

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Denise Teresinha Antonelli da Veiga

**ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) E SAÚDE: UM ESTUDO NO
METABOLISMO ÓSSEO E SISTEMA CARDIOVASCULAR EM
MULHERES PÓS-MENOPAUSA.**

Santa Maria, RS

2018

Denise Teresinha Antonelli da Veiga

**ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) E SAÚDE: UM ESTUDO NO METABOLISMO
ÓSSEO E SISTEMA CARDIOVASCULAR EM MULHERES PÓS-MENOPAUSA.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) para a obtenção do título de **Doutor em Farmacologia.**

Orientadora: Profa. Dra. Melissa Orlandin Premaor

Santa Maria, RS

2018

Denise Teresinha Antonelli da Veiga

ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) E SAÚDE: UM ESTUDO NO METABOLISMO ÓSSEO E SISTEMA CARDIOVASCULAR EM MULHERES PÓS-MENOPAUSA.

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovado em 05 de julho de 2018:

Melissa Orlandin Premaor, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)
(Co-orientador)

Natielen Jacques Schuch, Dra. (UFN)

Patrícia Chagas, Dra. (UFSM - Campi Palmeira das Missões)

Marilise Escobar Bürger, Dra. (UFSM)

Rodrigo de Almeida Vaucher, Dr. (UFPEL)

Santa Maria, RS

2018

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Dilene e Elpídio (*in memoriam*), pois tudo começou com eles.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a oportunidade de ter chegado até aqui, nesse momento que congrega o esforço de muitas pessoas, que direta ou indiretamente, fizeram parte desse caminho.

A meus pais, primeiramente, por incentivar sempre a estudar e ir mais além, pois acreditavam que o saber “nunca ocupa espaço” e “que ninguém pode te tirar o que aprendeu”. Um presente para se levar para a vida toda. Agradecer pelas palavras de incentivo a cada passo.

A meus irmãos, que também me apoiaram e se alegraram comigo pelas vitórias.

A meu marido, que abriu mão de muitos dias e noites, de idas ao cinema ou viagens porque a revisão dos artigos ou as aulas eram mais importantes naquele momento.

Agradeço a minha orientadora, por apostar na ideia do trabalho, pela confiança que depositou em mim e principalmente, pelo grande aprendizado recebido. Aos demais orientadores, meu muito obrigado.

Agradeço aos componentes do Laboratório de Bioquímica Clínica pelo auxílio com as coletas e realização dos exames laboratoriais e principalmente, ao professor Rafael Moresco pela grande ajuda nas respostas aos editores das revistas.

À doutora Aline A. Bolignon pela execução das análises da erva-mate utilizada neste trabalho.

Às colegas de doutorado, Rafaela e Juliana, pela amizade que, ao longo do tempo de convívio, se fortaleceu. Das discussões dos artigos, das teorias e estatísticas até os desabafos.

À secretaria do Programa de Pós-graduação em Farmacologia pelo apoio e orientações nessa fase final da tese. Ao secretário do Departamento de Clínica Médica, Christian Kuntz, pelo auxílio na formatação dessa tese.

A todos, o meu muito obrigado!

RESUMO

ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) E SAÚDE: UM ESTUDO NO METABOLISMO ÓSSEO E SISTEMA CARDIOVASCULAR EM MULHERES PÓS-MENOPAUSA.

AUTOR: Denise Teresinha Antonelli da Veiga

ORIENTADOR: Melissa Orlandin Premaor

A menopausa é um evento caracterizado pela cessação completa dos ciclos menstruais como consequência da redução importante dos níveis séricos de estrogênio, o que leva ao aumento de doenças crônicas (osteoporose, doenças coronarianas, hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus) e maior mortalidade. O desequilíbrio do estresse oxidativo, provocado pela diminuição do estrogênio, é um dos processos que explicam essas alterações presentes na mulher pós-menopausa. A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma árvore nativa do sul da América Latina possui propriedades antioxidante, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante e vasodilatadora, relacionadas ao conteúdo fenólico. Recentemente, estudos em animais e humanos evidenciam efeito da erva-mate no osso, com aumento da densidade mineral óssea. Existem poucas evidências sobre o consumo da erva-mate em relação às fraturas osteoporóticas e doenças cardiovasculares em mulheres pós-menopausa. Este trabalho estuda o efeito do consumo da erva-mate, consumido na forma de chimarrão, sobre os marcadores do metabolismo ósseo (P1NP e CTX), as fraturas osteoporóticas, as doenças cardiovasculares e seus fatores de risco, além do estresse oxidativo nas mulheres pós-menopausa. Trata-se de um estudo caso-controle aninhado ao estudo de coorte: Obesidade e Fraturas Ósseas, realizado nas Unidades Básicas de Saúde, do município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, com mulheres pós-menopausa acima de 55 anos. De um total de 1057 mulheres incluídas, identificou-se 118 (11,6%) fraturas osteoporóticas e 46 fraturas confirmadas foram sorteadas para avaliação. O grupo controle constitui-se de 49 mulheres sem fratura. As participantes preencheram questionário sobre o consumo de chimarrão. Medidas antropométricas foram realizadas, além de dosagens séricas dos marcadores do metabolismo ósseo (P1NP e CTX), homeostase do cálcio (Ca, F, PTH e Vitamina D), estresse oxidativo (FRAP, AOPP e NOx), e dosagens de lipídeos e glicose. Análise estatística: foram utilizados Qui-quadrado, exato de Fischer, teste t Student e regressão logística, com $p < 0,05$. Não houve diferença significativa quanto às fraturas e alterações nos níveis séricos de CTX, P1NP, FRAP, AOPP, colesterol total, LDL, HDL e triglicédeos. Entretanto, o óxido nítrico foi significativamente elevado nas mulheres com consumo de 1 litro ou mais de chimarrão e as que consumiam por mais de dez anos. Em uma análise de regressão logística, as fraturas osteoporóticas somente foram associadas com a idade das mulheres. As mulheres que consumiram 1 litro ou mais de chimarrão ao dia tiveram significativamente menos diagnósticos de doença coronariana, hipertensão arterial e dislipidemia, assim como os níveis séricos de glicose significativamente menores quando comparados àquelas com nenhum consumo ou menos que um litro ao dia. Conclui-se que a erva-mate tem um efeito neutro sobre as fraturas osteoporóticas, sem alterar os parâmetros do metabolismo ósseo e o estresse oxidativo. É o primeiro relato sobre a redução dos diagnósticos de doenças cardiovasculares confirmando os benefícios do consumo da erva-mate sobre o sistema cardiovascular.

Palavras-chave: erva-mate; *Ilex paraguariensis*; pós-menopausa; osteoporose; fraturas osteoporóticas; doenças cardiovasculares; estresse oxidativo; metabolismo ósseo.

ABSTRACT

YERBA MATE (*Ilex paraguariensis*) AND HEATH: A STUDY ON BONE METABOLISM AND CARDIOVASCULAR SYSTEM IN POSTMENOPAUSE WOMEN.

AUTHOR: Denise Teresinha Antonelli da Veiga
ADVISOR: Melissa Orladim Premaor

Menopause is an event characterized by the complete cessation of menstrual cycles as a consequence of the important reduction of serum estrogen levels, which leads to increased chronic diseases (osteoporosis, coronary artery disease, arterial hypertension and diabetes mellitus) and greater mortality. The imbalance of oxidative stress, caused by the decrease in estrogen, is one of the processes that explain these changes present in the post-menopausal woman. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) is a native tree in Southern Latin America with antioxidant, hypocholesterolemic, hypoglycemic and vasodilating properties related to phenolic content. Recently, animal and human studies have demonstrated the effect of yerba mate on bone, with increased bone mineral density. There is little evidence about the consumption of yerba mate in relation to osteoporotic fractures and cardiovascular diseases in postmenopausal women. This work studies the effect of the consumption of yerba mate, consumed in the form of mate, on the markers of the bone metabolism (P1NP and CTX), osteoporotic fractures, cardiovascular diseases and their risk factors, as well as oxidative stress in women postmenopausal. It is believed that yerba mate may reduce the prevalence of osteoporotic fractures, improves the parameters of oxidative stress and decreases cardiovascular events. It is a case-control study nested in the cohort study: Obesity and bone fractures, performed in the Basic Health Units, of the municipality of Santa Maria, Rio Grande do Sul, with postmenopausal women above 55 years of age. Of a total of 1057 women included, it was identified 118 (11.6%) fractures osteoporotic and 46 confirmed fractures were drawn for evaluation. The control group consisted of 49 women without a fracture. Participants completed a questionnaire on the consumption of mate. Anthropometric measurements were carried out, in addition to serum dosages of bone metabolism markers (P1NP and CTX), calcium homeostasis (Ca, F, PTH and vitamin D), oxidative stress (FRAP, AOPP and NOx), and dosages of lipids and glucose. Statistical analysis were used chi-squared, exact Fischer, T Student test and logistic regression, with $P < 0.05$. There was no significant difference regarding fractures and changes in serum levels of CTX, P1NP, FRAP, AOPP, total cholesterol, LDL-C, HDL-C and triglycerides. However, nitric oxide was significantly elevated in women consuming 1 liter or more of "chimarrão" and consuming them for more than 10 years. In a logistic regression analysis, osteoporotic fractures were only associated with the age of women. Women who consumed 1 liters or more of day-old had significantly fewer diagnoses of coronary disease, hypertension and dyslipidemia, as well as significantly lower serum glucose levels when compared to those with no or less than 1 liter daily. It was concluded that yerba mate has a neutral effect on osteoporotic fractures, without altering the parameters of bone metabolism and oxidative stress. It is the first report on the reduction of diagnoses of cardiovascular diseases confirming the benefits of consumption of yerba mate on the cardiovascular system.

Keywords: yerba mate; *Ilex paraguariensis*; postmenopausal; osteoporosis; osteoporotic fractures; cardiovascular diseases; oxidative stress; bone metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Função ovariana na menopausa.....	17
Figura 2 – Consequências da menopausa sobre o sistema cardiovascular.....	19
Figura 3 – Reabsorção óssea e relação entre o osteoblasto e o osteoclasto.....	21
Figura 4 - Regulação do estrogênio sobre o osteoblasto, osteoclasto e osteócito.....	22
Figura 5 Áreas de Produção de erva-mate.....	31
Figura 6 – Fluxograma do Estudo 1	39
Figura 7 – Fluxograma do Estudo 2	41
Artigo 1 – Figure 1. Representative high-performance liquid chromatography profile of <i>Ilex paraguariensis</i> infusion, detection UV was at 327nm.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Marcadores do Metabolismo Ósseo	23
Artigo 1 – Table 1. Clinical and laboratory characteristics of the studied women according to their yerba mate (MATE) intake.....	56
Artigo 1 – Table 2. Clinical and laboratory characteristics of the studied women regarding their daily intake of yerba mate.....	57
Artigo 1 – Table 3. Clinical and laboratory characteristics of the participants regarding their time of yerba mate use.....	57
Artigo 1 – Table 4. Composition of <i>Ilex paraguariensis</i> infusion.....	58
Artigo 1 – Tabela 5. Logistic regression evaluating association of age, BMI, mate consumption and NOX log with fractures.....	58
Artigo 2 – Table 1. Clinical characteristics of the studied women according to their daily intake of yerba mate.....	71
Artigo 2 – Table 2. Table 2. Laboratory characteristics of the studied women regarding their daily intake of MATE.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AOPP	produtos avançados da oxidação das proteínas
BRAZOS	The BRAZilian Osteoporosis Study
CAT	catalase
CCS	Centro de Ciências da Saúde
COX-2	ciclooxigenase 2
CAT	catalase
CT	colesterol total
CTX	Telopeptídeo C terminal do colágeno tipo 1
DC	doença coronariana
DCV	doenças cardiovasculares
DM 2	diabetes melitus
DMO	densidade mineral óssea
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
E2	17 β estradiol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EO	estresse oxidativo
EROS	espécies reativas de oxigênio
FAT	fosfatase alcalina total
FIOP	plasma fluorescent oxidation products
FRAP	capacidade de redução do ferro no plasma
FSH	follicle-stimulating hormone
GLU	glicemia
GLOW	Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women
GSH	glutathiona reduzida
GSH-Px	glutathiona peroxidase
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	hemoglobina glicosilada
HDL-C	High Density Lipoprotein-Colesterol
IMC	índice de massa corporal
iNOX	nitric oxide synthase inducible
LAVOS	Latin American Vertebral Osteoporosis Study
LDL-C	Light Density lipoprotein-Colesterol

LH	luteinizing hormone
MDA	malondialdeído
NCEP-ATP III	National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III
NFKB	nuclear factor kappa B
NOx	nitrite/nitrate
NTX	Telo-peptídeo N terminal do colágeno tipo 1
OB	osteoblasto
OC	osteoclasto
OMS	Organização Mundial de Saúde
OP	osteoprotegerina
PN 1	Padrão Nacional 1
PN 2	Padrão Nacional 2
PN 3	Padrão Nacional 3
PTH	paratormônio
P1NP	pró-peptídeo amino-terminal do pró-colágeno tipo 1
P1CP	pró-peptídeo carboxi-terminal do pró-colágeno tipo 1
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa B
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
RIA	radioimunoensaio.
SM	síndrome metabólica
SOD	superóxido dismutase
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TG	triglicerídeos
TNF α	tumor necrosis factor alfa
UBS	Unidade Básica de Saúde
VEGF	vascular endothelial cell growth factor
1, 25 dihidroxivitamina D	calcitriol

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	13
1.2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
1.3	OBJETIVOS	35
1.4	HIPÓTESE CIENTÍFICA	35
1.5	MATERIAIS E MÉTODOS	36
2	ARTIGO 1 – YERBA MATE INTAKE HAS A NEUTRAL EFFECT ON BONE: A CASE-CONTROL STUDY IN POSTMENOPAUSAL WOMEN	41
3	ARTIGO 2 – PROTECTIVE EFFECT OF YERBA MATE INTAKE ON THE CARDIOVASCULAR SYSTEM: A POST HOC ANALYSIS STUDY IN POSTMENOPAUSAL WOMEN	59
4	DISCUSSÃO	72
5	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXO A – Questionário sobre o consumo da erva-mate	86
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE)	95
	ANEXO C – ARTIGO 1 – The yerba mate intake has a neutral effect on bone: A case-control study in postmenopausal women.....	98
	ANEXO D – ARTIGO 2 – Protective effect yerba mate intake on the cardiovascular system: a <i>post hoc</i> analysis study in postmenopausal women.....	99

1. APRESENTAÇÃO

Com a redução da produção de estrógenos pelos ovários, as mulheres pós-menopausa estão sujeitas a várias doenças crônicas, entre elas a osteoporose, as doenças cardiovasculares, o diabetes mellitus e a síndrome metabólica (CERVELATTI, 2016). No período perimenopausa, cerca de um a quatro anos antes da menopausa (período de doze meses após a última menstruação), ocorre distribuição da gordura corporal com adiposidade na região central (abdominal), com aumento na resistência à insulina, levando a alteração no perfil lipídico, mais aterogênico, devido a inflamação de baixo grau provocado pelo acúmulo de gordura visceral (DAVIS, 2015).

A prevalência de hipertensão arterial (HAS) e a mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) aumentam nesta fase, provocadas por distúrbios na vasodilatação, alteração do perfil lipídico com aumento de LDL-colesterol (LDL-C) e redução do HDL-colesterol (HDL-C) (LIMA, 2012). A associação de diabetes mellitus (DM2) e dislipidemia aumenta o risco para doenças cardiovasculares. Mulheres com DM2 tem risco 50 vezes maior de doença coronariana fatal do que os homens (HUXLEY, 2006).

Alguns estudos associam a menopausa como um fator de risco para o desequilíbrio no estresse oxidativo, devido a ação *scavenger* de radicais livres do estrogênio, com consequente redução da sua capacidade antioxidante. Outros estudos mostram aumento da lipoperoxidação dos lipídeos e redução da atividade das enzimas antioxidantes, principalmente a glutatona reduzida (GSH) e a glutatona peroxidase (GSH-Px) em mulheres pós-menopausa (KOLESNIKOVA, 2015).

Outra doença crônica do período pós-menopausa é a osteoporose, um distúrbio do metabolismo ósseo que afeta a quantidade e qualidade do osso, sendo a fratura osteoporótica, sua principal manifestação, que acarreta aumento na mortalidade (COMPSTON, 2010). Além das fraturas, a mortalidade associada à osteoporose também está relacionada às doenças cardiovasculares e pulmonares (KADO, 2000).

No Brasil, a incidência de fraturas varia conforme a região geográfica. No Sul, a porcentagem é menor que na região Nordeste (ARANTES, 2013). No entanto, a perspectiva para os próximos 50 anos para a América Latina é de aumento na incidência das fraturas osteoporóticas semelhante aos países desenvolvidos (RIERA-ESPINOZA, 2009).

Esse distúrbio no metabolismo ósseo decorre do desequilíbrio entre a formação e reabsorção óssea, com reparo insuficiente e/ou aumento na reabsorção, envolvendo várias células (osteoblastos, osteoclastos), citocinas (TNF α , RANKL) e hormônios (paratormônio, 1,25 dihidroxivitamina D, estrogênio), participantes do processo de remodelamento ósseo (SEIBEL, 2005).

Alguns métodos diagnósticos são utilizados para avaliação e quantificação do processo de remodelamento ósseo, entre eles a Densitometria Óssea, que avalia a densidade mineral óssea (DMO) e os biomarcadores do metabolismo ósseo, utilizados para medir as rápidas e dinâmicas mudanças do metabolismo ósseo (HLAING, 2014; SEIBEL, 2005). Também podem ser usados como ferramenta na determinação do risco de fraturas osteoporóticas em mulheres pós-menopausa (SEIBEL, 2005; EASTEL, 2008).

Os produtos do estresse oxidativo (EO) são encontrados na borda reabsortiva do osteoclasto, sugerindo que o radical superóxido seja necessário para a função das células ósseas e do processo de remodelamento ósseo (KEY, 1994; WAUQUIER, 2009). Entretanto, também são apontados como responsáveis pela fisiopatogenia da perda óssea relacionada à idade e à osteoporose em mulheres pós-menopausa (MARCUS, 2013; MANOLAGAS, 2010; ZHANG, 2011). Vários estudos mostram que a perda da DMO pode estar relacionada ao aumento de oxidantes e/ou redução dos níveis antioxidantes (ALTINDAG, 2008; SENDUR, 2009. CERVELLATI, 2014). O EO também pode ser preditor do risco de fratura de quadril em mulheres na pós-menopausa (YANG, 2014).

Nos últimos anos, estudos sobre os efeitos de frutas, verduras e chás vem ganhando força, para comprovar seus benefícios na saúde óssea. Os compostos fenólicos são os responsáveis por esses benefícios, pois atuam como antioxidantes (HECK, 2007).

Pela presença de flavonóides em sua composição, a erva-mate pode atuar como antioxidante no tecido ósseo. Em estudos experimentais com ratas Wistar senis, que consumiram chá mate por oito semanas, observou-se a melhora na DMO e nos parâmetros da FRAP (capacidade de redução do ferro no plasma) (BIAGGI, 2013, PEREIRA, 2013). Estudo em mulheres pós-menopausa, a DMO daquelas que consumiram a erva-mate na forma de chimarrão era maior quando comparada com aquelas que não faziam uso da bebida (CONFORTI, 2012).

Os efeitos da erva-mate sobre o sistema cardiovascular e metabólico também são evidentes. Vários estudos mostram um efeito sobre o estresse oxidativo; efeito vasodilatador e cardioprotetor no processo isquemia/reperfusão; melhora do perfil lipídico aterogênico dos lipídeos e redução dos níveis glicêmicos, tanto em estudos animais e humanos (SCHINELLA, 2005, PAGANINI STEIN, 2005, GAO, 2013, de MORAIS, 2009, PEREIRA 2012).

O consumo da erva-mate preparada na forma de chimarrão não foi estudado sobre o metabolismo ósseo: os biomarcadores do remodelamento ósseo, as fraturas osteoporóticas e os marcadores do estresse oxidativo. Apesar das evidências apontando efeitos benéficos sobre os níveis de lipídeos e glicose, não há pesquisas no impacto do consumo de erva-mate sobre a redução dos diagnósticos de doenças cardiovasculares. Nosso estudo visa responder se o consumo de chimarrão melhora a saúde óssea, reduz as fraturas, diminui os níveis de marcadores do estresse oxidativo, melhora os marcadores do metabolismo ósseo e reduz os diagnósticos de doenças cardiovasculares. São os primeiros estudos a reportar a relação do chimarrão com os desfechos descritos.

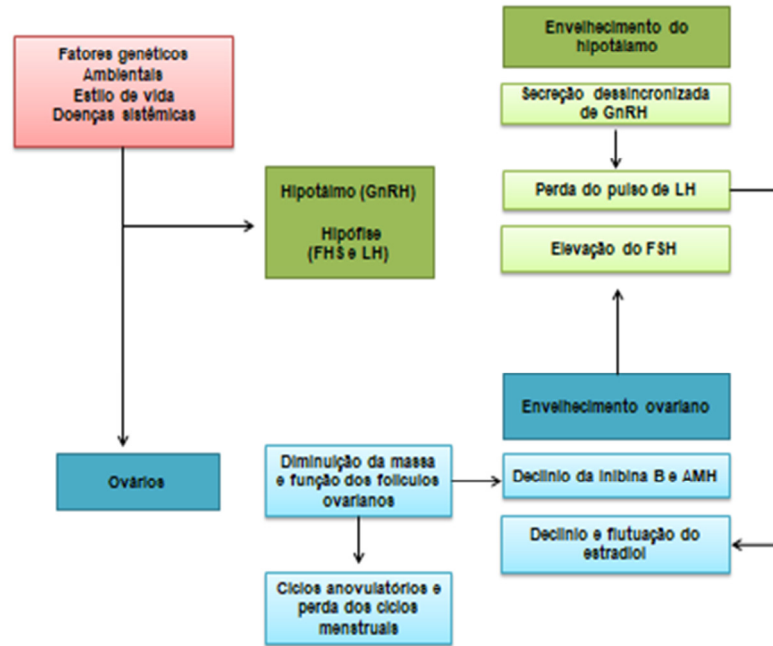
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1. Menopausa

A menopausa é um período de transição na vida reprodutiva da mulher, marcada pela redução acentuada da produção de estrogênios pelos ovários e consequente supressão dos ciclos menstruais (CERVELATTI, 2016). A menopausa é definida retrospectivamente, após doze meses da última menstruação (DALAL, 2017) e ocorre, em média aos 48,8 anos, sendo que na América Latina, a idade média é de 47,2 anos (DAVIS, 2015). A fase anterior à menopausa é denominada perimenopausa, que inicia, em média quatro anos antes da parada total da menstruação. Os ciclos menstruais tornam-se irregulares com períodos de amenorreia, ocorrem sintomas vasomotores (fogachos e suores noturnos) e insônia devido à insuficiência de produção de estrogênio, e a baixa qualidade dos folículos restantes (DAVIS, 2015). Segue-se, o período pós-menopausa, caracterizado pela falência da produção hormonal, com repercussões físicas importantes: tendência ao acúmulo de gordura abdominal/visceral, risco aumentado para DCV, principalmente a doença coronariana (DC) e osteoporose (CERVELATTI, 2016; DALAL, 2016; DAVIS, 2015).

