

Metabolic Benefits of Yerba Mate and Green Tea: Experimental Evaluation and Molecular Docking with Lipid-Regulating Enzymes

Benefícios Metabólicos da Erva-Mate e do Chá Verde: Avaliação Experimental e Docking Molecular com Enzimas Reguladoras dos Lípidos

Raphaela Cassol Piccoli ¹ , Daniela Volcan Almeida ² , & Rejane Giacomelli Tavares ^{3,4} 

Keywords: Yerba mate, green tea, chlorogenic acid, diabetes mellitus, dyslipidemia

Palavras-chave: Erva-mate, chá-verde, ácido clorogénico, diabetes mellitus, dislipidemia

To Cite:

Piccoli, R. C., Almeida, D. V., & Tavares, R. G. (2025) Metabolic Benefits of Yerba Mate and Green Tea: Experimental Evaluation and Molecular Docking with Lipid-Regulating Enzymes. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 22(2), 1-24.

 <https://doi.org/10.19277/bbr.22.2.360>

1- Post Graduation Program in Biochemistry and Bioprospecting, Federal University of Pelotas, 96010-610, Pelotas-RS, Brazil

2 - Institute of Biology, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pelotas, Campus Universitário S/N, 96160-000, Pelotas-RS, Brazil

3 - Center for Research in Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal

4 - Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Science (CCQFA), Federal University of Pelotas, Campus Universitário S/N, 96160-000, Pelotas-RS, Brazil

Correspondence to / Correspondência a:
tavares.rejane@gmail.com

Received / Recebido: 16/05/2025

Accepted / Aceite: 04/08/2025

Abstract

The global surge in metabolic disorders, including diabetes and dyslipidemia represents a major public health challenge. Natural products like yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camellia sinensis*) offer promising therapeutic potential due to their bioactive compounds. This study investigates the effects of *Ilex paraguariensis* and *Camellia sinensis* extracts on serum lipid and glucose levels in dyslipidemic and diabetic Wistar rats. Diabetes was induced by alloxan administration and dyslipidemia via a high-fat diet. To complement the *in vivo* findings, molecular docking analyses explored the interactions of major compounds of *Ilex paraguariensis* - chlorogenic acid, rutin and caffeic acid - with HMG-CoA reductase and adipose triglyceride lipase, enzymes involved in lipid metabolism. The findings demonstrated that the extracts effectively resulted in hypoglycemic effects in diabetic rats, reduced triacylglycerol levels in both models, and lowered total cholesterol and LDL-cholesterol in the dyslipidemic model. Molecular docking revealed strong inhibitory potential of all tested compounds, with chlorogenic acid showing the highest binding affinity. Together, these findings highlight the therapeutic promise of *I. paraguariensis* and *C. sinensis* in managing metabolic disorders and support further exploration of plant-based interventions.

Resumo

O aumento global dos distúrbios metabólicos, incluindo a diabetes e a dislipidemia, representa um grande desafio para a saúde pública. Produtos naturais como a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e o chá verde (*Camellia sinensis*) oferecem um potencial terapêutico promissor devido aos seus compostos bioativos. Este estudo investiga os efeitos dos extratos de *Ilex paraguariensis* e *Camellia sinensis* nos níveis séricos de lípidos e glicose em ratos Wistar com dislipidemia e diabetes. A diabetes foi induzida por administração de aloxano e a dislipidemia através de uma dieta rica em gordura. Para complementar os achados *in vivo*, análises de docking molecular exploraram as interações dos principais compostos de *Ilex paraguariensis* – ácido clorogénico, rutina e ácido cafeico – com a redutase da HMG-CoA e a lipase de triglicéridos do tecido adiposo, enzimas envolvidas no metabolismo lipídico. Os resultados demonstraram que os extratos produziram efeitos hipoglicemiantes nos ratos diabéticos, reduziram os níveis de triacilgliceróis em ambos os modelos e diminuíram o colesterol total e o LDL-colesterol no modelo dislipidémico. O docking molecular revelou um forte potencial inibitório de todos os compostos testados, sendo o ácido clorogénico o que apresentou maior afinidade de ligação. Em conjunto, estes resultados destacam o potencial terapêutico de *I. paraguariensis* e *C. sinensis* na gestão de distúrbios metabólicos e apoiam a continuação da investigação em intervenções baseadas em plantas.

Introduction

In recent decades, the global prevalence of non-communicable chronic diseases has surged, primarily driven by the rising incidence of metabolic disorders, including diabetes mellitus (DM), dyslipidemia, obesity, and hypertension, which together pose a critical public health issue (1-3). Among these, obesity serves as a central link, with projections indicating that approximately 2 billion adults will be classified as obese ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) by 2035 (4).

Excess body fat causes chronic low-grade inflammation, recruiting macrophages to adipose tissue. These macrophages release proinflammatory adipokines, leading to intracellular changes that disrupt insulin signaling and contribute to the onset of insulin resistance (IR) (5) and an imbalance in redox homeostasis, promoting the production of pro-oxidant free radicals (6). These metabolic changes contribute to the development of DM, comorbidities, and dyslipidemia, worsening metabolic dysfunction (7).

Plant extracts rich in bioactive compounds have been extensively studied for their phytochemical properties. In this sense, *Ilex paraguariensis* A. St. – Hill (Aquifoliaceae), popularly known as yerba mate, is a plant traditionally consumed across South American countries, primarily in the form of “mate”. Recent research highlights the diverse pharmacological benefits of *Ilex paraguariensis*, including antioxidant activity (8-10), mitochondrial bioenergetics (11), improved glucose tolerance (12), anti-inflammatory effects (13), weight loss support (14), and cholesterol improvement (15). These properties attributed to aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* can be attributed to the presence of polyphenols, such as caffeine derivatives, and flavonoids, which have been previously characterized in the literature (16). Among the main compounds reported in the literature are rutin, chlorogenic acid, and caffeic acid, which have been previously identified by collaborating research groups and in HPLC assays available in the literature (16-18).

The physiological properties of these polyphenols were first described in green tea (*Camellia sinensis* L. (Kuntze), Theaceae) (19), establishing this plant as a significant reference for various biological activities stemming from bioactive compounds (20).

Introdução

Nas últimas décadas, a prevalência global de doenças crônicas não transmissíveis aumentou significativamente, impulsionada principalmente pela crescente incidência de distúrbios metabólicos, incluindo diabetes mellitus (DM), dislipidemia, obesidade e hipertensão, que em conjunto representam um grave problema de saúde pública (1-3). Entre estas, a obesidade desempenha um papel central, com projeções a indicar que, até 2035, aproximadamente 2 mil milhões de adultos serão classificados como obesos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (4).

O excesso de gordura corporal provoca uma inflamação crônica de baixo grau, recrutando macrófagos para o tecido adiposo. Estes macrófagos libertam adipocinas pró-inflamatórias, desencadeando alterações intracelulares que perturbam a sinalização da insulina e contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina (RI) (5), bem como para um desequilíbrio na homeostasia redox, promovendo a produção de radicais livres pró-oxidantes (6). Estas alterações metabólicas favorecem o desenvolvimento da DM, comorbilidades e dislipidemia, agravando a disfunção metabólica (7).

Extratos de plantas ricos em compostos bioativos têm sido amplamente estudados pelas suas propriedades fitoquímicas. Nesse sentido, *Ilex paraguariensis* A. St. – Hill (Aquifoliaceae), popularmente conhecida como erva-mate, é uma planta tradicionalmente consumida em vários países da América do Sul, principalmente na forma de “mate”. Investigação recente destaca os diversos benefícios farmacológicos da *Ilex paraguariensis*, incluindo atividade antioxidante (8-10), bioenergética mitocondrial (11), melhoria da tolerância à glicose (12), efeitos anti-inflamatórios (13), apoio à perda de peso (14) e melhoria do perfil do colesterol (15). Estas propriedades atribuídas ao extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* devem-se à presença de polifenóis, como derivados da cafeína, e flavonoides, que já foram previamente caracterizados na literatura (16). Entre os principais compostos referidos na literatura encontram-se a rutina, o ácido clorogénico e o ácido cafeico, previamente identificados por grupos de investigação parceiros e em ensaios de HPLC disponíveis na literatura (16-18).

