



## Preparation

### NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

### References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

### Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

### Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

## REVISED SUBMISSIONS

### Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### Article structure

#### Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### Abstract

A concise and factual abstract is required and should be structured according to: Background & Aims - Methods - Results - Conclusions. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

#### Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

#### Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

#### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

## Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

## Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

## Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

## Artwork

### Electronic artwork

#### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
  - Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
  - Number the illustrations according to their sequence in the text.
  - Use a logical naming convention for your artwork files.
  - Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
  - For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
  - Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.
- A detailed guide on electronic artwork is available on our website:  
<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):  
 EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

For color reproduction in print, there is a charge of \$200 per figure; you will receive information regarding payment article once your article has been accepted for publication.

### Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is

also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

### Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

### References

#### Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

#### Reference style

References have to be cited in the text by Arabic numerals and numbered in the order in which they are cited. The reference section should be typed double-spaced at the end of the text, following the sample format given below. Abbreviate journal titles according to the List of Journals Indexed in Index Medicus (available from the Superintendent of Documents, US Government Printing Office, Washington, D.C. 20402, USA, DHEW Publication No. (NIH) 91-267; ISSN 0093-3821. Provide all authors' names. Provide article titles and inclusive pages. 'Unpublished data' and 'personal communications' do not qualify as References and should be placed in parentheses in the text. Accuracy of reference data is the responsibility of the author. **Refer to the Vancouver style of citation with your reference manager program**

or use the suggestions below.

#### Sample References

##### Article in a journal

1. Cummings J H, MacFarlane G T. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clin Nutr* 1997; 16: 3-11.

##### Book

1. McLaren D S, Meguid M M. Nutrition and its disorders, 4th edn. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988.

##### Chapter in a book

1. Goodwin S C, Liu S. Radiologic techniques for enteral access. In: Rombeau J L, Rolandelli R H, Eds. Enteral and tube feeding, 3rd edn. Philadelphia: W B Saunders, 1997: 193-206.

##### Website

1. U.S. positions on selected issues at the third negotiating session of the Framework Convention on Tobacco Control. Washington, D.C.: Committee on Government Reform, 2002. (Accessed March 4, 2002, at [http://www.house.gov/reform/index\\_accord.htm](http://www.house.gov/reform/index_accord.htm).)

##### Online journal article

- Tenesa A, Noble C, Satsangi J et al. Association of DLG 5 and inflammatory bowel disease across human populations. *Eur Journal Hum Genet* 2006: published online Jan 4. DOI:10.1038/sj.ejhg.5201516

### Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Manuscripts should be double-spaced (including references, tables, and figure legends). Lines should be numbered continuously, beginning in the title page and thus every line has a unique number (Microsoft WORD: /Page Layout>Line Numbers). When applicable refer to Clinical Nutrition papers from the last 2 years. The number of Figures and Tables should be in balance with the length of the manuscript, and carefully prepared to avoid duplication of data in the text. Standard abbreviation may be used without definition, while non-standardized abbreviations should be explained in the text (as well as Tables and Figures) and should be listed on the title page.

### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



### **After Acceptance**

#### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alphanumeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

## ANEXO B – Instruções aos autores do periódico *British Journal of Nutrition*

# British Journal of Nutrition

Welcome to Cambridge Journals Online

To access subscriptions and personalised features please log in or register

Home > British Journal of Nutrition > BJN Instructions for Contributors

## BJN Instructions for Contributors

*British Journal of Nutrition* (BJN) is an international peer-reviewed journal that publishes original papers and review articles in all branches of nutritional science. The underlying aim of all work should be to develop nutritional concepts.

## SUBMISSION

This journal uses ScholarOne Manuscripts for online submission and peer review.

Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

## SCOPE

BJN encompasses the full spectrum of nutritional science and reports of studies in the following areas will be considered for publication: Epidemiology, dietary surveys, nutritional requirements and behaviour, metabolic studies, body composition, energetics, appetite, obesity, ageing, endocrinology, immunology, neuroscience, microbiology, genetics, and molecular and cell biology. The focus of all manuscripts submitted to the journal must be to increase knowledge in nutritional science.

**The journal does NOT publish papers on the following topics:** Case studies; papers on food technology, food science or food chemistry; studies of primarily local interest; studies on herbs, spices or other flavouring agents, pharmaceutical agents or that compare the effects of nutrients to those of medicines, complementary medicines or other substances that are considered to be primarily medicinal agents; studies in which a nutrient or extract is not administered by the oral route (unless the specific aim of the study is to investigate parenteral nutrition); studies using non-physiological amounts of nutrients (unless the specific aim of the study is to investigate toxic effects); food contaminants.

### *In vivo and in vitro models*

Studies involving animal models of human nutrition and health or disease **will only be considered for publication** if the amount of a nutrient or combination of nutrients used could reasonably be expected to be achieved in the human population.