O evento da menopausa se inicia nas células da camada granulosa dos ovários, com a diminuição do número de folículos e redução da produção de 17β -estradiol (E2), forma mais comum e mais potente de estrogênio. Os ovários não respondem mais aos estímulos hipofisários do *follicle-stimulating hormone* (FSH) e *luteinizing hormone* (LH) e a produção de estrogênio e progesterona cessam. Entretanto, a mulher pós-menopausa ainda mantém pequenos níveis estrogênicos produzidos pela conversão do androgênio adrenal e ovariano em estrona, uma forma menos potente, no tecido adiposo (DALAL, 2017; SEGAL, 2013). Na fase pré-menopausa, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal permanece intacto e com a falência ovariana, o nível de FSH eleva-se em resposta à redução do E2 e à ausência do *feedback* negativo do ovário. Então, a menopausa é caracterizada pela diminuição de E2 e elevação do FSH (DALAL, 2017) (Figura 1). Os níveis de E2 caem para 10pg/ml, quando comparados aos níveis da mulher na idade fértil com cerca de 100-250pg/ml (CERVELLATI, 2016).

Figura 1 - Função ovariana na menopausa.



Fonte: (adaptado de Davis, 2015, p. 4)

1.2.2. Alterações metabólicas e cardiovasculares na mulher pós-menopausa.

A primeira alteração metabólica ocorrida na menopausa é a redistribuição da gordura ginecoide/periférica para a região abdominal/visceral, influenciada pela redução de E2, com conseqüente aumento da resistência à insulina, propensão ao desenvolvimento de diabetes mellitus e modificação do perfil lipídico, com elevação do LDL-C e triglicerídeos (TG) e redução do HDL-C (DAVIS, 2017; FONSECA, 2017). A associação de DM2 e dislipidemia aumenta o risco para doenças cardiovasculares. Mulheres com DM2 tem risco 50 vezes maior de doença coronariana fatal do que os homens, provavelmente por apresentarem níveis de pressão arterial e de lipídeos mais elevados (HUXLEY, 2006). Em um estudo caso-controle com mulheres saudáveis e mulheres diabéticas, observou-se que a menopausa foi associada a níveis glicêmicos mais elevados e pior redução de HDL-C; e ainda, foi determinante para o aumento da pressão arterial tanto em mulheres diabéticas quanto nas saudáveis. Nesse mesmo estudo observou-se que os marcadores inflamatórios de risco cardiovascular, como proteína C reativa altamente sensível,

vascular endothelial cell growth factor (VEGF) e ácido úrico estavam significativamente elevados nas mulheres diabéticas e se mantiveram na fase pós-menopausa, acompanhados por aumento de TNF- α e foram associados à circunferência abdominal. A elevação nos marcadores inflamatórios infere um estado de inflamação crônica de baixo grau provocado pelo acúmulo de gordura abdominal/visceral (MASCARENHAS-MELO, 2013).

A disposição central da gordura associada a fatores de risco cardiovasculares, incluindo hipertensão, baixos níveis de HDL-C, aumento de LDL-C, TG e glicemia (GLU), caracterizam a síndrome metabólica (SM). Segundo os critérios diagnósticos baseados no *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III – NCEP-ATP III-2005*, o diagnóstico é feito pela combinação de três ou mais fatores associados, sendo que a gordura abdominal/visceral é o elemento central (GRUNDY, 2005). A SM é mais prevalente em mulheres pós-menopausa (de MARCHI, 2017; VELOSO, 2014), devido à redução da produção de estrogênios e aumento dos androgênios circulantes, resultando no acúmulo de gordura visceral e produção local de citocinas inflamatórias, EO e fatores vasoconstritores e trombóticos que conferem maior risco de doenças cardiovasculares (STEFANSKA, 2015). O risco cardiovascular aumenta conforme o número de alterações metabólicas presentes.

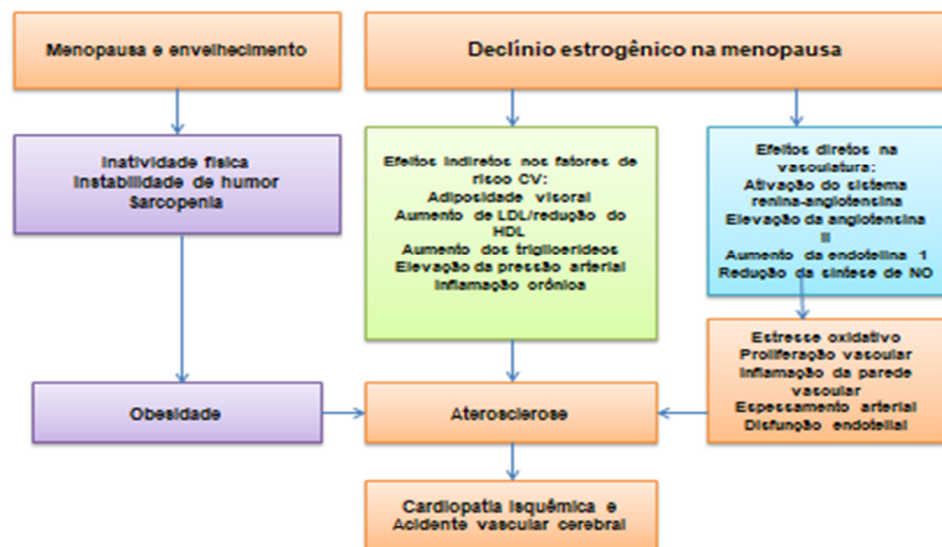
Após a menopausa, a prevalência de HAS é mais elevada em mulheres do que em homens, sendo que 75% das mulheres americanas com mais de 60 anos de idade são hipertensas. Os níveis tensionais são mais elevados e a HAS é de mais difícil controle, mesmo com uso de medicamentos anti-hipertensivos (LIMA, 2012). Alguns mecanismos podem estar relacionados com o aumento da pressão arterial, com perda da ação vasodilatadora produzida pelo estrogênio: ativação do sistema renina-angiotensina, com aumento da renina plasmática e níveis elevados de endotelina e desequilíbrio do EO com redução da produção de óxido nítrico (ON). Além disso, a obesidade pode elevar a pressão arterial pela ativação do sistema nervoso simpático provocando vasoconstrição, através do aumento da leptina (LIMA, 2012).

A doença cardiovascular é mais prevalente na mulher pós-menopausa, assim como o aumento do diagnóstico de infarto do miocárdio e da mortalidade por DCV e

está relacionado com número de fatores de risco presentes. Em um estudo longitudinal, a taxa anual de eventos coronarianos foi de 1,3% em mulheres sem fatores de risco e 8,7% com mais de cinco fatores de risco, um aumento de seis vezes (VITTINGHOFF, 2003). Outro estudo em mulheres chinesas internadas por doença arterial coronariana evidenciou que os fatores de risco tradicionais, como hipertensão, diabetes e dislipidemia, eram mais prevalentes nas mulheres pós-menopausa, incluindo maior recorrência da doença, que foi associada ao DM2 (YIHUA, 2017).

A Figura 2 resume as consequências da redução do estrogênio sobre o sistema cardiovascular na mulher pós-menopausa.

Figura 2 – Consequências da menopausa sobre o sistema cardiovascular.



Fonte: (adaptado de Davis, 2015, p. 7).

1.2.3 Estresse oxidativo e estrogênio.

Na mulher pré-menopausa ocorre um balanço apropriado do EO, que é perdido pela redução do estrogênio, considerado um antioxidante natural (SEIGAL, 2013). O estrogênio, por sua estrutura química, atua como *scavenger* de radicais livres que previne o dano oxidativo (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, 2012). No período

pós-menopausa ocorre um desequilíbrio do estresse oxidativo. Alguns marcadores do dano oxidativo encontram-se alterados nessa fase. Observou-se significativa elevação dos níveis de lipoperóxidos (através de TBARS) e redução da atividade da GSH-Px em mulheres pós-menopausa. Esses achados suportam a ideia de que o E2 influencie a atividade de enzimas antioxidantes (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, 2012). Os níveis séricos de α -tocoferol e retinol, assim como a atividade antioxidante total estavam significativamente diminuídos nas mulheres pós-menopausa quando comparadas com mulheres com ciclos menstruais regulares. Provavelmente esses achados estão relacionados à intensidade da peroxidação dos lipídeos em consequência da redução dos níveis de estrogênio (KOLESNIKOVA, 2015).

1.2.4. Tecido ósseo

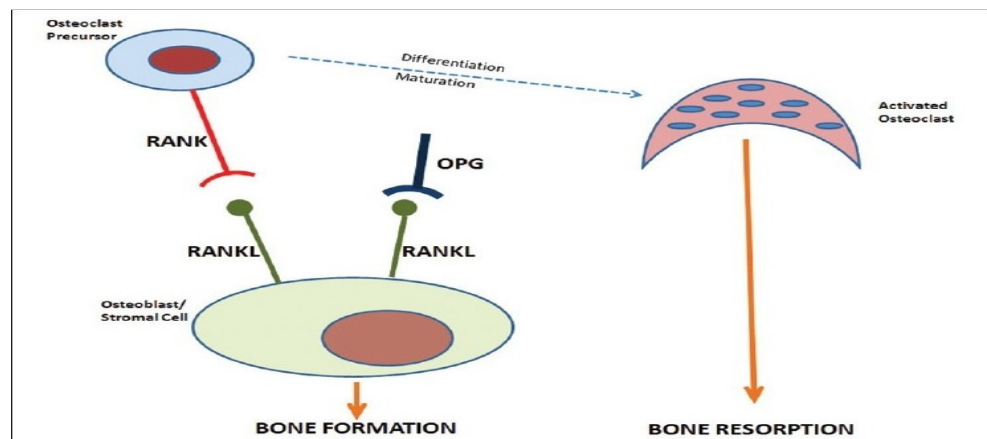
O osso é um tecido dinâmico composto por células e uma matriz inorgânica, representada pelo colágeno tipo I, osteocalcina, glicoproteínas e proteoglicanos, que perfaz 35% do tecido ósseo; os demais componentes (65%) são formados por moléculas inorgânicas, como: cálcio (Ca) e fósforo (F) na forma de cristais de hidroxi-apatita (HLAING, 2014). As três principais células do osso são: o osteoblasto (OB), responsável pela formação óssea; o osteoclasto (OC), responsável pela reabsorção óssea e, finalmente, o osteócito, que atua como um mecanoreceptor (SEIBEL, 2005).

O remodelamento ósseo, processo acoplado de reabsorção e formação óssea, se inicia em uma lacuna óssea, denominada lacuna de Howship, sob a ação de uma unidade celular multinucleada, o OC. Esta ação é seguida pela formação óssea, coordenada pelo OB, com depósito de material osteóide (matriz óssea não mineralizada), e com posterior mineralização. Todo o ciclo de remodelamento ósseo, em condições normais, dura cerca de três meses, com a fase de reabsorção durando em torno de sete a dez dias. Em situações usuais, a quantidade de osso reabsorvido é igual à quantidade formada (HLAING, 2014; SEIBEL, 2005).

O processo de reabsorção óssea é regulado por citocinas presentes nas membranas das células ósseas. O RANKL, membro da superfamília dos $TNF\alpha$, e a

osteoprotegerina (OP) são produzidas pelo osteoblasto, sob a ação do PTH e da 1,25 dihidroxivitamina D. Na membrana plasmática do osteoclasto ocorre a expressão do RANK que interage com o RANKL estimulando a ativação e sobrevivência do osteoclastos. A OP, por outro lado, age inibindo essa ligação, atuando como regulador do remodelamento (GONÇALVES, 2013) (Figura 3).

Figura 3 - Reabsorção óssea e relação entre o osteoblasto e o osteoclasto.



Disponível em: <www.researchgate.net/figure/Interaction-of-the-RANKL-RANK-OPG-biomolecular-complex_fig1_51625080>. Acesso em 08/07/18.

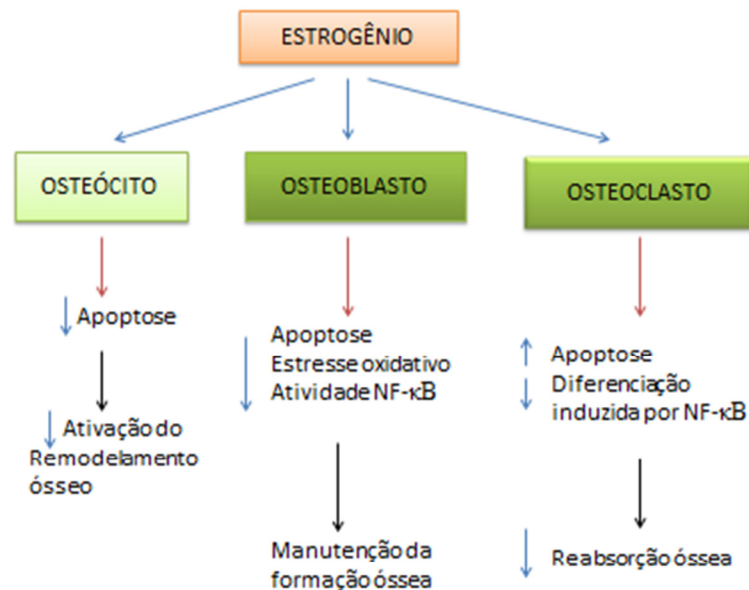
O estradiol, também participa do processo de remodelamento ósseo e é necessário para a formação e a manutenção da densidade mineral óssea. Atua sobre todas as células ósseas através de vários mecanismos. Aumenta a apoptose dos osteoclastos, aumenta a produção de osteoprotegerina e do RANKL pelos osteoblastos e inibe a apoptose dos osteoblastos e osteócitos, contribuindo para a formação óssea (PRISBY, 2017) (Figura 4).

Uma das funções do remodelamento ósseo é a manutenção dos níveis séricos normais de cálcio, através do PTH, 1,25 dihidroxivitamina D e da calcitonina, estimulando as células ósseas. Níveis de cálcio sérico diminuídos estimulam a síntese de 1,25 dihidroxivitamina D através da secreção de PTH, para que gradualmente aumente o nível sanguíneo de cálcio (ARABI, 2010).

No período entre a infância e a início da vida adulta, a quantidade de osso formado é maior que a de osso removido. O pico de massa óssea, definido como a máxima densidade e resistência, é atingido entre os 20 e 30 anos. Após este

período, há uma redução gradual da densidade óssea, de cerca de 1% ao ano (HLAING, 2014).

Figura 4 – Regulação do estrogênio sobre o osteoblasto, osteoclasto e osteócito.



Fonte: (adaptado de Khosla, 2013, p. 12)

Na maioria das situações, a formação e reabsorção óssea costuma ser um processo acoplado. Os marcadores bioquímicos de formação e reabsorção refletem esse processo, pois mostram as rápidas e dinâmicas mudanças do metabolismo ósseo (HLAING, 2014; SEIBEL, 2005).

A tabela 1, adaptada de Seibel e Coates, mostra os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, mais utilizados.

Os marcadores de formação e reabsorção óssea são facilmente avaliados no soro/plasma ou na urina (SEIBEL, 2005; COATES, 2013). Esses são divididos em duas categorias:

- a) Marcadores de formação óssea, relacionados com a atividade osteoblástica;
- b) Marcadores de reabsorção óssea, relacionados com a atividade osteoclástica.

Tabela 1 - Marcadores do Metabolismo Ósseo.

Marcadores Ósseos	Tecido		Método analítico	Varição
<i>Formação óssea</i>				
Osteocalcina	Osso, plaquetas	Soro	RIA ELISA	8%
Pró-peptídeo N pró-colágeno tipo 1 (P1NP)	Osso, tecidos moles e pele	Soro Plasma	RIA ELISA	8%
Fosfatase Alcalina total (FAT)	Osso, fígado, cérebro	Soro Plasma	Eletroforese RIA	8%
<i>Reabsorção óssea</i>				
Telopeptídeo C terminal do colágeno tipo 1 (CTX)	Osso, pele	Soro Plasma	RIA	8%
Telopeptídeo N terminal do colágeno tipo 1 (NTX)	Tecidos com colágeno	Soro Urina	ELISA RIA	Soro 12% Urina 25%

c) RIA: radioimunoensaio. ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

d) Adaptada de Seibel e Coates.

1.2.5 Marcadores do metabolismo ósseo.

1.2.5.1 Marcadores de formação óssea

a) Fosfatase alcalina total (FAT): a FAT é uma enzima localizada na membrana externa da célula. É originária de vários tecidos; entre eles o tecido

ósseo, renal, hepático, hematopoiético e placentário. Em adultos, 50% dela é produzida no fígado. A FAT é o marcador mais largamente usado para avaliação do metabolismo ósseo, devido a seu método de aferição ser simples e barato. Quando doenças hepáticas são descartadas, a elevação da FAT promove uma boa impressão sobre a extensão da formação óssea e da atividade osteoblástica (SEIBEL, 2005).

b) Pró-peptídeos do pró-colágeno tipo I: são derivados do colágeno tipo I, a mais abundante forma de colágeno encontrada no osso. Secretados na forma de pré-pró-colágeno e são caracterizados por pequenos peptídeos terminais – o pró-peptídeo amino-terminal do pró-colágeno total tipo 1 (P1NP) e o pró-peptídeo carboxi-terminal do pró-colágeno total tipo 1 (P1CP). Após sua secreção no espaço extracelular, esses peptídeos são enzimaticamente clivados e liberados na circulação. Diferentes estudos tem mostrado uma boa correlação entre o nível sérico de P1NP e a formação óssea. Ele é termoestável, podendo ser estocado por longos períodos (meses a anos) e facilmente transportado (SEIBEL, 2005).

e) Osteocalcina: é uma proteína não colágena, pequena sintetizada exclusivamente pelos osteoblastos, através do estímulo da 1,25-dihidroxitamina D. Pesquisas sugerem que a osteocalcina está envolvida na mineralização do osteóide porque se expressa principalmente nesta fase da formação óssea (SEIBEL, 2005). Apresenta uma meia-vida muito curta, cerca de cinco minutos (HLAING, 2014). Apesar de ser um marcador sensível da atividade do osteoblasto, seu uso na prática clínica é limitado devido a sua instabilidade, grande variedade de métodos e alta variabilidade biológica. Além disso, outras funções extra-ósseas foram identificadas para este peptídeo, nos fazendo acreditar que ele possa se tratar de um hormônio peptídeo. Por esses motivos, a osteocalcina não é um bom marcador de formação óssea (CLEMENS, 2011).

1.2.5.2. Marcadores de reabsorção óssea

a) Telo-peptídeos ligados ao colágeno tipo I: são os marcadores de reabsorção óssea, mais estudados e utilizados na prática clínica. Estes marcadores se apresentam em duas formas dependendo do sítio de ligação com o colágeno: telopeptídeos N terminal (NTX) e telopeptídeos C terminal (CTX). Ambos são

secretados na urina. Eles podem ser tanto aferidos em coleta de urina de 24 horas ou no soro. A coleta desses marcadores deve ser realizada em jejum devido à marcada variação circadiana, mais pronunciada com o CTX (QVIST, 2002).

1.2.5.3. Marcadores ósseos na determinação do risco de fraturas

O metabolismo ósseo aumentado é um fator de risco independente para fraturas osteoporóticas, tanto vertebrais quanto de colo de fêmur, em mulheres pós-menopausa (SEIBEL, 2006). Tanto o aumento dos marcadores de reabsorção, como a diminuição dos marcadores de formação óssea, determinam um risco elevado para fraturas (SEIBEL, 2006). No entanto, a associação entre o risco de fratura e a osteocalcina é mais fraca (HLAING, 2014).

O risco de fratura aumenta dramaticamente quando associado a uma baixa densidade mineral óssea (EASTEL, 2008). Há evidências que sugerem o uso combinado dos marcadores ósseos, a DMO e outros fatores de risco na avaliação do risco de fraturas em homens e mulheres pós-menopausa (SEIBEL, 2005; EASTEL, 2008).

1.2.6 Osteoporose

A osteoporose é um distúrbio do metabolismo ósseo caracterizada por baixa DMO e por alteração na microarquitetura do osso, levando a aumento na susceptibilidade a fraturas, com considerável impacto econômico e individual, pelo aumento da morbidade e mortalidade particularmente relacionado à fratura de quadril (COMPSTON, 2010).

As fraturas osteoporóticas tem predileção pelo osso trabecular e os sítios mais frequentes de fratura são as vértebras, o terço distal do rádio, o fêmur, o úmero, as costelas e os metatarsos. São conhecidas como fraturas de baixo impacto, definidas como as que ocorrem após queda da própria altura ou menos (POOLE, 2006). Cerca de 10 - 20% das mulheres morrem após fratura de quadril; e daquelas que sobrevivem, a metade perde a capacidade de vida independente (COMPSTON, 2010).

A osteoporose além de aumentar o risco de fraturas, também aumenta o risco de mortalidade para outras doenças. A redução da massa óssea, em particular a do

quadril, foi associada com aumento da mortalidade por doenças coronárias e pulmonares (KADO, 2000). Copês et al (2015) mostrou associação positiva entre fraturas osteoporóticas e doença isquêmica cardíaca. O compartilhamento de achados fisiopatológicos comuns entre a calcificação vascular e óssea poderia ser a explicação para os resultados encontrados (SPRINI, 2014).