As propriedades fisiológicas destes polifenóis foram inicialmente descritas no chá verde (*Camellia sinensis* L. (Kuntze), Theaceae) (19), estabelecendo esta planta como uma referência significativa para diversas atividades biológicas resultantes de compostos

The major phenols found in *Camellia sinensis* are catechins such as (-)-epicatechin (EG), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG3), (-)-epigallocatechin (ECG), and (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the latter being the most abundant (21). The properties attributed to these substances include antihypertensive (22), antioxidant (23,24), anti-atherosclerotic (25), anticarcinogenic effects (26,27), cholesterol-lowering activity (28), as well as reductions in blood glucose levels (29,30).

In addition to the *in vivo* biochemical effects, recent advancements in molecular modeling have enabled the exploration of the potential of phenolic compounds in inhibiting key enzymes involved in lipid metabolism, such as HMG-CoA reductase (HMGR; EC 1.1.1.34) and adipose triglyceride lipase (ATGL) (25, 30, 31). HMGR is crucial in lipid metabolism, regulating cholesterol biosynthesis in the liver and serving as the primary target for statins, which inhibit its activity (31). Additionally, ATGL has been linked to dyslipidemia due to its role in promoting lipolysis and the release of free fatty acids from adipose tissue (32).

In this sense, the present study aimed to investigate the effects of *Ilex paraguariensis* in biochemical parameters obtained from (i) hyperlipidemic fed rats and (ii) alloxan-induced diabetic rats in comparison with *Camellia sinensis*. Furthermore, we explored the interaction of compounds such as rutin, caffeic acid, and chlorogenic acid with the enzymes HMGR and ATGL through molecular docking analyses. By addressing these gaps in the literature, we hope to contribute to the understanding of the potential therapeutic effects of these extracts in modulating lipid and carbohydrate metabolism.

Materials and Methods

Preparation of extracts

To obtain crude extracts comparable to those traditionally used in extractive solutions, the aqueous extracts (decoctions) were prepared following the methodology described by Felippi (2005) (33), with slight modifications. Samples of *Ilex paraguariensis* and *Camellia sinensis* were obtained in their commercial form. Aqueous extracts were produced

bioativos (20). Os principais fenóis encontrados na *Camellia sinensis* são, especialmente, as catequinas, como (-)-epicatequina (EG), (-)-epicatequina-3-galato (ECG3), (-)-epigallocatequina (ECG) e (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), sendo esta última a mais abundante (21). As propriedades atribuídas a estas substâncias incluem efeitos anti-hipertensivos (22), antioxidantes (23,24), antiateroscleróticos (25), anticancerígenos (26,27), atividade redutora do colesterol (28), bem como a diminuição dos níveis de glicose no sangue (29,30).

Para além dos efeitos bioquímicos *in vivo*, os avanços recentes na modelação molecular têm permitido explorar o potencial dos compostos fenólicos na inibição de enzimas-chave envolvidas no metabolismo lipídico, tais como a redutase HMG-CoA (HMGR; EC 1.1.1.34) e a lipase de triglicéridos do tecido adiposo (ATGL) (25, 30, 31). A HMGR desempenha um papel crucial no metabolismo lipídico, regulando a biossíntese do colesterol no fígado e sendo o principal alvo das estatinas, que inibem a sua atividade (31). Por outro lado, a ATGL tem sido associada a dislipidemias devido ao seu papel na promoção da lipólise e na libertação de ácidos gordos livres a partir do tecido adiposo (32).

Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos de *Ilex paraguariensis* nos parâmetros bioquímicos obtidos a partir de (i) ratos alimentados com dieta hiperlipídica e (ii) ratos diabéticos induzidos por aloxano, em comparação com *Camellia sinensis*. Além disso, exploraremos a interação de compostos como rutina, ácido cafeico e ácido clorogénico com as enzimas HMGR e ATGL através de análises de *docking* molecular. Ao abordar essas lacunas na literatura, esperamos contribuir para a compreensão dos potenciais efeitos terapêuticos destes extratos na modulação do metabolismo lipídico e glucídico.

Material e Métodos

Preparação dos extratos

Para obter extratos brutos comparáveis aos tradicionalmente utilizados em soluções extrativas, os extratos aquosos (decocções) foram preparados seguindo a metodologia descrita por Felippi (2005) (33), com pequenas modificações. Amostras de *Ilex paraguariensis* e *Camellia sinensis* foram adquiridas em sua forma comercial. Os extratos aquosos foram

by adding hot distilled water (approximately 100°C) to the commercial plant samples at a concentration of 100 g/L. The extraction process lasted 20 minutes, after which the mixtures were filtered and subjected to rotary evaporation. The resulting solutions were then transferred to Petri dishes and allowed to evaporate completely in an oven set at 70°C. The dried extracts were subsequently scraped from the dishes and ground into a fine powder. The extraction yield was approximately 20% for yerba mate and 5% for *Camellia sinensis*. For experimental use, the dried extracts were reconstituted in distilled water at a concentration of 180 mg/mL. The administered doses were 45 mg/kg/day for *Camellia sinensis* and 90 mg/kg/day for *Ilex paraguariensis* once a day via oral gavage. Doses were selected based on previous standardized studies with similar animal models, available in the literature (34-36)

Animals and ethical procedures

The animal experiments were approved by the CEUA (protocol no. 2.08.03.07.912). The animals were obtained from the animal facility of Feevale University, Novo Hamburgo, RS, Brazil, and were kept in cages under standard conditions of temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), relative humidity (45–55%), and lighting (12-hours light/dark cycle) and had free access to a standard rodent diet (Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes Prod. Vet. Ltda® – Curitiba PR) and water *ad libitum*. Eighty two male *Wistar* rats weighing between 250 and 330 g were divided into two sets of experiments. Forty six animals were used in the protocol of DM, and thirty six animals were used for the hyperlipidemic fed protocol.

Diabetes mellitus induction

From the initial sample of 46 rats, 18 were randomly divided into three groups used as normal control groups, each consisting of six animals: (i) control group receiving vehicle water (1 mL), (ii) control group receiving *Camellia sinensis* extract (45 mg/kg), and (iii) control group receiving *Ilex paraguariensis* extract (90 mg/kg). The remaining 28 rats were subjected to DM induction via intravenous injection of alloxan (42 mg/kg). The animals confirmed as diabetic were redistributed into three groups and received daily treatment by gavage for a period of 21 days. The diabetic rats were divided into a diabetic control group, receiving vehicle water, and test groups, receiving *Camellia sinensis* extract or *Ilex paraguariensis* extract. The experimental DM model

produzidos pela adição de água destilada quente (aproximadamente 100°C) às amostras comerciais da planta, na concentração de 100 g/L. O processo de extração durou 20 minutos, após os quais as misturas foram filtradas e submetidas à evaporação rotativa. As soluções resultantes foram então transferidas para placas de Petri e deixadas para evaporação completa em estufa a 70°C. Os extratos secos foram posteriormente raspados das placas e moídos até obter um pó fino. O rendimento da extração foi de aproximadamente 20% para a erva-mate e 5% para a *Camellia sinensis*. Para uso experimental, os extratos secos foram reconstituídos em água destilada na concentração de 180 mg/mL. As doses administradas foram de 45 mg/kg/dia para *Camellia sinensis* e 90 mg/kg/dia para *Ilex paraguariensis*. As doses foram selecionadas com base em estudos padronizados prévios com modelos animais semelhantes disponíveis na literatura (34-36).

Animais e procedimentos éticos

Os experimentos com animais foram aprovados pelo CEUA (Protocolo nº 2.08.03.07.912). Os animais foram obtidos no biotério da Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brasil, e mantidos em gaiolas sob condições padrão de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa (45–55%) e ciclo de iluminação de 12 horas claro/escuro. Eles tiveram acesso livre a uma dieta padrão para roedores (Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes Prod. Vet. Ltda® – Curitiba, PR) e água *ad libitum*. Foram utilizados oitenta e dois ratos machos da linhagem *Wistar*, pesando entre 250 e 330 g, divididos em dois grupos experimentais. Quarenta e seis animais foram utilizados no protocolo de DM, enquanto trinta e seis foram empregados no protocolo de alimentação hiperlipídica.