Studies involving in vitro models **will only be considered for publication** if the amount of a nutrient or combination of nutrients is demonstrated to be within the range that could reasonably be expected to be encountered in vivo, and that the molecular form of the nutrient or nutrients is the same as that which the cell type used in the model would encounter in vivo.

### *Extracts*

Studies involving extracts **will only be considered for publication** if the source of starting material is readily accessible to other researchers and that there are appropriate measures for quality control, that the method of extraction is described in sufficient detail with appropriate quality control measures, that the nutrient composition of the extract is characterised in detail and that there are measures to control the quality of the composition of the extract between preparations, and that the amount of extract used could reasonably be expected to be achieved in the human population (or in animals if they are the specific target of an intervention).

Studies involving extracts in in vitro models **will only be considered for publication** if the above guidelines for studies involving extracts are followed, and that the amount and molecular form of the extract is the same as that which would be encountered by the cell type used in the model in vivo.

### *Probiotics*

Studies involving probiotics may be considered provided that the primary focus of the study/review is the effects on nutrient absorption and/or metabolism.

Studies/reviews that focus primarily on probiotics per se will not be considered.

**Manuscripts submitted to BJN that are outside of the journal's scope or do not meet the above requirements will be rejected immediately.**

## REVIEW PROCESS

BJN uses a single blind review process.

As part of the online submission process, authors are asked to affirm that the submission represents original work that has not been published previously, and that it is not currently being considered by another journal. Authors must also confirm that each author has seen and approved the contents of the submitted manuscript. Finally, authors should confirm that permission for all appropriate uses has been obtained from the copyright holder for any figures or other material not in his/her copyright, and that the appropriate acknowledgement has been made to the original source.

At submission, authors are asked to nominate at least four potential referees who may then be asked by the Editorial Board to help review the work.

Manuscripts are normally reviewed by two external peer reviewers and a member of the Editorial Board.

When substantial revisions are required to manuscripts after review, authors are normally given the opportunity to do this once only; the need for any further changes should at most reflect only minor issues. If a paper requiring revision is not resubmitted within 2 months, it may, on resubmission, be deemed a new paper and the date of receipt altered accordingly.

## PUBLISHING ETHICS

BJN considers all manuscripts on the strict condition that:

1. The manuscript is your own original work, and does not duplicate any other previously published work;
2. The manuscript has been submitted only to the journal - it is not under consideration or peer review or accepted for publication or in press or published elsewhere;
3. All listed authors know of and agree to the manuscript being submitted to the journal; and
4. The manuscript contains nothing that is abusive, defamatory, fraudulent, illegal, libellous, or obscene.

The Journal adheres to the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines on research and publications ethics.

Text taken directly or closely paraphrased from earlier published work that has not been acknowledged or referenced will be considered plagiarism.

Submitted manuscripts in which such text is identified will be withdrawn from the editorial process. If a concern is raised about possible plagiarism in an article submitted to or published in BJN, this will be investigated fully and dealt with in accordance with the COPE guidelines.

## ARTICLE TYPES

BJN publishes the following: Research Articles, Review Articles, Systematic Reviews, Horizons in Nutritional Science, Workshop Reports, Invited Commentaries, Letters to the Editor, Obituaries, and Editorials.

Research Articles, Reviews, Systematic Reviews, Horizons Articles, Letters to the Editor and Workshop Reports should be submitted to <http://mc.manuscriptcentral.com/bjn>. Please contact the Editorial Office [onbjn.edoffice@cambridge.org](mailto:onbjn.edoffice@cambridge.org) regarding any other types of article.

### **Review Articles**

BJN is willing to accept critical reviews that are designed to advance knowledge, policy and practice in nutritional science. Current knowledge should be appropriately contextualised and presented such that knowledge gaps and research needs can be characterised and prioritised, or so that changes in policy and practice can be proposed along with suggestions as to how any changes can be monitored. The purpose or objective of a review should be clearly expressed, perhaps as question in the Introduction, and the review's conclusions should be congruent with the initial objective or question. Reviews will be handled by specialist Reviews Editors. Please contact the Editorial Office with any queries regarding the submission of potential review articles. All reviews, including systematic reviews and meta-analyses, should present the uncertainties and variabilities associated with the papers and data being reviewed; in particular BJN cautions against uncritical acceptance of definitions and non-specific global terminology, the advice of advisory bodies, and reference ranges for example.

- **Reviews:** These articles are written in a narrative style, and aim to critically evaluate a specific topic in nutritional science.
- **Horizons in Nutritional Science:** These are shorter than Review articles and aim to critically evaluate recent novel developments that are likely to produce substantial advances in nutritional science. These articles should be thought-provoking and possibly controversial.
- **Systematic Reviews and meta-analyses:** A systematic review or meta-analysis of randomised trials and other evaluation studies must be accompanied by a completed Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) Statement checklist, a guideline to help authors report a systematic review and meta-analysis (see *British Medical Journal* (2009) 339, b2535). Meta-analysis of observational studies must be accompanied by a completed Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) reporting checklist, indicating the page where each item is included (see *JAMA* (2000) 283, 2008-2012). Manuscripts in these areas of review will not be sent for peer review unless accompanied by the relevant completed checklist.