1.2.6.1 Epidemiologia - Osteoporose no mundo e no Brasil

A incidência de fraturas osteoporóticas no mundo varia mundialmente. Nos Estados Unidos 40% das mulheres e 13% dos homens terão pelo menos uma fratura óssea durante a sua vida (CAULEY, 2014). Já no Reino Unido, o risco absoluto de fratura de quadril, punho ou vertebral é de 14%, 13% e 18%, respectivamente.

Na América Latina, o estudo LAVOS (Latin American Vertebral Osteoporosis Study), avaliou 1922 mulheres acima dos 50 anos quanto ao desfecho fraturas vertebrais morfométricas. Os autores encontraram uma prevalência de 11,18% de fraturas vertebrais nessa população. Quando avaliado isoladamente, o subgrupo da população brasileira apresentou uma prevalência de fraturas vertebrais morfométricas igual a 14,8%. A frequência de fraturas não vertebrais nos brasileiros foi 23,8%, incluindo as de fêmur (2,5%) (CLARK, 2009).

Entretanto, segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), nos próximos 50 anos, o número de fraturas osteoporóticas na América Latina quase se igualará aos números encontrados na Europa e Estados Unidos (RIERA-ESPINOZA, 2009).

No Brasil, alguns estudos regionais sugerem uma baixa a moderada incidência de fraturas de fêmur na população acima dos 50 anos, quando comparada à população caucasiana do Norte da Europa. O estudo BRAZOS (The BRAZilian Osteoporosis Study), foi o primeiro estudo epidemiológico brasileiro sobre a realidade das fraturas osteoporóticas e determinou a prevalência de fraturas de baixo impacto (úmero, fêmur, coluna, antebraço e costelas) em homens e mulheres acima dos 50 anos na população urbana e rural do Brasil no ano de 2009. Esse estudo encontrou uma prevalência de 15,1% de fraturas em mulheres e de 12,8% em homens (PINHEIRO, 2009).

Variação regional na frequência de fraturas osteoporóticas também ocorre no Brasil. No estudo BRAZOS, a prevalência de fraturas foi maior no Nordeste e menor na Região Sul (mulheres: 15,3% vs. 13,8%; homens: 21,8 vs. 10,6%) (Pinheiro *et al.*, 2010). Arantes *et al* identificaram uma incidência menor de fraturas nas cidades de Curitiba e Porto Alegre quando comparadas à Recife, Salvador, São Paulo e Rio de Janeiro (ARANTES, 2013).

1.2.6.2 Fatores de risco para fraturas osteoporóticas

Como a osteoporose é uma doença silenciosa, sendo diagnosticada somente após a ocorrência de fraturas, a avaliação dos fatores de risco é fundamental para o diagnóstico precoce desta patologia.

Alguns fatores de risco para fraturas ósseas já são bem estabelecidos. Entre eles: o sexo feminino, a idade avançada, os níveis baixos de estrógeno e testosterona, a história familiar de fraturas (especialmente de quadril e/ou em parentes de primeiro grau), a baixa DMO, as quedas ao solo, o sedentarismo, o consumo excessivo de álcool, o tabagismo, a deficiência de vitamina D e o baixo consumo de cálcio (COMPSTON, 2010; PINHEIRO, 2010).

Os fatores de risco para fraturas podem diferir conforme a população estudada. A frequência de deficiência de vitamina D costuma variar de acordo com a latitude (ARABI, 2013). Interessantemente, o estudo BRAZOS encontrou uma frequência de quedas que também variou conforme a região brasileira estudada. Esta prevalência foi significativamente menor na região Sul do Brasil (14, 9% para mulheres e 8,9% para homens) quando comparado com as demais regiões brasileiras (PINHEIRO, 2009).

Além dos fatores anteriormente descritos, outros fatores podem estar associados às fraturas ósseas. Desde o ano 2000, alguns estudos transversais relataram a importância do consumo de frutas e vegetais na manutenção da saúde óssea. Em sua maioria, estes estudos focaram principalmente no consumo de flavonoides encontrados nos vegetais, grãos, ervas e bebidas, como chás, vinho e sucos (CASTELO-BRANCO, 2013; NIEVES, 2013; SCHILLING, 2014; UYSAL, 2013; WEAVER, 2012).

Um estudo de coorte que incluiu 3160 gêmeas britânicas, com idade entre 18 e 79 anos, a ingestão de flavonoides foi associada a um aumento da densidade mineral óssea na coluna vertebral. Da mesma maneira, a ingestão de antocianinas (flavonoides derivados da uva, vinho, pera, cebola) e flavonas (flavonoides derivados da pimenta, laranja, vinho) foi positivamente associada com aumento da DMO nas vértebras e quadril (WELCH, 2012)..

Hardcastle et al (2011) realizaram estudo de base populacional sobre fatores de risco para fratura osteoporótica com 5119 mulheres com idade entre 45 a 54 anos; dessas, 3883 completaram avaliação com densitometria óssea e marcadores do metabolismo ósseo. Houve associação positiva entre a ingestão total de flavonoides e a DMO na coluna lombar e quadril de mulheres peri-menopausa. Nesse estudo, o chá foi o principal contribuinte da ingestão de flavonoides.

Em recente ensaio clínico randomizado; porém aberto com 112 sujeitos saudáveis com idade entre 65 e 85 anos, não houve nenhum efeito da ingestão de cinco porções de frutas ou verduras por dia sobre os marcadores ósseos (CTX e osteocalcina) quando comparado a uma ingestão menor do que cinco porções. Estes achados sugerem que outros componentes da dieta, que não frutas ou verduras, possam ter algum efeito no metabolismo ósseo (NEVILLE, 2014).

Em estudo transversal realizado na Argentina, em 2012 – que comparou a DMO de 146 mulheres na pós-menopausa que ingeriam pelo menos 1 litro de chimarrão por dia por mais de cinco anos com 146 mulheres na pós-menopausa que ingeriam uma quantidade menor que 1 litro por dia – houve associação positiva entre o maior consumo de chimarrão e a DMO na coluna lombar e do colo do fêmur (CONFORTI, 2012).

O efeito do chá-mate sobre o EO e a perda de massa óssea foi avaliado em dois estudos experimentais realizados com fêmeas senis de ratos Wistar. Os animais foram tratados com chá-mate por quatro e oito semanas e observou-se aumento significativo da FRAP e melhora na DMO no fêmur, assim como da força mecânica. Entretanto, o uso do chá-mate por quatro semanas não foi suficiente para minimizar o dano oxidativo (BIAGGI, 2013, PEREIRA, 2013).

1.2.6.3 Estresse oxidativo na osteoporose

Desde a década de 1990, o interesse pelo EO no metabolismo ósseo vem aumentando. Estudo realizado por Key Jr (1994) demonstrou que o radical superóxido está presente, de maneira concentrada e generalizada, na face externa da borda em escova dos osteoclastos, promovendo diretamente a reabsorção da matriz proteica do osso. O estresse oxidativo é uma causa potencial de muitas doenças e pode estar envolvido na perda de massa óssea e na altura do osso (MARCUS, 2013). Com a idade e a redução da produção de estrógenos há aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) que afetam a geração e sobrevivência dos osteoclastos, osteoblastos e osteócitos (MARCUS, 2013; MANOLAGAS, 2010; ZHANG, 2011).

O balanço oxidante/antioxidante (índice de estresse oxidativo) foi comparado com a DMO de mulheres pós-menopausa e observou correlação negativa entre o índice de EO e a DMO na coluna lombar e na cabeça femoral (ALTINDAG, 2008). Estudo realizado em 45 mulheres pós - menopausa com osteoporose sem fraturas correlacionou o aumento plasmático da malondialdeído (MDA) com a redução da DMO no colo femoral, possivelmente por aumento da atividade osteoclástica (SENDUR, 2009).

Cervellati et al (2014) sugerem que os marcadores do EO possam mediar o aumento da reabsorção óssea em mulheres pós-menopausa. A diminuição da DMO no fêmur total e da coluna lombar foi associada negativa e independentemente com aumento da peroxidação lipídica. O aumento sérico de CTX também foi relacionado com níveis elevados de hidroperóxidos. Os marcadores do estresse oxidativo falharam na correlação com a fosfatase alcalina óssea.

O papel dos sistemas antioxidantes, a peroxidação lipídica e o óxido nítrico (ON) em mulheres com osteoporose pós-menopausa, sem fratura foi avaliado. Houve aumento significativo da superóxido dismutase (SOD) e malondialdeído (MDA), enquanto que a atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) e ON foi comparada às mulheres controle. Houve associação positiva entre os níveis de SOD, catalase (CAT) e ON eritrocitário com a DMO (OZGOCMEN, 2007).

Recentemente, os marcadores do EO foram associados ao risco de fraturas osteoporóticas de quadril, em mulheres pós-menopausa. O estudo sugere que o

nível aumentado de FOP₃₂₀ (*plasma fluorescent oxidation products*) foi preditor para o risco de fratura de quadril (YANG, 2014).

1.2.6.4 Flavonóides como antioxidante.

Os flavonoides estão na categoria dos antioxidantes cujo papel está na prevenção de doenças e promoção da saúde. Muitos antioxidantes estão relacionados com a saúde óssea incluindo vitamina A, C e E, carotenóides e flavonóides (NIEVES, 2013). Entre as fontes de flavonóides estão frutas, vegetais, grãos, ervas, vinho tinto, sucos e chá, incluindo a erva - mate (NIEVES, 2013; BRACESCO, 2011; VIEIRA, 2008).

1.2.7 Erva-Mate – *Ilex paraguariensis* St.Hill. var.*paraguariensis* (Aquifoliaceae)

A erva-mate, *Ilex paraguariensis* St.Hill. var.*paraguariensis* (Aquifoliaceae) é uma planta nativa da América do Sul, especialmente dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do sul, no Brasil; além da Argentina, Uruguai e Paraguai. A área de erva mate abrange 5% do território brasileiro e se reduz para 3% na América do Sul. http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ervamate/CultivodaErvaMate2ed/Distrib_geograf.htm (Figura 5).

A erva-mate é uma árvore perene dioica, que pode crescer de 8-15 m. As folhas longas, de oito centímetros, de coloração verde-oliva são perenes, alternas, coriáceas, ovaladas, com margens dentadas e ápice obtuso, e tem uma base em forma de cunha. Os pecíolos são até 15 mm de comprimento. A floração ocorre durante primavera, produzindo flores pequenas, unissexuais que têm quatro pétalas brancas. Em algumas espécies tropicais ou subtropicais, o número de pétalas pode ser 5, 6 ou sete. Estes podem ser agrupados em grupos de 1-15 flores que aparecem na axila das folhas. Os frutos são bagas de cor vermelha contendo 4-5 sementes (BRACESCO, 2011).

1.2.7.1 Consumo.

A erva-mate é bastante consumida no sul do Brasil, onde cerca de 70% da população dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná bebem chimarrão, diariamente. Entre os países da América do Sul, o Uruguai apresenta o

maior consumo per capita 8 - 10 kg/hab/ano; enquanto que, na Argentina o consumo se situa ao redor de 6,5 kg/hab/ano e, na região sul do Brasil, se situa entre 3 e 5 kg/hab/ano (BRACESCO, 2011).

Figura 5. Áreas de Produção de erva-mate.



Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>.

Acesso em 05 de maio de 2014.

1.2.7.2 Processamento.

O processamento da erva-mate consiste em três fases distintas: um processo inicial de secagem rápida das folhas e ramos chamado "sapeco", que tem o objetivo de inibir a atividade enzimática, reduzir o nível de umidade e impedir sua decomposição; uma etapa de secagem parcial, a qual é normalmente executada por rotação de cilindros aquecidos por queima de madeira e seguida por uma secagem adicional e subsequente moagem (chamada de cancheamento ou fragmentação) (VIEIRA, 2008).

1.2.7.3 Preparo.

A erva-mate quanto a sua forma de apresentação, tecnologia de obtenção pode ser de preparada como:

- a) Chimarrão: quando a erva-mate cancheada e padronizada é moída e preparada para consumo com água quente.
- b) Tererê: quando a erva-mate cancheada e padronizada é moída e preparada para consumo com água fria.

Para a erva-mate/chimarrão, a Portaria nº 234, de 25 de março de 1998 (http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ervamate/CultivodaErvaMate_2ed/Distrib_geograf.htm, acesso em 05 de maio de 2014), da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, define seguintes padrões, conforme a quantidade de folhas e partes do ramo:

- Padrão Nacional 1 (PN 1) — mínimo de 70% de folhas e máximo de 30% de outras partes do ramo.
- PN 2 — 60% e 40%, respectivamente.
- PN 3 — 50% e 50%, respectivamente.

Para o preparo do chimarrão, cerca de 50g de folhas secas e moídas são colocadas em uma cuia ou porongo, preenchendo 1/3 do seu volume. No volume livre é adicionada água quente, formando uma infusão parcial, pois parte da erva permanece seca. O extrato aquoso é sorvido através de uma bomba de 10-12 cm. A adição de água quente é repetida várias vezes. Vinte a 40 ml da bebida fresca são ingeridos a cada vez, sendo que muitos consomem de 1-2 litros por dia. Essa quantidade equivale a 200 ml de café ingerido em 10min (MEINHART, 2010).

1.2.7.4 Erva-mate: composição, efeito antioxidante nos vários sistemas orgânicos.

Numerosos princípios fitoquímicos têm sido identificados na erva-mate, entre eles: polifenóis (ácido clorogênico), xantinas (cafeína e teobromina), alcalóides (ácido cafêico, 3,4-ácido dicafeoilquinico, 3,5- ácido dicafeoilquinico), flavonóides (quercetina, campeferol e rutina), aminoácidos, minerais (P, Fe e Ca) e vitaminas (C, B1 e B2) (BOJIC, 2013; GIULIAN, 2007, HECK, 2007; HEINRICHS, 2001). Meinhart et al (2010) estimaram a quantidade de xantinas e componentes fenólicos em extrato aquoso de erva – mate, chimarrão e tererê. Verificaram que a quantidade de metilxantinas no chimarrão foi menor do que no tererê; entretanto, a quantidade de compostos fenólicos foi maior. Apontam o chimarrão como uma interessante fonte de componentes fenólicos na dieta humana.

As propriedades antioxidantes do extrato preparado da infusão de erva-mate foram avaliadas em hepatócitos de ratos e verificou-se a inibição da peroxidação

lipídica microsomal hepática e atuação como *scavenger* de ânion superóxido; mas sem modificação na remoção do radical hidroxila (SCHINELLA 2000).

Matsumoto et al (2009) realizou estudo com chá mate em mulheres jovens saudáveis e observaram aumento na expressão de mRNA das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, sugerindo que o consumo contínuo de chá mate possa proteger o organismo contra danos oxidativos. A mesma opinião é compartilhada por Bracesco (2011), sobre o consumo contínuo de chimarrão, que pode produzir constante e sustentada concentração plasmática de componentes antioxidantes.

Em estudo realizado por Puangpraphant e De Mejia (2009), a erva-mate preparada na forma de chá mate inibiu a iNOS e COX-2 de macrófagos induzidos por lipopolisacarídeos via NFkB, provavelmente pelo sinergismo da quercetina e da saponina. O efeito anti-inflamatório do extrato de erva-mate também foi demonstrado em camundongos obesos induzidos por dieta rica em gordura, com melhora na resistência à insulina, talvez por inibição do TNF- α hepático e restauração da sinalização da insulina no tecido hepático e muscular (ARÇARI 2011).

Estudo em adultos normais, hipercolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos em uso de estatinas concluiu que o consumo de um litro por dia de chá mate melhorou os parâmetros do colesterol nos indivíduos normais e hipercolesterolêmicos e teve um efeito adicional na redução do LDL-colesterol nos indivíduos hipercolesterolêmicos em uso de estatinas. No entanto, não ocorreram mudanças significativas nos níveis séricos de triglicerídeos. A provável explicação é atribuída à presença de saponinas, de componentes fenólicos e/ou cafeína que bloqueiam a absorção do colesterol no intestino delgado e/ inibição da produção de colesterol no tecido hepático (de MORAIS, 2009).

Boaventura et al (2013) realizaram estudo piloto de intervenção, com indivíduos diabéticos e pré-diabéticos e o consumo de 330ml de infusões de erva-mate tostada na forma de chá ingerido após as principais refeições. Os níveis séricos de GLU, hemoglobina glicosilada (HbA1c) e os marcadores do EO foram analisados. Houve redução nos níveis de GLU e HbA1c nos sujeitos diabéticos após 60 dias. Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) aumentaram e os de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) reduziram em ambos os grupos. Concluíram que o consumo de

infusões de erva-mate tostada melhora significativamente o sistema de defesa antioxidante.

1.3. OBJETIVOS

- Geral: avaliar a associação do consumo de erva - mate, na forma de chimarrão, com as fraturas osteoporóticas maiores e sistema cardiovascular, em mulheres na pós-menopausa, com idade acima de 55 anos.

- Específicos:
 - a) Avaliar a influência do consumo da erva-mate na forma de chimarrão sobre os marcadores do estresse oxidativo (AOPP, FRAP e ON) em mulheres pós-menopausa com e sem fraturas ósseas maiores.

 - b) Analisar a associação do consumo da erva-mate na forma de chimarrão nos níveis séricos de P1NP e CTX em mulheres pós-menopausa com e sem fraturas ósseas maiores.

 - c) Associar o consumo da erva – mate na forma de chimarrão com a dosagem sérica de cálcio, fósforo, PTH e vitamina D em mulheres pós-menopausa com e sem fraturas ósseas maiores.

 - d) Medir os níveis séricos de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos e glicose nas mulheres pós-menopausa com e sem consumo de chimarrão.

 - e) Observar a influência do consumo da erva – mate na forma de chimarrão sobre as co-morbidades (doenças cardiovasculares, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, diabete mellitus) em mulheres pós-menopausa.

1.4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O consumo de erva-mate, na forma de chimarrão, está associado à redução das fraturas osteoporóticas, melhora dos parâmetros do estresse oxidativo e do metabolismo ósseo em mulheres pós-menopausa. O consumo de chimarrão está associado a redução das doenças cardiovasculares e melhora dos níveis séricos da glicose e dos lipídeos.

1.5 MATERIAIS E MÉTODOS

1.5.1 Delineamento estudo 1: estudo caso – controle aninhado. Trata-se de um estudo aninhado a um estudo de coorte (Obesidade e Fraturas Ósseas) que visa estudar o impacto da obesidade nas fraturas ósseas, em mulheres pós-menopausa, na cidade de Santa Maria, localizada no paralelo 29º, Sul do Brasil. População do estudo: mulheres na pós-menopausa com idade superior a 55 anos que consultam nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) do município de Santa Maria.

Inicialmente foram convidadas a participar 1301 mulheres provenientes de todos os bairros e distritos da cidade de Santa Maria, que tivessem algum atendimento nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) de seu território de domicílio pelo menos uma vez nos 24 meses anteriores ao início do estudo. Destas, 239 se negaram a participar, uma foi excluída por não ser de Santa Maria, três foram excluídas por ainda menstruarem e uma por ter menos de 55 anos. Todas as mulheres que preencheram os critérios de inclusão foram incluídas na pesquisa, resultando em uma amostra final de 1057 mulheres. Desta forma, foi possível compor uma amostra representativa da cidade de Santa Maria. Após recrutamento das pacientes, as mesmas eram informadas sobre a natureza do projeto e solicitava-se a aquisição e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ver fluxograma, figura 6).

Cálculo da amostra: a amostra foi calculada considerando-se uma exposição ao uso de chimarrão de 50% na população com fraturas e um OR = 3,5 para o risco de fraturas. O poder foi de 0,80, o alfa de 0,05 e a razão de casos e controle igual a um, totalizando um n de 46 mulheres em cada grupo (CONFORTI, 2012).

No estudo de coorte anterior foram identificadas 118 fraturas maiores entre as 1057 mulheres. Dessas, foram sorteadas 46 mulheres que apresentavam pelo menos uma fratura maior confirmada após os 45 anos (fratura de fêmur, úmero, coluna vertebral sintomática ou punho). Um número igual de mulheres sem fraturas ósseas maiores foi sorteado para compor o grupo controle.

Crítérios de inclusão: mulheres com idade acima de 55 anos e na pós-menopausa que faziam parte do estudo de Coorte Obesidade e Fraturas Ósseas (CAAE 11166012.6.0000.5346). Foram considerados casos, as mulheres que

apresentaram pelo menos uma fratura maior após os 45 anos (fratura de fêmur, úmero, coluna vertebral sintomática ou punho) e controles, as mulheres que não apresentaram fratura maior óssea os 45 anos. O ponto de corte para idade escolhido (similar ao do estudo GLOW) foi de 55 anos, visando obter a quase totalidade de mulheres na menopausa após essa idade (HOOVEN, 2009).

Critérios de exclusão: mulheres com déficit cognitivo, com dificuldade de comunicação e de preenchimento do questionário.

Fator em estudo: consumo de chimarrão.

Desfechos: primário: fraturas ósseas maiores, metabolismo ósseo e estresse oxidativo e secundário: comorbidades cardiovasculares e metabolismo da glicose e lipídeos.