Indução do diabetes mellitus

Da amostra inicial de 46 ratos, 18 foram aleatoriamente distribuídos em três grupos utilizados como grupos controle normais, cada um composto por seis animais: (i) grupo controle a receber veículo (água, 1 mL), (ii) grupo controle a receber extrato de *Camellia sinensis* (45 mg/kg) e (iii) grupo controle a receber extrato de *Ilex paraguariensis* (90 mg/kg). Os 28 ratos restantes foram submetidos à indução de diabetes mellitus (DM) através de injeção intravenosa de aloxano (42 mg/kg). Os animais confirmados como diabéticos foram redistribuídos em três grupos e receberam tratamento diário por gavagem durante um período de 21 dias. Os ratos diabéticos foram divididos em: grupo controle diabético, a receber veículo (água), e grupos experimentais, a receber extrato de *Camellia sinensis* ou extrato de *Ilex paraguariensis*. O modelo

was established following the induction protocol by Lerco *et al.* (2003) (37), modified by Cavalli *et al.* (2007) (38), with some adaptations. DM was induced by intravenous injection of a 2% aqueous solution of alloxan at a dose of 42 mg/kg body weight (Alloxan monohydrate, SIGMA-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) into one of the tail veins of the animals. After a 24-hour fasting period, each rat was then restrained, and alloxan was rapidly injected into the tail vein. Thirty minutes later, the animals resumed normal feeding and were provided with a 10% glucose solution as their sole water source for 24 hours. On the sixth day post-induction, fasting blood glucose levels were measured. Rats with glucose levels exceeding 190 mg/dL, alongside clinical signs of diabetes mellitus (e.g., weight loss, increased water intake), were included. Animals with glucose levels below 120 mg/dL or intermediate levels (120–190 mg/dL), regardless of clinical signs, were excluded.

Serum glucose evaluation

Blood glucose levels were assessed on the sixth day after DM induction with alloxan and on the twenty-second day following the initiation of treatments with water, *Camellia sinensis* extract, or *Ilex paraguariensis* extract. To confirm DM using the alloxan model, glucose was measured with a blood glucose monitor (Glucotrend Blood Glucose Monitor®).

Clinical evaluation

Animals were placed in individual metabolic cages for a period of 24 hours to measure urinary excretion and water intake. Furthermore, to monitor clinical progression, the animals were weighed before DM induction, at the beginning, and at the end of the treatment.

Hiperlipidemic feed protocol

The animals were randomly divided into six groups (n=6), (i) control, (ii) high fat diet (HFD) plus water, (iii) normocaloric diet plus *Ilex paraguariensis* extract (90 mg/kg), (iv) HFD plus *Ilex paraguariensis* extract (90 mg/kg), (v) normocaloric diet plus *Camellia sinensis* extract (45 mg/kg), and (vi) HFD plus *Camellia sinensis* extract (45 mg/kg). The HFD was previously standardized by Estadella *et al.* (2004) (39), consisted of a mixture of hypercaloric foods in the following proportions: 15 g of normocaloric commercial rat chow (Nuvilab®) (3.78 kcal/g), 10 g of roasted peanuts

experimental de DM foi estabelecido segundo o protocolo de indução descrito por Lerco *et al.* (2003) (37), modificado por Cavalli *et al.* (2007) (38), com algumas adaptações. A DM foi induzida por injeção intravenosa de uma solução aquosa a 2% de aloxano, na dose de 42 mg/kg de peso corporal (Aloxano monohidratado, SIGMA-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA), numa das veias caudais dos animais. Após um jejum de 24 horas, cada rato foi contido e o aloxano foi injetado rapidamente na veia da cauda. Trinta minutos após a injeção, os animais retomaram a alimentação normal e receberam solução de glicose a 10% como única fonte de água durante 24 horas. No sexto dia após a indução, os níveis de glicemia em jejum foram medidos. Foram incluídos no estudo os ratos com níveis de glicose superiores a 190 mg/dL, acompanhados de sinais clínicos de diabetes mellitus (por exemplo, perda de peso, aumento da ingestão de água). Animais com níveis de glicose inferiores a 120 mg/dL ou com níveis intermédios (120–190 mg/dL), independentemente dos sinais clínicos, foram excluídos.

Avaliação da glicemia sérica

Os níveis de glicose no sangue foram avaliados no sexto dia após a indução do DM com aloxana e no vigésimo segundo dia após o início dos tratamentos com água, extrato de *Camellia sinensis* ou extrato de *Ilex paraguariensis*. Para a confirmação do DM no modelo de aloxana, a glicemia foi medida utilizando um monitor de glicose no sangue (Glucotrend Blood Glucose Monitor®).

Avaliação clínica

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais por um período de 24 horas para medir a excreção urinária e a ingestão de água. Além disso, para monitorizar a progressão clínica, os animais foram pesados antes da indução do DM, no início e no final do tratamento.

Protocolo de alimentação hiperlipídica

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (n=6): (i) controlo, (ii) dieta hiperlipídica (DHL) mais água, (iii) dieta normocalórica mais extrato de *Ilex paraguariensis* (90 mg/kg), (iv) DHL mais extrato de *Ilex paraguariensis* (90 mg/kg), (v) dieta normocalórica mais extrato de *Camellia sinensis* (45 mg/kg) e (vi) DHL mais extrato de *Camellia sinensis* (45 mg/kg). A DHL foi previamente padronizada por Estadella *et al.* (2004) (39) e consistiu numa mistura de alimentos hipercalóricos nas seguintes proporções: 15 g de normocalóricação ração comercial para ratos

(5.95 kcal/g), 10 g of milk chocolate (5.4 kcal/g), and 5 g of Maizena biscuits (4.25 kcal/g). The normocaloric diet (control) consisted of the Nuvilab® commercial rat chow. The animals were fed the diet for a period of 30 days prior to the beginning of the gavage procedure and continued receiving the same diet until the end of the experiment.

Sample collection and biochemical assay

At the end of both experimental periods, all rats were fasted for 12 hours and then euthanized by decapitation. Blood was collected and centrifuged at 800g for 15 minutes and the resulting serum was stored at -80°C for further biochemical analysis.

Biochemical parameters

Measurements of serum glucose, triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and HDL cholesterol, were performed using the automated Cobas Roche® system, employing standardized enzymatic methods. The LDL cholesterol levels were calculated using the Friedewald formula: $LDL = TC - (HDL + TG/5)$.

Molecular docking

Molecular docking simulations were performed using AutoDock 4.2.6. The crystal structure of HMG-CoA reductase (PDB ID: 1HWL) was obtained from the Protein Data Bank (PDB). The structure was prepared for docking by removing water molecules, adding non-polar hydrogen atoms, correcting any erroneous amino acids, and adjusting the charges as necessary.

For ATGL (Adipose Triglyceride Lipase), the predicted protein structure was obtained from SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) using the FASTA sequence of ATGL (UniProt ID: Q96AD5) retrieved from UniProt (<https://www.uniprot.org/>). The structure of ATGL was validated using the Ramachandran plot and G-factors provided by the PROCHECK server (<https://saves.mbi.ucla.edu/>), a suite of programs used to assess the stereochemical quality of protein structures.

The ligand structures were sourced from PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) and converted to PDB format using PyMOL version 3.0. The specific ligands used were caffeic acid (PubChem CID 689043), chlorogenic acid (PubChem CID 1794427), and rutin (PubChem CID 5280805). Additionally, a redocking

(Nuvilab®) (3,78 kcal/g), 10 g de amendoim torrado (5,95 kcal/g), 10 g de chocolate de leite (5,4 kcal/g), e 5 g de bolachas Maizena (4,25 kcal/g). A dieta normocalórica (controle) consistiu na ração comercial para ratos Nuvilab®. Os animais foram alimentados com a dieta durante um período de 30 dias antes do início do procedimento de gavagem e continuaram a receber a mesma dieta até ao final do experimento.

Recolha de amostras e análise bioquímica

No final de ambos os períodos experimentais, todos os ratos foram submetidos a um jejum de 12 horas e posteriormente eutanasiados por decapitação. O sangue foi recolhido e centrifugado a 800g durante 15 minutos, sendo o soro resultante armazenado a -80°C para análises bioquímicas futuras.

Parâmetros bioquímicos

As medições dos níveis séricos de glicose, triglicéridos (TG), colesterol total (TC) e colesterol HDL foram realizadas utilizando o sistema automatizado Cobas Roche®, através de métodos enzimáticos padronizados. A concentração de colesterol LDL foi determinada pela fórmula de Friedewald: $LDL = TC - (HDL + TG/5)$.