### **Letters to the Editor**

Letters are invited that discuss, criticise or develop themes put forward in papers published in BJN. They should not, however, be used as a means of publishing new work. Acceptance will be at the discretion of the Editorial Board, and editorial changes may be required. Wherever possible, letters from responding authors will be included in the same issue as the original article.

## DETAILED MANUSCRIPT PREPARATION INSTRUCTIONS

### **Language**

Papers submitted for publication must be written in English and should be as concise as possible. We recommend that authors have their manuscript checked by someone whose first language is English before submission, to ensure that submissions are judged at peer review exclusively on academic merit. We list a number of third-party services specialising in language editing and / or translation, and suggest that authors contact as appropriate. Use of any of these services is voluntary, and at the author's own expense.

Spelling should generally be that of the *Concise Oxford Dictionary* (1995), 9th ed. Oxford: Clarendon Press. Authors are advised to consult a current issue in order to make themselves familiar with BJN as to typographical and other conventions, layout of tables etc. Sufficient information should be given to permit repetition of the published work by any competent reader of BJN.

Published examples of BJN article types can be found below:

- Research Article

- Review Article
- Horizons Article
- Letter to the Editor

#### **Authorship**

The Journal conforms to the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) definition of authorship, as described by P.C. Calder (*Br J Nutr* (2009) **101**, 775).

The contribution of individuals who were involved in the study but do not meet these criteria should be described in the Acknowledgments section.

#### **Ethical standards**

The required standards for reporting studies involving humans and experimental animals are detailed in an Editorial by G.C. Burdge (*Br J Nutr* (2014) **112**).

#### **Experiments involving human subjects**

The notice of contributors is drawn to the guidelines in the World Medical Association (2000) Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects, with notes of clarification of 2002 and 2004 (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>), the *Guidelines on the Practice of Ethics Committees Involved in Medical Research Involving Human Subjects* (3rd ed., 1996; London: The Royal College of Physicians) and the Guidelines for the ethical conduct of medical research involving children, revised in 2000 by the Royal College of Paediatrics and Child Health: Ethics Advisory Committee (*Arch Dis Child* (2000) **82**, 177–182). Articles reporting randomised trials must conform to the standards set by the Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) consortium.

**Required disclosures:** A paper describing any experimental work on human subjects must include the following statement in the Experimental Methods section: "This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects/patients were approved by the [insert name of the ethics committee; a specific ethics number may be inserted if you wish]. Written [or Verbal] informed consent was obtained from all subjects/patients. [Where verbal consent was obtained this must be followed by a statement such as: Verbal consent was witnessed and formally recorded]." For clinical trials, the trial registry name, registration identification number, and the URL for the registry should be included.

**PLEASE NOTE:** From 1 October 2014, as a condition for publication, all randomised controlled trials that involve human subjects submitted to BJN for review must be registered in a public trials registry. A clinical trial is defined by the ICMJE (in accordance with the definition of the World Health Organisation) as any research project that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Registration information must be provided at the time of submission, including the trial registry name, registration identification number, and the URL for the registry.

#### **Experiments involving the use of other vertebrate animals**

Papers that report studies involving vertebrate animals must conform to the 'ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research' detailed in Kilkeny et al. (*J Pharmacol Pharmacother* (2010) **1**, 94-99) and summarised at [www.nc3rs.org.uk](http://www.nc3rs.org.uk). Authors must ensure that their manuscript conforms to the checklist that is available from the nc3Rs website. The attention of authors is drawn particularly to the ARRIVE guidelines point 3b ('Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology', point 9c ('Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment') and point 17a ('Give details of all important adverse events in each experimental group'). The Editors will not accept papers reporting work carried out involving procedures that cause or are considered likely to cause distress or suffering which would confound the outcomes of the experiments, or experiments that have not been reviewed and approved by an animal experimentation ethics committee or regulatory organisation.

**Required disclosures:** Where a paper reports studies involving vertebrate animals, authors must state in the Experimental Methods section the institutional and national guidelines for the care and use of animals that were followed and that all experimental procedures involving animals were approved by the [insert name of the ethics committee or other approving body; wherever possible authors should also insert a specific ethics/approval number].

#### **Manuscript Format**

The requirements of BJN are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the ICMJE. Typescripts should be prepared with 1.5 line spacing and wide margins (2 cm), the preferred font being Times New Roman size 12. At the ends of lines, words should not be hyphenated unless hyphens are to be printed. **Line numbering and page numbering are required.**

Manuscripts should be organised as follows:

#### **Cover letter**

Papers should be accompanied by a cover letter including a brief summary of the work and a short explanation of how it advances nutritional science. The text for the cover letter should be entered in the appropriate box as part of the online submission process.

