

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**PAPEL PROTETOR DOS CHÁS PROVENIENTES  
DA *CAMELLIA SINENSIS* SOBRE ATIVIDADE DA  
ENZIMA  $\delta$ -ALA-D DE TECIDO OVARIANO  
INIBIDA PELO CÁDMIO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Melina Bucco Soares**

**Uruguaiana, RS, Brasil**

**2014**

**MELINA BUCCO SOARES**

**PAPEL PROTETOR DOS CHÁS PROVENIENTES DA *CAMELLIA  
SINENSIS* SOBRE ATIVIDADE DA ENZIMA  $\delta$ -ALA-D DE TECIDO  
OVARIANO INIBIDA PELO CÁDMIO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Francielli Weber  
Santos Cibin

**Uruguaiana**

**2014**

**MELINA BUCCO SOARES**

**PAPEL PROTETOR DOS CHÁS PROVENIENTES DA *CAMELLIA SINENSIS*  
SOBRE ATIVIDADE DA ENZIMA  $\delta$ -ALA-D DE TECIDO OVARIANO  
INIBIDA PELO CÁDMIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Dissertação defendida e aprovada em: 22 de fevereiro de 2014.  
Banca examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Francielli Weber Santos Cibir  
Orientadora  
(UNIPAMPA)

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Simone Noremborg  
(UNIPAMPA)

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Marina Prigol  
(UNIPAMPA)

## AGRADECIMENTO

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Paulo e Izabel, e meu irmão, Pablo, por todo suporte emocional, pelo carinho, pelos telefonemas, por acreditarem em mim e tornar esse sonho realidade. Mais uma etapa que está sendo concluída e tudo devo a vocês.

A minha mãe científica, orientadora e amiga, Francielli, por todo apoio, carinho incentivo, paciência. Fran, tu me ensinou mais que ser uma pesquisadora, me ensinou a ser uma pessoa melhor, por todos os exemplos que me deu.

Agradecer ao Biotech, pela ajuda, pelas risadas e pelo companheirismo. Mais que um laboratório eficiente, é uma família. Aos mais novos Amanda, Gabriel, Flávio, Natasha, Suzi, Mariane, Poty, Duda que estão sempre prontos para qualquer coisa. Como também aos de mais longo tempo, Cris (por tantas ajudas, socorros prestados, caronas... sempre pronto para ajudar), Laura e Aryele.

Laurinha e Ary! Gurias, começamos juntas essa jornada, vencemos, aprendemos, erramos juntas (mais aprendizagem que erros). Tenho certeza que a pesquisa nos uniu e fortaleceu nossa amizade. Muito obrigada por tudo!

Ao Vine, pelo incentivo, pelo carinho, amor e por sempre me apoiar, mesmo que isso significasse minha ausência e minhas loucuras (Obrigada também por cuidar do Joey). A família Silva que se tornou minha família emprestada de Uruguaiana. Obrigada pelo apoio de todos, e claro, pelos churrascos e cervejadas.

Agradecer imensamente a Deus, por esse sonho realizado, por todas as conquistas que obtive e pelas pessoas que estiveram e estão no meu caminho.

MUITO OBRIGADA!

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal  
Fundação Universidade Federal do Pampa

### **PAPEL PROTETOR DOS CHÁS PROVENIENTES DA *CAMELLIA SINENSIS* SOBRE ATIVIDADE DA ENZIMA $\delta$ -ALA-D DE TECIDO OVARIANO INIBIDA PELO CÁDMIO**

AUTOR: Melina Bucco Soares

ORIENTADORA: Francielli Weber Santos Cibirin

Data e Local da Defesa: 22 de fevereiro de 2014, Uruguaiana.

A  $\delta$ -Aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D) é uma enzima tiólica que catalisa uma das reações iniciais da biossíntese do heme. Essa enzima é considerada um marcador proteico de intoxicação com metais. O cádmio é um dos poluentes tóxicos, amplamente distribuído no meio ambiente, sendo que a exposição humana resulta principalmente da fumaça do cigarro, da poluição do ar e do consumo de alimentos e água contaminados pelo metal. O cádmio apresenta uma baixa taxa de excreção no organismo e um elevado tempo de meia-vida biológico e por esta razão, se acumula no sangue, rins e fígado, bem como nos órgãos reprodutivos, incluindo o ovário. A patogênese do dano ovariano e a redução da viabilidade folicular após exposição ao cádmio tem sido associada a danos oxidativos. Assim, compostos antioxidantes poderiam ser uma terapia alternativa frente a toxicidade do cádmio. O presente estudo avalia o efeito protetor da *Camellia sinensis* (chás verde, branco e vermelho) sobre a inibição da atividade da  $\delta$ -ALA-D ovariana induzida pelo cádmio *in vitro* (ovário bovino) e *ex vivo* (ovário de camundonga). O efeito do cloreto de cádmio (IC<sub>50</sub>, 20  $\mu$ M), das infusões de chás (0,07 – 10 mg/mL) e das catequinas isoladamente –epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG), epigalocatequina galato (EGCG) - foram avaliadas sobre a atividade da  $\delta$ -ALA-D de ovário bovino (*in vitro*). Além disso, a composição das infusões de chá foi avaliada por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) em um ensaio quantitativo de catequinas, alcalóides purina e ácido gálico, bem como o conteúdo de polifenóis totais. Os chás verde e branco nas maiores concentrações estudadas restauraram a atividade da  $\delta$ -ALA-D inibida pelo cádmio enquanto o chá vermelho não apresentou efeito *in vitro*. O chá verde apresenta maior quantidade de conteúdo fenólico (757,24  $\mu$ g EAG/mL) bem como de catequinas (EGCG = 205,64  $\mu$ g/mL, EC = 84,59  $\mu$ g/mL, EGC = 75,53  $\mu$ g/mL, ECG = 64,73  $\mu$ g/mL) comparado

com o chá branco (499,37  $\mu\text{g}$  EAG/mL) (EGCG = 105,57  $\mu\text{g/mL}$ , EC = 54,73  $\mu\text{g/mL}$ , EGC = 81,96  $\mu\text{g/mL}$ , ECG = 34,25  $\mu\text{g/mL}$ ) e com o chá vermelho (272,39  $\mu\text{g}$  EAG/mL) (só foi detectado ECG= 1,36  $\mu\text{g/mL}$ ). Nenhuma das catequinas testadas isoladamente foi eficaz em restaurar a atividade da enzima inibida pelo cádmio. Para os experimentos *ex vivo*, camundongas receberam uma única administração nas doses de 2,5 mg/kg e 5 mg/kg de  $\text{CdCl}_2$  por via intraperitoneal e chá verde (250 mg/kg) administrado via oral. Verificou-se que a exposição aguda ao cádmio nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg inibiu (cerca de 26% e 33%, respectivamente) a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D de ovário de camundongas e o chá verde foi capaz de restaurar essa inibição. O maior efeito do chá verde observado *in vitro*, bem como o papel protetor apresentado no estudo *ex vivo*, poderia ser atribuído ao maior teor de fenóis, mas não de catequinas. Na verdade, as catequinas não foram capazes de restaurar a atividade da enzima inibida por cádmio, demonstrando que estes compostos não são os principais componentes responsáveis pelo efeito benéfico do chá verde observada neste estudo. Esse estudo demonstrou a eficácia do chá verde em restaurar a atividade da  $\delta$ -ALA-D inibida pelo cádmio em tecido ovariano.

**Palavras-chave:** Cádmio,  $\delta$ -ALA-D, Ovário, *Camellia sinensis*, Catequinas.

**ABSTRACT**

Dissertation of Master's Degree  
Program of Post-Graduation in Animal Science  
Federal University of Pampa

**PROTECTIVE ROLE OF THE *CAMELLIA SINENSIS* TEAS ON OVARIAN  $\delta$ -ALA-D ENZYME ACTIVITY INHIBITED BY CADMIUM**

AUTHOR: MELINA BUCCO SOARES  
ADVISOR: FRANCIELLI WEBER SANTOR CIBIN  
Date and Place of Defense: Uruguaiiana, February 22, 2014.

$\delta$ -aminolevulinatase ( $\delta$ -ALA-D) is a thiol enzyme that catalyzes one of the initial reactions of heme biosynthesis. This enzyme is considered a marker protein for metal poisoning. Cadmium is a toxic pollutant, widely distributed in the environment, and human exposure results mainly from cigarette smoke, air pollution and consumption of food and water contaminated by the metal. Cadmium has a low excretion rate of the organism and high biological half-life and for this reason it accumulates in the blood, kidney and liver as well as on reproductive organs including the ovaries. The pathogenesis of ovarian follicular damage and reduction of viability after exposure to cadmium has been associated with oxidative damage. Thus, antioxidant compounds may be an alternative therapy against cadmium toxicity. The present study evaluates the protective effect of *Camellia sinensis* (green, white and red teas) on the inhibition of ovarian  $\delta$ -ALA-D activity induced by cadmium *in vitro* and *ex vivo*. The effect of cadmium chloride (IC<sub>50</sub> 20 $\mu$ M), tea infusions (0.07 to 10 mg/ml) and individual catechins – epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG) - were evaluated on bovine ovaries  $\delta$ -ALA-D activity (*in vitro*). Furthermore, the composition of tea infusions was measured on a HPLC quantitative assay of catechins, gallic acid and purine alkaloids, and the content of total polyphenols was measured by Folin–Ciocalteu method. The green and white teas, at the highest concentrations studied, restored the  $\delta$ -ALA-D activity inhibited by cadmium while red tea had no effect *in vitro*. Green tea has higher amount of phenolic content ( 757.24 mg GAE/mL ) and catechins (EGCG = 205.64  $\mu$ g/mL; EC = 84.59  $\mu$ g/mL; EGC = 75.53  $\mu$ g/mL; ECG = 64.73  $\mu$ g/mL) compared with white tea ( 499.37 mg GAE/mL ) (EGCG = 105.57  $\mu$ g/mL; EC = 54.73  $\mu$ g/mL; EGC = 81.96  $\mu$ g/mL; ECG = 34.25  $\mu$ g/mL) and red tea (272.39 mg GAE/mL) ( only detected ECG = 1.36  $\mu$ g/mL).

None of the tested catechins alone was effective in restoring the enzyme activity inhibited by cadmium. For the *ex vivo* experiments, mice received a single administration of CdCl<sub>2</sub>, at doses of 2.5 mg/kg and 5 mg/kg intraperitoneally, and green tea (250 mg/kg) administered orally. We found that acute exposure to cadmium at doses of 2.5 and 5 mg/kg inhibited (about 26% and 33%, respectively)  $\delta$ -ALA-D activity of mice ovaries, and green tea was able to restore this inhibition. The greater effect observed *in vitro* by green tea as well as the protective role presented at the *ex vivo* study, could be attributed to the higher phenols content, but not catechins. In fact, the catechins were not able to restore the enzyme activity inhibited by cadmium, demonstrating that these compounds are not the key components responsible for the beneficial effect of green tea observed in this study. This study demonstrated the effectiveness of green tea in restoring the  $\delta$ -ALA-D activity inhibited by cadmium in ovarian tissue.

**Key-words:** Cadmium,  $\delta$ -ALA-D, Ovary, *Camellia sinensis*, Catechins.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão Bibliográfica

<b>Figura 1.</b> Estabilização dos grupos tióis vicinais pelo Zinco.	16
<b>Figura 2.</b> Síntese do porfobilinogênio a partir de duas moléculas do ácido aminolevulínico	17
<b>Figura 3.</b> Etapas do processamento de diferentes tipos de chá ( <i>Camellia sinensis</i> )	22
<b>Figura 4.</b> Estruturas das principais catequinas do chá verde	24

### Artigo

<b>Figure 1</b> – Effect of green tea on cadmium-induced ovary d-ALA-D inhibition	30
<b>Figure 2</b> – Effect of red tea on cadmium-induced ovary d-ALA-D inhibition	31
<b>Figure 3</b> – Effect of white tea on cadmium-induced ovary d-ALA-D inhibition	31
<b>Figure 4</b> – Effect of green tea on cadmium-induced alterations in ovary d-ALA-D activity of cadmium-exposed mice	32

## LISTA DE TABELAS

### Artigo

<b>Tabela 1</b> – Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) of catechins, purine alkaloids and gallic acid in infusions of green tea, white tea and red tea. Data obtained by HPLC analyses and in comparison to the standard references solution.	32
<b>Tabela 2</b> – Effect of catechins on cadmium-induced ovary d-ALA-D inhibition in vitro.	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**CAT** - Catalase

**Cd<sup>2+</sup>** - Cádmió

**EC** - (-)-epicatequina

**ECG** - (-)-epicatequina-3-gallato

**EGC** - (-)-epigallocatequina

**EGCG** - (-)-epigallocatequina-3-gallato

**ERO** – Espécies Reativas de Oxigênio

**GPx** – Glutathione Peroxidase

**GR** – Glutathione Redutase

**GST** – Glutathione S-transferase

**HPLC**- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês High-performance liquid chromatography)

**IARC** - Agência de Pesquisa sobre o Câncer

**-SH** – Grupos tiólicos

**SOD** – Superóxido dismutase

**Zn** – Zinco

**δ-ALA** - Ácido δ-aminolevulínico

**δ-ALA-D** - δ-Aminolevulinato desidratase

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>X</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
2.1 $\delta$ -ALA-D .....	<b>16</b>
2.2 Cádmio .....	<b>19</b>
2.3 <i>Camellia sinensis</i> .....	<b>21</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
3.1 <b>Objetivo Geral</b> .....	<b>26</b>
3.2 <b>Objetivos específicos</b> .....	<b>26</b>
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>27</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>28</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>28</b>
<b>2. Methods and Materials</b> .....	<b>29</b>
2.1. Chemicals .....	<b>29</b>
2.2. Herbal materials .....	<b>29</b>
2.3. The in vitro effect of cadmium and teas infusions on cow ovary d-ALA-D activity .....	<b>29</b>
2.3.1. Sample .....	<b>29</b>
2.3.2. Enzyme assay .....	<b>29</b>
2.3.2.1. Effect of teas infusions on cow ovary d-ALA-D activity in the presence of cadmium. ....	<b>29</b>
2.4. <i>Determination of total polyphenols content</i> .....	<b>29</b>
2.5. <i>HPLC analysis of the catechins, purine alkaloids and gallic acid in standard mixtures and tea infusion samples</i> .....	<b>29</b>
2.6. The in vitro effect of catechins on d-ALA-D activity in the presence of cadmium .....	<b>29</b>
2.6.1. <i>Effect of catechins on cow ovary d-ALA-D activity in the presence of cadmium</i> .....	<b>29</b>
2.7. <i>Exposure to cadmium chloride and antioxidant therapy</i> .....	<b>29</b>
2.7.1. Animals .....	<b>29</b>
2.7.2. Exposure .....	<b>29</b>
2.8. <i>Protein determination</i> .....	<b>29</b>
2.9. <i>Statistical analysis</i> .....	<b>30</b>
<b>3. Results</b> .....	<b>30</b>
3.1. In vitro experiments .....	<b>30</b>
3.1.1. Effect of green, white and red teas on d-ALA-D inhibition induced by cadmium .....	<b>30</b>
3.2. <i>The total polyphenols content</i> .....	<b>30</b>
3.3. <i>HPLC analysis of catechins, purine alkaloids and gallic acid</i> .....	<b>30</b>
3.4. Effect of catechins on d-ALA-D inhibition induced by cadmium .....	<b>30</b>
3.5. Ex vivo experiments .....	<b>30</b>

<i>3.5.1. Effect of green tea on ovary d-ALA-D activity of mice exposed to cadmium.....</i>	<i>30</i>
<b>4. Discussion.....</b>	<b>31</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>33</b>
<b>Conflict of interest.....</b>	<b>33</b>
<b>References.....</b>	<b>33</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>35</b>
<b>6 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>
<b>APÊNDICE A – Esquema representativo dos resultados.....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO A – Manuscrito publicado na Food and Chemical Toxicology.....</b>	<b>.....</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D) é uma metaloenzima que requer íons zinco para sua atividade catalítica máxima (Jaffe et al., 1995). Esta enzima catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas do ácido  $\delta$ -aminolevulínico ( $\delta$ -ALA), formando o porfobilinogênio, em um dos passos iniciais da biossíntese do heme (Gibson et al., 1955, Jaffe, 1995; Layer et al., 2010; Lawrence et al., 2011; Jaffe e Lawrence, 2012). A inibição desta enzima pode prejudicar a rota biossintética do heme resultando em consequências patológicas (Sassa, 1989; Goering, 1993, Farina et al., 2003b; Valentini et al., 2008) e no acúmulo do substrato ALA (ácido aminolevulínico) no sangue, o qual pode estar relacionado com a produção de espécies ativas de oxigênio (Bechara et al., 1993). Além disso, tem sido demonstrado que a oxidação do ALA, *in vitro*, pode provocar lipoperoxidação, liberação de ferro da ferritina (Oteiza et al., 1994), lesões no DNA e inibição da adenilato ciclase cerebral (Emanuelli et al., 2001).