Procedimentos:

a) Entrevistadores e treinamento: as voluntárias que concordaram em participar do estudo preencheram novo TCLE. As pacientes que não quiseram vir à universidade responderam o TCLE pelo telefone e autorizaram a utilização do sangue já coletado no primeiro estudo para as aferições realizadas neste estudo. A aplicação dos questionários, as medidas de peso e altura e a coleta de sangue foram realizadas por bolsistas (acadêmicos de Medicina) devidamente treinados, com supervisão da autora e da orientadora do projeto. As informações foram sistematicamente anotadas conforme ficha de coleta. Antes do início da coleta, houve treinamento e padronização da coleta juntamente com os orientadores do projeto.

b) Variáveis coletadas: todas as mulheres selecionadas já foram submetidas a um questionário previamente validado, próprio, para ser auto-administrado, que também pode ser facilmente utilizado em pessoas com baixo nível de instrução (HOOVEN 2009). Os dados deste questionário foram aproveitados nesse novo estudo. O etilismo foi definido como a ingestão de mais de três unidades diárias (HOOVEN 2009). A prática de atividade física foi quantificada pela frequência semanal (BAECKE, 2010). Com relação ao índice de massa corporal, foram utilizados os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) (OMS, 2004). O índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela fórmula peso em Kg dividido pelo

quadrado da altura em metros. Os pontos de corte foram: baixo peso (IMC < 18,49 Kg/m²), peso normal (IMC entre 18,5 e 24,9 Kg/m²), sobrepeso (IMC entre 25 e 29,9 Kg/m²), obesidade grau I (IMC entre 30 e 34,9 Kg/m²), obesidade grau II (IMC entre 35 e 39,9 Kg/m²) e obesidade grau III (IMC maior ou igual 40 Kg/m²). Fraturas ósseas foram autorelatadas e posteriormente, confirmadas por RX ou prontuário, e as fraturas por fragilidade foram consideradas aquelas que ocorreram após os 45 anos, excluindo cabeça, mãos e pés. Foram consideradas fraturas maiores as fraturas localizadas em quadril, antebraço, úmero ou coluna vertebral clínica.

Foi aplicado um novo questionário (em anexo) referente ao consumo de erva-mate na forma de chimarrão e consumo de frutas e verduras (frequência alimentar). O consumo de chimarrão foi medido em litros/dia, sendo o ponto de corte 1l/dia (CONFORTI, 2012).

As amostras de sangue foram coletadas pela manhã, às 8 horas, em jejum, centrifugadas e armazenadas a - 80°. Os níveis de 25(OH) vitamina D e PTH intacto foram medidos por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), de acordo com o fabricante. Seus coeficientes de variação foram 4,7% e 4,8%, respectivamente. Os marcadores ósseos analisados foram o P1NP e CTX, medidos no plasma, por ELISA, com precisão intra-ensaio de 10% para P1NP e 8% para CTX. Os níveis séricos de albumina, cálcio, fósforo e creatinina foram medidos por análise automática com método padrão. Os níveis séricos de nitrito/nitrato (NOx) foram medido no aparelho Cobas MIRA, pelo método descrito e validado por Tatsch et al (2011). Os níveis séricos de albumina, CT, LDL-C, HDL-C, TG, GLU e creatinina foram medidos usando o aparelho automático Cobas MIRA®, através de método padrão.

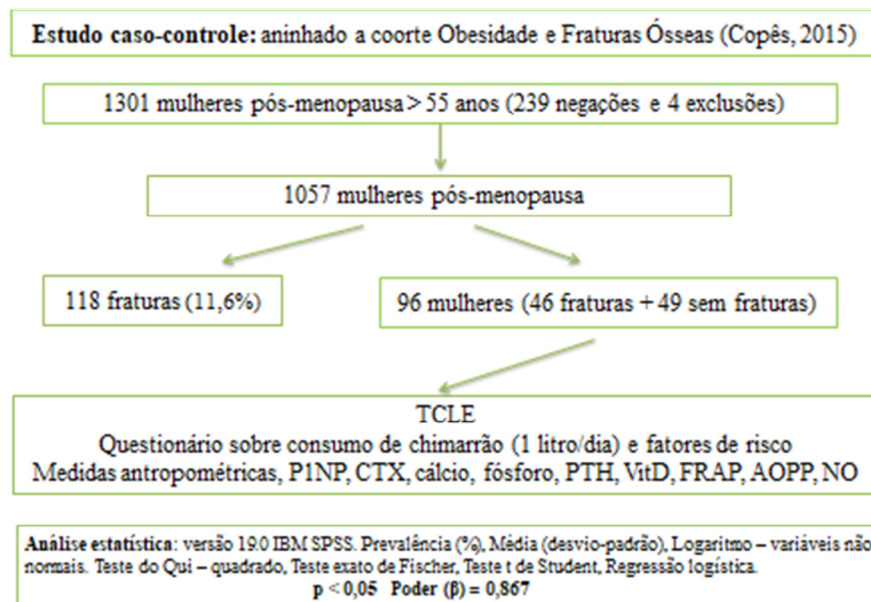
c) Análise estatística: foi realizada utilizando a versão 19.0 do programa estatístico IBM SPSS para Windows, São Paulo, Brasil. Os dados foram descritos em taxa de prevalência (por cento), media (desvio padrão). As variáveis de distribuição não normal foram transformadas para o seu logaritmo natural. Os testes Qui-quadrado, exato de Fisher e t de Student foram utilizados para avaliar possíveis diferenças entre os dois grupos. Foram utilizados modelos de regressão logística para avaliar uma possível associação entre o chimarrão e fraturas. O valor de P <

0,05. O poder do estudo foi calculado baseado na margem de não-inferioridade de 0,2 e foi de 0,867.

e) Risco da participação: o risco na participação do projeto foi considerado mínimo. A aplicação do questionário levou em torno de 20 minutos. Os participantes foram expostos, apenas aos riscos de punção venosa, que pode ocasionar equimoses, e muito raramente flebites ou síncope vaso-vagal.

A privacidade dos participantes foi preservada, e seus dados foram utilizados exclusivamente para a execução do presente projeto. As informações serão publicadas em artigos científicos ou congressos relacionados ao assunto, de forma anônima, e foram mantidas no Departamento de Clínica Médica, sala 1337, prédio 26 (local onde serão armazenados os dados) por um período de cinco anos sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Melissa Premaor. Após este período, os dados serão destruídos.

Figura 6 - Fluxograma do Estudo 1.



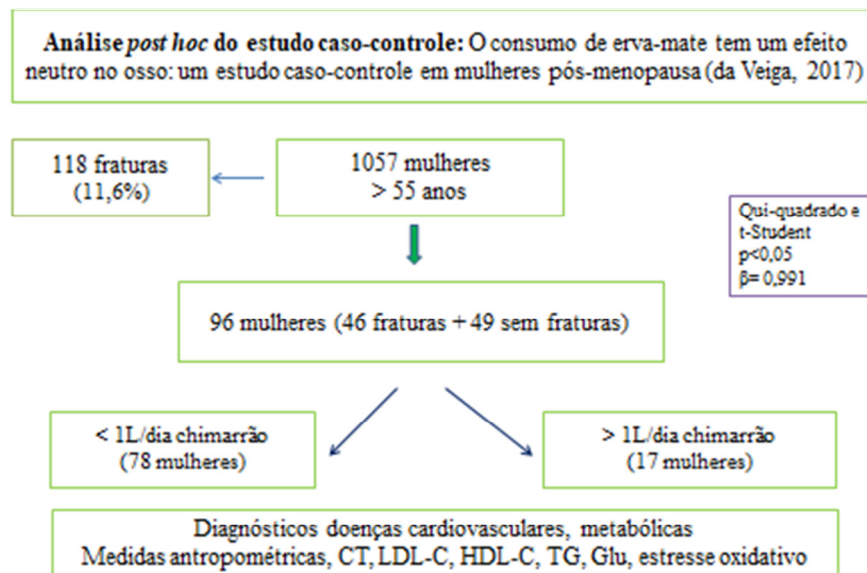
1.5.2 Delineamento estudo 2 - estudo transversal *post hoc* do estudo número 1, que avaliou o consumo do extrato aquoso de erva-mate consumido na forma de chimarrão em mulheres pós-menopausa. A coorte inicial constitui-se de 1057 mulheres com idade maior do que 55 anos, que tivessem sido atendidas nas

Unidades Básicas de Saúde da cidade de Santa Maria – RS. Foram excluídas as mulheres na menacme e aquelas com dificuldade de comunicação ou déficit cognitivo. Todas as 46 mulheres com fratura e as 49 mulheres do grupo controle sem fraturas foram incluídas na análise *post hoc* (n=95) (ver fluxograma, figura 7).

Um questionário padronizado com perguntas sobre fatores de risco cardiovasculares e doenças cardiovasculares autoreportadas foi aplicado. A ingestão de erva-mate foi avaliada por um questionário de frequência alimentar e quantificada por litro por dia.

Os níveis séricos de albumina, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicerídeos, glicose e creatinina foram medidos usando método comercial no Cobas MIRA (Laboratório Roche). Os níveis séricos de nitrito/nitrato (NOx), a capacidade de redução do ferro no plasma (FRAP) e os produtos avançados da oxidação das proteínas (AOPP) também foram analisados utilizando o Cobas MIRA.

Figura 7 – Fluxograma do Estudo 2.



A análise estatística foi realizada usando o programa IBM SPSS (versão 19.0 para Windows, Brasil). Os resultados foram relatados como taxas de prevalência (porcentagens) ou médias (desvio padrão). O ponto de corte considerado para o consumo de mate foi 1 L/dia, um critério adaptado e modificado de Conforti et al.

(2012). O teste do Qui-quadrado e teste T de Student foram usados para determinar possíveis diferenças entre os dois grupos. Diferenças foram consideradas significantes quando o P de duas vias fosse menor do que 0.05. O poder desse estudo para a avaliação da associação entre consumo de mate e frequência de doenças coronarianas foi de 0.991.

Os estudos foram aprovados pelo comitê de Ética em Pesquisa da UFSM, sob o nº **04320312.1.0000.5346** e pelo Núcleo de Educação Permanente em Saúde (NEPeS) do município de Santa Maria, nº **492/2012/SMS/NEPeS**, da Secretaria de Saúde da cidade de Santa Maria.

A tese será apresentada em formato de artigos científicos. Os artigos foram publicados nas seguintes revistas científicas: *Phytotherapy Research* (Estudo 1) e *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (Estudo 2).

2. ARTIGO 1 – YERBA MATE INTAKE HAS A NEUTRAL EFFECT ON BONE: A CASE-CONTROL STUDY IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

Running title: Yerba mate and Fractures

Denise T. A. da Veiga¹, Raísa Bringhenti¹, Aline A. Bolignon², Etiane Tatsh³, Rafael N. Moresco³, Fabio V. Comim¹, Melissa O. Premaor¹✉

¹Departamento de Clínica Médica, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

² Phytochemical Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

³Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

Abstract

Nutritional factors have been associated with osteoporosis and fractures. The intake of coffee may increase the risk of fracture while the intake of black and green tea is associated with its reduction. Recently, consumption of yerba mate was associated with increased bone mineral density in postmenopausal women. Nonetheless, its influence on fracture is not known. The aim of this study was to evaluate the effect of yerba mate tea intake on fractures, bone markers, calcium homeostasis, and oxidative stress in postmenopausal women. A case-control study was carried out in South Brazil, 46 women with fractures and 49 controls completed the study. There was no significant difference between the frequency of fractures in women who drank mate tea and women who did not (48.3% vs. 48.5%, $P=0.99$). Moreover, there was no significant difference concerning the serum levels of total calcium, phosphorus, PTH, vitamin D, P1NP, and CTX in the subjects with the history of yerba mate use when compared to controls. Higher serum levels of NOx were found in women who drank the yerba mate infusion. In conclusion, the yerba mate intake is not associated with fracture and it appears to have a neutral effect on the bone metabolism.

Keywords

"Yerba mate"; "*Ilex paraguariensis*"; "Postmenopausal women"; "Fracture"; "Bone markers", "Antioxidant"

Introduction

Osteoporosis is a disorder of bone metabolism characterized by reduced bone strength due to low bone mineral density (BMD) and altered microarchitecture, favoring an occurrence of vertebral and non-vertebral fractures. The osteoporotic fractures had a predilection for the trabecular bone and are usually low impact fractures (Eastell *et al.*, 2016). Studies have projected a significant increase in the prevalence of osteoporosis due to the aging of the world population. In the United States, this prevalence will be around 14 million by 2020. By 2025, the expected increase is almost 50% of the number of fractures, that is, more than three million fractures (Burge *et al.*, 2007). In Brazil, the elderly will comprehend a 23% of the total population by 2050, with an increase in the number of chronic diseases, including osteoporosis (Baccaro *et al.*, 2015). Moreover, several studies have shown the considerable impact of osteoporosis on morbidity and mortality, especially related to hip fracture (Eastell *et al.*, 2016).

Some nutritional risk factors are linked to the reduction of bone mineral density (BMD) and fracture. Low calcium intake and vitamin D deficiency are well-established risk factors for low BMD, increased bone markers, and fracture (Rizzoli *et al.*, 2014). The consumption of coffee, mainly two or more cups a day, equivalent to 220mg of caffeine, is associated with an increased risk of fragility fracture (Lee *et al.*, 2014). Contrastively, studies indicate the consumption of black tea and green tea (*Camelia sinensis*) is a protective factor for fractures, probably because of its polyphenols content (Sheng *et al.*, 2014; Shen e Chyu, 2016).

Recently, the intake of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) was associated with an increase in BMD in postmenopausal women who consumed one liter of mate per day, similar to that observed in black tea consumption (Conforti *et al.*, 2012; Myers *et al.*, 2015). On the other hand, some believe that it could have a deleterious effect on bone metabolism due to its high content of caffeine. The yerba mate (*Ilex*

paraguariensis) is a plant native of southern South America. Its leaves can be roasted to prepare the mate tea which is served with hot or cold water. The yerba mate used in the preparation of the tea called "Chimarrão" goes through a process of drying and grinding, keeping the leaves green and is consumed with hot water. Several phytochemical components are identified in the leaves of yerba mate, among them the xanthines (caffeine and theobromine) and polyphenols (Meinhart *et al.*, 2010) such as chlorogenic acid and epigallocatechin (Bracesco *et al.*, 2011). Therefore, its effect on bone metabolism and bone fracture could be different from coffee, black tea or green tea.

The aim of this study was to evaluate the association between the consumption of mate tea and fragility fractures, calcium homeostasis, bone markers and oxidative stress.

Experimental

Study Setting

This study was designed as a pragmatic case-control study nested in the Obesity and Bone Fracture cohort (Copes *et al.*, 2015) that aims to explore the impact of obesity on osteoporotic fractures in postmenopausal women in the city of Santa Maria, located in the 29th parallel, in southern Brazil. The original cohort included 1057 postmenopausal women, older than 55 years, a representative sample of the population attended at the primary care. The chosen cut-off point of 55 years was due to the fact that almost all women are post-menopausal after this age (Sowers *et al.*, 2006). Women with cognitive deficits, communication difficulties and questionnaire completion were excluded from the study. In total, 118 fractures (11.6%) were identified in the initial cohort study (n=1057). We were able to retrieve the X-ray information in 46 women who self-reported a fracture. We confirmed at least one major fracture in these 46 women, and they formed our case group. The 49 controls were randomly selected among the women without self-reported fracture.

Ethics

This study was approved by the ethics committee of the Federal University of Santa Maria, following Resolution 466/12 of the National Health Council and the Declaration of Helsinki. (CAAE 04320312.2.0000.5346). All participants who met the inclusion criteria and accepted to participate in the study signed the Informed Consent Term.

Measurements

A questionnaire with the risk factors for osteoporosis and fracture was applied at the baseline (Hooven *et al.*, 2009; Copes *et al.*, 2015). Height and weight were measured according to the World Health Organization (WHO) recommendation. Also, the body mass index (BMI) was calculated according to the WHO (WHO, 2004). Ethanol consumption was defined as the intake of more than three daily units (Kanis, Johansson, *et al.*, 2005). The practice of physical activity was quantified by the weekly frequency (Baecke *et al.*, 1982).

The yerba mate (*Ilex paraguariensis*) intake was evaluated by a food frequency questionnaire. The intake of the aqueous extract of mate tea consumed as "Chimarrão" (MATE) was quantified per day and for how long (most of the days per year).

Blood samples were drawn at morning with 8 hours fast. The specimens were centrifuged at 2500 x g for 15 min at 4°C. All of the samples were frozen at - 80° C and analyzed at the same time. Serum levels of 25(OH) vitamin D total [25(OH)D] and intact Parathyroid hormone (PTH) were measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (ALPCO, Salem, MA, USA) according to manufacturer's instructions. Their intra-assay coefficients of variation were, respectively, 4.7% and 4.8%. The bone markers assessed were Human total Procollagen Type I Intact N-terminal Propeptide (P1NP) and human Cross-Linked C-Telopeptide of Type I Collagen (CTX). Their quantification was performed in the plasma also using ELISA commercial kits (MyBiosource Inc., San Diego, CA, USA) according to manufacturer's instructions. The intra-assay precision was under 10% for P1NP and under 8% for CTX. Serum albumin, total calcium, phosphorus, and creatinine levels were measured using the standard methods on Cobas MIRA® (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland) automated analyzer. The serum levels of

nitrite/nitrate (NO_x) were measured also on Cobas MIRA[®] by a method previously described and validated by Tatsch et al. (Tatsch *et al.*, 2011).

Major fractures were considered after 45 years in the femur, humerus, clinical spine or wrist (Copes *et al.*, 2015). All fractures included in the study were confirmed by X-ray or surgical reports.

***Ilex paraguariensis* infusion and quantification of compounds.**

Commercial mate samples (dried and minced leaves and twigs of *Ilex paraguariensis*) were obtained from the local market in Santa Maria city, South Brazil. The infusion was made by pouring 10 mL of boiling water at 70°C on 0.9 g of commercial mate sample. The mixture was left to stand for 20 min and filtered; the infusion obtained was analyzed by HPLC.

All chemicals were of analytical grade. Methanol, formic acid, gallic acid, isochlorogenic acid and caffeic acid purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin, theobromine, caffeine, rutin, catechin, epigallocatechin, and kaempferol were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software.

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C18 column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5µm diameter particles. The mobile phase was water containing 1% formic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 15% of B until 10 min and changed to obtain 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 20% and 10% B at 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 min, respectively, following the method described by Abbas et al. with slight modifications (Abbas *et al.*, 2014). A concentration of 20 mg/mL was used to analyze the components of *Ilex paraguariensis* infusion. The investigated compounds were: gallic acid, isochlorogenic acid, caffeic acid, catechin, epigallocatechin, quercetin, rutin, kaempferol, caffeine, and theobromine. These compounds were identified through comparison of their retention time, and UV absorption spectrum using their

respective commercial standards. The flow rate was 0.7 ml/min, injection volume 40 µl and the wavelength were 254 nm for gallic acid, 270 nm for theobromine, 281 nm for catechin, epigallocatechin and caffeine, 327 nm for caffeic and isochlorogenic acids, and 366 nm for quercetin, rutin, and kaempferol. All the samples and mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath before use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.030 – 0.250 mg/ml for kaempferol, quercetin, catechin, epigallocatechin, rutin, caffeine and theobromine; and 0.045 – 0.300 mg/ml for gallic, caffeic and isochlorogenic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). All chromatography operations were carried out at room temperature and in triplicate.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using version 19.0 of the IBM SPSS statistical program for Windows, São Paulo, Brazil. Data were described in prevalence rate (percent) or mean (standard deviation). The consumption of MATE was described as yes/no, liters/day (being the cutoff 1L/day), and duration of the intake 10 (being the cutoff 10 yrs), this criteria was adapted and modified from Conforti et al. (Conforti *et al.*, 2012). To determine if a variable had normal distribution we constructed normal Q-Q plots and used the Shapiro-Wilk test accepting a significance level of 0.05. The non-normal distribution variables were transformed to their natural logarithm. Chi-square, Fisher's exact, and Student's t tests were used to evaluate possible differences between the two groups. Logistic regression models were used to assess a possible association between yerba mate use and fractures. Differences were considered significant when the two-tail p-value was less than 0.05. The power of this study was calculated based in a non-inferiority margin of 0.2 and was 0.867.

Results

Case-control study

In total, 118 fractures (11.6%) were identified in the initial cohort study (n=1057). The characteristics of the whole group are described in detail elsewhere

(Copes *et al.*, 2015). The characteristics of the 46 women with major fractures and the 49 controls are described according to their MATE intake in table 1.

Regarding MATE intake, without taking quantity or duration of intake into account, there was no significant difference observed between age and risk factors for fracture (alcoholism, smoking, and falls) between the groups. Women who consumed MATE had grade I obesity (BMI = 30.2 Kg/m², p = 0.027) more frequently than women who not consumed it. There was no significant difference between the non-intake group and the intake concerning total and osteoporotic fractures (p = 0.82 and p = 0.99, respectively). The NOx serum levels were not associated with fracture. Moreover, NOx did not correlate with the bone markers [Ln(NOx) and Ln(CTX), evaluated by Pearson correlation, R = -0,122, p = 0,286; Ln(NOx) and Ln(P1NP), evaluated by Pearson correlation, R = -0,029, p = 0,803].

The serum levels of NOx were significantly elevated in the MATE group (p = 0,017). On the other hand, the consumption of MATE did not significantly alter the serum levels of total calcium, phosphorus, PTH and Vitamin D and bone markers [P1NP and CTX (p = 0.88 and 0.66, respectively)] (Table 1).

Table 2 shows the characteristics of the participants with a daily consumption of MATE greater than 1L per day. There was no significant difference between the evaluated risk factors for fracture and serum levels of total calcium, phosphorus, PTH, Vitamin D, P1NP, CTX and NOx.

Interestingly, a significantly higher BMI (p = 0.001) was observed in women who consumed MATE for more than ten years. In this group, NOx was significantly elevated (p = 0,05). There was no significant difference concerning the serum levels of total calcium, phosphorus, PTH, vitamin D, P1NP, and CTX in the subjects with the history of MATE use for more than ten years when compared to subjects with use for less than ten years. (Table 3).

A logistic regression evaluating the odds of osteoporotic fractures associated with the consumption of MATE was performed. Major fractures were not associated with the MATE intake (OR 1.2, 95% CI 0.43 to 3.28, p=0.73), BMI (OR 1.04; 95% CI 0.97 to 1.12, p=0.24), or Log NOx (OR 1.04; 95% CI 0.62 to 1.73; p=0.87), in this

regression model. There was a positive association only with age (OR 1.1; 95% CI 1.05 to 1.20; $p=0.001$).

***Ilex paraguariensis* infusion components**

The HPLC analysis of *Ilex paraguariensis* infusion (MATE) revealed the presence of the gallic acid (tR = 9.96 min; peak a), catechin (tR = 15.03 min; peak b); isochlorogenic acid (tR = 21.43 min; peak c), caffeic acid (tR = 24.15 min; peak d), caffeine (tR = 27.49 min; peak e), theobromine (tR = 32.64 min; peak f), epigallocatechin (tR = 35.11 min; peak g), rutin (tR = 39.50 min; peak h), quercetin (tR = 49.27 min; peak i) and kaempferol (tR = 54.61 min; peak j) (Figure 1 and Table 4).