#### **Title Page**

The title page should include:

1. The title of the article;
2. Authors' names;
3. Name and address of department(s) and institution(s) to which the work should be attributed for each author;
4. Name, mailing address, email address, telephone and fax numbers of the author responsible for correspondence about the manuscript;
5. A shortened version of the title, not exceeding 45 characters (including letters and spaces) in length;
6. At least four keywords or phrases (each containing up to three words).

Authors' names should be given without titles or degrees and one forename may be given in full. Identify each author's institution by a superscript number (e.g. A.B. Smith<sup>1</sup>) and list the institutions underneath and after the final author.

#### **Abstract**

Each paper must open with an unstructured abstract of **not more than 250 words**. The abstract should be a single paragraph of continuous text without subheadings outlining the aims of the work, the experimental approach taken, the principal results (including effect size and the results of statistical analysis) and the conclusions and their relevance to nutritional science.

#### **Introduction**

It is not necessary to introduce a paper with a full account of the relevant literature, but the introduction should indicate briefly the nature of the question asked and the reasons for asking it. It should be **no longer than two manuscript pages**.

#### **Experimental methods**

The methods section must include a subsection that describes the methods used for statistical analysis (see the section on statistical analysis in the Appendix) and the sample size must be justified by the results of appropriate calculations and related to the study outcomes.

For studies involving humans subjects or experimental animals, the Methods section must include a subsection that reports the appropriate ethical approvals for the study (see Ethical Standards above).

All analytical procedures must be accompanied by a statement of within and between assay precision.

*Diets:* The nutrient composition of diets used in studies published in BJN must be described in detail, preferably in a table(s). Experimentally relevant differences in composition between diets are essential. For instance, studies of fat nutrition should always include fatty acid compositions of all diets.

*PCR analysis:* Where experiments involve measurement of mRNA including microarray analysis, for analysis of individual genes, mRNA should be measured by quantitative RTPCR. A statement about the quality and integrity of the RNA must be provided together with the results of electrophoretic analysis of the purity of the PCR products. Unless published elsewhere, full details of the oligonucleotide primers and of the PCR protocol must be stated either in the text or in Supplementary Material. The stability of reference genes used for normalisation of PCR data must be reported for the experimental conditions described. Where possible, analysis of mRNA levels should be accompanied by assessment of either protein levels or activities.

*Microarray analysis:* Studies involving microarray analysis of mRNA must conform to the "Minimum Information about a Microarray Experiment" (MIAME) guidelines including deposition of the raw data in an appropriate repository (the Access Code must be stated in the Methods). All microarray experiments must be accompanied by appropriate validation by quantitative RTPCR.

#### **Results**

These should be given as concisely as possible, using figures or tables as appropriate. Data must not be duplicated in tables and figures.

#### **Discussion**

While it is generally desirable that the presentation of the results and the discussion of their significance should be presented separately, there may be occasions when combining these sections may be beneficial. Authors may also find that additional or alternative sections such as 'conclusions' may be useful. The discussion should be **no longer than five manuscript pages**.

#### **Acknowledgments**

Here you may acknowledge individuals or organizations that provided advice and/or support (non-financial). Formal financial support and funding should be listed in the following section.

#### **Financial Support**

Please provide details of the sources of financial support for all authors, including grant numbers. For example, "This work was supported by the Medical research Council (grant number XXXXXX)". Multiple grant numbers should be separated by a comma and space, and where research was funded by more than one agency the different agencies should be separated by a semi-colon, with "and" before the final funder. Grants held by different authors should be identified as belonging to individual authors by the authors' initials. For example, "This work was supported by the Wellcome Trust (A.B., grant numbers XXXX, YYYY), (C.D., grant number ZZZZ); the Natural Environment Research Council (E.F., grant number FFFF); and the National Institutes of Health (A.B., grant number GGGG), (E.F., grant number HHHH)".

This disclosure is particularly important in the case of research that is supported by industry. Support from industry not only includes direct financial support for the study but also support in kind such as provision of medications, equipment, kits or reagents without charge or at reduced cost and provision of services such as statistical analysis; all such support must be disclosed here and if no such support was received this must be stated. Where no specific funding has been provided for research, please provide the following statement: "This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors."

In addition to the source of financial support, please state whether the funder contributed to the study design, conduct of the study, analysis of samples or data, interpretation of findings or the preparation of the manuscript. If the funder made no such contribution, please provide the following statement:

"[Funder's name] had no role in the design, analysis or writing of this article."

#### **Conflict of Interest**

Please provide details of all known financial, professional and personal relationships with the potential to bias the work. Where no known conflicts of interest exist, please include the following statement: "None."

For more information on what constitutes a conflict of interest, please see the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) guidelines.