A  $\delta$ -ALA-D é uma enzima sulfidrílica e diversos metais tais como o mercúrio (Rocha et al., 1995; Peixoto et al., 2007), o chumbo (Goering, 1993; Wang et al., 2011), o cádmio (Santos et al., 2005a; 2005b; Luchese et al., 2007; Brandão et al., 2009, 2010), assim como outros compostos capazes de oxidar os grupos sulfidrílicos da enzima podem modificar sua atividade (Emanuelli et al., 1996; Flora et al., 2002). Dessa forma, (Rocha et al., 2012)

De todos os metais tóxicos encontrados no ambiente e utilizados industrialmente, o cádmio é um dos de maior interesse clínico, uma vez que as intoxicações por cádmio são de difícil tratamento (Jones e Cherian, 1990).

A emissão do cádmio na atmosfera tem sido um problema de saúde mundial devido ao seu elevado tempo de meia-vida biológica em muitos seres vivos, incluindo os seres humanos (10-35 anos) (WHO, 2011). Este metal pode se acumular em vários órgãos, tais como fígado, rins (Jihen et al., 2008), pulmões (Klimisch, 1993), testículos (Spiazzi et al., 2013) e ovários (Nampoothiri e Gupta, 2006).

O cádmio ( $Cd^{2+}$ ) tem o potencial de afetar a reprodução e desenvolvimento de muitas maneiras diferentes, e em todos os estágios do processo reprodutivo. No ovário, o desenvolvimento dos oócitos é inibido, a esteroidogênese é reduzida, e ocorre hemorragia nos ovários em doses elevadas de cádmio (Thompson e Bannigan, 2008).

Em vista disso, o dano provocado pelo  $Cd^{2+}$  ao sistema reprodutivo tem sido associado ao estresse oxidativo por muitos autores, tanto por formação de radicais livres quanto pela inibição de defesas celulares enzimáticas e não-enzimáticas (Santos et al., 2004; Acharya et al., 2008; Ognjanovic et al., 2010).

Neste contexto, a utilização de compostos com atividade antioxidante poderia auxiliar na terapia das intoxicações por cádmio. As infusões de ervas (especialmente chá) são importantes fontes de antioxidantes (Marongiu et al., 2004; Wu et al., 2004). O chá, bebida popular mais conhecida no Oriente, desperta grande interesse entre os cientistas, devido aos efeitos benéficos à saúde. Os benefícios à saúde associados ao consumo de chá têm sido atribuídos em parte à atividade antioxidante dos flavonóides presentes neles (Rusak et al., 2008). De fato, o consumo de flavonóides presentes no chá parece estar relacionado à menor incidência de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e câncer.

Há uma grande variedade de chás obtidos a partir das folhas novas da planta *Camellia sinensis*. O que os torna diferentes é o lugar no qual a planta cresce (clima, tipo de solo e outras condições de crescimento) e o processamento pelo qual as folhas são submetidas. Essas diferenças são responsáveis pelas variações no sabor, na aparência e também na composição dos chás (Costa e Silva, 2011).

Os chás do gênero *Camellia sinensis* podem ser divididos dentro de três categorias de acordo com o processo de fabricação (fermentação): chá verde e branco (não fermentado), chá oolong e vermelho (parcialmente fermentado) e chá preto (completamente fermentado) (Almajano et al., 2008; Kin et al., 2011).

As infusões de chás (*Camellia sinensis*) apresentam propriedades benéficas na prevenção de doenças como câncer, doenças do coração e doenças neurodegenerativas (Serafini et al., 2002). Estudos recentes têm relatado que a ingestão de chá verde e ou chá branco tem efeito antioxidante no plasma e em diversos órgãos, como coração e pulmão (Koutelidakis et al., 2009). Há poucos estudos em relação aos efeitos benéficos do chá vermelho.

Considerando: (a) os danos causados pelo  $Cd^{2+}$  sobre o sistema reprodutor feminino; (b) que a enzima  $\delta$ -ALA-D é um marcador importante de intoxicações por metal; (c) o papel benéfico que terapias naturais com potencial antioxidante poderiam ter frente a intoxicações por metais; o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do  $Cd^{2+}$  sobre a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D de tecido ovariano *in vitro e ex vivo*, bem como analisar o papel protetor de chás provenientes da *Camellia sinensis*

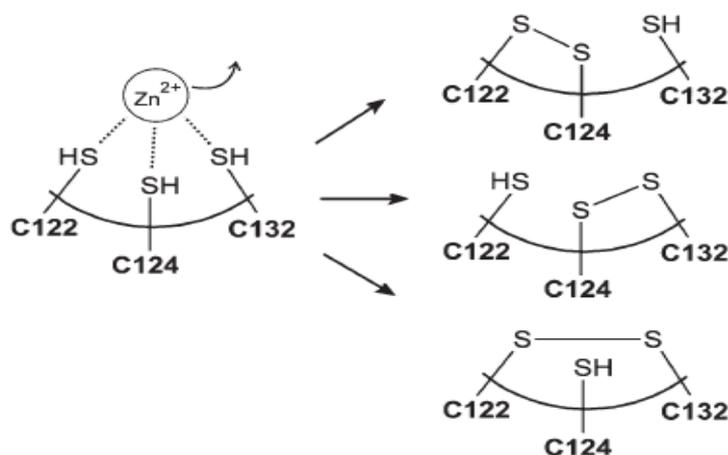
frente a um possível efeito tóxico do metal. Além disso, determinar a presença de catequinas, alcalóides (cafeína e teobromina), fenóis totais e ácido gálico presentes nas infusões dos chás por HPLC, a fim de relacionar a presença dessas substâncias com os efeitos observados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 $\delta$ -Aminolevulinato Desidratase

A  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D) ou porfobilinogênio sintase é uma metaloenzima que requer íons zinco para sua atividade catalítica máxima (Jaffe et al., 1995). Uma característica especial na estrutura funcional da  $\delta$ -ALA-D é a presença de resíduos cistenil no seu sítio ativo. (Markham, et al., 1995) Esses grupos tióis estão envolvidos na coordenação de íons essenciais como o Zinco (Zn) e a proximidade entre eles tornam a enzima particularmente sensível a oxidação (Markham, et al., 1995; Farina et al., 2002; Saraiva et al., 2012). O Zn também está envolvido na estabilização dos grupos tióis/tiolatos vicinais e sua remoção por agentes quelantes pode acelerar a autooxidação da enzima. (Emanuelli et al., 1998; Beber et al., 1998; Peixoto et al., 2003) (Figura 1).

**Figura 1.** Estabilização dos grupos tióis vicinais pelo Zinco.



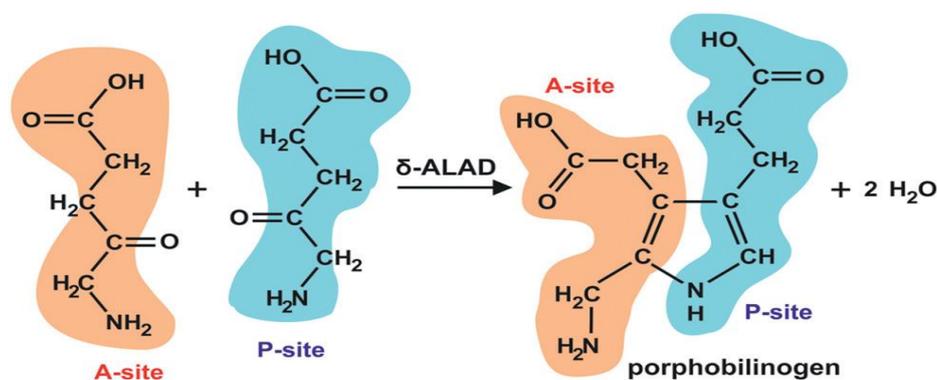
Fonte: Rocha et al, 2012

Notavelmente, os seus grupos sulfidrilos ativos tornam-na altamente sensível a situações pró-oxidante como a exposição a metais pesados ou ao oxigênio molecular bem como agentes oxidantes que induzem a formação de ponte dissulfeto e inibição enzimática (Farina et al., 2003a; Perottoni et al., 2005). Na verdade, a enzima  $\delta$ -ALA-D,

pode desempenhar um importante papel como marcador de estresse oxidativo e de prejuízo em processos metabólicos (Farina et al., 2003a; Valentini et al., 2008).

A  $\delta$ -ALA-D é uma enzima muito difundida na natureza (Jaffe, 1995; Layer et al., 2010; Lawrence et al., 2011; Jaffe e Lawrence, 2012) sendo responsável por catalisar a condensação assimétrica de duas moléculas do ácido aminolevulínico (ALA) formando o monopirrol – porfobilinogênio (Figura 2). Dentro das células, os monopirróis são precursores para a síntese de tetrapirróis (Rocha et al., 2012).

**Figura 2.** Síntese do porfobilinogênio a partir de duas moléculas do ácido aminolevulínico



Fonte: Rocha et al, 2012

As moléculas tetrapirróis são essenciais para organismos aeróbicos desde grupos prostéticos de proteínas importantes fisiologicamente como a hemoglobina e citocromo (Sassa, 1998). Os compostos tetrapirrólicos têm importância metabólica baseada, principalmente, na sua função como grupos prostéticos de proteínas. O heme (ferroprotoporfirina), por exemplo, faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina e mioglobina, respectivamente); do transporte de elétrons (citocromos a, b e c); da biotransformação de xenobióticos (citocromo P450) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases) (Timbrell, 1991).

Consequentemente, agentes tóxicos ou metabólitos que rompem ou interferem com a síntese de tetrapirróis podem ter profundos efeitos sobre metabolismo celular (Heineman et al., 2008). A deficiência genética na  $\delta$ -ALA-D está associada com porfirias hepáticas em humanos que podem ser exacerbadas ou precipitadas por intoxicações com chumbo (Sassa et al., 1975; Sassa, 1998; Fujita et al., 2002). A

inibição da  $\delta$ -ALA-D pode resultar no acúmulo do substrato ALA no sangue, com consequente aumento na excreção urinária do mesmo.

O ALA é sintetizado dentro da mitocôndria a partir de glicina e succinil-CoA pela ALA sintetase, que é a enzima limitante na via de síntese do heme (Wang, et al., 2010). Bechara e colaboradores demonstraram que o substrato da  $\delta$ -ALA-D, o ácido 5-aminolevulínico ou ALA pode exibir propriedades pro-oxidantes sob condições fisiológicas relevantes (Onuki et al., 1994; Rocha et al., 2003; Bechara, et al., 2007). Eles também demonstraram que os marcadores de estresse oxidativo estavam alterados em trabalhadores expostos ao chumbo e postularam que isso pode estar relacionado com o aumento na circulação do ALA (Costa et al., 1997). Consequentemente, a inibição da  $\delta$ -ALA-D por agentes tóxicos ou condições patológicas associadas com estresse oxidativo pode iniciar um ciclo pró-oxidativo vicioso que vai inibir ainda mais a  $\delta$ -ALA-D e aumentar a concentração de componentes potencialmente tóxicos como ALA e metabólitos relacionados (Bechara et al., 2007)

O acúmulo de ALA também está relacionado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio (Bechara et al., 1993). Tem sido demonstrado que a oxidação do ALA, *in vitro*, pode provocar lipoperoxidação (Oteiza et al., 1994), liberação de ferro da ferritina (Oteiza et al., 1994), lesões no DNA e inibição da adenilato ciclase cerebral (Emanuelli et al., 2001).

Diversas enzimas podem ter suas atividades reduzidas pelo aumento na concentração de metais tóxicos, como o cádmio, no organismo. Esses metais podem ligar-se a grupos sulfidrílicos (-SH) e/ou substituir metais de algumas enzimas alterando suas atividades (Casalino et al., 2000). A  $\delta$ -ALA-D é uma enzima que contém grupos -SH, sendo extremamente sensível a agentes oxidantes (Nogueira et al., 2003a; Emanuelli et al., 1996; Flora et al., 2002), e, diversos metais tais como o mercúrio (Rocha et al., 1995; Peixoto et al., 2007), o chumbo (Goering, 1993; Wang et al., 2011) e o cádmio (Santos et al., 2005a; 2005b; Luchese et al., 2007; Brandão et al., 2009, 2010).

O  $Cd^{2+}$  é extremamente tóxico para as células vivas e um importante poluente ambiental e ocupacional que pode promover doenças (por exemplo, câncer e doenças renais) (Khlifi e Hamza-Chaffai, 2010; Hartwig, 2010; Matović et al., 2011; Nzenguet al., 2012). O mecanismo molecular de toxicidade do  $Cd^{2+}$  não está completamente compreendido mas pode envolver a perturbação da homeostase do Zn, (Moulis, 2010) que por sua vez pode modificar a atividade de enzimas tais como  $\delta$ -ALA-D de

mamíferos (Braga et al., 2012). Além disso, o  $\text{Cd}^{2+}$  também pode estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), tanto direta ou indiretamente, através da inibição da atividade antioxidante (Khlifi e A. Hamza-Chaffai, 2010; Hartwig, 2010; Matović et al., 2011; Nzunguet al., 2012).