Discussion

Our study was the first to evaluate the use of yerba mate, the risk of osteoporotic fractures and bone metabolism in postmenopausal women. We did not find a significant association between major fractures and yerba mate intake, even when we consider the amount of the intake or the duration of its use. This lack of association was also found between the yerba mate intake and the serum levels of bone markers and calcium homeostasis. These findings suggest this beverage consumption is safe regarding the bone metabolism.

We believe that the lack of effect of yerba mate on osteoporotic fractures might be due to the presence of polyphenols, i. g. epigallocatechin, rutin, quercetin, kaempferol and isochlorogenic acid, which may counteract the effect of the high content of caffeine and caffeic acid. The fact that the amount of polyphenols found in the yerba mate infusion are greater than its amount found in blended tea support this hypothesis (Heck e De Mejia, 2007). Epigallocatechin, which a high amount is also found in green tea, has been showing a favorable effect on bone metabolism in experimental studies (Qiu *et al.*, 2016). Moreover, subjects that have an intake of three or more cups per day of black tea were found to have fewer fractures than subjects with a lesser intake (Myers *et al.*, 2015). On the other hand, the consumption of coffee appears to be associated with fractures (Sheng *et al.*, 2014), which could be mainly due to its caffeine contain.

The lack of association with mate intake and the markers of bone resorption (CTX) and formation (P1NP) also suggests that yerba mate has a neutral effect on bone. Hardcastle et al. evaluated the association between black tea intake and bone health in 3160 Scottish women with a mean age of 48.3 years. They found that the highest amount of flavonoids found in two to three cups black tea per day were able to reduce bone resorption markers of determined by free pyridinoline ratio and urinary free deoxypyridinoline (Hardcastle *et al.*, 2011). In our study, the amount of flavonoid present in the yerba mate infusion appears to be lower than the amount described in the study aforementioned. Therefore we speculated that it might not be sufficient to modify these markers. Experimental studies also have found no evidence of bone parameters modification with the yerba mate consumption (Brun *et al.*, 2015).

Although the serum level of NOx was significantly elevated in women consuming Mate tea, it was not associated with osteoporotic fractures and were not correlated with the bone markers P1NP and CTX. High levels of NO appears to stimulate osteoprotegerin, inhibiting RANK-RANKL binding and reducing bone resorption in vitro. It has been described that NOx has been able to act as an estrogenic mediator in osteocytes (Joshua *et al.*, 2014). Ozgocmen et al. evaluated women with postmenopausal osteoporosis without fracture did not observe an increase in NOx when comparing with women without osteoporosis (Ozgocmen *et al.*, 2007). Interestingly, in these study, the erythrocyte NOx was significantly elevated in osteoporotic women, with a negative association with CTX, suggesting that it may have a role in bone formation. Nonetheless, Sendur et al. found high serum levels of NOx in osteoporotic women that were not associated with a low bone mineral density (Sendur *et al.*, 2009).

There are few studies evaluating calcium homeostasis after the ingestion of mate tea. Although the availability of calcium is favored by the hot water present in the yerba mate infusion (Brun *et al.*, 2015), the amount of calcium found in the dry leaves is usually small, about 6.8mg / g (Conforti *et al.*, 2012). Brun et al. studied young rats treated with daily infusion of mate for 90 days. They showed that the consumption of yerba mate did not alter the absorption of dietary calcium. In our study, the serum levels were not influenced by the yerba mate intake, data in agreement with the experimental studies (Brun *et al.*, 2015).

Yerba mate is usually considered a stimulant drink, due to the presence of caffeine and theobromine in its composition. It has been speculated that it could promote some psychomotor agitation, providing a higher risk of falls. However; in our study, the number of falls did not differ significantly between groups, even after the post hoc analysis for quantity and duration of the intake.

In the multivariate analysis, only age was associated with an increase in the prevalence of osteoporotic fractures. Age is a well-established risk factor for fracture, especially hip. The probability of fracture increases with age, from 0.2% at the age of 50 years and 22% in women over 80 years (Kanis *et al.*, 2002; Arceo-Mendoza e Camacho, 2015). Moreover, the risk of hip fracture increases 30-fold with aging, indicating that the changing of the risk with aging is approximately seven times greater than the changing of the risk with the increasing of BMD (Kanis, Borgstrom, *et al.*, 2005). A cohort designed to assess the effect of age and bone mass in 521 Caucasian women confirmed that the older the population, the greater the risk of fracture (Hui *et al.*, 1988).

Although obese women contribute for more than 40% of the total fractures in the primary cohort there was no association between fractures and BMI in our study (Copes *et al.*, 2015). Obesity has been found to be associated with a decreased rate of fractures in some bone sites such as hip and pelvis but a increased rate of fractures in others such as humerus (Prieto-Alhambra *et al.*, 2012; Premaor *et al.*, 2014). We could not find an association between fracture site and obesity in our study probably due to lack of power to this outcome (Copes *et al.*, 2015).

Surprisingly, women who consumed yerba mate were more frequently obese (BMI 30.2). This finding persisted after the post hoc analysis considering the duration of the intake, but it disappeared when the daily intake was assessed. Although the BMI of yerba mate drinkers in the Conforti study as also increased, they were not obese (26.4 kg/m²) (Conforti *et al.*, 2012). We could not rule out that an unknown confounder might have contributed to this finding. More studies are needed to clarify this question.

Our study has some strengths, it evaluates a hard outcome i. e. fractures. All studied women, cases and controls, belong to the same cohort which could attenuate the confound factors. Still, it also has some limitations. The memory bias is inherent

to this study design; however, the subjects were not aware of the study outcome. Therefore there is no reason to believe that this bias was different between the case and control group. Moreover, the sample size was small, and it could not be sufficient to find a small effect size. Nevertheless, we did not find any evidence of harm.

In conclusion, the yerba mate use appears to have no effect on bone fractures or bone metabolism in this case-control study. This negative result is relevant due to the deeply rooted habit of southern South American people to drink this beverage. We found no evidence of harm in our subjects. More studies are necessary to evaluate a possible small effect size.

Acknowledgements

This study has grants from the Federal University of Santa Maria under its Programme *Fundo de Incentivo a Pesquisa* (FIPE) [edital FIPE/CCS 2013] and from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico–CNPq [472211/2013-7 and 307057/2013-5]. All authors state that they have no conflict of interest regarding this manuscript.

References

Abbas SR, Sabir SM, Ahmad SD, Boligon AA and Athayde ML (2014) Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Food Chem* **147**:10-16.

Arceo-Mendoza RM and Camacho P (2015) Prediction of fracture risk in patients with osteoporosis: a brief review. *Womens Health (Lond)* **11**:477-482; quiz 483-474.

Baccaro LF, Conde DM, Costa-Paiva L and Pinto-Neto AM (2015) The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. *Clin Interv Aging* **10**:583-591.

Baecke JA, Burema J and Frijters JE (1982) A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr* **36**:936-942.

Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T and Gugliucci A (2011) Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol* **136**:378-384.

Brun LR, Brance ML, Lombarte M, Maher MC, Di Loreto VE and Rigalli A (2015) Effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) on Histomorphometry, Biomechanics, and Densitometry on Bones in the Rat. *Calcif Tissue Int* **97**:527-534.

Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A and Tosteson A (2007) Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res* **22**:465-475.

Conforti AS, Gallo ME and Saravi FD (2012) Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. *Bone* **50**:9-13.

Copes RM, Comim FV, Langer FW, Codevilla AA, Sartori GR, de Oliveira C, Cocco AR, de Almeida AM, de Almeida LL, Dal Osto LC, Compston JE and Premaor MO (2015) Obesity and Fractures in Postmenopausal Women: A Primary-care Cross-Sectional Study at Santa Maria, Brazil. *J Clin Densitom* **18**:165-171.

Eastell R, O'Neill TW, Hofbauer LC, Langdahl B, Reid IR, Gold DT and Cummings SR (2016) Postmenopausal osteoporosis. *Nat Rev Dis Primers* **2**:16069.

Esmelindro MCT, G.; Waczuk, A.; Dariva, C.; Oliveira, D. E. (2002) Caracterização físico-química da erva-mate: Influência das etapas do processamento industrial. *Ciênc Tecnol Aliment* **22**:193-204.

Hardcastle AC, Aucott L, Reid DM and Macdonald HM (2011) Associations between dietary flavonoid intakes and bone health in a Scottish population. *J Bone Miner Res* **26**:941-947.

Heck CI and de Mejia EG (2007) Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci* **72**:R138-151.

Hooven FH, Adachi JD, Adami S, Boonen S, Compston J, Cooper C, Delmas P, Diez-Perez A, Gehlbach S, Greenspan SL, LaCroix A, Lindsay R, Netelenbos JC,

Pfeilschifter J, Roux C, Saag KG, Sambrook P, Silverman S, Siris E, Watts NB and Anderson FA, Jr. (2009) The Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW): rationale and study design. *Osteoporos Int* **20**:1107-1116.

Hui SL, Slemenda CW and Johnston CC, Jr. (1988) Age and bone mass as predictors of fracture in a prospective study. *J Clin Invest* **81**:1804-1809.

Joshua J, Kalyanaraman H, Marathe N and Pilz RB (2014) Nitric oxide as a mediator of estrogen effects in osteocytes. *Vitam Horm* **96**:247-263.

Kanis JA, Borgstrom F, De Laet C, Johansson H, Johnell O, Jonsson B, Oden A, Zethraeus N, Pfleger B and Khaltvaev N (2005a) Assessment of fracture risk. *Osteoporos Int* **16**:581-589.

Kanis JA, Johansson H, Johnell O, Oden A, De Laet C, Eisman JA, Pols H and Tenenhouse A (2005b) Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos Int* **16**:737-742.

Kanis JA, Johnell O, Oden A, De Laet C, Jonsson B and Dawson A (2002) Ten-year risk of osteoporotic fracture and the effect of risk factors on screening strategies. *Bone* **30**:251-258.

Lee DR, Lee J, Rota M, Lee J, Ahn HS, Park SM and Shin D (2014) Coffee consumption and risk of fractures: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Bone* **63**:20-28.

Meinhart AD, Bizzotto CS, Ballus CA, Poloni Rybka AC, Sobrinho MR, Cerro-Quintana RS, Teixeira-Filho J and Godoy HT (2010) Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages. *J Agric Food Chem* **58**:2188-2193.

Myers G, Prince RL, Kerr DA, Devine A, Woodman RJ, Lewis JR and Hodgson JM (2015) Tea and flavonoid intake predict osteoporotic fracture risk in elderly Australian women: a prospective study. *Am J Clin Nutr* **102**:958-965.

Ozgoemen S, Kaya H, Fadillioglu E, Aydogan R and Yilmaz Z (2007) Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Mol Cell Biochem* **295**:45-52.

Premaor MO, Comim FV and Compston JE (2014) Obesity and fractures. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **58**:470-477.

Prieto-Alhambra D, Premaor MO, Fina Aviles F, Hermosilla E, Martinez-Laguna D, Carbonell-Abella C, Nogues X, Compston JE and Diez-Perez A (2012) The association between fracture and obesity is site-dependent: a population-based study in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* **27**:294-300.

Qiu Y, Chen Y, Zeng T, Guo W, Zhou W and Yang X (2016) EGCG ameliorates the hypoxia-induced apoptosis and osteogenic differentiation reduction of mesenchymal stem cells via upregulating miR-210. *Mol Biol Rep* **43**:183-193.

Rizzoli R, Bischoff-Ferrari H, Dawson-Hughes B and Weaver C (2014) Nutrition and bone health in women after the menopause. *Womens Health (Lond)* **10**:599-608.

Sendur OF, Turan Y, Tastaban E and Serter M (2009) Antioxidant status in patients with osteoporosis: a controlled study. *Joint Bone Spine* **76**:514-518.

Shen CL and Chyu MC (2016) Tea flavonoids for bone health: from animals to humans. *J Investig Med* **64**:1151-1157.

Sheng J, Qu X, Zhang X, Zhai Z, Li H, Liu X, Li H, Liu G, Zhu Z, Hao Y, Qin A and Dai K (2014) Coffee, tea, and the risk of hip fracture: a meta-analysis. *Osteoporos Int* **25**:141-150.

Sowers MR, Jannausch M, McConnell D, Little R, Greendale GA, Finkelstein JS, Neer RM, Johnston J and Ettinger B (2006) Hormone predictors of bone mineral density changes during the menopausal transition. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:1261-1267.

Tatsch E, Bochi GV, Pereira Rda S, Kober H, Agertt VA, de Campos MM, Gomes P, Duarte MM and Moresco RN (2011) A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem* **44**:348-350.

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of the studied women according to their yerba mate (MATE) intake.

Characteristics	No MATE use n=29	MATE use n=66	p-value
Age (yrs) ^a	70.3 (7.7)	68.6 (7.0)	0.29 ^c
BMI (Kg/m ²) ^a	27.6 (4.3)	30.2 (6.5)	0.027 ^c
Tobacco use ^b	10.3%	12.1	0.80 ^d
Alcohol use (>=3 drinks/day) ^b	3.4%	0	1 ^d
Falls ^{b,e}	27.6%	39.4%	0.27 ^e
Major Fracture ^b	48.3%	48.5%	0.99 ^e
Baecke's questionnaire ^a	2.5 (0.5)	2.4 (0.5)	0.45 ^c
Total calcium	8.0 (1.3)	7.9 (1.3)	0.64 ^c
Phosphorus	3.7 (1.44)	3.34 (0.75)	0.11 ^c
Albumin	4.7 (0.7)	4.4 (0.9)	0.09 ^c
Creatinine	0.8 (0.2)	0.7 (0.2)	0.35 ^c
P1NP	189.3 (296.0)	267.8 (399.5)	
Ln (P1NP)	4.2 (1.6)	4.3 (1.8)	0.88 ^c
CTX	25.81 (35.42)	79.41 (153.93)	
Ln (CTX)	2.65 (1.02)	2.79 (1.35)	0.659 ^c
Vitamin D	39.7 (20.0)	42.5 (20.6)	0.58 ^c
PTH	20.7 (20.6)	21.4 (21.4)	
Ln (PTH)	2.5 (1.2)	2.5 (1.1)	0.85 ^c
Nox	146,3 (125,2)	311,8 (461,5)	
Ln (NOx)	4,7 (0,7)	5,2 (0,9)	0,017^c

^a The data are shown as mean (SD).

^b The data are shown as percent

^c Student's t

^d Fisher's exact

^e Chi-square

^e Subjects who had at least one fall in the past year

Table 2. Clinical and laboratory characteristics of the studied women regarding their daily intake of yerba mate.

Characteristics	< 1L MATE ^a n=78	>= 1L MATE ^b n=17	p-value
Age (yrs)	69.2 (6.6)	68.8 (9.8)	0.88 ^c
BMI (Kg/m ²)	29.4 (6.2)	29.4 (5.0)	0.99 ^c
Major Fracture	50.0%	41.2%	0.59 ^d
Falls ^e	32.1%	52.9%	0.16 ^d
P1NP	255.6 (387.6)	207.3 (318.3)	
Ln (P1NP)	4.3 (1.7)	3.8 (1.8)	0.25 ^c
CTX	57.0 (146.2)	20.5 (22.4)	
Ln (CTX)	2.8 (1.33)	2.6 (0.95)	0.324 ^c
Nox	259,9 (415,2)	267,6 (312,0)	
Ln (NOx)	5,0 (0,9)	5,2 (0,9)	0,94 ^c

The data are shown as mean (SD) or as percent

^a women who did not drank mate infusion and those who drank less than 1 L/day

^b women who had a daily consumption of mate infusion at or above 1 L

^cStudent's t

^dChi-square

^e Subjects who had at least one fall in the past year

Table 3. Clinical and laboratory characteristics of the participants regarding their time of yerba mate use.

Characteristics	<10 yrs MATE use ^c n=37	>10 yrs MATE use ^d n=57	P
Age (yrs) ^a	69.7 (7.5)	68.9 (7.1)	0.62 ^e
BMI (Kg/m ²) ^a	27.1 (4.5)	30.9 (6.4)	0.001^e
Major fracture ^b	40.5%	54.4%	0.21 ^f
Falls ^{b,g}	29.7%	40.4%	0.16 ^f
P1NP ^a	188.7 (266.9)	297.0 (422.0)	
Ln (P1NP) ^a	4.1 (1.5)	4.3 (1.8)	0.28 ^e
CTX ^a	36.2 (80.7)	57.9 (154.9)	0.480 ^e
Ln (CTX) ^a	2.7 (1.13)	2.8 (1.3)	0.689 ^e
Nox	144,6 (116,2)	338,8 (490,8)	
Ln (NOX)	4,7 (0,6)	4,2 (1)	0,005^e

^a The data are shown as mean (SD).

^b The data are shown as percent

^c women who did not drank mate infusion and those who drank it for less than 10 yrs

^d women who drank mate infusion for 10 or more years

^eStudent's t

^fChi-square

^g Subjects who had at least one fall in the past year

Table 4. Composition of *Ilex paraguariensis* infusion.

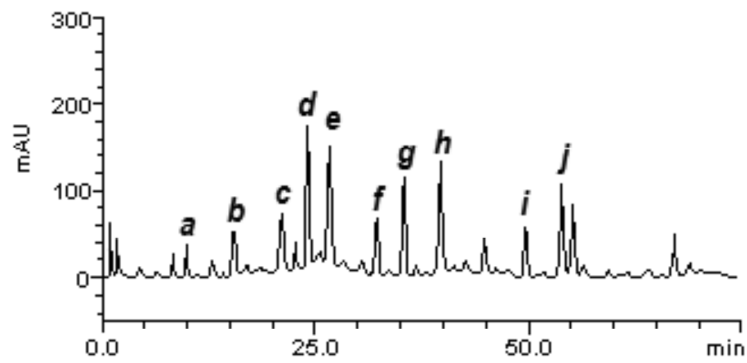
Compounds	<i>Ilex paraguariensis</i>
	mg/g
Gallic	1.25; 1.29; 1.32
Catechin	3.01; 3.00; 2.98
Isochlorogenic	3.69; 3.72; 3.68
Caffeic acid	9.15; 9.18; 9.12
Caffeine	8.84; 8.87; 8.85
Theobromine	3.71; 3.68; 3.02
Epigallocatechin	6.01; 6.04; 5.98
Rutin	7.43; 7.40; 7.46
Quercetin	3.15; 3.11; 3.12
Kaempferol	5.94; 5.98; 6.03

Results are expressed as triplicate of three determinations.

Table 5. Logistic regression evaluating association of age, BMI, mate consumption and NOX log with fractures.

	OR	IC95%	p
Age	1,1	1,05-1,2	0,001
BMI	1,04	0,97-1,12	0,24
Mate consumption	1,2	0,43-3,28	0,73
Log NOX	1,04	0,62-1,73	0,87

Figure 1 – Representative high-performance liquid chromatography profile of *Ilex paraguariensis* infusion, detection UV was at 327nm. Gallic acid (peak *a*), catechin (peak *b*), isochlorogenic acid (peak *c*), caffeic acid (peak *d*), caffeine (peak *e*), theobromine (peak *f*), epigallocatechin (peak *g*), rutin (peak *h*), quercetin (peak *i*) and kaempferol (peak *j*).



3. ARTIGO 2 – PROTECTIVE EFFECT OF YERBA MATE INTAKE ON THE CARDIOVASCULAR SYSTEM: A POST HOC ANALYSIS STUDY IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

Denise T. A. da Veiga¹, Raísa Bringhenti¹, Rafaela Copes¹, Etiane Tatsh², Rafael N. Moresco², Fabio V. Comim¹, Melissa O. Premaor¹✉

¹Departamento de Clínica Médica, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

² Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

Running title: Yerba mate and cardiovascular system

Abstract

The prevalence of cardiovascular and metabolic diseases is increased in postmenopausal women, which contributes to the burden of illnesses in this period of life. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is a native bush from southern South America. Its leaves are rich in phenolic components, which may have antioxidant, vasodilating, hypocholesterolemic, and hypoglycemic properties. This post hoc analysis of the case-control study nested in the Obesity and Bone Fracture cohort evaluated the consumption of yerba mate and the prevalence of hypertension, dyslipidemia, and coronary diseases in postmenopausal women. Ninety-five postmenopausal women were included in this analysis. A questionnaire was applied to evaluate the risk factors and diagnosis of cardiovascular diseases and consumption of yerba mate infusion. The Student's t-test and chi-square test were used to assess significant differences between groups. The group that consumed more than 1 L/day of mate infusion had significantly fewer diagnoses of coronary disease, dyslipidemia, and hypertension ($p < 0.049$, $p < 0.048$, and $p < 0.016$, respectively). Further, the serum levels of glucose were lower in the group with a higher consumption of yerba mate infusion ($p < 0.013$). The serum levels of total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, and triglycerides were similar between the groups. This pragmatic study points out the benefits of yerba mate consumption on the cardiovascular and metabolic systems. The ingestion of more than 1 L/day of mate infusion was associated with fewer self-reported cardiovascular diseases and lower serum levels

of glucose. Longitudinal studies are needed to evaluate the association between yerba mate infusion and reduction of cardiovascular diseases in postmenopausal women.

Keywords

"Yerba mate"; "*Ilex paraguariensis*"; "Postmenopausal women"; "Diabetes mellitus"; "Hypertension", "Cardiovascular disease"

Introduction

Menopause is associated with an increased frequency of chronic conditions, such as hypertension, cardiovascular disease (CVD), metabolic syndrome, and diabetes mellitus (DM). Traditional cardiovascular risk factors are usually more prevalent after menopause than before menopause because of loss of estrogenic protection. The latter has been associated with dyslipidemia, hyperglycemia, and hypertension. The prevalence of hypertension in postmenopausal women is twice higher than that in premenopausal women; further, more than 75% of women older than 60 years have hypertension (1). Moreover, DM type 2 is a disease associated with specific changes in the lipid profile promoting an atherogenic pattern (2). These findings contribute to the morbidity of CVD in postmenopausal women.