Acoplamento molecular

As simulações de acoplamento molecular foram realizadas utilizando o AutoDock 4.2.6. A estrutura cristalina da HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HWL) foi obtida a partir do Protein Data Bank (PDB). A preparação da estrutura para o acoplamento envolveu a remoção de moléculas de água, a adição de átomos de hidrogénio não polares, a correção de eventuais aminoácidos erróneos e o ajuste das cargas conforme necessário.

Para a ATGL (Adipose Triglyceride Lipase), a estrutura proteica predita foi obtida através do SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), utilizando a sequência FASTA da ATGL (UniProt ID: Q96AD5) recuperada do UniProt (<https://www.uniprot.org/>). A estrutura da ATGL foi validada por meio do gráfico de Ramachandran e dos fatores G fornecidos pelo servidor PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu/>), um conjunto de programas utilizados para avaliar a qualidade estereoquímica das estruturas proteicas.

As estruturas dos ligandos foram obtidas a partir do PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e convertidas para o formato PDB utilizando o PyMOL versão 3.0. Os ligandos específicos utilizados foram ácido cafeico (PubChem CID 689043), ácido clorogénico (PubChem CID 1794427) e rutina

procedure was performed using rosuvastatin (PubChem CID 446157) as the ligand to validate the docking protocol for HMG-CoA reductase.

Molecular docking was performed using the default parameters of AutoDock 4.2.6 (150 individuals in a population, a maximum of 2,500,000 energy evaluations, and a maximum of 27,000 generations) with the Lamarckian Genetic Algorithm as the search method, conducted over 100 genetic algorithm (GA) runs. The grid box for docking was defined with the following parameters, for ATGL: dimensions of $54 \times 60 \times 58$ Å, grid center coordinates $X = 0.026$, $Y = 0.72$, $Z = -3.81$, and a grid spacing of 0.375 Å; and for HMG-CoA reductase: dimensions of $82 \times 68 \times 76$ Å, grid center coordinates $X = 18.589$, $Y = 4.419$, $Z = 12.363$, and a grid spacing of 0.375 Å.

After the docking simulations, the Binding Energies and Inhibition Constants (K_i) of the selected compounds were calculated for both HMG-CoA reductase and ATGL enzymes. These parameters provide insights into the strength of the interaction between the ligands and the target enzymes, with lower Binding Energy values indicating stronger binding affinity, and lower Inhibition Constants suggesting more potent inhibition of the enzyme's activity.

Statistical analyses

The findings are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Paired t-test was employed to assess glycaemic response. All other statistical comparisons were performed using one-way analyses of variance (one way-ANOVA) followed by Tukey's test. P-values that were less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered significant. GraphPad PRISM 8.0.2® (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for all analyses.

Results

In the present study, the effects of *Ilex paraguariensis* and *Camellia sinensis* extracts were evaluated in experimental models of diabetes and hyperlipidemia. When we evaluated the DM animal model parameters, both extracts exhibited significant hypoglycemic activity compared to the diabetic control group

(PubChem CID 5280805). Adicionalmente, foi realizado um procedimento de redocking utilizando a rosuvastatina (PubChem CID 446157) como ligando de referência para validar o protocolo de acoplamento da HMG-CoA redutase.

O acoplamento molecular foi conduzido com os parâmetros padrão do AutoDock 4.2.6 (população de 150 indivíduos, máximo de 2.500.000 avaliações energéticas e máximo de 27.000 gerações), empregando o Algoritmo Genético Lamarckiano como método de busca, com um total de 100 execuções do algoritmo genético (GA). A caixa de grade para o acoplamento foi definida com os seguintes parâmetros: para a ATGL: dimensões de $54 \times 60 \times 58$ Å, coordenadas do centro da grade $X = 0.026$, $Y = 0.72$, $Z = -3.81$, e espaçamento da grade de 0.375 Å; e para a HMG-CoA redutase: dimensões de $82 \times 68 \times 76$ Å, coordenadas do centro da grade $X = 18.589$, $Y = 4.419$, $Z = 12.363$, e espaçamento da grade de 0.375 Å.

Após as simulações de acoplamento, foram calculadas as Energias de Ligação (Binding Energies) e as Constantes de Inibição (K_i) dos compostos selecionados para as enzimas HMG-CoA redutase e ATGL. Estes parâmetros fornecem informações sobre a força da interação entre os ligandos e as enzimas-alvo, sendo que valores mais baixos de Energia de Ligação indicam maior afinidade de ligação, e Constantes de Inibição mais baixas sugerem uma inibição mais potente da atividade enzimática.

Análises estatísticas

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). O teste t pareado foi utilizado para avaliar a resposta glicêmica. Todas as outras comparações estatísticas foram realizadas através de análises de variância unidirecionais (one-way ANOVA), seguidas pelo teste de Tukey. Valores de P inferiores a 0,05 ($p < 0.05$) foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad PRISM 8.0.2® (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Resultados

No presente estudo, foram avaliados os efeitos dos extratos de *Ilex paraguariensis* e *Camellia sinensis* em modelos experimentais de diabetes e hiperlipidemia. Ao avaliar os parâmetros do modelo animal de DM, ambos os extratos demonstraram atividade hipoglicemiante significativa em comparação com

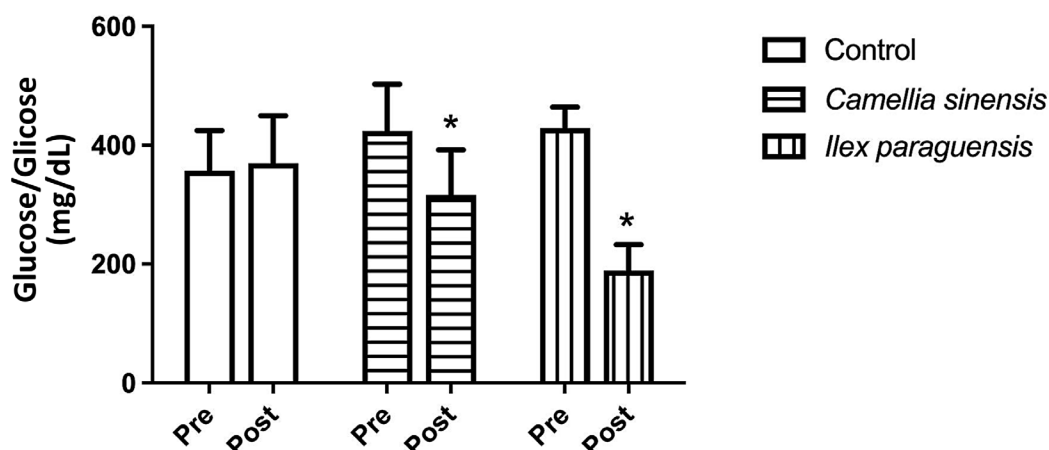


Figure 1 - Effect of *C. sinensis* and *I. paraguariensis* aqueous extracts on blood glucose levels before and after Type 2 Diabetes Mellitus- induction by aloxan Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. (n = 5-6). *, $p < 0.05$ compared to the Control group. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. PRE: Day 1 after aloxan injection; POST: After 21 days of treatment with extracts after aloxan injection

Figura 1 - Efeito dos extratos aquosos de *C. sinensis* e *I. paraguariensis* nos níveis de glucose no sangue antes e depois da indução de Diabetes Mellitus Tipo 2 por aloxano. Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. (n = 5-6). *, $p < 0,05$ em comparação com o grupo de Controlo. ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. PRE: Dia 1 após a injeção de aloxano; POST: Após 21 dias de tratamento com extractos' após injeção de aloxano