Anteriormente, nosso grupo demonstrou pela primeira vez que a atividade da  $\delta$ -ALA-D de ovário foi inibida por  $\text{Cd}^{2+}$  tanto *in vitro* quanto *ex vivo* (Vargas et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que esse metal reduz a atividade da  $\delta$ -ALA-D testicular em camundongos (Santos et al. 2004, 2005a). Estas observações demonstram que este metal provoca um efeito tóxico sobre o sistema reprodutivo masculino e feminino e a atividade da  $\delta$ -ALA-D pode ser um marcador de toxicidade.

## 2.2 Cádmio

O  $\text{Cd}^{2+}$  foi descoberto no início do século XIX por Friedrich Strohmeier, e já no final deste século (XIX) e início do século XX houve várias comprovações dos efeitos tóxicos deste metal (Nordberg, 2009), evidenciada pela doença *itai-itai* em moradores da região do rio Jinzu na Província de Toyama, Japão, por volta dos anos 1950. A doença é principalmente caracterizada pela disfunção tubular renal, osteomalácia severa, pseudofraturas e anemia. Isso se deve à alta ingestão do cádmio (cerca de 1000  $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) através do consumo de alimentos contaminados com esse metal pelos moradores da região (Shuto, 2005).

O  $\text{Cd}^{2+}$  encontra-se relativamente disperso no ambiente, principalmente pela poluição causada por indústrias de baterias, pigmentos, plásticos, fertilizantes e galvanoplastia (ATSDR, 2008). Outras fontes de liberação do metal para o ambiente são mineração, fundição, queima de combustíveis fósseis, eliminação (WHO, 2010) e fumaça de cigarro, a qual apresenta quantidades significativas deste metal (Filipic, 2012).

Este metal não apresenta nenhuma função biológica conhecida e a exposição prolongada causa efeitos tóxicos para os seres humanos e animais (Zhang e Jia, 2007), sendo que ele tem sido classificado como carcinogênico humano pela Agência de Pesquisa sobre o Câncer desde 1993 (IARC, 1993). Esses efeitos tóxicos do  $\text{Cd}^{2+}$  junto com o elevado tempo de meia vida para eliminação (10-35 anos) (WHO, 2011) e uma

baixa excreção (1-2 µg/dia) (Goering, et al., 1995) contribuem para o fato de que a exposição ao Cd<sup>2+</sup> é atualmente um dos mais importantes problemas de saúde pública.

As emissões de Cd<sup>2+</sup> têm aumentado dramaticamente durante o século 20. A principal razão para isto é que os produtos contendo esse metal raramente são reciclados, mas muitas vezes descartados junto com o lixo doméstico (Zang et al., 2008). A população em geral é exposta ao Cd<sup>2+</sup> via água de beber, comida e inalação através da fumaça de cigarro (Honda et al., 2010).

O Cd<sup>2+</sup> tem sido associado com danos em vários tecidos incluindo rim, fígado, osso, pulmão e coração bem como no sistema reprodutor em órgãos, incluindo a placenta, testículo, ovário (Piasek et al., 2001). Além disso, esse metal tem o potencial de afetar a reprodução e o desenvolvimento de muitas formas diferentes, e em todos os estágios do processo reprodutivo (Thompson e Bannigan, 2008).

Estudos epidemiológicos demonstraram maiores concentrações de Cd<sup>2+</sup> no fluido folicular e nas placentas de fumantes que apresentaram redução nos níveis de progesterona (Piasek et al., 2001; Yang et al., 2006). Vários efeitos do Cd<sup>2+</sup> sobre endocrinologia reprodutiva foram descritos, mas conclusões definitivas de suas ações sobre os tecidos-alvo variam de acordo com o modelo experimental e a dose empregada (Smida et al., 2003). Há também evidência direta de que o Cd<sup>2+</sup> reduz a biossíntese de progesterona em cultura de células trofoblásticas humanas (Yang et al., 2006).

Piasek (2002) demonstrou alteração na esteroidogênese de ovário e placenta após exposição ao cádmio *in vitro* e *in vivo*. Zhang et al. (2007) verificou que após incubação de células da granulosa de ovários com CdCl<sub>2</sub> (10, 20 ou 40 µM) *in vitro*, houve diminuição dos níveis de progesterona dose-dependente. Posteriormente foi demonstrado que o Cd<sup>2+</sup> pode inibir a liberação de progesterona e estrogênio nos ovários, um importante mecanismo de desregulação endócrina, que pode ter influenciado na diminuição do crescimento folicular e aumento de folículos atrésicos encontrados (Zhang, et al., 2008).

O Cd<sup>2+</sup> não é ativo em reações do tipo redox ele não pode, por si só, produzir reações como as de Fenton (Moriwaki, et al., 2008), por isso acredita-se que as ERO são geradas indiretamente pelo cádmio. Dependendo da sua concentração, ocorre uma diminuição nos níveis de antioxidantes celulares e também pode ocorrer a ligação do Cd<sup>2+</sup> com grupos sulfidrílica em moléculas críticas, levando à inativação desses grupos e consequentemente a um estresse oxidativo (Rikans e Yamano, 2000).

Anteriormente foi verificado que a exposição ao  $Cd^{2+}$  inibiu a atividade da  $\delta$ -ALA-D em testículo (Santos, et al., 2004a; Santos, et al., 2004b; Brandão, et al., 2009; Spiazzi et al., 2013) e ovário (Vargas, et al., 2013). De fato, parece que a atividade da  $\delta$ -ALA-D é um importante marcador toxicológico sobre sistemas reprodutivos. Levando-se em conta que  $\delta$ -ALA-D é uma enzima tiólica, o  $Cd^{2+}$  poderia inibir a sua atividade por oxidação de grupos tióis.

Muitos estudos indicam que o efeito tóxico do  $Cd^{2+}$  está relacionado principalmente com o estresse oxidativo. Ognjanović e colaboradores (2010) demonstraram que, a exposição a este metal leva a uma redução na atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione-S-transferase (GST) em testículo de camundongos. A diminuição destas defesas antioxidantes contribui para o aumento na quantidade de espécies reativas, que, por sua vez, reagem com proteínas, lipídios e DNA, provocando deterioração oxidativa (Kryston et al., 2011). Desta maneira, compostos com propriedades antioxidantes poderiam ser uma alternativa na proteção ou tratamento do dano oxidativo induzido pela exposição ao cádmio.

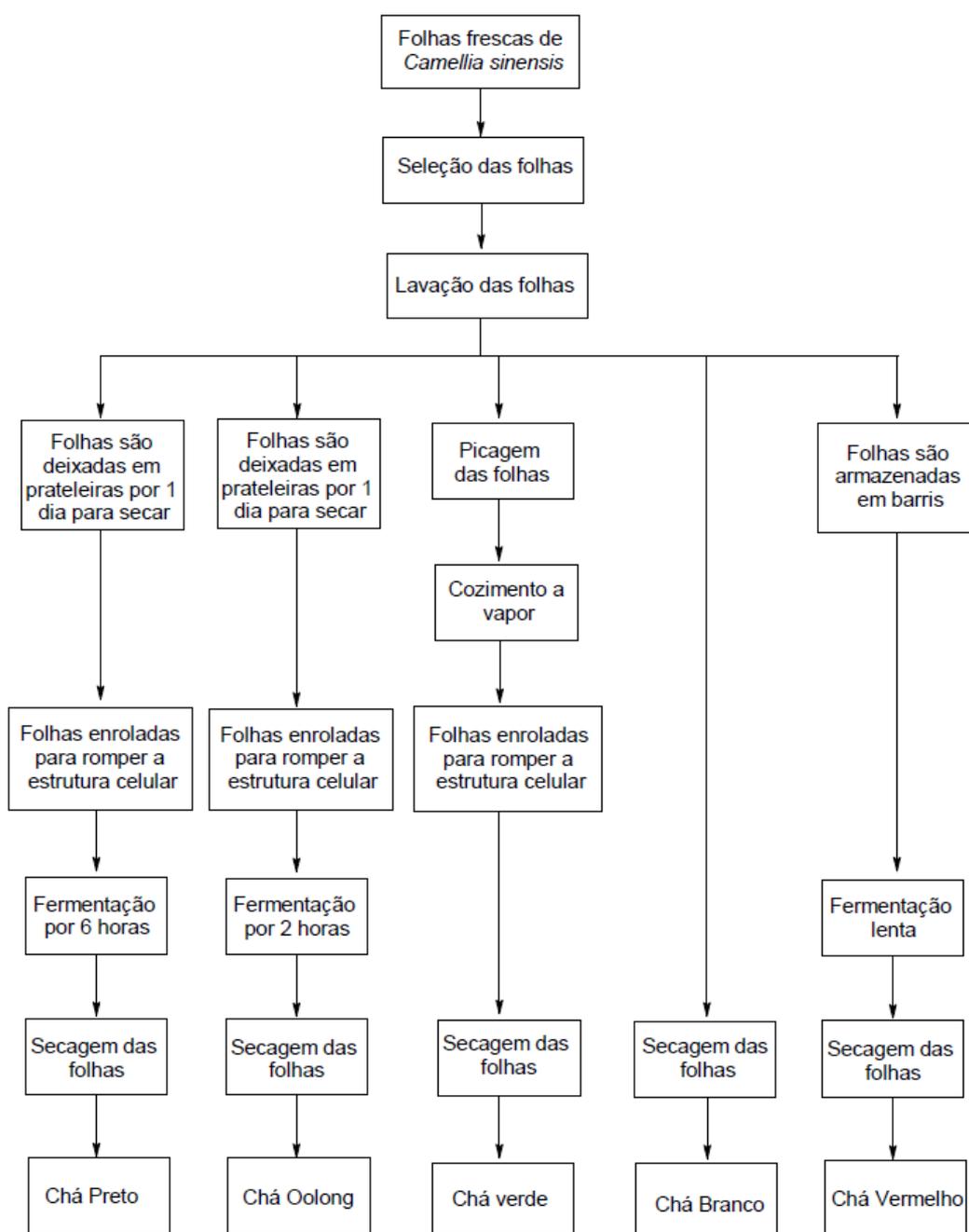
### **2.3 *Camellia sinensis***

O chá (*Camellia sinensis*) é a bebida mais consumida no mundo depois da água, sendo consumida em quantidades superiores quando comparado com o consumo de café, cerveja, vinho e refrigerantes (Rietveld e Wiseman, 2003). Anteriormente, seu consumo concentrava-se em países da Ásia e Europa, panorama que vem mudando ao longo dos últimos anos (Matsubara, et al., 2006). As razões para a popularidade mundial do chá estão relacionadas ao aroma e sabor característico. Mais recentemente, a sua popularidade tem aumentado devido aos seus efeitos benéficos para a saúde prevenindo doenças cardiovasculares e câncer, bem como aos seus efeitos anti-hipertensivo, hipocolesterolêmico, hipolipidêmico, e as propriedades anti-ateroscleróticas, os quais parecem estar relacionados principalmente com o potencial antioxidante de flavonóides presentes no chá (Chan et al, 1999; Chen et al., 2001; Cheng, 2006).

Há uma grande variedade de chás obtidos a partir das folhas jovens da planta *Camellia sinensis* (família Theaceae) (Obanda et al., 2004), o que os torna diferentes é o lugar no qual a planta cresce (clima, tipo de solo e outras condições de crescimento) e o

processamento ao qual as folhas são submetidas. Essas diferenças são responsáveis pelas variações no sabor, na aparência e também na composição dos chás (Costa e Silva, 2011) (figura 3). Estudos têm demonstrado que o chá brasileiro apresenta maior quantidade de compostos fenólicos quando comparado com chás de outros países e tal fato é atribuído às características do clima e do solo (Saito et al., 2007a, b).

**Figura 3.** Etapas do processamento de diferentes tipos de chá (*Camellia sinensis*)



FONTE: Costa e Silva, 2011.

A composição do chá é afetada pelo processo de fermentação. Existem três tipos de chás: não fermentado (chá verde e chá branco), parcialmente fermentado (chá oolong e vermelho) e completamente fermentado (chá preto). Durante a fermentação das folhas frescas de chá, algumas catequinas são oxidadas ou condensadas para moléculas polifenólicas maiores (Almajano, 2008).

O chá branco é elaborado a partir de folhas muito jovens do chá ou botões cobertos com pequenos fios prateados, que são colhidas apenas uma vez por ano no início da primavera. O chá branco é cozido no vapor e seco imediatamente após a colheita para evitar a oxidação, dando-lhe um sabor delicado. Apesar dos inúmeros dados sobre os componentes fenólicos e a atividade antioxidante do chá verde e preto para a saúde humana, pouco se sabe, nesse sentido, sobre o chá branco, que é o mais raro e o chá menos processado (Rusak et al., 2008). Num estudo recente, Koutelidakis e colaboradores (2009) relataram que a suplementação com extrato de chá branco durante cinco dias consecutivos, não só aumenta a capacidade antioxidante do plasma, mas também em diferentes órgãos de camundongos. Além disso, foi demonstrado que o chá branco tem efeito quimiopreventivo e antineoplásico em células de cancro do pulmão (Mao, et al.2010) e pode proteger a pele humana a partir da estimulação solar da luz ultravioleta (Camouse et al., 2009). Em outro estudo recente, o chá branco demonstrou ter forte atividade lipolítica e anti-adipogênica *in vitro* (Sohle et al., 2009).

O chá vermelho (Pu-erh) é preparado pela fermentação completa, e, por longo tempo, das folhas. Durante essa fermentação observa-se a presença do microrganismo *Aspergillus niger*. O processo todo de produção do chá vermelho exige, no mínimo, três anos. É ao longo deste tempo que a bebida adquire a sua cor característica. Acredita-se que quanto maior for o tempo de preservação das folhas do chá, melhor será sua qualidade (Wu et al., 2007). O Chá Pu-erh está ganhando muita atenção por suas atividades benéficas a saúde. Os efeitos conhecidos que são associados ao Pu-erh incluem retardamento ou prevenção do cancro, da doença cardíaca, artrite reumatóide e doença imunitária (Kuo et al., 2005; Way, et al., 2009). Além disso, Duh e colaboradores (2004) verificaram que a epicatequina, o ácido ascórbico e os compostos polifenólicos estão presentes nos extratos aquosos do chá pu-erh, o que poderia que pode contribuir para o efeito protetor sobre danos oxidativo, bem como a captura do óxido nítrico.