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is a native plant from southern South America, consumed daily by ~70% of that population, in the form of mate, tea mate, or tererê. Several classes of phytochemicals are found in its leaf composition: xanthines (such as caffeine and theobromine), saponins (derived from ursolic and oleanolic acids), and phenolic components (such as chlorogenic acid and other classes of polyphenols). Many experimental studies indicate antioxidant, anti-inflammatory, vasodilating, hypocholesterolemic, and hypoglycemic properties related to yerba mate use (3). In humans, some experimental studies have pointed out a beneficial effect of the consumption of yerba mate on the levels of cholesterol total (CT), triglycerides (TG), and glucose (4-6). The aim of this study was to

evaluate the association between the consumption of yerba mate and the frequencies of dyslipidemia, DM, and CVDs in postmenopausal women.

Methods

This study was a post hoc analysis of the case-control study (7) nested in the Obesity and Bone Fracture cohort (8) that aimed to evaluate the association between bone fracture and the intake of the aqueous extract of mate tea consumed as “Chimarrão” in postmenopausal women. It was conducted in the municipality of Santa Maria, Brazil. The original cohort recruited 1057 women aged >55 years at the primary care. Women at the menacme and those with cognitive deficits or communication difficulties were excluded from the survey. All 46 women with confirmed major bone fractures in the original cohort and 49 randomly selected controls without fractures (7) were included in this post hoc analysis (n=95). All participants who agreed to participate in the study signed the Informed Consent Term. This research followed the Declaration of Helsinki principles and was approved by the Ethics Committee of Federal University of Santa Maria (04320312.2.0000.5346).

A standardized questionnaire including risk factors for CVD and self-reported CVD was applied at the baseline (8-10). Yerba mate intake was evaluated by a food frequency questionnaire. The intake of the aqueous extract of yerba mate consumed as “Chimarrão” (MATE) was quantified per day. More information regarding the data collection is shown in the supplementary material.

The serum albumin, CT, LDL-cholesterol (LDL-C), HDL-cholesterol (HDL-C), TG, glucose, and creatinine levels were measured using the standard methods on Cobas MIRA[®] (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland) automated analyzer. The serum levels of nitrite/nitrate (NO), ferric reducing ability of plasma (FRAP), and advanced oxidation protein products (AOPP) also were measured using Cobas MIRA[®].

The statistical analysis was performed using the IBM SPSS program (version 19.0 for Windows, São Paulo, Brazil). Data were described as prevalence rates (percentages) or means (standard deviations). The considered cutoff for MATE

consumption was 1 L/day, a criterion adapted and modified from Conforti et al. (11). The chi-square and Student's t tests were used to determine possible differences between the two groups. Differences were considered significant when the two-tailed p-value was less than 0.05. The power of this study for the evaluation of the association between MATE intake and the frequency of coronary disease was 0.991.

Results

The characteristics of the original cohort and the case-control study were described in detail elsewhere (7, 8). Table 1 shows the clinical characteristics of the participants with a daily consumption of MATE. There were no differences between the groups regarding age, body mass index, waist circumference, physical activity, tobacco use, and years of schooling. The women who drank at least 1 L/day of MATE had significantly fewer diagnoses of dyslipidemia, hypertension, and coronary disease (Table 1).

There was no significant difference in the levels of albumin, serum lipids, markers of oxidative stress, and creatinine between the women with an intake of MATE equal to or greater than 1 L/day and women with a lesser intake. The fasting serum levels of glucose were lower in the women with a higher consumption of MATE (Table 2).

Discussion

In this post hoc analysis, it was observed that the postmenopausal women who consumed more than 1 L/day reported fewer diagnoses of dyslipidemia, hypertension, and coronary disease. Although some metabolic findings have been reported in previous studies (4-6, 12), to the best of our knowledge, this is the first study to report the beneficial effect of yerba mate consumption on the incidence of chronic diseases in postmenopausal women.

The acute effect of mate tea on blood pressure was first described by de Moraes et al. They evaluated the impact of an intake of 1 L/day of mate tea within 40 days in adult subjects and found a systolic blood pressure reduction of 2.3% in the

experimental group (4). Although we did not find an effect on the blood pressure measured at the time of blood sample collection, the women in our study presented significantly fewer diagnoses of hypertension and coronary disease. However, the exact mechanism by which yerba mate consumption has favorable effects on the cardiocirculatory system is not known. Schinella et al. described the protective effect of the aqueous extract of mate on myocardial dysfunction induced by ischemia and reperfusion in an experimental animal model (13). In their study, the cardioprotective effect appears to be linked to an NO-dependent mechanism (13). Other studies conducted on rats fed with a high-fat diet found that mate aqueous extract also showed beneficial effects on the vascular endothelium (14, 15).

In our study, the women had fewer diagnoses of dyslipidemia, despite the fact that no significant differences were observed in the evaluation of the serum levels of CT, LDL-C, HDL-C, and TG. These results might suggest that mate intake could have a longer-term effect or an indirect mechanism. Different studies have reported different effects on the serum lipid levels (4, 5, 16). In a study conducted on adult subjects, the intake of 990 mL/day of mate for 40 days decreased the serum levels of CT and LDL-C and increased the serum levels of HDL-C in subjects with dyslipidemia. Conversely, only the serum levels of LDL-C decreased in normolipemic individuals (4). These findings suggest that yerba mate consumption might have a different effect on the lipid levels, depending on the previous metabolic status of the subject. Another study also conducted on middle-aged subjects described a decrease in the serum levels of TC and LDL-C but no changes in the serum levels of TG (5).

In the present study, a significant difference was observed in the serum glucose levels between the higher-consumption mate group and the controls. The reduction in serum glucose levels and improvement in insulin resistance have been described in previous studies (6, 16). In a clinical trial, Boaventura et al. evaluated the consumption of 1 L of mate per day for 60 days on glycemia, advanced glycation end-products (HbA1c), and oxidative stress in subjects with DM and pre-DM (16). They observed reductions in the levels of glucose, HbA1c, and lipid peroxidation, suggesting that yerba mate intake could have a long-term beneficial effect on DM.

In the postmenopausal period with estrogen reduction, there is an imbalance in oxidative stress, with decreased antioxidant defenses and increased oxidation,

mainly with lipid peroxidation (17). In our study, the markers of oxidative stress were not modified by the consumption of mate, which was partly different from the findings of the study by Boaventura et al. (16). Although they find no change in the serum levels of FRAP, there was an increase in the erythrocyte levels of reduced glutathione after 60 days of treatment with 1 L of mate per day. Several factors may explain the negative findings of our study regarding oxidative stress. First, the markers in our study were measured from the samples obtained in the blood instead of in the liver. Sometimes, serum markers may not reflect what is occurring in other tissues. Second, many variables other than yerba mate intake in non-experimental conditions, such as the systemic inflammation present in CVDs, could influence the markers of oxidative stress. Finally, the manner by which yerba mate was prepared and ingested may also have affected the results (18, 19).

The main strength of our study is that it is a pragmatic study with a sample representative of Brazilian primary care, which makes the generalization of the findings more intuitive. However, it also has some weakness. The study is a post hoc analysis; as such, the results must be confirmed with other studies. The small sample size could have contributed to the negative results in the blood pressure, blood lipid levels, and oxidative stress. The blood pressure was only measured once at the time of blood sample collection. We also do not have information on the patients' treatment, which may have affected the blood pressure and biochemistry measurements. Moreover, the diagnoses were self-reported. Nonetheless, there is no reason to believe that the memory bias was different between mate drinkers and non-mate drinkers.

In conclusion, we described a potential beneficial effect of yerba mate use on the cardiovascular system, as indicated by fewer diagnoses of dyslipidemia, hypertension, and coronary disease in postmenopausal women.

Funding

This study has grants from the Federal University of Santa Maria (edital FIPE/CCS 2013) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (472211/2013-7 and 307057/2013-5). The funding sources had

no role in the design, conduct, or analysis of our study or in the decision to submit this manuscript for publication.

Ethics approval

Approval for this study was obtained from the Federal University of Santa Maria Ethic Committee [Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM (CEP – UFSM); CAAE 04320312.2.0000.5346] and from the Municipality of Santa Maria City [Núcleo de Educação Permanente em Saúde (Ofício 492/2012/SMS/NEPeS) da Secretaria de Saúde da prefeitura de Santa Maria].

Competing interests

All authors state that they have no conflict of interest regarding this manuscript.

Contributors

DV and MP designed the study. DV, RB, RC, ET, RM, and FV contributed to the clinical and experimental work. DV and MP were responsible for the statistical analysis. DV, RM, and MP drafted the paper. All authors revised the manuscript critically for intellectual content and approved the final version. All authors agree to be accountable for the work and to ensure that any questions relating to the accuracy and integrity of the paper are investigated and properly resolved. MP is the guarantor.

References

1. Lima R, Wofford M, Reckelhoff JF. Hypertension in postmenopausal women. *Curr Hypertens Rep* 2012; 14: 254-260.
2. Fonseca MIH, da Silva IT, Ferreira SRG. Impact of menopause and diabetes on atherogenic lipid profile: is it worth to analyse lipoprotein subfractions to assess cardiovascular risk in women? *Diabetol Metab Syndr* 2017; 9: 22.

3. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol* 2011; 136: 378-384.
4. de Moraes EC, Stefanuto A, Klein GA, Boaventura BC, de Andrade F, Wazlawik E, et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 8316-8324.
5. Messina D, Soto C, Mendez A, Corte C, Kemnitz M, Avena V, et al. [Lipid-lowering effect of mate tea intake in dyslipidemic subjects]. *Nutr Hosp* 2015; 31: 2131-2139.
6. Klein GA, Stefanuto A, Boaventura BC, de Moraes EC, Cavalcante Lda S, de Andrade F, et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: a pilot study. *J Am Coll Nutr* 2011; 30: 320-332.
7. da Veiga DTA, Bringhenti R, Bolognon AA, Tatsh E, Moresco RN, Comim FV, et al. The yerba mate intake has a neutral effect on bone: A case-control study in postmenopausal women. *Phytother Res*. 2017 (in press).
8. Copes RM, Comim FV, Langer FW, Codevilla AA, Sartori GR, de Oliveira C, et al. Obesity and Fractures in Postmenopausal Women: A Primary-care Cross-Sectional Study at Santa Maria, Brazil. *J Clin Densitom* 2015; 18: 165-171.
9. Hooven FH, Adachi JD, Adami S, Boonen S, Compston J, Cooper C, et al. The Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW): rationale and study design. *Osteoporos Int* 2009; 20:1107-1116.
10. Baecke JA, Burema J, Frijters JE. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr* 1982; 36: 936-942.
11. Conforti AS, Gallo ME, Saravi FD. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. *Bone* 2012; 50: 9-13.

12. Gugliucci A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224: 338-344.
13. Schinella G, Fantinelli JC, Mosca SM. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. *Clin Nutr* 2005; 24: 360-366.
14. Gao H, Liu Z, Qu X, Zhao Y. Effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on vascular endothelial function and liver lipoprotein receptor gene expression in hyperlipidemic rats. *Fitoterapia* 2013; 84: 264-272.
15. Paganini Stein FL, Schmidt B, Furlong EB, Souza-Soares LA, Soares MC, Vaz MR, et al. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biol Res Nurs* 2005; 7:146-156.
16. Boaventura BDP, PF; Klein, GA; Stefanuto, A; de Moraes, EC; de Andrade, D; Wazlawik, E; da Silva, EL. Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. *Journal of Functional Foods* 2013; 5: 1057-1064.
17. Cakir T, Goktas B, Mutlu MF, Mutlu I, Bilgihan A, Erdem M, et al. Advanced oxidation protein products and malondialdehyde - the new biological markers of oxidative stress - are elevated in postmenopausal women. *Ginekol Pol* 2016; 87: 321-325.
18. Meinhart AD, Bizzotto CS, Ballus CA, Poloni Rybka AC, Sobrinho MR, Cerro-Quintana RS, et al. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 2188-2193.
19. Blum-Silva CC, VC; Schenkel, EP; Coelho, GC; Reginatto, FH. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* extracts. . *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2015; 25: 1- 6.

Table 1. Clinical characteristics of the studied women according to their daily intake of yerba mate

Characteristics	< 1 L of MATE ^a (n=78)	≥ 1 L of MATE ^b (n=17)	p-value
Age (yrs)	69.2 (6.6)	68.8 (9.8)	0.847 ^c
BMI (Kg/m ²)	29.4 (6.2)	29.4 (5.0)	0.992 ^c
Waist circumference (cm)	97.5 (11.0)	100.8 (11.0)	0.299 ^c
Diastolic blood pressure (mmHg)	80.4 (13.1)	82.4 (8.6)	0.435 ^c
Systolic blood pressure (mmHg)	139.5 (23.0)	136.5 (26.9)	0.672 ^c
Physical activity (Baecke's score)	7.2 (1.5)	6.9 (1.1)	0.486 ^c
Tobacco use	12.8	5.9	0.418 ^d
Health insurance	55.8	64.3	0.504 ^d
Scholarity (≤ 8 yrs)	65.3	68.8	0.794 ^d
Diagnoses			
Dyslipidemia	61.5	35.3	0.048 ^d
Hypertension	66.7	35.3	0.016 ^d
Diabetes mellitus	23.1	11.8	0.300 ^d
Metabolic syndrome	66.6	52.9	0.412 ^d
Stroke	9.0	0	0.199 ^d
Coronary disease	19.2	0	0.049 ^d
Heart failure	2.6	5.9	0.478 ^d

The data are shown as mean (SD) or as percent

^a women who did not drink mate infusion and those who drank less than 1 L/day

^b women who had a daily consumption of mate infusion at or above 1 L

^cStudent's t test

^dChi-square test

Table 2. Laboratory characteristics of the studied women according to their daily intake of yerba mate.

Characteristics	< 1 L of MATE ^a n=78	≥ 1 L of MATE ^b n=17	p-value ^c
Albumin (g/dL)	4.48 (0.84)	4.30 (0.82)	0.579
Total cholesterol (mg/dL)	112.3 (33.0)	99.0 (14.0)	0.917
LDL (mg/dL)	130.9 (50.9)	121.4 (42.2)	0.917
HDL (mg/dL)	54.6 (16.0)	53.0 (13.9)	0.709
Triglyceride (mg/dL)	168.6 (79.0)	182.4 (123.0)	0.481
Glucose (mg/dL)	112.3 (33.0)	99.0 (14.0)	0.013
Creatinine (mg/dL)	0.73 (0.20)	0.63 (0.16)	0.062
Ln (NOx)	5.04 (0.89)	5.20 (0.89)	0.557
Ln (FRAP)	6.07 (0.51)	5.90 (0.72)	0.299
Ln (AOPP)	3.35 (0.77)	3.29 (0.90)	0.807

The data are shown as mean (SD) or as percent

^a women who did not drink mate infusion and those who drank less than 1 L/day

^b women who had a daily consumption of mate infusion at or above 1 L

^cStudent's t test

Electronic supplementary material

Methods

Data collection and outcomes definition

The standardized questionnaire applied in our study was translated to Portuguese by two of the researchers (RMC and MOP) with the authorization of the GLOW study investigators and *The Center for Outcomes Research, University of Massachusetts of Medical School* (<http://www.outcomes-umassmed.org/GLOW/default.aspx>; Hooven *et al.*, 2009). It included information regarding the demographic characteristics of the population (age, education level, weight, and height), lifestyle (physical activity, alcohol, and tobacco use), previous fractures, family history of fractures, menopause, medications, and comorbidities (blood pressure, heart disease, stroke, and dyslipidemia). Medical students applied the questionnaire. All the information in this questionnaire was self-reported. Furthermore, the women were asked if their doctor ever told them that: 1) they had “high blood pressure or hypertension”; 2) they had “heart disease, such as 2.1) “angina, heart attack, or heart ischemia” and 2.2) “heart failure, big heart, or weak heart”; 3) they had “dyslipidemia or high cholesterol”; 4) they had “stroke, AVC, or cerebral ischemia”; and 5) they had “high blood sugar or diabetes.” All data were recorded as a yes/no answer. A diagnosis was considered positive when the subject answered yes for any of these queries.

Height, weight, and waist circumference were measured in accordance with the World Health Organization recommendations (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO STEPS SURVEILLANCE, Part 3: Training and Practical Guides, Section 3: Guide to physical Measurement, 2008). All scales used in the study were validated by the Brazilian National Institute of Metrology, Quality, and Technology (Inmetro, 2013). Weight was measured in kilograms and was recorded to one decimal place. Height was measured in meters with two decimal places. Waist circumference was measured in centimeters with one decimal place. BMI was calculated using the formula weight in kg divided by the square of height in meters.

All blood samples were drawn at early morning with at least 8 hours of fasting. The specimens were centrifuged at $2500 \times g$ for 15 min at 4°C . All of the samples were frozen at -80°C and analyzed at the same time. The blood pressure was measured in accordance with the guidelines of the Brazilian Society of Cardiology (Malachias *et*

al., 2016) a few minutes prior to the blood collection. The practice of physical activity was quantified by the weekly frequency Baecke questionnaire (Baecke *et al.*, 1982).

All fractures included in the study were confirmed by X-ray or surgical reports. Major fractures were considered after 45 years in the femur, humerus, clinical spine, or wrist (Copes *et al.*, 2015).

The diagnosis of metabolic syndrome was adapted from the Brazilian Society of Endocrinology and Metabology. It was considered present when the subject had at least three of the following: 1) waist circumference greater than 88 cm; 2) self-reported diagnosis of hypertension, systolic blood pressure higher than 130 mmHg, or diastolic blood pressure higher than 85 mmHg; 3) self-reported diagnosis of diabetes mellitus or fasting blood glucose level greater than 110 mg/dL; 4) triglyceride level greater than 150 mg/dL; and 5) self-reported dyslipidemia or HDL-cholesterol level lower than 50 mg/dL.

1. <http://www.outcomes-umassmed.org/GLOW/default.aspx>.
2. Hooven FH, Adachi JD, Adami S, Boonen S, Compston J, Cooper C, et al. The Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW): rationale and study design. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2009;20(7):1107-16.
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO STEPS SURVEILLANCE, Part 3: Training and Practical Guides, Section 3: Guide to physical Measurement. 2008.
4. INMETRO. <http://www.inmetro.gov.br>. 2013.
5. Malachias MVB, Gomes MAM, Nobre F, Alessi A, Feitosa AD, Coelho EB. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 2 - Diagnosis and Classification. *Arq Bras Cardiol*. 2016;107(3 Suppl 3):7-13.
6. Baecke JA, Burema J, Frijters JE. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr*. 1982;36(5):936-42.

7. Copes RM, Comim FV, Langer FW, Codevilla AA, Sartori GR, de Oliveira C, et al. Obesity and Fractures in Postmenopausal Women: A Primary-care Cross-Sectional Study at Santa Maria, Brazil. *J Clin Densitom.* 2015;18(2):165-71.

4. DISCUSSÃO

O consumo da erva-mate é um hábito muito comum entre as populações do sul da América Latina (HECK, 2007) e utilizada tradicionalmente como diurético, estimulante e analgésico (GOETZ, 2013). Estudos experimentais em animais e humanos demonstram seu efeito antioxidante, hipocolesterolêmico, hipoglicêmico, vasodilatador, entre outros (BRACESCO, 2011; SCHINELLA, 2000; de MORAIS, 2009; BOAVENTURA, 2013). Recentemente, os efeitos da erva-mate sobre a densidade mineral óssea foram documentados (CONFORTI, 2012; PEREIRA, 2013).

No nosso entendimento, esse foi o primeiro estudo que avaliou o uso da erva-mate sobre o risco de fratura e o metabolismo ósseo. Não foi observada associação significativa entre o consumo de erva-mate e o risco de fraturas osteoporóticas, nem alteração nos marcadores do metabolismo ósseo ou na homeostase do cálcio, mesmo quando considerado o tempo e quantidade. Esses achados sugerem que o consumo é seguro em relação ao metabolismo do osso.

Na composição fito-química da erva-mate estão presentes muitas substâncias que podem interferir no metabolismo ósseo, como a cafeína e polifenóis. Na análise da erva-mate, apesar da quantidade de cafeína, vários polifenóis foram detectados (ácido isoclorogênico, ácido cafêico, catequinas, epigallocatequina, rutina, quercitina e kaempferol). Essa composição pode equilibrar o efeito da cafeína, pois o conteúdo de polifenóis do chimarrão é superior aos de outros chás (HECK, 2007); além disso, a concentração de cafeína é muito menor que a encontrada no café (MEINHART, 2010). Na amostra de erva-mate analisada foi encontrada a epigallocatequina, semelhante àquela do chá verde. Estudos em animais apontam a melhorara do metabolismo ósseo relacionada a esse polifenol (QIU, 2016). Ainda, indivíduos que consomem três ou mais xícaras de chá preto por dia tem se mostrado com menos fraturas do que aqueles com consumo menor (MYERS, 2005). Já o consumo de café parece estar associado com fraturas osteoporóticas (SHENG, 2014).

A falta de associação com o consumo de mate e os marcadores da reabsorção óssea (CTX) e os de formação (P1NP) também sugerem um efeito neutro sobre o osso. Hardcastle et al (2011) avaliaram a associação entre chá preto

e a saúde óssea em 3160 mulheres escocesas com média de idade de 48,8 anos. Eles observaram que o alto consumo de flavonoides encontrados em duas a três xícaras de chá preto por dia foi suficiente para reduzir os marcadores de reabsorção óssea determinados pela razão piridinolina livre e deoxipiridinolina livre urinária. Em nosso estudo, a quantidade de flavonoides presentes na infusão de erva-mate parece ser mais menor do que a encontrada por Hardcastle, não sendo suficiente para modificar esses marcadores. Estudos experimentais também não encontraram nenhuma evidencia de modificação nos parâmetros dos marcadores ósseos com consumo de erva-mate (BRUN, 2015).