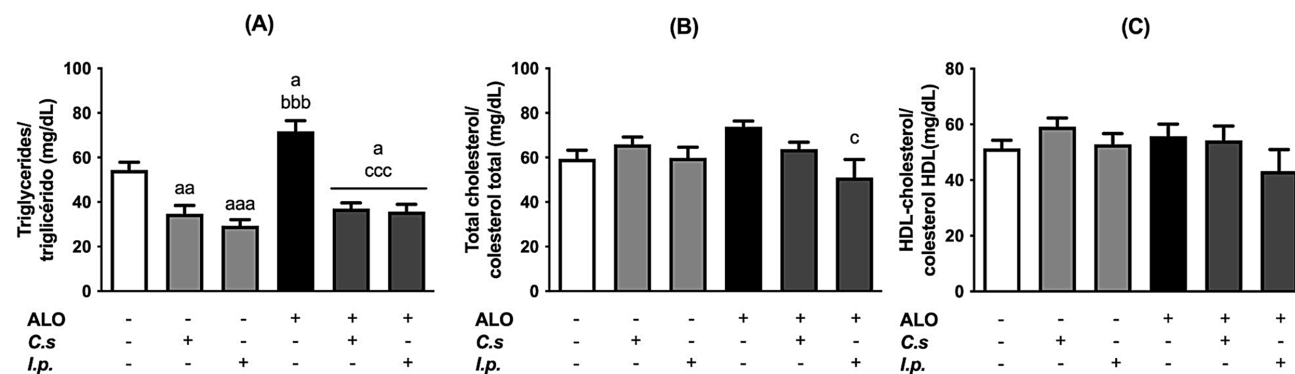


Figure 2 - Effect of *C. sinensis* and *I. paraguariensis* aqueous extracts on serum levels of triglycerides (A), total cholesterol (B), and HDL cholesterol (C) following experimental induction of Type 2 Diabetes Mellitus. Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. (n = 5-6). a represents $p < 0.05$, aa represents $p < 0.01$, aaa represents $p < 0.001$ compared to the Control group, bbb represents $p < 0.001$ compared to the Control, *C. sinensis* and *I. paraguariensis* groups, c represents $p < 0.05$, ccc represents $p < 0.001$ compared to the Diabetic control group. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. ALO, aloxan; C.s., *C. sinensis*; HDL, high density lipoprotein; I.p., *I. paraguariensis*.

Figura 2- Efeito dos extratos aquosos de *C. sinensis* e *I. paraguariensis* nos níveis séricos de triglicéridos (A), colesterol total (B) e colesterol HDL (C) após indução experimental de Diabetes Mellitus Tipo 2. Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. (n = 5-6). a representa $p < 0,05$, aa representa $p < 0,01$, aaa representa $p < 0,001$ em comparação com o grupo de Controlo, bbb representa $p < 0,001$ em comparação com os grupos de Controlo de *C. sinensis* e *I. paraguariensis*, c representa $p < 0,05$, ccc representa $p < 0,001$ em comparação com o grupo de Controlo Diabético. ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. ALO, aloxano; C.s., *C. sinensis*; HDL, lipoproteína de alta densidade; I.p., *I. paraguariensis*.

Table 1 - Daily liquid consumption and 24-hour urinary excretion of diabetic rats.

Tabela 1 - Consumo diário de líquidos e excreção urinária em 24 horas de ratos diabéticos.

	Control / Controle	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Ilex paraguariensis</i>
Water intake / Consumo de água (ml)	135 ± 9	98 ± 30*	65 ± 29**
Urinary excretion / Excreção urinária (g)	77 ± 11	60 ± 26*	32 ± 23**

Data expressed are mean ± SEM (n=4). One-way ANOVA followed by Tukey's test, *p<0,05; **p<0,01./ Os dados são expressos como média ± E.P.M. (n=4). ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Tukey, *p< 0.05; **p<0.01.

($p<0.05$) (Figure 1). The serum lipid profile of diabetic animals is presented in Figure 2. Notably, the induction of diabetes resulted in a significant increase in triglyceride (TG) levels compared to the control group and the non-diabetic groups treated with *Ilex paraguariensis* or *Camellia sinensis* extracts ($p<0.05$, $p<0.001$, and $p<0.001$, respectively). Both extracts effectively reduced TG levels when compared to the diabetic control group ($p<0.001$ for both) and even relative to the normal control group ($p<0.01$ and $p<0.001$, respectively) (Figure 2A). Regarding total cholesterol (TC) levels, only the group treated with *Ilex paraguariensis* showed a significant reduction compared to the diabetic control group ($p<0.05$) (Figure 2B). No significant differences in HDL-cholesterol levels were observed among any of the experimental groups ($p>0.05$) (Figure 2C). In addition, clinical symptoms of DM were evaluated through measurements of daily water intake and urine output. Both *Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis* extracts significantly attenuated signs of polydipsia ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively) and polyuria ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively), as presented in Table 1. No significant changes in body weight were observed among the groups throughout the experimental period.

In the dyslipidemia model, the HFD administration significantly increased serum glucose levels across all HFD groups compared to the control group (Figure 3). However, glucose levels remained within physiological limits, thereby validating the effectiveness of the dyslipidemia model. Notably, treatment with either extract did not significantly affect serum glucose levels in this model. Figure 4 presents the effects of treatments on the serum lipid profile in the dyslipidemia model. HFD exposure significantly elevated triglyceride (TG) levels compared to the control diet group, as well as to the groups treated

o grupo controle diabético ($p<0,05$) (Figura 1). O perfil lipídico sérico dos animais diabéticos encontra-se apresentado na Figura 2. A indução da diabetes resultou num aumento significativo nos níveis de triglicéridos (TG) em comparação com o grupo controle e com os grupos não diabéticos tratados com os extratos de *Ilex paraguariensis* ou *Camellia sinensis* ($p<0,05$, $p<0,001$ e $p<0,001$, respetivamente). Ambos os extratos reduziram de forma eficaz os níveis de TG em comparação com o grupo controle diabético ($p<0,001$ para ambos) e mesmo em relação ao grupo controle normal ($p<0,01$ e $p<0,001$, respetivamente) (Figura 2A). Relativamente aos níveis de colesterol total (CT), apenas o grupo tratado com *Ilex paraguariensis* apresentou uma redução significativa em comparação com o grupo controle diabético ($p<0,05$) (Figura 2B). Não se observaram diferenças significativas nos níveis de colesterol HDL entre os grupos experimentais ($p>0,05$) (Figura 2C). Adicionalmente, os sintomas clínicos da DM foram avaliados através da medição da ingestão diária de água e da excreção urinária. Os extratos de *Camellia sinensis* e *Ilex paraguariensis* atenuaram significativamente os sinais de polidipsia ($p<0,05$ e $p<0,01$, respetivamente) e poliúria ($p<0,05$ e $p<0,01$, respetivamente), conforme apresentado na Tabela 1. Não foram observadas alterações significativas no peso corporal entre os grupos ao longo do período experimental.

No modelo de dislipidemia, a administração de uma dieta rica em gordura (HFD) aumentou significativamente os níveis séricos de glicose em todos os grupos com HFD, em comparação com o grupo controle (Figura 3). Contudo, os níveis de glicose mantiveram-se dentro dos limites fisiológicos, validando a eficácia do modelo de dislipidemia. Importa referir que o tratamento com qualquer um dos extratos não provocou alterações significativas nos níveis séricos de glicose neste modelo. A Figura 4 apresenta os efeitos dos tratamentos no perfil lipídico sérico no modelo de dislipidemia. A exposição à HFD aumentou significativamente os níveis de TG em comparação com o grupo com

with *Camellia sinensis* or *Ilex paraguariensis* extracts under the control diet ($p<0.05$, $p<0.05$, and $p<0.001$, respectively). Conversely, the *Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis* control groups, along with the *Ilex paraguariensis* control diet-treated group, showed significantly lower TG levels compared to the control diet group ($p<0.05$, $p<0.01$, and $p<0.01$, respectively). Additionally, both extract-treated HFD groups showed significantly reduced TG levels compared to the HFD control group ($p<0.001$ for both) (Figure 4A).

Similarly, total cholesterol (TC) levels were significantly increased in the HFD group when compared to the control diet group ($p<0.05$) and to both extract-treated control diet groups ($p<0.05$ for both). However, administration of *Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis* extracts under HFD conditions led to significantly lower TC levels compared to the HFD control group ($p<0.05$ and $p<0.001$, respectively) and also relative to the control diet group ($p<0.05$ for both) (Figure 4B). LDL-cholesterol analysis showed that HFD significantly increased LDL levels compared

dieta controle, assim como em relação aos grupos tratados com os extratos de *Camellia sinensis* ou *Ilex paraguariensis* sob dieta controle ($p<0,05$, $p<0,05$ e $p<0,001$, respetivamente). Por outro lado, os grupos de controle tratados com *Camellia sinensis* e *Ilex paraguariensis*, juntamente com o grupo tratado com *Ilex paraguariensis* sob dieta controle, apresentaram níveis de TG significativamente inferiores em comparação com o grupo de dieta controle ($p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,01$, respetivamente). Além disso, ambos os grupos tratados com extratos sob HFD mostraram uma redução significativa nos níveis de TG em comparação com o grupo HFD controle ($p<0,001$ para ambos) (Figura 4A).