#### **Authorship**

Please provide a very brief description of the contribution of each author to the research. Their roles in formulating the research question(s), designing the study, carrying it out, analysing the data and writing the article should be made plain.

#### **References**

References should be numbered consecutively in the order in which they first appear in the text using superscript Arabic numerals in parentheses, e.g. 'The conceptual difficulty of this approach has recently been highlighted<sup>(1,2)</sup>'. If a reference is cited more than once, the same number should be used each time. References cited only in tables and figure legends should be numbered in sequence from the last number used in the text and in the order of mention of the individual tables and figures in the text.

Names and initials of authors of unpublished work should be given in the text as 'unpublished results' and not included in the References. References that have been published online only but not yet in an issue should include the online publication date and the Digital Object Identifier (doi) reference, as per the example below.

At the end of the paper, on a page(s) separate from the text, references should be listed in numerical order using the Vancouver system. When an article has more than three authors only the names of the first three authors should be given followed by '*et al.*' The issue number should be omitted if there is continuous pagination throughout a volume. Titles of journals should appear in their abbreviated form using the NCBI LinkOut page. References to books and

monographs should include the town of publication and the number of the edition to which reference is made. References to material available on websites should follow a similar style, with the full URL included at the end of the reference, as well as the date of the version cited and the date of access.

Examples of correct forms of references are given below.

#### Journal articles

1. Rebello SA, Koh H, Chen C *et al.* (2014) Amount, type, and sources of carbohydrates in relation to ischemic heart disease mortality in a Chinese population: a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* **100**, 53-64.
2. Villar J, Ismail LC, Victora CG *et al.* (2014) International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet* **384**, 857-868.
3. Alonso VR & Guarner F (2013) Linking the gut microbiota to human health. *Br J Nutr* **109**, Suppl. 2, S21-S26.
4. Bauserman M, Lokangaka A, Gado J *et al.* A cluster-randomized trial determining the efficacy of caterpillar cereal as a locally available and sustainable complementary food to prevent stunting and anaemia. *Public Health Nutr.* Published online: 29 January 2015. doi: 10.1017/S1368980014003334.

#### Books and monographs

1. Bradbury J (2002) Dietary intervention in edentulous patients. PhD Thesis, University of Newcastle.
2. Ailhaud G & Hauner H (2004) Development of white adipose tissue. In *Handbook of Obesity. Etiology and Pathophysiology*, 2nd ed., pp. 481-514 [GA Bray and C Bouchard, editors]. New York: Marcel Dekker.
3. Bruinsma J (editor) (2003) *World Agriculture towards 2015/2030: An FAO Perspective*. London: Earthscan Publications.
4. World Health Organization (2003) *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases*. Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series no. 916. Geneva: WHO.
5. Keiding L (1997) *Astma, Allergi og Anden Overfølsomhed i Danmark – Og Udviklingen 1987–1991 (Asthma, Allergy and Other Hypersensitivities in Denmark, 1987–1991)*. Copenhagen, Denmark: Dansk Institut for Klinisk Epidemiologi.

#### Sources from the internet

1. Nationmaster (2005) HIV AIDS – Adult prevalence rate. [http://www.nationmaster.com/graph-T/hea\\_hiv\\_aid\\_adu\\_pre\\_rat](http://www.nationmaster.com/graph-T/hea_hiv_aid_adu_pre_rat) (accessed June 2013).

#### Figures

Figures should be supplied as separate electronic files. Figure legends should be grouped in a section at the end of the manuscript text. Each figure should be clearly marked with its number and separate panels within figures should be clearly marked (a), (b), (c) etc. so that they are easily identifiable when the article and figure files are merged for review. Each figure, with its legend, should be comprehensible without reference to the text and should include definitions of abbreviations. The nature of the information displayed in the figures (e.g. mean (SEM)) and the statistical test used must be stated.

We recommend that only TIFF, EPS or PDF formats are used for electronic artwork. Other non-preferred but usable formats are JPG, PPT and GIF files and images created in Microsoft Word. Note that these non-preferred formats are generally NOT suitable for conversion to print reproduction. For further information about how to prepare your figures, including sizing and resolution requirements, please see our artwork guide.

In curves presenting experimental results the determined points should be clearly shown, the symbols used being, in order of preference, ○, ●, △, ▲, □, ■, ×, +. Curves and symbols should not extend beyond the experimental points. Scale-marks on the axes should be on the inner side of each axis and should extend beyond the last experimental point. Ensure that lines and symbols used in graphs and shading used in histograms are large enough to be easily identified when the figure size is reduced to fit the printed page. Statistically significant effects should be indicated with symbols or letters.

Colour figures will be published online free of charge, and there is a fee of £350 per figure for colour figures in the printed version. If you request colour figures in the printed version, you will be contacted by CCC-Rightlink who are acting on our behalf to collect colour charges. Please follow their instructions in order to avoid any delay in the publication of your article.