Embora o nível sérico de óxido nítrico foi significativamente elevado nas mulheres consumindo erva-mate, ele não foi associado com fraturas osteoporóticas e não foi relacionado com os marcadores P1NP e CTX. Altos níveis de ON parecem estimular a osteoprotegerina, inibindo a ligação RANK-RANK-L e reduzindo a reabsorção óssea. Foi descrito que o ON possa atuar como receptor estrogênico nos osteócitos (JOSHUA, 2014). Ozgocmen et al (2007) avaliaram mulheres com osteoporose pós-menopausa sem fraturas e não observaram aumento do ON quando comparado com mulheres sem osteoporose. Interessante, neste estudo, o ON eritrocitário foi significativamente elevado nas mulheres osteoporóticas, com associação negativa com o CTX, sugerindo, que o ON possa ter um papel na formação óssea. No entanto, Sendur et al (2009) encontrou altos níveis de ON em mulheres osteoporóticas que não foram associados com baixa densidade mineral óssea (SENDUR, 2009).

Há poucos estudos avaliando a homeostase do cálcio após a ingestão de erva-mate. Embora a viabilidade do cálcio seja favorecida pela água quente na infusão de erva-mate (BRUN, 2015), a quantidade de cálcio encontrada nas folhas secas é usualmente pequena, aproximadamente 6,8 mg/g (CONFORTI, 2012). Brun et al (2015) estudou ratos tratados com infusão de erva-mate por 90 dias. Eles mostraram que o consumo de erva-mate não alterou a absorção do cálcio da dieta. Em nosso estudo, os níveis séricos de cálcio não foram influenciados pelo consumo de erva-mate, concordando com o estudo experimental.

A erva-mate é usualmente considerada uma bebida psico-estimulante, devido a presença de xantinas (cafeína e teobromina) na sua composição. Tem sido

especulado que possa promover agitação psicomotora, promovendo maior risco de quedas. Porém em nosso estudo, o número de queda não diferiu significativamente entre os grupos, mesmo após análise *posthoc* para quantidade e duração do consumo.

Na análise multivariada, somente a idade foi associada com um aumento na prevalência de fraturas osteoporóticas. A idade é um fator de risco para fraturas bem estabelecido, especialmente a de quadril. A probabilidade do aumento das fraturas aumentar com a idade é de 0,2% na idade de 50 anos e 22% na idade de 80 anos (ARCEO-MENDOZA, 2015; KANIS, 2002). Além disso, o risco de fratura de quadril aumenta 30 vezes com a idade, indicando que a mudança de risco associada com a idade é aproximadamente 7 vezes maior do que a mudança de risco associada a densidade mineral óssea (KANIS, 2005). Uma coorte desenhada para avaliar o efeito da idade e massa óssea em 521 mulheres caucasianas confirmou que a população mais envelhecida tinha risco maior de fratura (HUI, 1988).

Embora as mulheres obesas contribuíssem com mais de 40% do total de fraturas em uma coorte primária (COPÊS, 2015), não houve associação entre IMC e fratura em nosso estudo. Sabe-se que a obesidade está associada a uma redução do número de fraturas em alguns sítios ósseos como quadril e pelve, mas aumentado em outros, como o úmero (PREMAOR, 2014; PRIETO-ALHAMBRA, 2012).

Surpreendentemente, mulheres que consumiam erva-mate foram mais obesas (IMC 30,2). Esse achado persistiu após análise da duração do consumo, mas desapareceu quando se avaliou o uso diário. Embora o IMC das mulheres que consumiam erva-mate no estudo de Conforti et al (2012) também estava aumentado, elas não eram obesas (IMC 26.4 mg/m²). Nós não podemos descartar que um fator confundidor possa estar presente em nosso estudo. Mais estudos devem esclarecer esse achado.

Recentemente, um estudo de coorte envolvendo mais de 18000 indivíduos, na sua maioria mulheres, mostrou que os consumidores de mais de um litro de chimarrão ao dia eram obesos, devido ao maior consumo de carboidratos,

possivelmente relacionados à hipoglicemia induzida pelo uso da erva-mate (CHAVES, 2018).

Limitações do estudo: o viés de memória é inerente ao tipo de estudo; entretanto, as participantes não conheciam os objetivos do estudo. Portanto, não há razão para que esse viés fosse diferente nos dois grupos. Além disso, o tamanho da amostra foi pequeno, e não deve ser suficiente para avaliar um pequeno efeito de tamanho. Mesmo assim, nós não encontramos qualquer evidencia de prejuízo.

A osteoporose e as doenças cardiovasculares tornam-se mais prevalentes na mulher na pós-menopausa (BACCARO, 2015; CESAR, 2014) e a mortalidade nas mulheres com osteoporose está relacionada às fraturas, principalmente as de quadril (COMPSTON, 2010), à coronariopatia e doença pulmonar (KADO, 2000). Copês et al (2015) mostrou associação positiva entre fraturas osteoporóticas e doença isquêmica cardíaca).

Em análise *post hoc* do estudo: *The yerba mate intake has a neutral effect on bone: A case-control study in postmenopausal women* (da VEIGA, 2017) observou-se que as mulheres pós-menopausa que consumiam mais do que 1L/dia de chimarrão tiveram menos diagnósticos de doença coronariana, HAS e dislipidemia, provavelmente por efeito sobre os fatores de risco para doenças cardiovasculares.

Um efeito agudo do consumo de 1L/dia de chá mate durante 40 dias reduziu a pressão sistólica em torno de 2,3% em indivíduos adultos (de MORAIS, 2009). Os mecanismos pelos quais a erva-mate beneficia o sistema cardiovascular não são conhecidos. Schinella et al (2005) descreveu um efeito protetor sobre a disfunção miocárdica provocada por isquemia e reperfusão em animais. Em outro estudo, ratos alimentados com dieta rica em gordura e tratados com chá mate por quatro semanas mostrou um efeito benéfico sobre o endotélio vascular, com redução da endotelina e tromboxane (GAO, 2013). Nos dois estudos, os efeitos da erva-mate foram relacionados com o óxido nítrico.

Os níveis séricos de CT, LDL-C, HDL-C e TG foram semelhantes nos dois grupos de mulheres, apesar de que houve menos diagnóstico de dislipidemia no grupo com maior consumo de erva-mate. Alguns estudos relatam resultados

diferentes. Em um estudo com indivíduos adultos, o consumo de 330 ml de chá mate, após as principais refeições durante 40 dias (total de 990ml/dia), reduziu os níveis de CT, LDL-C e aumentou HDL-C nos indivíduos dislipidêmicos. Nos indivíduos normais, somente o LDL-C foi reduzido. Parece haver resposta melhor nos indivíduos com estado metabólico alterado (de MORAIS, 2009). Outro estudo descreveu redução do CT e LDL-C, sem mudança nos níveis séricos de TG (MESSINA, 2015).

Quando se avaliou os níveis séricos de glicose, as mulheres com maior consumo de chimarrão tinham significativamente níveis mais baixos comparados às daquelas do grupo controle. Esse resultado concorda com os encontrados por Boaventura et al (20013). Nesse estudo, os níveis de glicemia, hemoglobina glicosilada e os marcadores do estresse oxidativo foram reduzidos, em indivíduos pré-diabéticos que consumiam 1L/dia de chá mate, durante 60 dias, sugerindo um efeito benéfico a longo prazo na diabetes mellitus.

No período pós-menopausa com a redução de estrogênio, existe um desequilíbrio no estresse oxidativo, com diminuição das defesas antioxidantes e aumento da oxidação, principalmente com peroxidação lipídica (CAKIR, 2016). Em nosso estudo, os marcadores de estresse oxidativo não foram modificados pelo consumo de mate, diferentemente do estudo experimental de Pereira et al (2017), realizado com rato Wistar fêmea tratado com chá mate. Eles mostraram uma melhora na capacidade antioxidante determinada pelo aumento de FRAP, SOD e GPx, e diminuição de MDA no fígado e eritrócitos. Vários fatores podem explicar os achados negativos de nosso estudo sobre o estresse oxidativo. Em primeiro lugar, em nosso estudo, os marcadores foram medidos no sangue em vez do fígado. Às vezes, os marcadores de soro podem não refletir o que está ocorrendo em outros tecidos. Em segundo lugar, em condições não experimentais, muitas variáveis diferentes da ingestão de erva-mate, como a inflamação sistêmica presente na doença cardiovascular, podem influenciar os marcadores do estresse oxidativo. Finalmente, a forma como a erva-mate foi preparada e ingerida também pode ter afetado os resultados (MEINHART, 2010; BLUM-SILVA, 2015).

Esses resultados sugerem uma associação benéfica entre a erva-mate e a redução dos diagnósticos de doenças cardiovasculares; entretanto esse resultado

não pode ser generalizado, devido ao pequeno tamanho da amostra, mesmo sendo representativa da população atendida em serviços básicos de saúde. Mais estudos são necessários para confirmar esse resultado.

5. CONCLUSÃO

Uma extensiva revisão bibliográfica permite-nos propor que este foi o primeiro a descrever o efeito da erva-mate sobre as fraturas osteoporóticas, os marcadores do metabolismo ósseo, o estresse oxidativo e os diagnósticos de doenças cardiovasculares e metabólicas em mulheres pós-menopausa.

O consumo de erva-mate não afetou a frequência de fraturas osteoporóticas ou modificou os parâmetros dos marcadores do metabolismo ósseo (P1NP e CTX), mostrando um risco nulo sobre o osso, provavelmente devido à composição fito-química da erva-mate. Apesar do aumento do ON, este não foi associado com as fraturas osteoporóticas. Na análise regressiva de outros fatores associados a fraturas, a idade se mostrou positivamente associada, que já é um fator de risco bem estabelecido.

O uso da erva-mate não foi associado às fraturas e ao metabolismo ósseo nesse estudo caso-controle. Esse resultado negativo é relevante, pois o hábito do chimarrão é um costume na região sul da América do Sul. Mais estudos são necessários para avaliar o possível tamanho de efeito.

As mulheres com consumo maior de erva-mate tiveram menos diagnósticos de doença coronariana, hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia, além de níveis glicêmicos significativamente menores. Esses resultados sugerem o efeito da erva-mate sobre os lipídeos e a glicemia, assim como um provável efeito vasodilatador corroborando os estudos experimentais.

O estudo apresenta pontos fortes, pois é um estudo pragmático, que mostrou aspectos reais do consumo da erva-mate e seus efeitos em mulheres pós-menopausa, que refletiu uma amostra significativa da população atendida nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Santa Maria – RS. Entretanto, o tipo de desenho do estudo e tamanho da amostra, não foi para generalizar esses resultados para toda a população.

Outros estudos com delineamentos diferentes e amostras maiores serão necessários para avaliar a associação do consumo de erva-mate sobre as doenças cardiovasculares e metabólicas.

REFERÊNCIAS

1. Altindag O; Erel O; Soran N; Celik H; Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatol Int* 2008;28:317-321.
2. Arabi A; El Rassi R; El-Hajj Fuleihan G. Hypovitaminosis D in developing countries-prevalence, risk factors and outcomes. *Nature reviews Endocrinology* 2010;6(10):550-61.
3. Arantes HP; Chiang AY; Bilezikian JP; Lazaretti-Castro M. New vertebral and nonvertebral fractures in postmenopausal women with low bone mass followed-up for 4 years: correlation with clinical, laboratory and densitometric indices. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2013;57(SUP 7):S519 - S20.
4. Arçari DP et al. Anti-inflammatory effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2011;335:110–115.
5. Baccaro LF; Conde DM; Costa-Paiva L; Pinto-Neto AM. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. *Clinical Interventions in Aging* 2015;10:583–591.
6. Baecke JA; Burema J; Frijters JE. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr* 1982;36(5):936-42.
7. Becker AM. Erva-mate (*Ilex paraguariensis*, *St. Hill*) em cápsulas: estudos de toxicidade clínica e efeitos hipocolesterolêmico e antioxidante em indivíduos com dislipidemia. 2013. 218 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.
8. Biagi EMPA et al. Chá-mate (*Ilex Paraguaiensis*) reduz o dano oxidativo e a perda de massa óssea em fêmeas Wistar senis. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2013;57(SUPL 7):S514.
9. Blum-Silva CC; Chaves VC; Schenkel, EP; Coelho, GC et al. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2015;25:1- 6.
10. Boaventura BCB et al. Antioxidant potencial of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. *Journal of Funcional Foods* 2013;5:1057-1064.
11. Bojic M; Simon Haas V; Saric D; Males Z. Determination of flavonoids, phenolic acids, and xanthines in mate Tea (*Ilex paraguariensis* *St.-Hil.*). *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2013;2013:658596.

12. Bracesco N; Sanchez AG; Contreras V; Menini T; Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. Journal of Ethnopharmacology 2011;136(3):378-84.
13. Cakir T; Goktas B; Mutlu MF; Mutlu I; Bilgihan A et al. Advanced oxidation protein products and malondialdehyde - the new biological markers of oxidative stress - are elevated in postmenopausal women. Ginekol Pol. 2016;87(5):321-5.
14. Castelo-Branco C; Soveral I. Phytoestrogens and bone health at different reproductive stages. Gynecological Endocrinology 2013;29(8):735-43.
15. Cauley JA; Chalhoub D; Kassem AM; Fuleihan GE. Geographic and ethnic disparities in osteoporotic fractures. Nature reviews Endocrinology 2014;10:338-351.
16. Chaves G; Brites N; Oviedo G; Gonzalez G et al. Heavy drinkers of *Ilex paraguariensis* beverages show lower lipid profiles but higher body weight. Phytotherapy Research 2018;1-9.
17. Cervellati C et al. Oxidative stress and bone resorption interplay as a possible trigger for postmenopausal osteoporosis. BioMed Research International 2014. Epub 2014 May 21.
18. Cervellati C; Bergamini CM. Oxidative damage and the pathogenesis of menopause related disturbances and diseases. Clin Chem Lab Med 2016; 54(5): 739–753.
19. Cesar LA; Ferreira, JF; Armaganijan D; Gowdak LH. Diretriz de Doença Coronária Estável. Arq. Bras. Cardiol 2014;103(2) supl.2.
20. Clark P et al. The prevalence of radiographic vertebral fractures in Latin American countries: the Latin American Vertebral Osteoporosis Study (LAVOS). Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA 2009;20(2):275-82.
21. Clemens TL; Karsenty G. The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. Journal of Bone and Mineral Research 2011;26(4):677-80.
22. Coates P. Bone Turnover Markers. Australian Family Physician 2013;42(5):285-287.
23. Compston J. Osteoporosis: social and economic impact. Radiologic clinics of North America 2010; 48(3):477-82.
24. Conforti AS; Gallo ME; Saravi FD. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. Bone 2012;50(1):9-13.

25. Copês, RM et al. Obesity and fractures in postmenopausal women: a primary-care cross-sectional study at Santa Maria, Brazil. *Journal of Clinical Densitometry* 2015;18(2):165-71.
26. Dalal PK; Agarwal, M. Postmenopausal syndrome. *Indian J Psychiatry* 2015;57 (Supplement 2).
27. Davis SR et al. Menopause. *Nature reviews disease primers* 2015;1:1-19.
28. de Andrade F; de Albuquerque CA; Maraschin M; da Luz EL. Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract: results of acute and 90 subchronic toxicity studies in rats and rabbits. *Food Chem Toxicol* 2012;50(2):328-334.
29. de Marchi R et al. Prevalence of metabolic syndrome in pre- and postmenopausal women. *Arch Endocrinol Metab.* 2017;61(2):160-166.
30. de Moraes EC et al. Consumption of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57:8316-8324.
31. Eastel R; Hannon A. Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *Proceedings of the Nutrition Society* 2008(67);157–162.
32. Fonseca MIH; da Silva IT; Ferreira SR. Impact of menopause and diabetes on atherogenic lipid profile: is it worth to analyse lipoprotein subfractions to assess cardiovascular risk in women? *Diabetol Metab Syndr* 2017;9:22
33. Gao H, Liu Z, Qu X, Zhao Y. Effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on vascular endothelial function and liver lipoprotein receptor gene expression in hyperlipidemic rats. *Fitoterapia.* 2013;84:264-72
34. Giulian R; dos Santos CEI; Shubeita SD; da Silva LM; Dias JF; Yoneama ML. Elemental characterization of commercial mate tea leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) before and after hot water infusion using ion beam techniques. *J Agr Food Chem* 2007;55(3):741-6
35. Goetz P. Maté, *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. (Aquifoliaceae). *Phytothérapie* 2013;11:116-120.
36. Gonçalves MJ; Rodrigues AM; Canhão H; Fonseca JE. Osteoporosis: from bone biology to individual treatment decision. *Acta Med Port* 2013;26(4):445-455.
37. Grundy SM et al. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005;118:2735-2752.

38. Hardcastle AC; Aucott L; Reid DM; Macdonald HM. Associations between dietary flavonoid intakes and bone health in a Scottish population. *Journal of Bone and Mineral Research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2011;26(5):941-7.
39. Heck CI; de Mejia EG. Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci* 2007;72(9):R138-R51.
40. Heinrichs R; Malavolta E. Composição Mineral do Produto Comercial da Erva-Mate. *Ciência Rural* 2001;31(5):781 - 5.
41. Hlaing TT; Compston J. Biochemical markers of bone turnover – uses and limitations. *Annals of Clinical Biochemistry* 2014;51(2):189–202.
42. Hooven, FH et al. The Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW): rationale and study design. *Osteoporos Int* 2009;20(7):1107-16.
43. http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ervamate/CultivodaErvaMate_2ed/Distrib_geograf.htm Acesso em 05 de maio de 2014.
44. http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/portarias/234_98.htm. Acesso em 05 de maio de 2014.
45. Huxley R; Barzi F; Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *BMJ* 2006, doi:10.1136/bmj.38678.389583.7C.
46. Kado DM; Browner WS; Blackwell T; Gore R, Cummings SR. Rate of bone loss is associated with mortality in older women: a prospective study. *Journal of Bone and Mineral Research* 2000;15(10):1974-80.
47. Key, Jr LL; Wolf WC; Gundberg CM; Ries, WL. Superoxide and bone resorption. *Bone* 1994,15(4); 431-436.
48. Kolesnikova L et al. Antioxidant status in peri- and postmenopausal women. *Maturitas* 2015;81:83-87.
49. Lima R; Wofford M; Reckelhoff JF. Hypertension in Postmenopausal Women. *Curr Hypertens Rep* 2012;14(3):254–260.
50. Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *End Rev* 2010,31(3);266-300.
51. Marcus R (Ed.), Feldman D (Ed.), Dempster DW (Ed.), Luckey M (Ed.), Cauley JA (Ed.). *Osteoporosis. Fourth Edition. Vol 1.* Oxford 2013: Elsevier.

52. Mascarenhas-Melo et al. Diabetes abrogates sex difference and aggravates cardiometabolic risk in postmenopausal women. *cardiovascular diabetology* 2013;12:61.
53. Meinhart AD et al. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages *J. Agric. Food Chem* 2010;58:2188–2193.
54. Messina D; Soto C; Mendez A; Corte C et al. Lipid - lowering effect of mate tea intake in dyslipidemic subjects. *Nutr Hosp.* 2015;31(5):2131-9.
55. Moura EC; Malta DC. Consumo de bebidas alcoólicas na população brasileira: características sociodemográficas e tendência. *Rev Bras Epidemiol* 2011;14(1):61-70.
56. Myers G; Prince RL; Kerr DA; Devine A et al. Tea and flavonoid intake predict osteoporotic fracture risk in elderly Australian women: a prospective study. *Am J Clin Nutr* 2015;102:958-965.
57. Neville CE et al. Effect of increased fruit and vegetable consumption on bone turnover in older adults: a randomised controlled trial. *Osteoporosis International* 2014;25(1):223-33.
58. Nieves JW. Skeletal effects of nutrients and nutraceuticals, beyond calcium and vitamin D. *Osteoporosis International* 2013;24(3):771-86.
59. Ozgocmen S; Kaya H; Fadilliouglu E; Aydogan R; Yilmaz Z. Role of antioxidant system, lipid peroxidation and nitric oxid in postmenopausal osteoporosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2007;295:45-52.
60. Pereira CS GV et al. Aumento da densidade mineral e da resistencia óssea em fêmur de ratas senis, associado ao consumo de mate (*Ilex Paraguariensis*). *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2013;57(SUPL 7):S512-S3.
61. Pereira CS; Stringheta-Garcia CT; Xavier LS; Tirapeli KG et al. *Ilex paraguariensis* decreases oxidative stress in bone and mitigates the damage in rats during perimenopause. *Exp Gerontol.* 2017;98:148-52.
62. Pinheiro MM; Ciconelli RM; Martini LA; Ferraz MB. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Osteoporosis International* 2009;20(3):399-408.
63. Pinheiro MM et al. The burden of osteoporosis in Brazil: regional data from fractures in adult men and women-the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Revista Brasileira de Reumatologia* 2010;50(2):113-27.
64. Pinheiro MM et al. Risk factors for osteoporotic fractures and low bone density in pre and postmenopausal women. *Revista de Saúde Pública* 2010;44(3):479-85.

65. Poole KE; Compston JE. Osteoporosis and its management. *BMJ* 2006;333(7581):1251-6.
66. Prisby RD. Mechanical, hormonal and metabolic influences on blood vessels, blood flow and bone. *J Endocrinol.*2017;235(3):R77-R100.
67. Puangpraphant S; De Meija EG. Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-Induced macrophages through NFkB pathways. *J Agr Food Chem* 2009;57:8873-83.
68. Qiu Y; Chen Y; Zeng T; Guo W et al. EGCG ameliorates the hypoxia-induced apoptosis and osteogenic differentiation reduction of mesenchymal stem cells via upregulating miR-210. *Molecular Biology Reports* 2016; 43;183-193.
69. Qvist P; Christgau S; Pedersen BJ; Schlemmer A; Christiansen C. Circadian variation in the serum concentration of C-terminal telopeptide of type I collagen (serum CTx): effects of gender, age, menopausal status, posture, daylight, serum cortisol, and fasting. *Bone* 2002;31(1):57–61.
70. Riera-Espinoza, G. Epidemiology of osteoporosis in Latin America 2008. *Salud Publica de Mexico* 2009;51(Suppl 1):S52-5.
71. Sánchez-Rodríguez MA et al. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause* 2012;19(3):361-367.
72. Schilling T; Ebert R; Raaijmakers N; Schutze N; Jakob F. Effects of phytoestrogens and other plant-derived compounds on mesenchymal stem cells, bone maintenance and regeneration. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2014;139:252-61.
73. Schinella GR; Troiani; Dávila V; de Buschiazzo PM; Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 269:357-360.
74. Schinella G, Fantinelli JC, Mosca SM. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. *Clin Nutr.* 2005;24(3):360-6.
75. Seigal BD; Agarwal, A. The role of oxidative stress in menopause. *J Midlife Health* 2013;4(3):140-146.
76. Seibel M. Biochemical Markers of Bone Turnover Part I : Biochemistry and Variability. *Clin Biochem Rev* 2005;26: 97-122.
77. Seibel M. Biochemical markers of bone turnover Part II: clinical applications in the management of osteoporosis. *Clin Biochem Rev* 2006;27:123-138.
78. Sendur OF; Turan Y; Tastaban E; Serter M. Antioxidant status in patients with osteoporosis: a control study. *Joint Bone Spine* 2009;(5):514-8.