De forma semelhante, os níveis de colesterol total (CT) aumentaram significativamente no grupo HFD em comparação com o grupo de dieta controle ($p<0,05$) e com ambos os grupos tratados com extratos sob dieta controle ($p<0,05$ para ambos). No entanto, a administração dos extratos de *Camellia sinensis* e *Ilex paraguariensis* sob condições de HFD levou a uma redução significativa dos níveis de CT em comparação com o grupo HFD controle ($p<0,05$ e $p<0,001$, respetivamente), e também relativamente ao grupo de dieta controle ($p<0,05$ para ambos) (Figura 4B). A análise do colesterol LDL revelou que a HFD aumentou significativamente os níveis de LDL

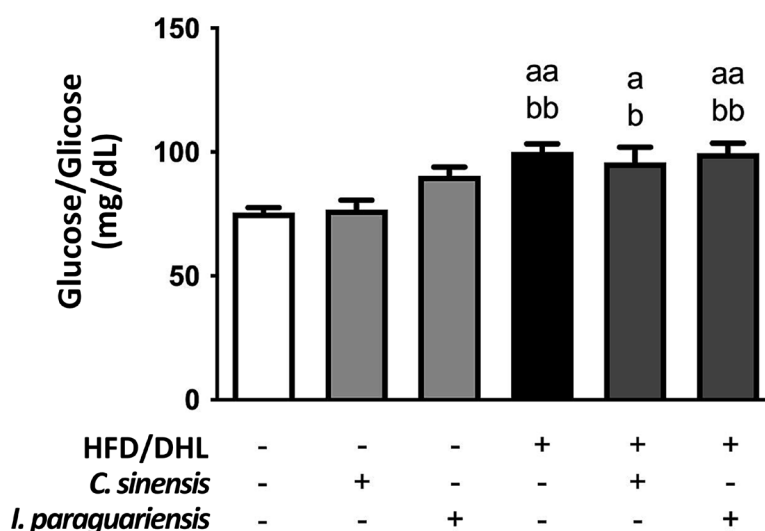


Figure 3 - Effect of *C. sinensis* and *I. paraguariensis* aqueous extracts on serum levels of glucose following experimental induction of Dyslipidemia. Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. ($n = 5-6$). a represents $p<0.05$, aa represents $p<0.01$ compared to the Control group, b represents $p<0.05$, and bb represents $p<0.01$ compared to the Control *C. sinensis* group. One-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. HFD, high fat diet

Figura 3 - Efeito dos extractos aquosos de *C. sinensis* e *I. paraguariensis* nos níveis séricos de glicose após indução experimental de dislipidemia. Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. ($n = 5-6$). a representa $p<0,05$, aa representa $p<0,01$ em comparação com o grupo de Controlo, b representa $p<0,05$, e bb representa $p<0,01$ em comparação com o grupo de Controlo de *C. sinensis*. ANOVA unidirecional seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. DHL, dieta hiperlipídica

to the control diet and both extract-treated control diet groups ($p<0.01$ for all). Furthermore, the *Camellia sinensis* HFD group also displayed elevated LDL levels compared to the control diet and both extract-treated control groups ($p<0.05$ for all). In contrast, the *Ilex paraguariensis* HFD group exhibited significantly lower LDL levels compared to both the HFD control

em comparação com a dieta controle e com ambos os grupos tratados com extratos sob dieta controle ($p<0,01$ para todos). Além disso, o grupo HFD com *Camellia sinensis* também apresentou níveis elevados de LDL em comparação com a dieta controle e com ambos os grupos tratados com extratos sob dieta controle ($p<0,05$ para todos). Em contraste, o grupo

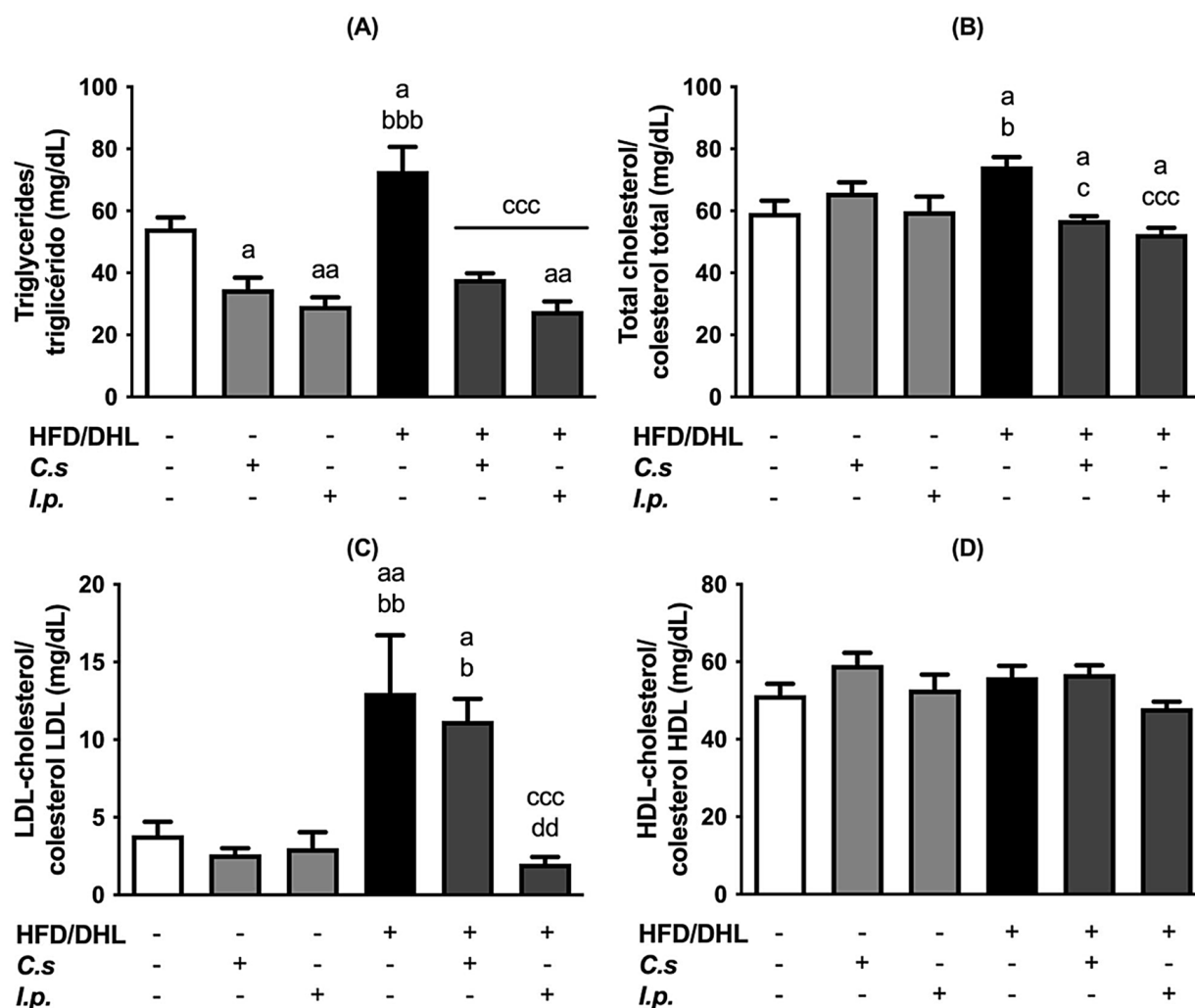


Figure 4 - Effect of *C. sinensis* and *I. paraguariensis* aqueous extracts on serum levels of triglycerides (A), total cholesterol (B), LDL cholesterol (C) and HDL cholesterol (D) following experimental induction of Dyslipidemia. Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. ($n = 5-6$). a represents $p<0.05$ and aa represents $p<0.01$ compared to the Control group, b represents $p<0.05$, bb represents $p<0.01$, and bbb represents $p<0.001$, compared to the Control *C. sinensis* and *I. paraguariensis* groups, c represents $p<0.05$, ccc represents $p<0.001$ compared to the Dyslipidemic control group dd represents $p<0.01$ compared to the HFD *I. paraguariensis* group. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. C.s., *C. sinensis*; HDL, high density lipoprotein; HFD, high fat diet; I.p., *I. paraguariensis*

Figura 4 - Efeito dos extratos aquosos de *C. sinensis* e *I. paraguariensis* nos níveis séricos de triglicéridos (A), colesterol total (B), colesterol LDL (C) e colesterol HDL (D) após indução experimental de dislipidemia. Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. ($n = 5-6$). a representa $p<0,05$ e aa representa $p<0,01$ em comparação com o grupo de Controle, b representa $p<0,05$, bb representa $p<0,01$, e bbb representa $p<0,001$, em comparação com os grupos de Controle de *C. sinensis* e *I. paraguariensis*, c representa $p<0,05$, ccc representa $p<0,001$ em comparação com o grupo de Controle Dislipidêmico, dd representa $p<0,01$ em comparação com o grupo DHL *I. paraguariensis*. ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. C.s., *C. sinensis*; HDL, lipoproteína de alta densidade; DHL, dieta hiperlipídica; I.p., *I. paraguariensis*

group ($p < 0.001$) and the *Camellia sinensis* HFD group ($p < 0.01$) (Figure 4C). No significant differences in HDL-cholesterol levels were observed among the experimental groups ($p > 0.05$) (Figure 4D).