Images submitted with a manuscript should be minimally processed; some image processing is acceptable (and may be unavoidable), but the final image must accurately represent the original data. Grouping or cropping of images must be identified in the legend and indicated by clear demarcation. Please refer to the Office of Research Integrity guidelines on image processing in scientific publication. Authors should provide sufficient detail of image-gathering procedures and process manipulation in the Methods sections to enable the accuracy of image presentation to be assessed. Authors should retain their original data, as Editors may request them for comparison during manuscript review.

#### Tables

Tables should be placed in the main manuscript file at the end of the document, not within the main text. Be sure that each table is cited in the text. Tables should carry headings describing their content and should be comprehensible without reference to the text. Tables should not be subdivided by ruled lines. The dimensions of the values, e.g. mg/kg, should be given at the top of each column. Separate columns should be used for measures of variance (SD, SE etc.), the ± sign should not be used. The number of decimal places used should be standardized; for whole numbers 1.0, 2.0 etc. should be used. Shortened forms of the words weight (wt) height (ht) and experiment (Expt) may be used to save space in tables, but only Expt (when referring to a specified experiment, e.g. Expt 1) is acceptable in the heading.

Footnotes are given in the following order: (1) abbreviations, (2) superscript letters, (3) symbols. Abbreviations are given in the format: RS, resistant starch. Abbreviations in tables must be defined in footnotes in the order that they appear in the table (reading from left to right across the table, then down each column). Symbols for footnotes should be used in the sequence: \*†‡§||¶, then \*\* etc. (omit \* or †, or both, from the sequence if they are used to indicate levels of significance).

For indicating statistical significance, superscript letters or symbols may be used. Superscript letters are useful where comparisons are within a row or column and the level of significance is uniform, e.g. <sup>a,b,c</sup>Mean values within a column with unlike superscript letters were significantly different ( $P < 0.05$ ). Symbols are useful for indicating significant differences between rows or columns, especially where different levels of significance are found, e.g. <sup>a</sup>Mean values were significantly different from those of the control group: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ '. The symbols used for  $P$  values in the tables must be consistent.

#### Supplementary material

Additional data (e.g. data sets, large tables) relevant to the paper can be submitted for publication online only, where they are made available via a link from the paper. The paper should stand alone without these data. Supplementary Material must be cited in a relevant place in the text of the paper. Although Supplementary Material is peer reviewed, it is not checked, copyedited or typeset after acceptance and it is loaded onto the journal's website exactly as supplied. You should check your Supplementary Material carefully to ensure that it adheres to journal styles. Corrections cannot be made to the Supplementary Material after acceptance of the manuscript. Please bear this in mind when deciding what content to include as Supplementary Material.

## COPYRIGHT

Authors or their institutions retain copyright of papers published in BJN. The corresponding author should complete a License to Publish form on behalf of all authors, and upload this with the manuscript files **at the time of submission**. If the manuscript is not accepted, the form will be destroyed.

## OPEN ACCESS

Authors in BJN have the option to publish their paper under a fully Open Access agreement, upon payment of a one-off Article Processing Charge. In this case, the final published Version of Record will be made freely available to all in perpetuity under a creative commons license, enabling its re-use and re-distribution. This Open Access option is only offered to authors upon acceptance of an article for publication.

Authors choosing the Open Access option are required to complete the Open Access License to Publish form. More information about Open Access in BJN, including the current Article Processing Charge, can be found on our website.

## PROOFS

PDF proofs are sent to authors in order that they make sure that the paper has been correctly set up in type. Only changes to errors induced by typesetting/copy-editing or typographical errors will be accepted.

Corrected proofs should be returned within 2 days by email to:

Emma Pearce  
Production Editor  
Cambridge University Press  
Telephone: +44 1223 325032  
Fax: +44 1223 325802  
Email: [bjnproduction@cambridge.org](mailto:bjnproduction@cambridge.org)

If corrected proofs are not received from authors within 7 days the paper may be published as it stands.

## OFFPRINTS

A PDF file of the paper will be supplied free of charge to the corresponding author of each paper, and offprints may be ordered on the order form sent with the proofs.

## CONTACT

Prospective authors may contact the Editorial Office directly on +44 (0) 1223 325977 (telephone) or [orbjn.edoffice@cambridge.org](mailto:orbjn.edoffice@cambridge.org).