79. Sprini D; Rinni GB; Stefanelo LD; Cianferotti L; Napoli N. Correlation between osteoporosis and cardiovascular disease. *Clinical Cases in Bone and Mineral Metabolism* 2014;11(2):117-119.
80. Stefanska A; Bergmann K; Sypniewska G. Metabolic Syndrome and Menopause: Pathophysiology, Clinical and Diagnostic Significance. *Adv Clin Chem.* 2015;72:1-75.
81. Uysal U et al. Consumption of polyphenol plants may slow aging and associated diseases. *Current Pharmaceutical Design* 2013;19(34):6094-111.
82. Veloso et al. Prevalência de Síndrome Metabólica em Mulheres Climatéricas. *Rev Bras Cardiol.* 2014;27(1):20-27.
83. Vieira MA et al. Chemical characterization of candy made of erva-Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *J. Agric. Food Chem* 2008;56:4637–4642.
84. Vittinghoff E et al. Risk factors and secondary prevention in women with heart disease: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. *Ann Intern Med.* 2003;138(2):81-9.
85. Wauquier F et al. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends in molecular Medicine* 2009;13(10):468-477.
86. Weaver CM; Alekel DL; Ward WE; Ronis MJ. Flavonoid intake and bone health. *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics* 2012;31(3):239-53.
87. Welch A; MacGregor A; Jennings A; Fairweather-Tait S. A. Habitual flavonoid intakes are positively associated with bone mineral density in women. *Journal of Bone and Mineral Research* 2012;27(9):1872-8.
88. Yang S; Feskanich D; Willet WC; Eliassen AH; Wu T. Association between biomarkers of oxidative stress and hip fracture in postmenopausal women: a prospective study. *Journal of Bone and Mineral Research* 2014;29(12):2577-2583.
89. Yihua L; Yun J; Zhao Dongshen Z. Coronary Artery Disease in Premenopausal and Postmenopausal Women. Risk Factors, Cardiovascular Features, and Recurrence. *International Heart Journal Association* 2017;58(2):174-179.
90. Zhang et al. Involvement of oxidative stress in age-related bone loss. *Journal of Surgical Research* 2011;169:e37-e42.

ANEXO A - Questionário sobre consumo de erva-mateQUESTIONÁRIO

IDENTIFICAÇÃO

NÚMERO DO CARTÃO DO SUS

NOME: _____

TELEFONE: _____

ENDEREÇO: _____

Medida da cintura abdominal (em centímetros): _____

Peso (em Kg): _____

Altura (em m): _____

INSTRUÇÕES

A sua participação neste estudo é voluntária.

Este questionário necessita ser aplicado sob forma de entrevista individualizada. Irá nos permitir coletar dados a respeito da sua história familiar de osteoporose, história menstrual e quanto ao seu nível de atividade física.

Deve-se responder as questões pintando o círculo do lado esquerdo das respostas ou fazendo um círculo ao redor do número referente à resposta certa.

1. Você tem parentes em primeiro grau (pais ou irmãos e filhos) com osteoporose?

() sim () não Qual parente? _____

2. Você tem parentes em primeiro grau (pais ou irmãos e filhos) que quebrou o quadril ou o fêmur?

() sim () não Qual parente? _____

3. Você toma chimarrão?

() Sim () Não

Quantos litros?

() Menos de um litro/dia () Mais de um litro/dia

Há quanto tempo?

() Menos de 5 anos () 5- 10 anos () mais de 10 anos

4. Você toma chá preto?

() Sim () Não

Quantas xícaras por dia?

() 1 () 2-4 () 5 ou mais

Há quanto tempo?

() Menos de 5 anos () 5- 10 anos () mais de 10

5. Você toma café?

() Sim () Não

Quantas xícaras por dia?

() 1 () 2-4 () 5 ou mais

Há quanto tempo?

() Menos de 5 anos () 5- 10 anos () mais de 10

6. Você toma vinho?

() Sim () Não

Quantas taças por dia?

() 1 () 2-4 () mais de 5

Há quanto tempo?

() Menos de 5 anos () 5- 10 anos () mais de 10

7. Você come cebola ou repolho roxo?

() Sim () Não

Quantas porções por dia?

() 1 () 2-4 () mais de 5

Há quanto tempo?

() Menos de 5 anos () 5- 10 anos () mais de 10

8. Qual a idade em que você teve a primeira menstruação (“regras”)?

_____a nos

9. Como foi o seu ciclo menstrual (quando você estava sem o uso de pílulas ou tratamentos hormonal)?

() de _____ dias ou (mais de 8 menstruações em um ano)

() 35 dias (ou até 8 ou menos menstruações em um ano)

() outro: _____

10. Você apresentou problemas com aumento de pêlos na face ou abdome, pernas, tórax ou região dorsal e lombar?

() Sim e necessitava depilação até duas vezes por semana

() Sim e necessitava depilação menos de duas vezes por semana.

() Não

11. Apresentou abortos espontâneos (perda do bebê) durante a gestação?

() Sim Número: _____

() Não

12. Precisou fazer algum tipo de tratamento para ficar grávida?

() Sim

() Não

QUESTIONÁRIO DE ATIVIDADE FÍSICA BASAL

Baecke, JAH – 1982

A) OCUPAÇÃO

P1) Qual a sua principal ocupação (descrever):

1 Trabalho em escritório, motorista, vendas, lecionando, estudando, em casa, médico/paramédico, outra de nível universitário, segurança

3 Trabalho fabril, encanador, carpinteiro, serralheiro, mecânica

5 Construção civil, pedreiro, marceneiro, carregador

P2) No trabalho, o sr(a) senta-se:

1 nunca

2 raramente

3 algumas vezes

4 frequentemente

5 sempre

P3) No trabalho, o sr(a) fica de pé:

1 nunca

2 raramente

3 algumas vezes

4 frequentemente

5 sempre

P4) No trabalho, o sr(a) anda:

1 nunca

2 raramente

3 algumas vezes

4 frequentemente

5 sempre

P5) No trabalho, o sr(a) carrega objetos pesados:

1 nunca

2 raramente

3 algumas vezes

4 frequentemente

5 muito frequentemente

P6) Depois do trabalho, o sr(a) sente-se fisicamente cansado:

- 1 nunca
- 2 raramente
- 3 algumas vezes
- 4 frequentemente
- 5 muito frequentemente

P7) No trabalho, o sr(a) sua:

- 1 nunca
- 2 raramente
- 3 algumas vezes
- 4 frequentemente
- 5 muito frequentemente

P8) Em comparação com outras pessoas do seu convívio e com a mesma idade, o sr(a) acha que seu trabalho é fisicamente:

- 1 muito mais leve
- 2 mais leve
- 3 da mesma intensidade
- 4 mais intenso
- 5 muito mais intenso

CÁLCULO DO ÍNDICE OCUPACIONAL = $[P1+(6 - P2)+P3+P4+P5+P6+P7+P8] \div 8 =$ _____

B) ESPORTES

P9) O sr(a) pratica algum esporte:

- SIM
- NÃO

P9a) Caso sim:

INTENSIDADE

Qual esporte você pratica mais frequentemente:

- 0,76 bilhar, boliche, vela, outro esporte sem deslocamento corporal ativo
 1,26 ciclismo, dança, natação, tênis, vôlei, caminhada
 1,76 basquete, boxe, futebol, canoagem, ginástica, corrida, musculação

TEMPO

Quantas horas por semana:

- 0,5 <1
 1,5 1-2
 2,5 2-3
 3,4 3-4
 4,5 >4

PROPORÇÃO

Quantos meses por ano:

- 0,04 <1
 0,17 1-3
 0,42 4-6
 0,67 7-9
 0,92 >9

P9b) O sr(a) pratica um segundo
 esporte: _____

- 0,76 bilhar, boliche, vela, outro esporte sem deslocamento corporal ativo
 1,26 ciclismo, dança, natação, tênis, vôlei, caminhada
 1,76 basquete, boxe, futebol, canoagem, ginástica, corrida, musculação

TEMPO

Quantas horas por semana:

- 0,5 <1
 1,5 1-2
 2,5 2-3
 3,5 3-4

4,5 >4

PROPORÇÃO

Quantos meses por ano:

0,04 <1

0,17 1-3

0,42 4-6

0,67 7-9

0,92 >9

P9b = INTENSIDADE x TEMPO x PROPORÇÃO = _____

P9 = P9a + P9b = _____

1 0

2 0,01 - <4

3 4 - <8

4 8 - <12

5 = ou >12

P10) Em comparação com outras pessoas de seu convívio e de mesma idade, o

sr(a) acha que sua atividade durante seu lazer é:

1 muito menor

2 menor

3 da mesma intensidade

4 maior

5 muito maior

P11) Durante seu lazer, o sr(a) sua:

1 nunca

2 raramente

3 algumas vezes

4 frequentemente

5 muito frequentemente

P12) Durante o seu lazer, o sr(a) pratica esportes:

- 1 nunca
- 2 raramente
- 3 algumas vezes
- 4 frequentemente
- 5 muito frequentemente

CALCULO DO ÍNDICE DE ATIVIDADE ESPORTIVA = [P9+P10+P11+P12]

□□4= _____

C) LAZER**P13) Durante o seu lazer, o Sr(a) assiste TV:**

- 1 nunca
- 2 raramente
- 3 algumas vezes
- 4 frequentemente
- 5 muito frequentemente

P14) Durante o seu lazer, o Sr(a) anda a pé:

- 1 nunca
- 2 raramente
- 3 algumas vezes
- 4 frequentemente
- 5 muito frequentemente

P15) Durante o seu lazer, o Sr(a) anda de bicicleta:

- 1 nunca
- 2 raramente
- 3 algumas vezes
- 4 frequentemente
- 5 muito frequentemente

P16) Quantos minutos habitualmente o Sr(a) anda a pé ou de bicicleta por dia, indo e

voltando trabalho, escola ou compras:

1 <5

2 5-15

3 15-30

4 30-45

5 >45

CÁLCULO DO ÍNDICE DE ATIVIDADE NO LAZER = [(6 – P13)+P14+15+P16] □□4

= _____

SUMÁRIO

ÍNDICE	VALOR (Mj)
OCUPACIONAL	
ATIVIDADE ESPORTIVA	
ATIVIDADE NO LAZER	
TOTAL ABSOLUTO (OC+AE+AL)	
TOTAL MÉDIO (TA ÷ 3)	

* Mj = milijoules.

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****METABOLISMO ÓSSEO E ERVA MATE**

Você está sendo convidada (o) para participar como voluntário de uma pesquisa. Este termo lhe trará informações sobre o estudo a ser realizado e caso você compreenda todas as informações e queira participar, preencha os dados do final deste termo. Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes de você se decidir a participar. Caso você não aceite participar não será penalizado, nem perderá o acompanhamento no Sistema Único de Saúde.

Este documento é composto por duas vias: umas delas é sua e a outra do pesquisador responsável.

Título do projeto: Metabolismo Ósseo e Erva Mate

Pesquisador responsável: Melissa Orlandin Premaor

Instituição/Departamento: Departamento de Clínica Médica

Telefone para contato: 32208508/ 91078009

Local da coleta de dados: Centro de Ciências da Saúde, prédio 26 da UFSM

Objetivo do estudo.

- Avaliar se a erva-mate está associada a fraturas ósseas. Ou melhor, nós queremos saber se tomar chimarrão pode diminuir o risco de quebrar algum osso.

Procedimentos.

- Nós estamos entrando em contato com a senhora porque você está participando do estudo sobre obesidade e fraturas. Desta vez nós queremos saber se o chimarrão protege o osso. Para isso nós precisamos que a senhora nos responda outro questionário. Dessa vez ele é sobre o chimarrão, exercícios físicos, e sobre alguns fatores de risco para fratura. A senhora não precisa responder todas as perguntas. Responda apenas aquelas que quiser responder.
- Nós também vamos precisar coletar uma nova amostra de sangue para saber se o chimarrão altera a formação do osso ou o estresse oxidativo (esses são os radicais livres). Se você não quiser coletar novamente o sangue é só nos autorizar a utilizar o sangue que nós já coletamos para dosar o colesterol e a glicose.
- Se você não quiser vir ao vir ao CCS, prédio 26 da UFSM, nós podemos fazer o questionário por telefone. Ou ainda, se você preferir, os alunos podem ir a sua casa aplicar o questionário.

Benefícios.

- Esta pesquisa trará maior conhecimento sobre o tema abordado, sem benefício direto para a senhora.

Riscos.

- A aplicação do questionário levará em torno de vinte minutos, e pode acontecer que no final das respostas você se sinta um pouco cansada.
- A coleta de sangue pode ocasionar equimoses (manchas roxas) e muito raramente inflamação da veia.

Sigilo.

- As informações fornecidas por você terão sua privacidade garantida pelos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados

em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

Considerações importantes.

- A participação é voluntária e você pode desistir da entrevista a qualquer momento, sem prejuízo algum ao seu tratamento, basta entrar em contato com o pesquisador pelo telefone acima.
- Caso haja qualquer dúvida nova, a senhora sempre pode perguntar ao entrevistador antes ou durante a pesquisa.
- A senhora não precisará pagar pelos dados obtidos e também não receberá nenhum valor financeiro pela sua participação na pesquisa.

Ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto, eu _____, estou de acordo em participar desta pesquisa, assinando este consentimento em duas vias, ficando com a posse de uma delas.

Santa Maria _____, de _____ de 20____

Assinatura

Professora Melissa Premaor – coordenadora do estudo

ANEXO C - ARTIGO 1 – The yerba mate intake has a neutral effect on bone: A case-control study in postmenopausal women.


Received: 30 June 2017 | Revised: 25 August 2017 | Accepted: 18 September 2017

DOI: 10.1002/ptr.5947

WILEY

RESEARCH ARTICLE

The yerba mate intake has a neutral effect on bone: A case-control study in postmenopausal women

Denise T. A. da Veiga¹ | Raísa Bringhent¹ | Aline A. Bolignon² | Etiane Tatsh³ | Rafael N. Moresco³ | Fabio V. Comim¹ | Melissa O. Premaor¹ 

¹ Departamento de Clínica Médica, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

² Phytochemical Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

³ Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Correspondence

Melissa Orlandin Premaor, MD, PhD, Grupo de Pesquisa em Doenças Endócrino-Metabólicas Prevalentes, Departamento de Clínica Médica, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Sala 1337, Prédio 26, CCS/Avenida Roraima 1000, Campus UFSM, Santa Maria, RS, Brazil. Email: premaor@ufsm.br

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 307057/2013-5 and 472211/2013-7; Universidade Federal de Santa Maria, Grant/Award Number: FIPE/CCS 2013

Nutritional factors have been associated with osteoporosis and fractures. The intake of coffee may increase the risk of fracture whereas the intake of black and green tea is associated with its reduction. Recently, consumption of yerba mate was associated with increased bone mineral density in postmenopausal women. Nonetheless, its influence on fracture is not known. The aim of this study was to evaluate the effect of yerba mate tea intake on fractures, bone markers, calcium homeostasis, and oxidative stress in postmenopausal women. A case-control study was carried out in South Brazil, 46 women with fractures and 49 controls completed the study. There was no significant difference between the frequency of fractures in women who drank mate tea and women who did not (48.3% vs. 48.5%, $p = .99$). Moreover, there was no significant difference concerning the serum levels of total calcium, phosphorus, PTH, vitamin D, P1NP, and CTX in the subjects with the history of yerba mate use when compared to controls. Higher serum levels of NOx were found in women who drank the yerba mate infusion. In conclusion, the yerba mate intake is not associated with fracture, and it appears to have a neutral effect on the bone metabolism.

KEYWORDS

antioxidant, bone markers, fracture, *Ilex paraguariensis*, postmenopausal women, yerba mate

1 | INTRODUCTION

Osteoporosis is a disorder of bone metabolism characterized by reduced bone strength due to low bone mineral density (BMD) and altered microarchitecture, favoring an occurrence of vertebral and non-vertebral fractures. The osteoporotic fractures had a predilection for the trabecular bone and are usually low impact fractures (Eastell et al., 2016). Studies have projected a significant increase in the prevalence of osteoporosis due to the aging of the world population. In the United States, this prevalence will be around 14 million by 2020. By 2025, the expected increase is almost 50% of the number of fractures, that is, more than 3 million fractures (Burge et al., 2007). In Brazil, the elderly will comprehend a 23% of the total population by 2050, with an increase in the number of chronic diseases, including osteoporosis (Baccaro, Conde, Costa-Paiva, & Pinto-Neto, 2015). Moreover, several studies have shown the considerable impact of osteoporosis on morbidity and mortality, especially related to hip fracture (Eastell et al., 2016).

Some nutritional risk factors are linked to the reduction of BMD and fracture. Low calcium intake and vitamin D deficiency are well-established risk factors for low BMD, increased bone markers, and fracture (Rizzoli, Bischoff-Ferrari, Dawson-Hughes, & Weaver, 2014). The consumption of coffee, mainly two or more cups a day, equivalent to 220 mg of caffeine, is associated with an increased risk of fragility fracture (Lee et al., 2014). Contrastively, studies indicate the consumption of black tea and green tea (*Camellia sinensis*) is a protective factor for fractures, probably because of its polyphenols content (Shen & Chyu, 2016; Sheng et al., 2014).

Recently, the intake of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) was associated with an increase in BMD in postmenopausal women who consumed 1 L of mate per day, similar to that observed in black tea consumption (Conforti, Gallo, & Saravi, 2012; Myers et al., 2015). On the other hand, some believe that it could have a deleterious effect on bone metabolism due to its high content of caffeine. The yerba mate (*I. paraguariensis*) is a plant native of southern South America. Its leaves can be roasted to prepare the mate tea, which is served with

ANEXO D - ARTIGO 2 - Protective effect yerba mate intake on the cardiovascular system: a *post hoc* analysis study in postmenopausal women.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2018) 51(8): e7253, <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20187253>
ISSN 1414-431X Research Article



1/5

Protective effect of yerba mate intake on the cardiovascular system: a *post hoc* analysis study in postmenopausal women

D.T.A. da Veiga¹, R. Bringhenti¹, R. Copes¹, E. Tatsch², R.N. Moresco², F.V. Comim¹ and M.O. Premaor¹

¹Departamento de Clínica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

²Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

Abstract

The prevalence of cardiovascular and metabolic diseases is increased in postmenopausal women, which contributes to the burden of illnesses in this period of life. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is a native bush from Southern South America. Its leaves are rich in phenolic components, which may have antioxidant, vasodilating, hypocholesterolemic, and hypoglycemic properties. This *post hoc* analysis of the case-control study nested in the Obesity and Bone Fracture Cohort evaluated the consumption of yerba mate and the prevalence of hypertension, dyslipidemia, and coronary diseases in postmenopausal women. Ninety-five postmenopausal women were included in this analysis. A questionnaire was applied to evaluate the risk factors and diagnosis of cardiovascular diseases and consumption of yerba mate infusion. Student's *t*-test and chi-square test were used to assess significant differences between groups. The group that consumed more than 1 L/day of mate infusion had significantly fewer diagnoses of coronary disease, dyslipidemia, and hypertension ($P < 0.049$, $P < 0.048$, and $P < 0.016$, respectively). Furthermore, the serum levels of glucose were lower in the group with a higher consumption of yerba mate infusion ($P < 0.013$). The serum levels of total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, and triglycerides were similar between the groups. This pragmatic study points out the benefits of yerba mate consumption for the cardiovascular and metabolic systems. The ingestion of more than 1 L/day of mate infusion was associated with fewer self-reported cardiovascular diseases and lower serum levels of glucose. Longitudinal studies are needed to evaluate the association between yerba mate infusion and reduction of cardiovascular diseases in postmenopausal women.

Key words: Yerba mate; *Ilex paraguariensis*; Postmenopausal women; Diabetes mellitus; Hypertension; Cardiovascular disease

Introduction

Menopause is associated with an increased frequency of chronic conditions, such as hypertension, cardiovascular disease (CVD), metabolic syndrome, and diabetes mellitus (DM). Traditional cardiovascular risk factors are usually more prevalent after menopause because of loss of estrogenic protection. Menopause has been associated with dyslipidemia, hyperglycemia, and hypertension. The prevalence of hypertension in postmenopausal women is two times higher than in premenopausal women and more than 75% of women older than 60 years have hypertension (1). Moreover, type 2 DM is a disease associated with specific changes in the lipid profile promoting an atherogenic pattern (2). These findings contribute to the morbidity of CVD in postmenopausal women.

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is a native plant from southern South America, consumed daily by ~70% of

that population in the form of mate, mate tea or *tererê*. Several classes of phytochemicals are found in its leaf composition: xanthines (such as caffeine and theobromine), saponins (derived from ursolic and oleanolic acids), and phenolic components (such as chlorogenic acid and other classes of polyphenols). Many experimental studies indicate antioxidant, anti-inflammatory, vasodilating, hypocholesterolemic, and hypoglycemic properties related to yerba mate use (3). In humans, some experimental studies have pointed out a beneficial effect of the consumption of yerba mate on the levels of total cholesterol (CT), triglycerides (TG), and glucose (4–6). The aim of this study was to evaluate the association between the consumption of yerba mate and the frequencies of dyslipidemia, DM, and CVDs in postmenopausal women.

Correspondence: M.O. Premaor. <premaor@ufsm.br>

Received October 27, 2017 | Accepted January 25, 2018

Braz J Med Biol Res | doi: 10.1590/1414-431X20187253