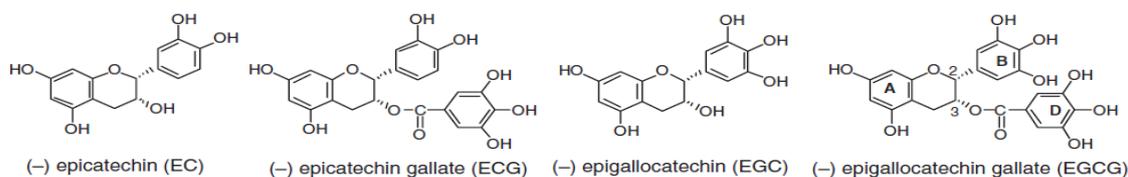
Durante a produção do chá verde, as folhas da *Camellia sinensis* são picadas e submetidas a um cozimento a vapor. Com isso, as folhas tornam-se flexíveis e maleáveis para serem trabalhadas. As folhas são enroladas e colocadas em bandejas aquecidas, com o intuito de romper a estrutura celular e, assim, se obter o sabor desejado do chá. Em seguida, as folhas são secas até que retenham apenas 2% de sua umidade original (Weisbutger 1997; Vinson e Dabbagh, 1998; Wang e Helliwell, 2000).

O chá verde e seus constituintes são mais conhecidos por suas propriedades antioxidantes, o que levou à sua avaliação sobre uma série de doenças associadas com ERO, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, bem como proporcionar uma proteção significativa contra a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, e danos isquêmicos (Mandel e Youdim, 2004). Vários estudos epidemiológicos, bem como estudos em modelos animais, demonstraram que o chá verde pode proporcionar proteção contra vários tipos de câncer, tais como o da pele, da mama, da próstata e do pulmão (Mukhtar e Ahmad, 2000; Yang et al., 2002).

Frank et al. (2009) demonstrou que o consumo diário de chá verde é seguro e não tem efeitos adversos sobre a saúde humana, já que o chá verde possui substâncias bioativas abundantes, que tem sido relatado ter efeitos biológicos benéficos.

As catequinas são os principais flavonóides presentes no chá verde. As quatro principais catequinas são (-)-epigallocatequina-3-gallato (EGCG), que representa aproximadamente 59% das catequinas totais; (-)-epigallocatequina(EGC) (19% aproximadamente); (-)-epicatequina-3-gallato (ECG) (13,6% aproximadamente); e (-)-epicatequina (EC) (6,4% aproximadamente) (McKay e Blumberg, 2002) (Figura 4) Embora as catequinas sejam os compostos fenólicos dominantes (Kilmartin e Hsu, 2003), diversos flavonóis (até 4%) e flavonas (em traços) também estão presentes nas folhas de chá. Outros compostos relacionados encontrados no chá são ácido gálico, cumárico e cafeico, bem como os alcalóides de purinas, teobromina e cafeína (Rusak et al., 2008).

**Figura 4.** Estrutura das principais catequinas do chá verde



Fonte: N.T. Zaveri, 2006

Em diversos modelos experimentais, as catequinas do chá verde demonstraram proteger contra a nefrotoxicidade induzida por cisplatina e atrasar o déficit cognitivo em ratos velhos (Unno et al, 2007; Khan et al, 2009). Além disso, foi demonstrado que os flavonóides do chá inibem a proliferação celular, induzem apoptose, estimulam a angiogênese e afetam vias de sinalização celular, em diferentes linhas celulares e em modelos animais (Henning et al., 2005). Os benefícios para a saúde associados ao consumo de chá tem sido atribuídos em parte à atividade antioxidante e scavenger de radicais livres dos flavonóides mais abundantes do chá (Rusak et al., 2008). Embora a EGCG seja o polifenol mais abundante e mais estudado do chá verde, parece que os efeitos preventivos do mesmo estão mais relacionados com uma mistura de catequinas do chá (Bode e Dong, 2009; Fu et al, 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral:

Esse trabalho propõe avaliar o efeito do cádmio, *in vitro* (ovário bovino) e *ex vivo* (ovário de camundongas), sobre a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D, bem como a habilidade de infusões de chás em proteger de um possível efeito tóxico do metal.

#### 3.2. Objetivos específicos:

- Analisar o efeito de diferentes concentrações de infusões dos chás verde, branco e vermelho (*Camellia sinensis*) sobre atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D em ovário bovino na presença e ausência de  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) *in vitro*.

- Determinar a presença de catequinas: (-)-epigallocatequina-3-gallato (EGCG); (-)-epigallocatequina (EGC); (-)-epicatequina-3-gallato (ECG); e (-)-epicatequina (EC), bem como alcalóides (cafeína e teobromina), fenóis totais e ácido gálico presentes nas infusões dos chás por HPLC, a fim de relacionar a presença dessas substâncias com os efeitos observados.

- Analisar o efeito isolado das catequinas EGCG; EGC; ECG; e EC, sobre a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D em ovário bovino *in vitro*, na presença de  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{IC}_{50}$ ).

- Verificar o efeito da exposição aguda ao cloreto de cádmio sobre a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D em ovário de camundongas *ex vivo*, bem como analisar o possível papel protetor do chá que obtiver melhor efeito *in vitro*.

## 4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão dos Resultados* e *Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito está apresentado da mesma forma que foi publicado no periódico ***Food and Chemical Toxicology***



## Catechins are not major components responsible for the beneficial effect of *Camellia sinensis* on the ovarian $\delta$ -ALA-D activity inhibited by cadmium

Melina Bucco Soares<sup>a</sup>, Aryele Pinto Izaguirry<sup>a</sup>, Laura Musacchio Vargas<sup>a</sup>,  
Andreas Sebastian Loureiro Mendez<sup>b</sup>, Cristiano Chiapinotto Spiazzi<sup>a</sup>, Francielli Weber Santos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (Biotech), Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Medicamentos (LDCQ), Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 October 2012

Accepted 23 January 2013

Available online 31 January 2013

#### Keywords:

Cadmium

$\delta$ -ALA-D

*Camellia sinensis*

Green tea

Catechin

Ovary

### ABSTRACT

Cadmium has been associated with a wide spectrum of deleterious effects on the reproductive tissues, including ovary. This investigation evaluated the protective role of *Camellia sinensis* (green, white and red teas) in the cadmium-induced inhibition of ovarian  $\delta$ -aminolevulinatase ( $\delta$ -ALA-D) activity *in vitro* and *ex vivo*. This study demonstrated that green and white teas restored the cow ovary  $\delta$ -ALA-D activity inhibited by cadmium whereas red tea had no effect *in vitro*. In addition, green tea was able to restore enzyme activity inhibited after acute cadmium exposure in mice ovary. Teas infusions composition was assessed by HPLC in a quantitative assay for catechins, purine alkaloids and gallic acid as well as total polyphenol content. The greatest effect of green tea observed *in vitro* as well as the protective role presented in the *ex vivo* study could be attributed to the major content of phenols, but not catechins. In fact, catechins were not able to restore enzyme activity inhibited by cadmium, demonstrating that these compounds are not major components responsible for the beneficial effect of green tea observed in this study. This study demonstrated the helpful effect of green tea infusion in ameliorating a marker protein of cadmium intoxication in ovarian tissue.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

In the recent decades, cadmium has received increasing attention in studies demonstrating the health risks associated with occupational exposure (Shin et al., 2011). In addition, general population in the absence of specific industrial exposure is vulnerable to the cadmium effect, the main sources of cadmium exposure being food and tobacco smoke (Järup and Åkesson, 2009). Taking into account that cadmium's biological half-life in mammals can reach decades, this metal can accumulate in many organs, and tobacco-smoking sub-population that includes millions of people worldwide could be susceptible to cadmium toxic effects. A wide spectrum of deleterious effects on reproductive tissues and developing embryos has also been described (Thompson and Bannigan, 2008) and the reproductive organs of smokers are at higher risk of exposure to toxic levels of cadmium.

Women have higher cadmium body burden than men, reflected as a higher concentration of cadmium in blood, urine and kidney cortex (Vahter et al., 2007). Ovarian cadmium concentration increases with age, and has been associated with failure of oocyte development progression from primary to secondary stage, and

failure to ovulate (Thompson and Bannigan, 2008). Thus, among females of both humans and experimental mammals, cadmium could be related with the reduction of fertility; however the mechanisms involved are not fully understood.

Recently, we demonstrated that cadmium inhibits ovarian  $\delta$ -aminolevulinatase ( $\delta$ -ALA-D) activity (Vargas et al., 2012).  $\delta$ -ALA-D is a thiol enzyme of the heme biosynthesis pathway and it presents an essential role for all aerobic organisms. This enzyme is considered a marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations (Rocha et al., 2012). Taking into account that  $\delta$ -ALA-D is a metalloenzyme requiring zinc ions for its activity, this enzyme could be inhibited by substances that compete with zinc and/or that oxidize the -SH groups (Nogueira et al., 2003). In this way,  $\delta$ -ALA-D activity could be used as a marker of metal toxicity.

In biological systems, cadmium is able to stimulate the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species, which are responsible, at least in part, for its toxicity (Stohs et al., 2001). Therefore, antioxidant therapies could provide a potential mean to treat cadmium poisoning in which the formation of reactive oxygen species exceeds the capability of natural protective mechanisms (Ognjanovic et al., 2010).

Herbal infusions (especially tea) are important sources of antioxidants. In fact, one of the most important beneficial effects of

\* Corresponding author. Tel./fax: +55 55 3413 4321.

E-mail address: [francielliweber@yahoo.com.br](mailto:francielliweber@yahoo.com.br) (F.W. Santos).

tea is the antioxidant activity and free radical-scavenging ability of polyphenol components (Frei and Higdon, 2003). Additionally, it is important to mention that polyphenol compounds (including green tea catechins) have metal chelating properties (Hider et al., 2001).

Tea is one of the most widely consumed beverages in the world. There are three kinds of teas obtained from “*Camellia sinensis*” plant: not fermented (green and white tea), partially fermented (red and oolong tea) and completely fermented (black tea) (Almajano et al., 2008), and their composition is affected by the fermentation process. Polyphenols constitute the most interesting group of green tea leaf components, and in consequence, green tea can be considered an important dietary source of polyphenols, particularly flavonoids (Cabrera et al., 2006). Catechins are the major flavonoids present in green tea. The four principal catechins are (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), that represents approximately 59% of the total catechins; (–)-epigallocatechin (EGC) (19% approximately); (–)-epicatechin-3-gallate (ECG) (13.6% approximately); and (–)-epicatechin (EC) (6.4% approximately) (McKay and Blumberg, 2002). The presence of these components and other phenolic compounds on green tea or fresh plant of *C. sinensis*, in analysis involving the qualitative and quantitative estimation by HPLC assay have been described (El-Shahawi et al., 2012).

In the present investigation, we studied the protective effect of *C. sinensis* (green, white and red teas) in restoring bovine ovary  $\delta$ -ALA-D activity inhibited by cadmium *in vitro*. Tea samples composition was assessed by HPLC in a quantitative assay for catechins, purine alkaloids and gallic acid as well as total polyphenol content. In attempt to provide more mechanism information we also evaluated the possible protective effect of isolated catechins (EC, EGC, ECG and EGCG) in the presence of cadmium ( $IC_{50}$ ). In addition, taking into account that the *in vitro* observations provide only a rough guide to the cadmium toxicity and the antioxidant–metal interactions, an *ex vivo* study was done to verify the effect of green tea and its interaction with metal on  $\delta$ -ALA-D enzyme activity in ovary of mice.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

$\delta$ -Aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA), cadmium chloride ( $CdCl_2$ ), *p*-dimethylamino-benzaldehyde, (–)-epicatechin (EC), (–)-epigallocatechin (EGC), (–)-epicatechin gallate (ECG), (–)-epigallocatechin gallate (EGCG), gallic acid, theobromine, caffeine, Folin–Ciocalteu reagent and bovine serum albumine were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All chemicals and solvents used in “High Performance Liquid Chromatography” (HPLC) analysis were of analytical reagent grade quality and were used as received. Doubly deionized water was used throughout. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

### 2.2. Herbal materials

Green, white and red teas (Madrugada Alimentos Ltda, Venâncio Alves, RS, Brazil) were purchased from a local supermarket. Teas were brewed immediately before each experiment using double distilled-deionized water (95–100 °C). The concentration during brewing was 5 g of tea per 100 mL of water. After 10 min the infusions were filtered through filter paper and the dilutions were prepared.

### 2.3. The *in vitro* effect of cadmium and teas infusions on cow ovary $\delta$ -ALA-D activity

#### 2.3.1. Sample

Bovine ovaries were obtained from a local slaughterhouse (Frigoste, Uruguaiana, RS, Brazil) and were transported in saline at 20 °C to the laboratory. Ovaries were rapidly homogenized in 50 mM Tris–Cl, pH 7.4 (1/5, w/v) and centrifuged at 2400g for 15 min. The low-speed supernatants (S1) were separated and used for enzyme assay.

#### 2.3.2. Enzyme assay

The activity of cow ovary  $\delta$ -ALA-D was assayed as described (Sassa, 1982). Enzymatic reaction was initiated by adding the substrate ( $\delta$ -ALA) to a final concentration of 2.2 mM in a medium containing 45 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8 and 300  $\mu$ L of ovary tissue (S1). The incubation was carried out for 180 min at 37 °C.

2.3.2.1. Effect of teas infusions on cow ovary  $\delta$ -ALA-D activity in the presence of cadmium. The protective effect of teas infusions (green, white and red teas) was studied in the presence of cadmium ( $IC_{50}$ , around 20  $\mu$ M) (Vargas et al., 2012). The ovarian tissue (S1) was pre-incubated at 37 °C for 10 min with cadmium ( $IC_{50}$ ) plus green, white and red teas (0.07, 0.35, 0.7, 1.75, 2.5, 5 and 10 mg/mL) (Tsai et al., 2008).

### 2.4. Determination of total polyphenols content

Total polyphenols content (TP) of the teas infusions was measured by spectrophotometry using the Folin–Ciocalteu method, with modifications (Chandra and Meija, 2004). The total polyphenol content was expressed as milligram of gallic acid equivalent per milliliter (mg GAE mL<sup>-1</sup>) of each infusion.

### 2.5. HPLC analysis of the catechins, purine alkaloids and gallic acid in standard mixtures and tea infusion samples

The chromatographic assay was conducted using a reversed phase technique. The analyses of tea infusions and standards were performed in a gradient elution mode with a 1.0 mL min<sup>-1</sup> flow, using a mobile phase of either 5% (v/v) acetonitrile (solvent A) or 50% (v/v) acetonitrile (solvent B) containing 0.05% (v/v) phosphoric acid (85%) (Goto et al., 1996). The teas infusions were injected directly, as prepared. A standard solution was prepared by mixture of seven substances at final concentrations as indicated: (–)-epicatechin (EC) (125  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), (–)-epigallocatechin (EGC) (125  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), (–)-epicatechin gallate (ECG) (125  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) and (–)-epigallocatechin gallate (EGCG) (125  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), gallic acid (50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), caffeine (125  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) and theobromine (60  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). The presence of these compounds in tea solutions were identified by comparison to those authentic standards, evaluating the chromatographic profile and UV absorption. All measurements and analysis were carried out in triplicate.