The ATGL structure was modeled using SWISS-MODEL in an automated mode. The selected template was Q96AD5, which corresponds to the human ATGL protein. The model showed high stereochemical quality, with a MolProbity score of 1.27, a clash score of 0.13, and 89.64% of residues in favored regions of the Ramachandran plot. The GMQE value of the model was 0.72, indicating good expected quality for the predicted structure.

The molecular docking simulations revealed distinct interactions of the ligands caffeic acid, chlorogenic acid, and rutin with the enzymes ATGL and HMG-CoA reductase (Table 2). Chlorogenic acid demonstrated the highest binding affinity with both enzymes, as indicated by the lowest binding energies, -13.65 kcal/mol for ATGL and -9.14 kcal/mol for HMG-CoA reductase, along with the lowest inhibition constants (98.50 pM and 198.27 nM, respectively). These results suggest a greater inhibitory potential of chlorogenic acid compared to the other ligands. As a positive control, we also performed the redocking of rosuvastatin, the co-crystallized ligand of HMG-CoA reductase, which yielded a binding energy of -9.98 kcal/mol—a lower value than that observed for chlorogenic acid. This result validates the docking protocol employed and reinforces that, although chlorogenic acid exhibits considerable affinity, rosuvastatin remains more potent in inhibiting HMG-CoA reductase. In contrast, rutin exhibited the lowest binding affinity for ATGL, with a binding energy of -4.64 kcal/mol and a high inhibition constant of 399.49 μ M, indicating a less effective inhibitory potential. These findings highlight the variability in the inhibitory efficacy of the tested compounds, with chlorogenic acid emerging as the most promising inhibitor for both enzymes, particularly for ATGL. The detailed analysis of amino acid interactions reveals that for ATGL, caffeic acid interacts with key residues such as PHE69, PHE17, LEU90, GLY16, SER47, ALA48, and ASP166. These interactions include conventional hydrogen bonds and hydrophobic (π -stacking) interactions, particularly involving PHE69, PHE17, and LEU90, which contribute significantly to the ligands binding stability. Chlorogenic acid, on the

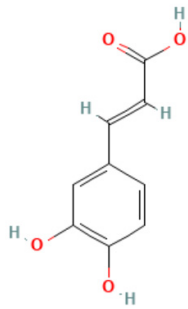
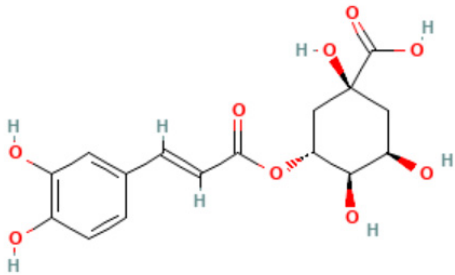
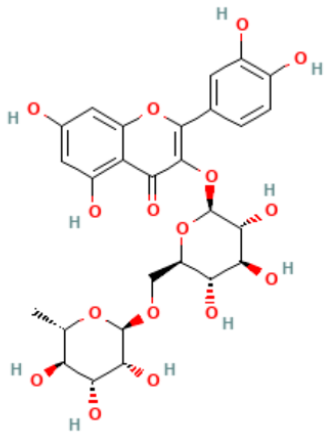
HFD com *Ilex paraguariensis* apresentou níveis de LDL significativamente inferiores em comparação com o grupo HFD controle ($p < 0,001$) e com o grupo HFD com *Camellia sinensis* ($p < 0,01$) (Figura 4C). Não se observaram diferenças significativas nos níveis de colesterol HDL entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) (Figura 4D).

A estrutura da ATGL foi modelada utilizando o SWISS-MODEL em modo automático. O modelo selecionado foi o Q96AD5, que corresponde à proteína humana ATGL. O modelo apresentou elevada qualidade estereoquímica, com um valor MolProbity de 1,27, um clash score de 0,13 e 89,64% dos resíduos localizados em regiões favorecidas do gráfico de Ramachandran. O valor GMQE do modelo foi de 0,72, indicando uma boa qualidade esperada para a estrutura prevista.

As simulações de *docking* molecular revelaram interações distintas dos ligandos ácido cafeico, ácido clorogénico e rutina com as enzimas ATGL e redutase da HMG-CoA (Tabela 2). O ácido clorogénico demonstrou a maior afinidade de ligação com ambas as enzimas, evidenciada pelos menores valores de energia de ligação: -13,65 kcal/mol para a ATGL e -9,14 kcal/mol para a redutase da HMG-CoA, juntamente com os menores valores de constante de inibição (98,50 pM e 198,27 nM, respetivamente). Estes resultados sugerem um maior potencial inibitório do ácido clorogénico em comparação com os outros ligandos. Como controle positivo, realizamos também o redocking da rosuvastatina, ligante co-cristalizado com a redutase da HMG-CoA, que apresentou uma energia de ligação de -9,98 kcal/mol, valor inferior ao observado para o ácido clorogénico. Esse resultado valida o protocolo de docking empregado e reforça que, embora o ácido clorogénico demonstre afinidade considerável, a rosuvastatina continua sendo mais potente na inibição da redutase da HMG-CoA. Por outro lado, a rutina apresentou a menor afinidade de ligação à ATGL, com uma energia de ligação de -4,64 kcal/mol e uma elevada constante de inibição de 399,49 μ M, indicando um potencial inibitório menos eficaz. Estes achados destacam a variabilidade na eficácia inibitória dos compostos testados, sendo o ácido clorogénico o inibidor mais promissor para ambas as enzimas, particularmente para a ATGL. A análise detalhada das interações com resíduos de aminoácidos revelou que, para a ATGL, o ácido cafeico interage com resíduos-chave como PHE69, PHE17, LEU90, GLY16, SER47, ALA48 e ASP166. Estas interações incluem ligações de hidrogénio convencionais e interações hidrofóbicas (π -stacking), particularmente envolvendo os resíduos PHE69, PHE17 e LEU90, que contribuem significativamente para a estabilidade da ligação do ligando. O ácido

Table 2 - Binding Energies and Inhibition Constants of Selected Compounds for HMG-CoA and Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Enzymes.

Tabela 2 - Energias de ligação e constantes de inibição de compostos selecionados para as enzimas HMG-CoA redutase e ATGL.

	HMG-CoA Binding Energy / Energia de Ligação (kcal/mol)	ATG Lipase Binding Energy / Energia de Ligação (kcal/mol)	HMG-CoA Inhibition Constant / Constante de Inibição, Ki	ATG Lipase Inhibition Constant/ Constante de Inibição, Ki
Caffeic acid / Ácido cafeico CID 689043	-7.28	-8.37	4.62 uM	735.09 nM
				
Chlorogenic acid / Ácido clorogénico CID 1794427	-9.14	-13.65	198.27 nM	98.50 pM
				
Rutin / Rutina CID 5280805	-7.16	-4.64	5.61 uM	399.49 uM
				

HMG-CoA= 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA redutase (PDB 1HWL); ATG Lipase = adipose triglyceride lipase.

Compound structures taken from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

HMG-CoA = 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (PDB 1HWL); Lipase ATG = lipase de triglicéridos do tecido adiposo.