## ANEXO C – Laudo de análise do Chá verde



Pharmanostra®

## CERTIFICADO DE ANÁLISE

ISUMO:		CHA VERDE 50 %		Pág 1	
RIGEM/PROCEDÊNCIA:		CHINA/CHINA	DATA DE ANÁLISE:		06/06/2014
OTE PHARMA NOSTRA:		14031670C	LOTE FABRICANTE:		CMLC20131125
ATA DE FABRICAÇÃO:		Novembro/2013	DATA DE VALIDADE:		Novembro/2016
ONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM: TEMPERATURA AMBIENTE					
BS 1: Nome Comum: Chá Verde					
BS 2: Nome Científico: Camellia sinensis					
BS 3: Parte Utilizada: Folha					
ATA DE EMISSÃO:		27/08/2014	NF: 6-043.111	ORDEM FRACIONAMENTO: 3508-14	
TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	REFERÊNCIAS		
escrição*	Pó fino marrom amarelado, com odor característico	Pó fino marrom amarelado, com odor característico	Fabricante		
entificação	HPTLC	Conforme	Fabricante		
arda por dessecação*	≤ 5,0% (peso constante/105°C)	2,10%	Fabricante		
inzas totais*	≤ 10,0%	0,97%	Fabricante		
ranulometria	≥ 95% passa malha 80	Conforme	Fabricante		
rsênico	≤ 2,0 mg/kg	0,0785 mg/kg	Fabricante		
umbo	≤ 3,0 mg/kg	0,1093 mg/kg	Fabricante		
ensidade aparente*	Com compactação 60 - 90 g/100mL Sem compactação 40 - 60 g/100mL	63 g/100mL 46 g/100mL	Fabricante Fabricante		
ádio	≤ 1,0 mg/kg	< 0,01 mg/kg	Fabricante		
ercúrio	≤ 0,1 mg/kg	0,0279 mg/kg	Fabricante		
olventes residuais*	Metanol ≤ 3000 ppm Etanol ≤ 5000 ppm	98,97 ppm 162,49 ppm	Fabricante		
or*	Polifenóis ≥ 50%	55,76%	Fabricante		
esticidas residuais	Conforme	Conforme	Fabricante		
TESTES MICROBIOLÓGICOS					
ontagem total de bactérias*	≤ 10000 UFC/g	< 10 UFC/g	Fabricante		
ungos e leveduras*	≤ 1000 UFC/g	< 10 UFC/g	Fabricante		
scherichia coli*	Negativo	Negativo	Fabricante		
almonella*	Negativo	Negativo	Fabricante		

Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA, E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

Solvente de extração: Etanol e água

LEGENDA DAS REFERÊNCIAS: FB (Farmacopeia Brasileira) / USP (United States Pharmacopoeia) / EP (European Pharmacopoeia) / BP (British Pharmacopoeia) / JP (Japanese Pharmacopoeia) / MG (Método Geral farmacopeico) / Fabricante (especificação e metodologia conforme o fabricante do sumo) / Informativo (resultado fornecido como informativo pelo LCQ SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA).

CONCLUSÃO: ( X ) Aprovado ( ) Reprovado

Responsável pelo Lab. Controle de Qualidade  
João Paulo Sarin Mendes - CRF-GO: 7355

Responsável Técnico  
Rodrigo Molinari Elias - CRF-GO Nº 3234

## ANEXO D – Laudo de análise da Metformina

C E R T I F I C A D O   D E   A N A L I S E  
#####

PRODUTO.: METFORMINA HCL  
 FABRIC.: 01/03/13      PROCED.: INDIA  
 VALIDADE.: 28/02/18      ORIGEM.: INDIA  
 LOTE FAB/INTERNO.: MET/C/13030443  
 EMISSAO.: 09/10/14  
 N.FISCAL.: 000068487

NOME DO PRODUTO: METFORMINA HCL  
 FORMULA MOLECULAR: C4H11N5 HCL  
 PESO MOLECULAR: 165.6  
 CAT. TEAPEUTICA: HIPOGLICEMIANTE  
 FATOR DE CORRECAO: 1.0081  
 DENSIDADE: 0.5390 g/mL  
 D.C.B.: 05782  
 CAS: 1115-70-4  
 FABRICANTE: ABHILASH CHEMICALS

BOLETIM DE ANALISE: 778/14      DATA DE ANALISE: 25/04/14      No OF: 7.973/14

TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
ASPECTO FISICO:	PO/CRISTAIS BRANCO (s)	DE ACORDO
SOLUBILIDADE:	LIVREMENTE SOLUVEL EM AGUA, POUCO SOLUVEL EM ALCOOL	DE ACORDO
IDENTIFICACAO:	IR/CLORETO/PONTO DE FUSAO/TLC/ *COLORIMETRIA	DE ACORDO
PONTO DE FUSAO:	222oC A 226oC	224.9oC
APARENCIA SOLUCAO:	LIMPIDA E INCOLOR	DE ACORDO
SUBS.RELATADAS (HPLC):	CIANOGUANIDINA MAX.0.02%	0.011%
	QUALQUER OUTRA IMPUREZA MAX.0,1%	0.036%
	TOTAL MAX.0.5%	0.067%
METAIS PESADOS:	MAX. 10 PPM	< 10 PPM
PERDA POR SECAGEM:	MAX. 0.5%	0.36%
CINZAS SULFATADAS:	MAX. 0.1%	0.07%
DOSEAMENTO:	98.5% A 101% (B.A.)	99.20%
+*TAMANHO DA	100% PASSA EM 14 MESH	DE ACORDO
PARTICULA:	90% PASSA EM 20 MESH	DE ACORDO
	APROX. 70% PASSA EM 40 MESH	DE ACORDO