### 2.6. The *in vitro* effect of catechins on $\delta$ -ALA-D activity in the presence of cadmium

2.6.1. Effect of catechins on cow ovary  $\delta$ -ALA-D activity in the presence of cadmium. The ovarian tissue (S1) was pre-incubated at 37 °C for 10 min with cadmium ( $IC_{50}$ ) plus catechins. We used the same concentrations of each catechin quantified by HPLC analysis in the green tea infusion as well as a representative concentration of the total content of catechins for this tea. The enzyme assay was carried out according to the method described above.

### 2.7. Exposure to cadmium chloride and antioxidant therapy

#### 2.7.1. Animals

Female adult Swiss albino mice (30–35 g) from our own breeding colony were used. The animals were kept on separate animals rooms, on a 12 h light/dark cycle, at room temperature of 22 ± 2 °C, with free access to food and water. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Santa Maria, Brazil.

#### 2.7.2. Exposure

A group of six mice was usually tested in each experiment. The mice were injected intraperitoneally (i.p.) with a single dose of  $CdCl_2$  (2.5 or 5 mg/kg) (dissolved in saline at 0.25 and 0.5 mg/mL) and 30 min later they received orally (via gavage) 250 mg/kg green tea (a non-toxic dose) (Sabu et al., 2002). The cadmium intoxication protocol has been chosen based on papers published by us that have caused testicular damage in mice (Santos et al., 2005) as well as according to Vargas et al. (2012). Green tea was brewed immediately before each experiment using double distilled-deionized water (95–100 °C). After 10 min the infusions were filtered through filter paper.

Animals were euthanized 24 h after cadmium treatment and then the ovaries were rapidly dissected, placed on ice and weighed. The protocol of mice treatment is given below:

- Group 1 – saline (i.p.) + water (gavage).
- Group 2 –  $CdCl_2$  (2.5 mg/kg, i.p.) + water (gavage).
- Group 3 –  $CdCl_2$  (5 mg/kg, i.p.) + water (gavage).
- Group 4 – saline (i.p.) + green tea (250 mg/kg, gavage).
- Group 5 –  $CdCl_2$  (2.5 mg/kg, i.p.) + green tea (250 mg/kg, gavage).
- Group 6 –  $CdCl_2$  (5 mg/kg, i.p.) + green tea (250 mg/kg, gavage).

### 2.8. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method as described (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard.

### 2.9. Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by the Duncan's test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. In vitro experiments

#### 3.1.1. Effect of green, white and red teas on $\delta$ -ALA-D inhibition induced by cadmium

At 5 and 10 mg/mL concentrations, green tea was able to restore the inhibitory effect of cadmium chloride (20  $\mu$ M) on  $\delta$ -ALA-D activity. Furthermore, green tea (10 mg/mL concentration) significantly increased the enzyme activity in the presence of cadmium compared to the control value (Fig. 1).

White tea at the highest studied concentration (10 mg/mL) was capable to restore enzyme activity (Fig. 3).

On the other hand, red tea at all concentrations evaluated did not reverse enzyme inhibition (Fig. 2).

Additionally, green and white teas, at the highest concentrations studied (5 and 10 mg/mL) demonstrated *per se* a significant increase on ovary  $\delta$ -ALA-D activity compared to the control (41% and 163%, respectively for green tea and 59% and 173%, respectively for white tea) (Figs. 1 and 3).

### 3.2. The total polyphenols content

We determined the total polyphenols content in tea infusions samples studied (green, white and red teas). We detected that the phenols levels in the teas samples were in the following order: green tea (757.24  $\mu$ g GAE/mL) > white tea (499.37  $\mu$ g GAE/mL) > red tea (272.39  $\mu$ g GAE/mL).

### 3.3. HPLC analysis of catechins, purine alkaloids and gallic acid

The chromatographic separation was adequately performed, and the components investigated were detected with good

resolution. The quantitation was done comparing the peak responses to standards evaluation, at 231 nm.

Gallic acid content was higher in the red tea sample (41.59  $\mu$ g/mL) compared to white and green tea samples (20.79  $\mu$ g/mL and 18.58  $\mu$ g/mL, respectively). Theobromine content was more elevated in the green tea sample (12.43  $\mu$ g/mL) following by red tea (8.41  $\mu$ g/mL) and white tea (4.80  $\mu$ g/mL). There was not a significant difference in the caffeine content among analyzed samples. Catechins content was more pronounced in the green tea sample (EGCG = 205.64  $\mu$ g/mL, EC = 84.59  $\mu$ g/mL, EGC = 75.53  $\mu$ g/mL, ECG = 64.73  $\mu$ g/mL) followed by white tea sample (EGCG = 105.57  $\mu$ g/mL, EC = 54.73  $\mu$ g/mL, EGC = 81.96  $\mu$ g/mL, ECG = 34.25  $\mu$ g/mL). In the red tea sample was only detected a small content of ECG (1.36  $\mu$ g/mL) (Table 1).

### 3.4. Effect of catechins on $\delta$ -ALA-D inhibition induced by cadmium

Aiming to provide more mechanism information we evaluated the protective effect of catechins in the presence of cadmium (IC<sub>50</sub>). Taking into account that green tea was more effective in restoring enzyme activity as well as this tea infusion presented a more pronounced catechins content, we used the same concentrations for each catechin quantified by HPLC analysis in green tea infusion (EC = 85  $\mu$ g/mL, EGC = 75  $\mu$ g/mL, ECG = 65  $\mu$ g/mL and EGCG = 205  $\mu$ g/mL) as well as a representative concentration of the total content of catechins (430  $\mu$ g/mL). The results showed that none of the studied catechins were effective in restoring the activity of the enzyme inhibited by cadmium. Additionally, EC and ECG *per se* in the lowest and highest concentration studied significantly inhibited the enzyme activity (Table 2).

### 3.5. Ex vivo experiments

#### 3.5.1. Effect of green tea on ovary $\delta$ -ALA-D activity of mice exposed to cadmium

Taking into account that green tea was more effective in restoring enzyme activity inhibited by cadmium *in vitro* as well as it presented a higher phenol content, we selected this tea to an *ex vivo*

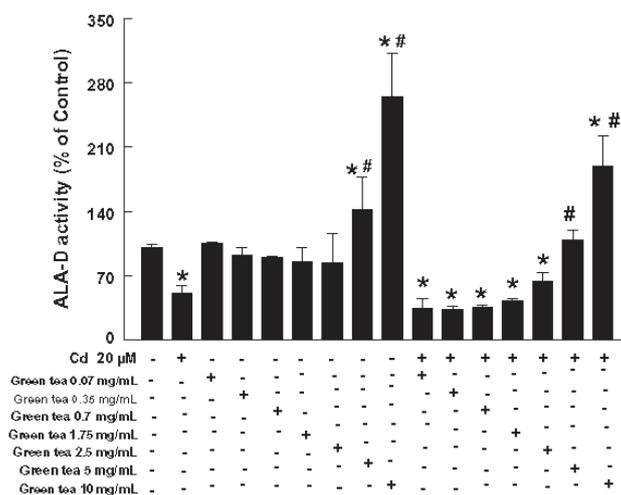
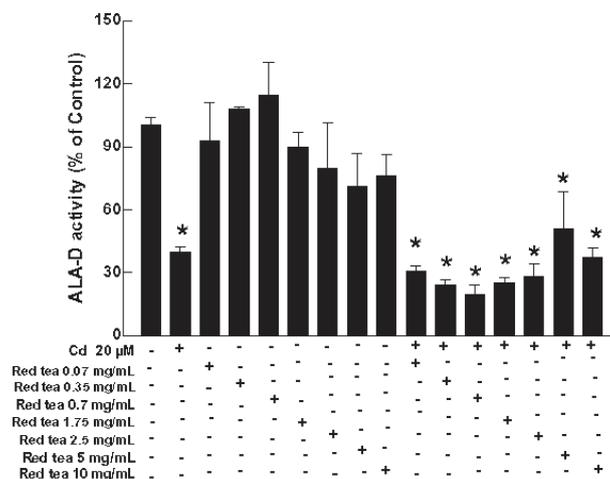
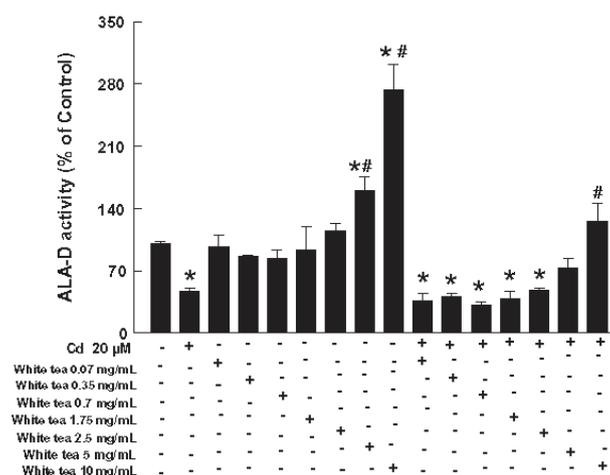


Fig. 1. Effect of green tea on cadmium-induced ovary  $\delta$ -ALA-D inhibition. Tissue was pre-incubated at 37  $^{\circ}$ C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ .  $\delta$ -ALA-D activity of control (100%) was of  $4.32 \pm 0.56$  (mean  $\pm$  SD) nmol of porphobilinogen/mg protein/hour. (\*) Denoted  $p < 0.05$  as compared to control (one-way ANOVA/Duncan). (#) Denoted  $p < 0.05$  as compared to cadmium 20  $\mu$ M (one-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.



**Fig. 2.** Effect of red tea on cadmium-induced ovary  $\delta$ -ALA-D inhibition. Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ .  $\delta$ -ALA-D activity of control (100%) was of  $5.07 \pm 0.64$  (mean  $\pm$  SD) nmol of porphobilinogen/mg protein/hour. (\*) Denoted  $p < 0.05$  as compared to control (one-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.



**Fig. 3.** Effect of white tea on cadmium-induced ovary  $\delta$ -ALA-D inhibition. Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ .  $\delta$ -ALA-D activity of control (100%) was of  $5.80 \pm 0.32$  (mean  $\pm$  SD) nmol of porphobilinogen/mg protein/hour. (\*) Denoted  $p < 0.05$  as compared to the control (one-way ANOVA/Duncan). (#) Denoted  $p < 0.05$  as compared to cadmium 20 µM (one-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.

evaluation. Thus, we studied the effect of green tea on ovary  $\delta$ -ALA-D activity from mice exposed to cadmium.

We verified that cadmium acute exposure inhibited  $\delta$ -ALA-D activity in ovary of mice. The exposure to 2.5 and 5 mg/kg of cadmium caused a significant reduction of enzyme activity comparing to the control group (around 26% and 33% of inhibition, respectively) (Fig. 4).

Green tea was able to restore enzyme activity inhibited by cadmium exposure (2.5 and 5 mg/kg). Additionally, we verified that animals treated with cadmium and green tea had a pronounced en-

hance of  $\delta$ -ALA-D activity in relation to the control group (Fig. 4). Green tea treatment alone did not alter enzyme activity, suggesting that the studied dose was not toxic on this parameter in mice ovary.

#### 4. Discussions

Cadmium is not an essential element, but is ubiquitously present in our environment. Non-occupational exposure is mainly from

**Table 1**

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) of catechins, purine alkaloids and gallic acid in infusions of green tea, white tea and red tea. Data obtained by HPLC analyses and in comparison to the standard references solution.

Component	Concentration of components in tea infusions ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Green tea	White tea	Red tea
Gallic acid	18.58	20.79	41.59
Theobromine	12.43	4.80	8.41
Caffeine	101.26	102.17	113.56
(-)-Epicatechin	84.59	54.73	ND
(-)-Epigallocatechin gallate	205.64	105.57	ND
(-)-Epigallocatechin	75.53	81.96	ND
(-)-Epicatechin gallate	64.73	34.25	1.36

ND: not detected.

**Table 2**

Effect of catechins on cadmium-induced ovary  $\delta$ -ALA-D inhibition *in vitro*.

Groups	$\delta$ -ALA-D activity (% of control)
Control	100 $\pm$ 1.47
Cd 20 $\mu\text{M}$	41.56 $\pm$ 7.99*
(-)-Epicatechin 85 $\mu\text{g/mL}$	32.55 $\pm$ 8.00#
(-)-Epigallocatechin gallate 205 $\mu\text{g/mL}$	102.43 $\pm$ 3.82#
(-)-Epigallocatechin 75 $\mu\text{g/mL}$	105.78 $\pm$ 4.08
(-)-Epicatechin gallate 65 $\mu\text{g/mL}$	47.61 $\pm$ 9.63*
Cd + EC 85 $\mu\text{g/mL}$	24.23 $\pm$ 4.52*#
Cd + ECG 205 $\mu\text{g/mL}$	33.06 $\pm$ 11.01*
Cd + EGC 75 $\mu\text{g/mL}$	43.18 $\pm$ 9.14*
Cd + ECG 65 $\mu\text{g/mL}$	30.75 $\pm$ 5.51*
(-)-Epicatechin 430 $\mu\text{g/mL}$	51.13 $\pm$ 12.21*
(-)-Epigallocatechin gallate 430 $\mu\text{g/mL}$	107.90 $\pm$ 4.15#
(-)-Epigallocatechin 430 $\mu\text{g/mL}$	119.94 $\pm$ 24.76*#
(-)-Epicatechin gallate 430 $\mu\text{g/mL}$	31.58 $\pm$ 9.95*
Cd + EC 430 $\mu\text{g/mL}$	45.77 $\pm$ 7.98*
Cd + ECG 430 $\mu\text{g/mL}$	23.10 $\pm$ 2.46*#
Cd + EGC 430 $\mu\text{g/mL}$	35.18 $\pm$ 6.21*
Cd + ECG 430 $\mu\text{g/mL}$	22.92 $\pm$ 2.63*#

Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min with cadmium plus catechins. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ .  $\delta$ -ALA-D activity of control (100%) was of 5.35  $\pm$  0.25 (mean  $\pm$  SD) nmol of porphobilinogen/mg protein/hour.