OBS.: RESULTADOS DE ACORDO COM ANALISES REALIZADAS NO LABORATORIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GEMINI (EP 6.0).  
 \* RESULTADO TRANSCRITO DO LAUDO DE ANALISE DO FABRICANTE (BP 2012).  
 + TESTE ADICIONAL DO FABRICANTE.  
 DISPOSICAO: APROVADO

Dra LUCIANA PEREIRA  
 FARM. RESP. CRM-GO 2400

=====

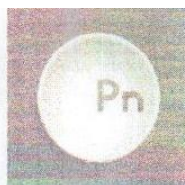
SERVICO DE ATENDIMENTO GEMINI - [gemini@geminifarmaceutica.ind.br](mailto:gemini@geminifarmaceutica.ind.br) 0800105008

=====

**GEMINI**

Rua Faustino Negri, 285 - Galpão 05 - São Bernardo do Campo - SP - Brasil  
 CEP: 09851-720 - Telefone: (0xx11) 2067-5600  
 V.P. - 4D, Quadra 08, Módulo 01 e 02, DAIA - Anápolis - GO - Brasil  
 CEP: 75132-105 - Telefone: (0xx62) 3701-5460  
[www.geminifarmaceutica.ind.br](http://www.geminifarmaceutica.ind.br)

## ANEXO E – Laudo de análise da Celulose (Placebo)




Pharma Nostra®

## CERTIFICADO DE ANÁLISE

INSUMO:		CELULOSE MICROCRISTALINA 101		Pág 1	
ORIGEM/PROCEDÊNCIA:		TAIWAN/BRASIL	DATA DE ANÁLISE:		10/07/2014
LOTE PHARMA NOSTRA:		14031307E	LOTE FABRICANTE:		C1312035
DATA DE FABRICAÇÃO:		Dezembro/2013	DATA DE VALIDADE:		Dezembro/2016
DCB:		09371	CAS:		9004-34-6
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM: TEMPERATURA AMBIENTE					
OBS 1: FM: (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub> /n=220					
OBS 2: PM: 36000					
DATA DE EMISSÃO:		27/08/2014	NF:	6-043.111	ORDEM FRACIONAMENTO: 3323-14
TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	REFERÊNCIAS		
Descrição*	Pó fino branco ou quase branco	Pó fino quase branco	USP - 36		
Identificação*	Colorimétrico: a substância assume uma cor violeta-azul	Conforme	USP - 36		
Solubilidade*	Praticamente insolúvel em solução de hidróxido de sódio (1:20) ; Insolúvel em água, em ácidos diluídos e na maioria de solventes orgânicos	Conforme	USP - 36		
pH*	5,0 - 7,5 (Solução 12,5% em água)	6,4	USP - 36		
Perda por dessecação*	≤ 7,0% (3 horas / 105°C)	2,90%	USP - 36		
Metais pesados*	≤ 10 ppm	< 10 ppm	USP - 36		
Resíduo por ignição*	≤ 0,1%	0,05%	USP - 36		
Substâncias Solúveis em Água*	≤ 12,5 mg (0,25%)	0,07%	USP - 36		
Substâncias Solúveis em Éter*	≤ 5,0 mg (0,05%)	0,01%	USP - 36		
Condutividade	≤ 75,0 µs/cm	37,2 µs/cm	USP - 36		
Densidade aparente*	0,26 - 0,34 g/mL	0,34 g/mL	USP - 36		
Distribuição do tamanho da partícula	D10: ≤ 30 µm D50: 40 - 60 µm D90: ≥ 80 µm	21 µm 50 µm 94 µm	USP - 36		
Solvente residual	Nenhum solvente é usado no processo de fabricação	Conforme	USP - 36		
Granulometria*	≤ 1,0% passa na malha 60 ≤30,0% passa na maha 200	0% 10,82%	USP - 36		
TESTES MICROBIOLÓGICOS					
Contagem total de bactérias*	≤ 1000 UFC/g	< 10 UFC/g	USP - 36		
Fungos e leveduras*	≤ 100 UFC/g	< 10 UFC/g	USP - 36		
Staphylococcus aureus*	Ausente	Ausente	USP - 36		
Pseudomonas aeruginosa*	Ausente	Ausente	USP - 36		
Escherichia coli*	Ausente	Ausente	USP - 36		
Salmonella sp*	Ausente	Ausente	USP - 36		

Continua na pág. 2...

  
 Responsável pelo Lab. Controle de Qualidade  
 João Paulo Sartin Mendes - CRF -GO: 7355

  
 Responsável Técnico  
 Rodrigo Molinari Elias - CRF-GO Nº 3234