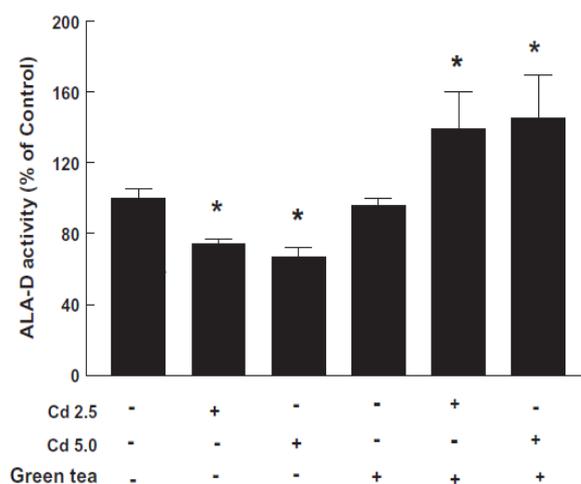
\* Denoted  $p < 0.05$  as compared to the control (one-way ANOVA/Duncan).

# Denoted  $p < 0.05$  as compared to cadmium 20  $\mu\text{M}$  (one-way ANOVA/Duncan).

cigarette smoke, which contains relatively high concentrations of this element (Filipic, 2012). In this context, a previous study demonstrated that the amount of cadmium in ovaries was elevated in smokers compared to nonsmokers (Varga et al., 1993). For nonsmokers, who are not occupationally exposed, diet seems to be the main route of exposure to cadmium.

This metal has the potential to affect reproduction and development in many different ways, and at every stage of the reproductive process. In the ovary, oocyte development is inhibited, steroidogenesis reduced, and ovarian hemorrhage occurs at higher cadmium doses (Thompson and Bannigan, 2008).

Previously, we demonstrated that this metal reduces  $\delta$ -ALA-D activity in testes (Santos et al., 2005) and ovary of mice (Vargas et al., 2012). These observations demonstrate that this metal disrupts  $\delta$ -ALA-D activity on reproductive system in male and female and this enzyme should be additionally studied as a marker of cadmium toxicity. In a recent review article, Rocha and collaborators (2012) have mentioned this enzyme as a marker protein of intoxication with several metals, including cadmium. Also, this enzyme is related with other pro-oxidant situations. In fact,  $\delta$ -ALA-D activity seems to be a potential biomarker for screenings of pathophysiological conditions, particularly in those associated with oxidative stress. The specific effects of cadmium on  $\delta$ -ALA-D activity seem to be depending of tissue, concentrations/doses evaluated and duration of exposure.



**Fig. 4.** Effect of green tea on cadmium-induced alterations in ovary  $\delta$ -ALA-D activity of cadmium-exposed mice. Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean  $\pm$  SD.  $\delta$ -ALA-D activity of control (100%) was of 8.54  $\pm$  0.96 (mean  $\pm$  SD) nmol of porphobilinogen/mg protein/hour. (\*) Denoted  $p < 0.05$  as compared to the control (one-way ANOVA/Duncan). (#) Denoted  $p < 0.05$  as compared to cadmium groups (one-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.

The results of the present investigation provides evidences on therapeutic efficacy of *C. sinensis*, in special unfermented form (green and white teas), in protecting against the cadmium-induced  $\delta$ -ALA-D enzyme inhibition in ovarian tissue. These beneficial effects observed with green and white teas can be related with the total polyphenols content. In fact, we observed that green tea presented a higher content of phenol, followed by white tea (around 1.5-folds lower) and red tea (around 2.8-folds lower). Also, it is important to mention that epigallocatechin-3-gallate (EGCG) amount verified in green tea sample was around 2-folds higher than white tea sample. Red tea sample did not present significant catechins amounts, which, together with the phenols content results, could explain the poor protective role observed with this tea *in vitro*. The reduced content of these antioxidant compounds in red tea could be related to the different manufacturing process of teas. Green and white teas are produced by drying and steaming the fresh leaves to inactivate the polyphenol oxidase and thus, no oxidation occurs (non-fermented); red tea is obtained by a post-harvest fermentation stage before drying and steaming, in which fermentation is attained by using microorganisms (Cabrera et al., 2006).

For these reasons we selected the green tea to the *ex vivo* study. Green tea is considered a dietary source of antioxidant nutrients because green tea is rich in polyphenols and contains carotenoids, tocopherols, ascorbic acid, minerals and certain phytochemical compounds. The beneficial effects of green tea observed in this study could be attributed to the antioxidant activity of the tea polyphenols by scavenging reactive oxygen and nitrogen species. In fact, the green tea catechins have been shown to be more effective antioxidant than Vitamins C and E (Rice-Evans et al., 1995). Furthermore, some natural products have been used to reduce heavy metal accumulation and intoxication by promoting excretion from the body. In this way, authors reported that green tea inhibits absorption and promotes excretion of cadmium (Kim and Rhee, 1994). Metal-chelating properties of green tea catechins are also important contributors to their antioxidative activity (Hider et al., 2001). In the current study, we verified that green tea therapy was able to reverse the enzyme inhibition induced by metal exposure in ovarian tissue of mice.

Considering that EGCG represents 65% of the catechins content in green tea and appears to be responsible for most of the beneficial physiological actions associated with green tea consumption (Zaveri, 2006) we expected that the beneficial effects on ovarian enzyme activity observed in the present study could be attributed to the higher content of EGCG in green tea compared to other teas evaluated. However, EGCG as well as other catechins studied were not able to restore  $\delta$ -ALA-D activity inhibited by cadmium *in vitro*. In this way, catechins are not the major components responsible for the beneficial effect of green tea observed in this study. In fact, the chemical composition of tea is complex, consisting of polyphenols (catechins and flavanoids), alkaloids (caffeine, theobromine, theophylline, etc.), volatile oils, polysaccharides, amino acids, lipids, vitamin C, minerals and other uncharacterized compounds (Karori et al., 2007). Ohe et al. (2001) observed that catechins (EC, ECG, EGC and EGCG) were not the most important constituents responsible for anti-genotoxic abilities of 12 tea leaf extracts, including green tea, against direct-acting nitroarenes. Additionally, Okai and Higashi-Okai (1997) verified that non-polyphenolic fraction of green tea presented an anti-genotoxic effect.

There was not a significant difference in the caffeine content comparing tea infusions, though the green tea presented high theobromine content. A high correlation between the polyphenols content (mainly caffeic acid, chlorogenic acid and rutin) and the antioxidant activity of different extracts has been demonstrated (Kono et al., 1997). Gallic acid, a metabolite of propyl gallate, is known to potentiate several pharmacological and biochemical

pathways having strong antioxidant (Kim et al., 2002) activity. Although red tea presented higher content of gallic acid it had no beneficial effect on enzyme activity. We evaluated the antioxidant potential of three teas studied and all of them presented a significant antioxidant potential in relation to scavenging activity of DPPH (2,2'-diphenyl- $\beta$ -picryl-hydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radicals as well as on reactive species (RS) production induced by sodium azide in mice liver homogenates *in vitro* (data not shown). Green tea was slightly better compared with other teas, which could explain a more prominent effect of this tea in reversing enzyme inhibition caused by cadmium.

In conclusion, this study supports evidence about the beneficial role of the nutritional sources like as unfermented teas evaluated (green and white teas), which were effective in protecting against  $\delta$ -ALA-D inhibition caused by cadmium in ovarian tissue. Additionally, the greatest effect of green tea observed *in vitro* as well as the protective role presented in the *ex vivo* study could be attributed to the major content of phenols, but not catechins. Furthermore, other products presented by the green tea infusion, not only polyphenolic, but also non phenolic content could be contributing to the beneficial effect observed in this study. Taking into account the cadmium toxicity on reproductive systems as well as the importance of studies to discover new therapeutic approaches to avoid cadmium toxicity, this study demonstrated the helpful effect of green tea infusion in ameliorating the acute cadmium toxicity on a marker protein of metal intoxication in ovarian tissue.

#### Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### Acknowledgements

The financial support by CNPq and FAPERGS is gratefully acknowledged. F.W.S. is the recipient of CNPq fellowships. CAPES is also acknowledged for financial support (M.Sc. Fellowship) to A.P.I. and L.M.V.

#### References

- Almajano, M.P., Carbó, R., Jimenez, J.A.L., Gordon, M.H., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem.* 108, 55–63.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cabrera, C., Artacho, R., Giménez, R., 2006. Beneficial effects of green tea – a review. *J. Am. Coll. Nutr.* 25 (2), 79–99.
- Chandra, S., Mejia, E.G., 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguayensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3583–3589.
- El-Shahawi, M.S., Hamza, A., Bahaffi, S.O., Al-Sibaai, A.A., Abdaljabbar, T.N., 2012. Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography. *Food Chem.* 134, 2268–2275.
- Filipic, M., 2012. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutat. Res.* 733, 69–77.
- Frei, B., Higdon, J.V., 2003. Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: evidence from animal studies. *J. Nutr.* 133 (10), 3275S–3284S.
- Goto, T., Yoshida, Y., Kiso, M., Nagashima, H., Mejia, E.G., 1996. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *J. Chromatogr. Anal.* 749, 295–299.
- Hider, R.C., Liu, Z.D., Khodr, H.H., 2001. Metal chelation of polyphenols. *Methods Enzymol.* 335, 190–203.
- Järup, L., Åkesson, A., 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 201–208.
- Karori, S.M., Wachira, F.N., Wanyoko, J.K., Ngure, R.M., 2007. Antioxidant capacity of different types of tea products. *Afr. J. Biotechnol.* 6 (19), 2287–2296.
- Kim, M.J., Rhee, S.J., 1994. Effects of Korean green tea, oolong tea and black tea beverage on the removal of cadmium in rat. *J. Korean Food Nutr.* 23 (5), 784–791.
- Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y., 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3713–3717.

- Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adashi, K., Ueda, A., Sawa, Y., Shibata, H., 1997. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochim. Biophys. Acta* 1335 (3), 335–342.
- McKay, D.L., Blumberg, J.B., 2002. The role of tea in human health: an update. *J. Am. Coll. Nutr.* 21 (1), 1–13.
- Nogueira, C.W., Soares, P.A., Nascimento, P.C., Muller, D., Rocha, J.B.T., 2003. 2,3-Dimercaptopropyl-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury and cadmium-induced inhibition of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicology* 184, 85–95.
- Ognjanovic, B.I., Markovic, S.D., Dordevic, N.Z., Trbojevic, I.S., Stajic, A.S., Saicic, Z.S., 2010. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: protective role of coenzyme Q10 and vitamin E. *Reprod. Toxicol.* 29, 191–197.
- Ohe, T., Marutani, K., Nakase, S., 2001. Catechins are not major components responsible for anti-genotoxic effects of tea extracts against nitroarenes. *Mutat. Res.* 496, 75–81.
- Okai, Y., Higashi-Okai, K., 1997. Potent suppressive activity of non-polyphenolic fraction of green tea (*Camellia sinensis*) against genotoxic-induced umuC gene expression in *Salmonella typhimurium* (TA1535/psk1002), association with pheophytins a and b. *Cancer Lett.* 120, 117–123.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res.* 22 (4), 375–383.
- Rocha, J.B.T., Saraiva, R.A., Garcia, S.C., Gravina, F.S., Nogueira, C.W., 2012. Aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. *Toxicol. Res.* 1, 85–102.
- Sabu, M.C., Smitha, K., Kuttan, R., 2002. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 83, 109–116.
- Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nascimento, P.C., Marques, M.S., Nogueira, C.W., 2005. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. *Food Chem. Toxicol.* 43, 1723–1730.
- Sassa, S., 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28, 133–145.
- Shin, M., Paek, D., Yoon, C., 2011. The relationship between the bone mineral density and urinary cadmium concentration of residents in an industrial complex. *Environ. Res.* 111 (1), 101–109.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., 2001. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20, 77–88.
- Thompson, J., Bannigan, J., 2008. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod. Toxicol.* 25, 304–315.
- Tsai, T., Tsai, T., Chien, Y., Lee, C., Tsai, P., 2008. In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: a comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chem.* 110, 859–864.
- Vahter, M., Akesson, A., Liden, C., Ceccatelli, S., Berglund, M., 2007. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environ. Res.* 104 (1), 85–95.
- Varga, B., Zsolnai, B., Paksy, K., Náray, M., Ungváry, G., 1993. Age dependent accumulation of cadmium in the human ovary. *Reprod. Toxicol.* 7 (3), 225–228.
- Vargas, L.M., Soares, M.B., Izaguirry, A.P., Lüdtké, D.S., Braga, H.C., Savegnago, L., Wollenhaupt, S., Brum, D.S., Leivas, F.G., Santos, F.W., 2012. Cadmium inhibits the ovary  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity in vitro and ex vivo: protective role of seleno-furanoside. *J. Appl. Toxicol.*, in press (<http://dx.doi.org/10.1002/jat.2783>).
- Zaveri, N.T., 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci.* 78 (18), 2073–2080.

## 5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos concluir que:

- As infusões provenientes da *Camellia sinensis*, especialmente as formas não fermentadas (chá branco e verde) nas maiores concentrações, foram eficazes em proteger contra a inibição da  $\delta$ -ALA-D causada por cádmio em tecido ovariano bovino, enquanto que o chá vermelho (forma parcialmente fermentada) não apresentou efeito *in vitro*.

- Após a determinação da quantidade de fenóis totais presentes nos chás, verificou-se que o chá verde apresenta maior quantidade comparada com o chá branco e o chá vermelho. Chá verde > Chá branco > Chá vermelho.

- As três variedades de chá não apresentaram diferença significativa na quantidade de cafeína, mas o chá vermelho apresentou maior quantidade de ácido gálico comparado com os demais, enquanto que o chá verde foi o que apresentou maior quantidade de teobromina.

- A quantidade de catequinas foi maior no chá verde, seguido pelo chá branco e o chá vermelho que apresentou somente a ECG.

- Verificou-se que nenhuma das catequinas estudadas foi eficaz na prevenção da atividade da enzima inibida pelo cádmio. Além disso, a EC e ECG *per se* inibiram a atividade da enzima.

- Após a exposição aguda ao cloreto de cádmio, verificou-se que este metal inibiu significativamente a atividade da  $\delta$ -ALA-D de ovário de camundongas e a terapia com o chá verde reverteu esta inibição.

- O maior efeito do chá verde observado *in vitro*, bem como o papel protetor apresentado no estudo *ex vivo*, poderia ser atribuído ao maior teor de fenóis, mas não ao conteúdo de catequinas. De fato, as catequinas não foram capazes de restaurar a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D inibida por cádmio em ovário bovino, demonstrando que estes compostos não são os principais responsáveis pelo efeito benéfico do chá verde observado neste estudo.

Levando-se em conta toxicidade de cádmio em sistemas reprodutivos, bem como a importância dos estudos para descobrir novas abordagens terapêuticas para evitar a toxicidade do cádmio, este estudo demonstrou o efeito protetor da infusão de chá verde

em melhorar a toxicidade aguda induzida pelo metal em uma proteína marcadora de intoxicação por metais no tecido ovariano. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para elucidar quais os possíveis mecanismos de ação do cádmio e do extrato, e sobre quais parâmetros em nível de sistema reprodutivo estes poderiam estar atuando.

## 6 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Realização de outro tratamento agudo, para determinar outros parâmetros, como a determinação dos níveis de antioxidantes não enzimáticos, como Glutathione reduzida (GSH) e Ácido Ascórbico, e outros enzimáticos, como Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Redutase (GR).
- Determinar os níveis de progesterona, hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante, com o objetivo de investigar se o cádmio altera os níveis destes hormônios e se o chá verde poderia interferir nestes parâmetros.
- Avaliar o efeito do cádmio e do chá verde, em um tratamento agudo, com camundongos machos, a fim de comparar a resposta terapêutica em sistema reprodutor feminino e masculino.
- Posteriormente, testar a terapia com o chá verde em um modelo de exposição crônica ao cádmio em camundongos machos e fêmeas, para posterior avaliação de parâmetros antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos), avaliação histológica dos testículos e ovários.
- Avaliar o efeito *ex vivo* dos chás branco e vermelho, frente a toxicidade aguda causada pelo cádmio na atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D em ovário de camundongas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almajano M. P.; Carbó R.; Jiménez A. L.; Gordon M. H.; **Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions.** Food Chemistry 108, 55–63, 2008.

Aramini, J.M.; Hiraoki, T.; Ke, Y.; Nitta, K.; Vogel, H.J. **Cadmium-113 NMR studies of bovine and human alpha-lactalbumin and equine lysozyme.**J. Biochem., 117, p.623-628, 1995.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Cadmium.** Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2008.

Beber, F.A.; Wollmeister, J.; Brigo, M.J.; Silva, M.C.; Pereira, C.N.; Rocha, J.B. **Delta-Aminolevulinate dehydratase inhibition by ascorbic acid is mediated by an oxidation system existing in the hepatic supernatant.** Int. J. Vitam.Nutr.Res., 68, 181–188, 1998.

Bechara, E. J. H.; Medeiros, M. H. G.; Monteiro, H. P.; Hermes-Lima, M.; Pereira, B.; Demasi, M.; Costa, C. A.; Abdall, D. S. P.; Onuki, J.; Wendel, C. M. A.; Masci, P. D. **A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload.** Quim.Nova., 16, p. 385-392, 1993.

Bechara, E. J. **Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid.** J. Med. Biol. Res., 29, 841–851, 1996.

Bechara, E. J. H.; Dutra, F. ; Cardoso, V. E.; Sartori, A.; Olympio, K. P.; Penatti, C. A.; Adhikari, A.; Assunção, N. A. **The dual face of endogenous  $\alpha$ -aminoketones: pro-oxidizing metabolic weapons.** Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol.Pharmacol, 146; 88-110, 2007.

Braga, M. M.; Dick, T.; de Oliveira, D. L.; Guerra, A. S.; Leite, M. C.; Ardaís, A. P.; Souza, D. O.; Rocha, J. B. **T.Cd modifies hepatic Zn deposition and modulates  $\delta$ -ALA-D activity and MT levels by distinct mechanisms.** J. Appl. Toxicol. 32, 20–25, 2012.

Brandão R.; Santos F.W.; Oliveira R.; Roman S.S.; Nogueira C.W. **Involvement of non-enzymatic antioxidant defenses in the protective effect of diphenylselenide on testicular damage induced by cadmium in mice.**J. Trace Elem. Med. Biol. 23: 324–333, 2009.

Brandão R.; Oliveira R.; Nogueira C.W. **Association between diphenyl diselenide and cadmium chloride attenuates the toxicity of both in tissues of mice in vitro.**Toxicol.In Vitro 26: 1736–1742, 2010.

Bode, A. M.; Dong, Z. **Epigallocatechin 3-gallate and green tea catechins: united they work, divided they fail.** Cancer Prevention Research, 2, 514–517, 2009.

Camouse, M.M.; Domingo, D.S.; Swain, F.R.; Conrad, E.P.; Matsui, M.S.; Maes, D.; Declercq, L.; Cooper, K.D.; Stevens, S.R.; Baron, E.D. **Topical application of green and white tea extracts provides protection from solar-simulated ultraviolet light in human skin.** *Exp. Dermatol.* 18, 522–526, 2009.

Casalino, E.; Calzaretti, G.; Sblano, C.; Landriscina, C. **Cadmium-Dependent Enzyme Activity Alteration Is Not Imputable to Lipid Peroxidation.** *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 383, 2, 15 p. 288–295, 2000.

Casalino, E., Valzaretti, G., Sblano, C., Landriscina, V., Felice Tecce, M., Landriscina, C. **Antioxidant effect of hydroxytyrosol (DPE) and Mn<sup>2+</sup> in liver of cadmium-intoxicated rats.** *Comp. Biochem. Physiol.* 133, 625-632, 2002.

Chan, P. T.; Fong, W. P.; Cheung, Y. L.; Huang, Y.; Ho, W. K. K.; Chen, Z. Y. **Jasmine green tea epicatechins are hypolipidemic in hamsters fed a high-fat diet.** *Journal of Nutrition,* 129, 1094–1101, 1999.

Chen, Z.; Zhu, Q. Y.; Tsang, D.; Huang, Y. **Degradation of green tea catechins in tea drinks.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 49, 477–482, 2001.

Cheng, T. O. **Review. All teas are not created equal: The Chinese green tea and cardiovascular health.** *International Journal of Cardiology,* 108, 301–308, 2006.

Costa, C. A. ; Trivelato, G. C. ; Pinto, A. M. P. ; Bechara, E. J. H. **Correlation Between Plasma 5-Aminolevulinic Acid Concentrations And Indicators Of Oxidative Stress In Lead-Exposed Workers.** *Clin. Chem,* 43, n. 7, p. 1196-1202, 1997.

Costa P. P.; Silva D.C. **Uma Xícara (chá) de Química.** *Rev. Virtual Quim.* 3, 27-36, 2011.

Demasi, M. ; Penatti, C. A. A. ; Delucia, R. ; Bechara, E. J. H. **The Prooxidant Effect Of 5-Aminolevulinic Acid In The Brain Tissue Of Rats: Implications In Neuropsychiatric Manifestations In Porphyrias..** *Free Radical Biol. Med.,* 20, 291-299, 1996.

Demasi, M.; Costa, C. A.; Pascual, C.; Llesuy, S.; Bechara, E. J. H. **Oxidative Damage Response Promoted By 5-Aminolevulinic Acid Promptly Induces Of Plasma Antioxidant Capacity.** *Free Radical Res.,* 26, 235-243, 1997.

Duh P.D.; Yen G.C.; Yen W.J.; Wang B.S.; Chang L.W. **Effects of pu-erh tea on oxidative damage and nitric oxide scavenging.** *J Agric Food Chem,* 52, 8169-8176, 2004.

Emanuelli, T.; Rocha, J.B.T.; Pereira, M.E.; Porciuncula; L.O, Morsch, V.M.; Martins, A.F.; Souza, D.O. **Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on aminolevulinatase dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice.** *Pharmacol.Toxicol.,* 79, 138-143, 1996.

Emanuelli T, Rocha JB, Pereira ME, Nascimento PC, Souza DO, Beber FA. **Delta-Aminolevulinate dehydratase inhibition by 2,3-dimercaptopropanol is mediated by chelation of zinc from a site involved in maintaining cysteinyl residues in a reduced state.** Pharmacol.Toxicol., 83, 95–103, 1998.

Emanuelli T., Pagel, F.W., Alves, L.B., Regner, A., Souza, D.O. **Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-aminolevulinic acid in rat and human brain.** Neurochem.Int., 38, 213-218, 2001.

Farina, M.; Barbosa, N. B. V.; Nogueira, C. W.; Folmer, V.; Zeni, G.; Andrade, L. H.; Braga, A. L.; Rocha, J. B. T. **Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of delta-aminolevulinate dehydratase from rat liver and cucumber leaves** Braz. J. Med. Biol. Res, 35, 623–631, 2002.

Farina, M.; Brandão, R.; deLara, F.S.; Pagliosa, L.B.; Soares, F.A.; Souza, D.O.; Rocha, J.B.T. **Profile of non protein thiols, lipid peroxidation and delta-aminolevulinate dehydratase activity in mouse kidney and liver in response to acute exposure to mercuric chloride and sodium selenite.** Toxicol 3, 179–87, 2003a.

Farina M., Brandão R., deLara F.S., Soares F.A.A., Souza D.O.; Rocha J.B.T. **Mechanism of the inhibitory effects of selenium and Mercury on the activity of δ-aminolevulinate dehydratase from mouse liver, kidney and brain.** Toxicol Lett; 139, 55-66, 2003b.

Filipic, M. **Mechanisms of cadmium induced genomic instability.** Mutat.Res. 733, 69–77, 2012.

Fraga, C.; Di Mascio, P. ; Onuki, J. ; Lucesoli, F. ; Bechara, E. J. H. **5-Aminolevulinic acid mediates the** Carcinogenesis (New York. Online), 15, 2241-2244, 1994.

Frank, J.; George, T. W.; Lodge, J. K.; Rodriguez-Mateos, A. M.; Spencer, J. P. E.; Minihane, A. M.; Rimbach, G. **Daily consumption of an aqueous green tea extract supplement does not impair liver function or alter cardiovascular disease risk biomarkers in healthy men.** The Journal of Nutrition, 139, 58–63, 2009.

Flora, S.J.S.; Dubey, R.; Kannan, G.M.; Chauhan, R.S.; Pant, B.P.; Jaiswal, D.K. **Meso 2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) and monoysoamyl DMSA effect on gallium arsenide induced pathological liver injury in rats.** Toxicol.Lett., 132, 9–17, 2002.

Fujita H.; C. Nishitani, C.; Ogawa,K. **Lead, Chemical Porphyria, and Heme as a Biological Mediator.** Tohoku J. Exp. Med., 196, 53–64, 2002.

Fu, H.; He, J.; Mei, F.; Zhang, Q.; Hara, Y.; Ryota, S.; Lubet, R. A.; Chen, R.; Chen, D. R.; You, M. **Lung cancer inhibitory effect of epigallocatechin-3-gallate is dependent on its presence in a complex mixture (polyphenon E).** Cancer Prevention Research, 2, 531–537, 2009.

Galleano, M.; Oteiza, P. I.; Fraga, C. G. **Cocoa, chocolate, and cardiovascular disease.** Cardiovascular Pharmacology, 54, 483–490, 2009.

Gibson, K.D.; Neuberger, A.; Scott, J.J. **The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase.** *Biochem. J.* 61, 618-628, 1955.

Goering, P.L. **Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity.** *Neurotoxicology* 14, 45-60, 1993.

Goering, P.L.; Waalkes, M.P.; Klassen, C.D. **Toxicology of cadmium. In: Toxicology of Metals: Biochemical Aspects.** Handbook of Experimental Pharmacology, Springer-Verlag, New York, 11, 189-213, 1995

Hartwig, A. **Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights.** *BioMetals*, 23, 951-960, 2010.

Heinemann, I. U.; Jahn, M.; Jahn, D. . **The biochemistry of heme biosynthesis.** *Arch. Biochem. Biophys.* 474, 238-251, 2008.

Henning, S. M.; Niu, Y.; Liu, Y.; Lee, N. H.; Hara, Y.; Thames, G. D. **Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals.** *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 610-616, 2005.

Honda, R.; Swaddiwudhipong, W., Nishijo, M.; Mahasakpan, P.; Teeyakasem, W., Ruangyuttikarn, W.; Satarug, S.; Padungtod, C.; Nakagawa, H. **Cadmium induced renal dysfunction among residents of rice farming area downstream from a zinc-mineralized belt in Thailand.** *Toxicol. Lett.*, 198, 26-32, 2010.

IARC, International Agency for Research on Cancer. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.** Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Industry, 58, 119-238. Lyon: IARC, 1993.

Jaffe, E.K.; Ali, S.; Mitchell, L.W.; Taylor, K.M.; Volin, M., Markham, G. D. **Characterization of the role of the stimulatory magnesium of Escherichia coli porphobilinogen synthase.** *Biochemistry*, 34, 244-251, 1995.

Jaffe, E.K. **The porphobilinogen synthase catalyzed reaction mechanism.** *Bioorg. Chem.*, 32, 316-325, 2004.

Jaffe, E.K.; Lawrence, S. H. **Allostery and the dynamic oligomerization of porphobilinogen synthase** *Arch. Biochem. Biophys.*, 519, 131-143, 2012.

Jihen, E.; Imed, M.; Fatima, H.; Abdelhamid, K. **Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: Histology and Cd accumulation.** *Food Chem. Toxicol.*, 46, 3522-3527, 2008.

Jones, M.M.; Cherian, M.G. **The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication.** *Toxicology* 6, 1-25, 1990.

Khan, S. A.; Priyamvada, S.; Khan, W.; Khan, S.; Farooq, N.; Yusufi, A. N. K. **Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced**

**nephrotoxicity.** Pharmacological Research, 60, 382–391, 2009.

Khelifi, R.; Hamza-Chaffai. **Head and neck cancer due to heavy metal exposure via tobacco smoking and professional exposure: a review.** Toxicol. Appl. Pharmacol 248, 71–88, 15, 2010.

Kilmartin, P. A.; Hsu, C. F. **Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry.** Food Chemistry, 82, 501–512, 2003.

Kim Y.; Goodner K. L.; Park J.D.; Choi J.; Talcott S.T. **Changes in antioxidant phytochemicals and volatile composition of Camellia sinensis by oxidation during tea fermentation.** Food Chemistry 129, 1331–1342, 2011.

Klimisch, H.-J. **Lung deposition, lung clearance and renal accumulation of inhaled cadmium chloride and cadmium sulphide in rats.** Toxicology, 84, 103-124, 1993.

Koizumi, T.; Li, Z.G. **Role of oxidative stress in single-dose, cadmium-induced testicular cancer.** J. Toxicol. Environ. Health 37, 25-36, 1992.

Kryston, T. B.; Georgiev, A. B.; Pissis, P.; Georgakilas, A. G. **Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis.** Mutation Research, 711 193–201, 2011.

Koutelidakis, A. E.; Argiri, K.; Serafini, M.; Proestos, C.; Komaitis, M.; Pecorari, M.; Kapsokefalou, M. **Green tea, white tea, and Pelargonium purpureum increase the antioxidant capacity of plasma and some organs in mice.** Nutrition 25 453–458, 2009.

Kuo K.L.; Weng M.S.; Chiang C.T.; Tsai Y.J.; Lin-Shiau S.Y.; Lin J.K. **Comparative studies on the hypolipidemic and growth suppressive effects of oolong black, Pu-erh, and green tea leaves in rats.** J Agric Food Chem, 53, 480-489, 2005.

Lawrence, S. H.; Selwood, T.; Jaffe, E. K. **Diverse clinical compounds alter the quaternary structure and inhibit the activity of an essential enzyme.** ChemMedChem, 6, 1067–1073, 2011.

Layer, G.; Reichelt, J.; Jahn, D.; Heinz, D. W. **Structure and function of enzymes in heme biosynthesis.** Protein Sci., 19, 1137–1161, 2010.

Luchese C.; Zeni G.; Rocha J.B.T.; Nogueira C.W.; Santos F.W. **Cadmium inhibits d-aminolevulinatedehydratase from rat lung in vitro: Interaction with chelating and antioxidant agents.** Chem. Biol. Interact. 165, 127–137, 2007.

Mao, J.T.; Nie, W.X.; Tsu, I.H.; Jin, Y.S.; Rao, J.Y.; Lu, Q.Y.; Zhang, Z.F.; Go, V.L.; Serio, K.J. **“White tea extract induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells” the role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and 15 lipoxigenases.** Cancer Prev. Res. (Phila.) 3, 1132–1140, 2010.

Markham, G.D.; Myers, C.B.; Harris, Jr K.A.; Volin, M.; Jaffe, E.K. **Spatial proximity and sequence localization of the reactive sulfhydryls of porphobilinogen synthase.** *Protein Sci.*, 2, 71–79, 1995.

Marongiu, B.; Porcedda, S.; Piras, A.; Rosa, A.; Deiana, M.; Dessi, M. A. **Antioxidant activity of supercritical extract of *Melissa officinalis* subsp *officinalis* and *Melissa officinalis* subsp *inodora*.** *Phytother. Res.* 18, 789-792, 2004.

Matović, V.; Buha, A.; Bulat, Z.; Dukić-Ćosić, D. **Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium.** *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 62, 65–76., 2011.

Matsubara, S.; Rodrigues-Amay D. B. **Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 26, 401-407, abr.-jun. 2006.

McKay, D.L.; Blumberg, J.B. **The role of tea in human health: an update.** *J. Am. Coll. Nutr.* 21, 1–13, 2002.

Monteiro H. P.; Abdalla, D.S.; Augusto O.; Bechara, E. J. **Free radical generation during delta-aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 271, 206–216, 1989.

Monteiro, H. P.; Bechara, E. J.; Abdalla, D. S. **Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning.** *Mol. Cell. Biochem.* 103, 73–83, 1991.

Moriwaki, H.; Osborne, M.; Phillips, D. **Effects of mixing metal ions on oxidative DNA damage mediated by a Fenton-type reduction.** *Toxicol In Vitro.* 22, 36-44, 2008.

Moulis, J. M. **Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals.** *BioMetals*, 23, 877–896, 2010.

Mukhtar, H., Ahmad, N. **Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health.** *American Journal of Clinical Nutrition* 71, 1698–1702, 2000.

Nampoothiri, L. P.; Gupta, S. **Simultaneous effect of lead and cadmium on granulosa cells: A cellular model for ovarian toxicity.** *Reproductive Toxicology*, 21, 179–185, 2007.

Nogueira, C.W., Soares, F.A., Nascimento, P.C., Muller, D., Rocha, J.B.T. **2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury and cadmium-induced inhibition of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase.** *Toxicology* 184, 85-95, 2003a.

Nordberg, G. F. **Historical perspectives on cadmium toxicology.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 192–200, 2009.

Nzengue, Y.; Candéias, S. M.; Sauvaigo, S.; Douki, T.; Favier, A.; Rachidi, W.; Guiraud, P. **Oxidative stress induced by cadmium in the C6 cell line: role of copper and zinc.** *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 25, 171–180, 2012.

Obanda, M.; Owuor, P. O.; Mang'oka, R. **Changes in thearubigen fractions and theaflavins levels due to variations in processing conditions and their effects on black tea liquor brightness and total colour.** *Food Chemistry*, 85, 163–173, 2004.

Ognjanovic, B.; Markovic, S.; Đorđević, N.; Trbojević, I.; Štajn, A.; Sačić, Z. **Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E.** *Reproductive Toxicology*, 29, 191–197, 2010.

Onuki, J.; Medeiros, M. H.; Bechara, E. J.; Di Mascio, P. **5-Aminolevulinic acid induces single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA in the presence of Fe<sup>2+</sup> ions.** *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis* 1225, 259–263, 1994.

Oteiza, P.I., Kleinman, C.G., Demasi, M., Bechara, E.J.H. **5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 316, 607–611, 1994.

Peixoto N.C.; Roza T.; Flores E.M.; Pereira M.E. **Effects of zinc and cadmium on HgCl<sub>2</sub>--ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats.** *Toxicology Letters* 146, 17–25, 2003.

Peixoto N.C.; Kratz C.P.; Roza T.; Morsch V.M. Pereira M.E. **Effects of HgCl<sub>2</sub> on porphobilinogen-synthase (E.C. 4.2.1.24) activity and on mercury levels in rats exposed during different precocious periods of postnatal life.** *Cell Biol. Int.* 31, 1057–1062, 2007.

Penatti, C. A.; Bechara, E. J.; Demasi, M. **The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: Implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 335, 53–60, 1996.

Pereira, B.; Curi, R.; Kokubun, E.; Bechara, E. **J.5-aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats.** *J Appl Physiol*, 72, 226–230, 1992.

Perottoni, J.; Meotti, F.C.; Folmer, V.; Pivetta, L.; Nogueira, C.W.; Zeni G.; Rocha, J.B.T. **Ebselen and diphenyl diselenide do not change the inhibitory effect of lead acetate on delta aminolevulinatase dehydratase.** *Environ Toxicol Pharmacol* 19, 239–48, 2005.

Piasek, M., Blanus, M., Kostial, K., Laskey, J.W. **Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers.** *Reprod. Toxicol.* 15, 673–681, 2001.

Piasek, M., Laskey, J.W., Kostial, R.K., Blanus, M. **Assessment of steroid disruption using cultures of whole ovary and/or placenta in rat and in human placental tissue.** *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 75, S36–S44, 2002.

- Rietveld, A.; Wiseman, S. **Antioxidant effects of tea: Evidence from human clinical trials.** *Journal of Nutrition*, 133, 3258S–3292S, 2003.
- Rikans, L.; Yamano, T. **Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity.** *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 14, 110-117, 2000.
- Rocha, J.B.T.; Pereira, M. E.; Emanuelli, T., Christofari, R. S.; Souza, D. O. **Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver kidney and blood of suckling rats.** *Toxicology*, 100, 27-37, 1995.
- Rocha, M.E.; Bandy, B.; Costa, C. A.; de Barros, M. P.; Pinto, A. M.; Bechara, E. J. **Iron mobilization by succinylacetone methyl ester in rats. A model study for hereditary tyrosinemia and porphyrias characterized by 5-aminolevulinic acid overload.** *Free Radical Res*, 32, 343–353, 2000.
- Rocha, M.E.; Dutra, F.; Bandy, B.; Baldini, R.L.; Gomes, S.L.; Faljoni-Alário A.; Liria, C.W.; Miranda, M.T.; Bechara, E.J. **Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid.** *Arch Biochem Biophys*; 409, 349-56, 2003.
- Rocha, J.B.T.; Saraiva, R.A.; Garcia, S.C.; Gravina, F.S., Nogueira, C.W. **Aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and pro-oxidant situations.** *Toxicol. Res.*1, 85-102, 2012.
- Rusak G.; Komes D.; Likic S.; Horz'ic' D.; Kovac' M. **Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used.** *Food Chemistry* 110, 852–858, 2008.
- Saito, S. T.; Fröhlich, P. E.; Gosmann, G.; Bergold, A. M. **Full validation of a simple method for determination of catechins and caffeine in Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) using HPLC.** *Chromatographia*, 65, 607-610, 2007a.
- Saito, S. T.; Gosmann G.; Saffi J.; Presser M.; Richter M.F.; Bergold A.M. **Characterization of the constituents and antioxidant activity of Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var. *assamica* IAC-259 cultivar) extracts.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9409-9414, 2007b.
- Santos, F. W.; Oro, T.; Zeni, G.; Rocha, J. B.; Nascimento, P. C.; Nogueira, C. W. **Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice.** *Toxicology Letters*, 152, 255–263, 2004a.
- Santos, F.W.; Zeni, G.; Rocha, J.B.T.; Nascimento, P.C.; Marques, M.S.; Nogueira, C.W. **Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice.** *Food Chem. Toxicol.*43, 1723-1730, 2005a.
- Santos, F.W.; Zeni, G.; Rocha, J.B.T.; Weis, S.N.; Fachinetto, J.M.; Favero, A.M.; Nogueira, C.W. **Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues.** *Chem.-Biol. Interact.* 151, 159-165, 2005b.

Saraiva, R.A.; Bueno, D. C.; Nogara, P. A.; Rocha, J. B. T. **Molecular Docking Studies of Disubstituted Diaryl Diselenides as Mammalian  $\delta$ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Enzyme Inhibitors** J. Toxicol. Environ. Health Part A, 75, 1012–1022, 2012.

Sassa, S.; Granick, S.; Kappas, A. **Effect of lead and genetic factors on heme biosynthesis in the human red cell.** Ann N Y Acad Sci; 244, 419–440, 1975.

Sassa, S. **Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay.** Enzyme 28, 133-145, 1989.

Sassa, S. **ALAD porphyria.** Semin. Liver Dis, 18, 95–101, 1998.

Serafini, M., Ghiselli, A., & Ferro-Luzzi, A. **In vivo antioxidant effect of green and black tea in man.** European Journal of Clinical Nutrition, 50, 28–32, 1996.

Shuto, R. Itai-itai. In: P. Wexler (Ed.), Encyclopedia of Toxicology (2<sup>a</sup> ed.). Bethesda, USA: Elsevier. (2005).

Smida, A.D., Cadmium, X.P. **Stimulates transcription of the cytochrome P450 side chain cleavage gene in genetically modified stable porcine granulosa cells.** Toxicol. Biol. Reprod. 10, 25–31, 2003.

Sohle, J.; Knott, A.; Holtzmann, U.; Siegner, R.; Gronniger, E.; Schepky, A.; Gallinat, S.; Wnck, H.; Stab, F.; Winnefeld, M. **White tea extract induces lipolytic activity and inhibits adipogenesis in humans subcutaneous (pre)-adipocytes.** Nutr. Metab. 6, 20, 2009.

Spiazzi, C.C.; Manfredini, V.; da Silva, F. E. B. Érico; Flores, M.M.; Izaguirry, A.P.; Vargas, L.M.; Soares, M.B.; Santos, F.W.  **$\gamma$ -Oryzanol protects against acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes.** Food and Chemical Toxicology, 55, 526-532, 2013.

Thompson, J.; Bannigan, J. **Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo.** Reproductive Toxicology. 25, 304–315, 2008.

Timbrell, A. **Principles of biochemical toxicology.** Second edition. Washington DC: Taylor e Francis London, 1991.

Unno, K.; Takabayashi, F.; Yoshida, H.; Choba, D.; Fukutomi, R.; Kikunaga, N.; Kishido, T.; Oku, N.; Hoshino, M. **Daily consumption of green tea catechin delays memory regression in aged mice.** Biogerontology, 8, 89–95, 2007.

Valentini J.; Grotto D.; Paniz C.; Roehrs M.; Burg G.; Garcia S.C. **The influence of the Hemodialy sistreat ment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients.** Biomed Pharmacother, 62, 378–82, 2008.

Vargas, L. M.; Soares, M. B.; Izaguirry, A. P.; Ludtke, D. S.; Braga, H. C.; Savegnago, L.; Wollenhaupt, S.; Brum, D. S.; Leivas, F. G.; Santos, F. W. **Cadmium inhibits the**

**ovary  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity in vitro and ex vivo: Protective role of seleno-furanoside.** J. Appl. Toxicol., 33, 679–684, 2013.

Vercesi, A. E.; Castilho, R. F.; Meinicke, A. R.; Valle, V. G.; Hermes-Lima, M.; Bechara, E. J. **Oxidative damage of mitochondria induced by 5-aminolevulinic acid: role of  $\text{Ca}^{2+}$  and membrane protein thiols.** Biochim.Biophys.Acta. 1188, 86–92, 1994.

Vinson, J.A.; Dabbagh, Y.A. **Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins.** Nutrition Research, Elmsford, 18, 1067-1075, 1998.

Wang, H.; Helliwell, K. **Epimerisation of catechins in green tea infusions.** Food Chemistry, 70, 337-344, 2000.

Wang, Q.; Zhao, H.; Chen, J.; Hao, Q.; Gub, K.; Zhu, Y.; Zhou, Y.; Ye, L.  **$\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase activity, urinary  $\delta$ -aminolevulinic acid concentration and zinc protoporphyrin level among people with low level of lead exposure.** Int. J. Hyg. Environ. Health 213, 52–58, 2010.

Wang Q.; Ye L.X.; Zhao H.H.; Chen J.W.; Zhou Y.K. **Benchmark dose approach for low-level lead induced haematogenesis inhibition and associations of childhood intelligences with ALAD activity and ALA levels.** Sci. Total Environ. 409, 1806–1810, 2011.

Way T.D., Lin H.Y., Kuo D.H., Tsai S.J., Shieh J.C., Wu J.C., Lee M.R., Lin J.K. **Pu-erh tea attenuates hyperlipogenesis and induces hepatoma cells growth arrest through activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human HepG2 cells.** J Agric Food Chem, 57, 5257-5264, 2009.

WHO. World Health Organization, Preventing Disease Through Healthy Environments. **Exposure to Cadmium: A Major Public Health Concern.** Geneva: World Health Organization. 2010.

WHO, World Health Organization, **Chemical Fact Sheets: Guidelines for Drinking-Water Quality**, fourth ed. World Health Organization, Geneva. 2011

Wu, S.J.; Ng, L.T.; Lin, C.C. **Antioxidant activities of some common ingredients of traditional Chinese medicine, Angelica sinensis, Lycium barbarum and Poria cocos.** Phytother.Res. 18, 1008-1012, 2004.

Wu, S.C.; Yen, G.C.; Wang, B.S.; Chiu, C.K.; Yen, W.J.; Chang, L.W.; Duh, P.D. **Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea LWT.** Food Sci. Technol, 40, 506, 2007.

Weisbutger, J. H. **Tea and health: a historical perspective.** Canc. Lett., 114, 315, 1997.

Yang, C.S.; Maliakal, P.; Meng, X. **Inhibition of carcinogenesis by tea.** Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology 42, 25–54, 2002.

Yang, K., Julan, L., Rubio, F. **Cadmium reduces 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity and expression in human placental trophoblast cells**. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*290, 135–142, 2006.

Zaveri, N.T. **Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications**. *Life Sciences* 78, 2073–2080, 2006.

Zhang,W.; Jia,H. **Effect and mechanism of cadmium on the progesterone synthesis of ovaries**.*Toxicology* 239, 204–212, 2007.

Zhang, W.; Pang, F.; Huang Y.; Yan P.; Lin W. **Cadmium exerts toxic effects on ovarian steroid hormone release in rats**.*Toxicology Letters* 182, 18–23, 2008.

APÊNDICE A – Esquema representativo dos resultados