Estruturas compostas retiradas de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

other hand, shows strong interactions with LEU90 and GLY16 through hydrogen bonds, with additional hydrophobic interactions involving PHE69, PHE97, and other residues like ILE94, ALA65, and LEU51, enhancing its overall binding affinity. Rutin interacts with a similar set of residues, including LEU90, GLY16, ALA48, PHE69, LEU51, ASN142, SER47, and PHE97, forming multiple hydrogen bonds and hydrophobic interactions that contribute to the stability of the complex, albeit with a slightly different interaction profile compared to chlorogenic acid (Figure 5).

For HMG-CoA reductase, caffeic acid primarily interacts with residues such as ASP767, THR558, ILE536, ILE762, ALA768, and GLN814. The interactions are predominantly characterized by hydrogen bonds with ASP767 and THR558, alongside hydrophobic interactions involving ILE536 and ILE762, which stabilize the ligand within the enzyme's binding pocket. Chlorogenic acid exhibits a robust interaction profile with ASP767, MET655, LYS735, ALA751, ARG590, ASN755, and GLU559, featuring several hydrogen bonds and hydrophobic interactions, particularly with ASP767, MET655, and GLU559, providing high stability to the enzyme-ligand complex. Rutin, interacting with residues such as LEU853, GLU559, ALA751, HIS752, SER661, ARG590, and GLY560, binds through extensive hydrogen bonds and hydrophobic interactions. However, the interaction with residues like LEU853, GLU559, and HIS752 suggests a relatively less stable interaction compared to the other ligands (Figure 6).

Discussion

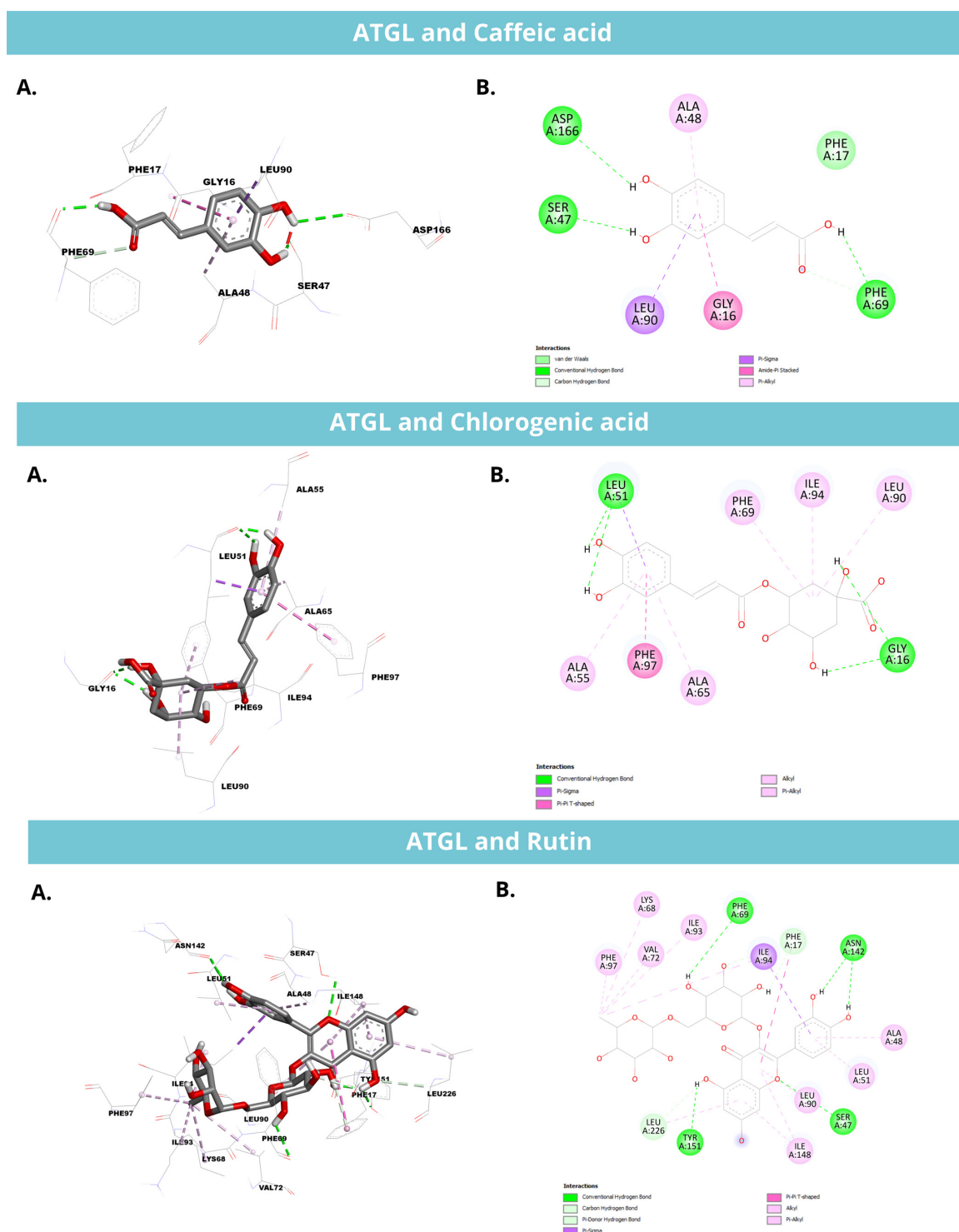
In this study, we evaluated the pharmacological and protective effects of aqueous extracts of *Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis* on alloxan-induced diabetes and HFD-induced dyslipidemia in rats. Our findings indicate that administration of both extracts led to significant modulation in serum glucose levels, in addition to improvements in parameters such as polyuria and polydipsia in the DM model, which are characteristic of the disease. Moreover, it was possible to observe a modulation of lipid metabolism in both chronic conditions, as evidenced by reductions in triacylglycerol, LDL, and total cholesterol levels. Furthermore, molecular docking analysis *in silico* suggested that major compounds in *Ilex paraguariensis* extract directly interact with lipid-

clorogénico, por sua vez, apresenta fortes interações com LEU90 e GLY16 através de ligações de hidrogénio, além de interações hidrofóbicas envolvendo PHE69, PHE97 e outros resíduos como ILE94, ALA65 e LEU51, o que reforça a sua afinidade de ligação. A rutina interage com um conjunto semelhante de resíduos, incluindo LEU90, GLY16, ALA48, PHE69, LEU51, ASN142, SER47 e PHE97, formando múltiplas ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas que contribuem para a estabilidade do complexo, embora com um perfil de interação ligeiramente diferente em relação ao ácido clorogénico (Figura 5).

No que respeita à redutase da HMG-CoA, o ácido cafeico interage principalmente com resíduos como ASP767, THR558, ILE536, ILE762, ALA768 e GLN814. As interações são predominantemente constituídas por ligações de hidrogénio com ASP767 e THR558, além de interações hidrofóbicas com ILE536 e ILE762, que estabilizam o ligando no sítio de ligação da enzima. O ácido clorogénico exibe um perfil de interação robusto com os resíduos ASP767, MET655, LYS735, ALA751, ARG590, ASN755 e GLU559, apresentando várias ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas, particularmente com ASP767, MET655 e GLU559, conferindo elevada estabilidade ao complexo enzima-ligando. A rutina, que interage com resíduos como LEU853, GLU559, ALA751, HIS752, SER661, ARG590 e GLY560, liga-se através de extensas ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas. No entanto, a interação com resíduos como LEU853, GLU559 e HIS752 sugere uma interação relativamente menos estável em comparação com os outros ligandos (Figura 6).

Discussão

Neste estudo, avaliamos os efeitos farmacológicos e protetores dos extratos aquosos de *Camellia sinensis* e *Ilex paraguariensis* em modelos de diabetes induzida por aloxano e dislipidemia induzida por dieta rica em gorduras (HFD) em ratos. Os nossos resultados indicam que a administração de ambos os extratos conduziram a uma modulação significativa dos níveis séricos de glicose, além de melhorias em parâmetros como a poliúria e a polidipsia no modelo de diabetes, características típicas da doença. Além disso, foi possível observar uma modulação do metabolismo lipídico em ambas as condições crônicas, evidenciada por reduções nos níveis de triacilgliceróis, LDL e colesterol total. Adicionalmente, a análise de *docking* molecular *in silico* sugeriu que os principais compostos do extrato de *Ilex paraguariensis* interagem diretamente com enzimas envolvidas



Figures 5 and 6 were designed using Biovia Discovery Studio. / As figuras 5 e 6 foram desenhadas usando o programa Biovia Discovery Studio.

Figure 5 - Molecular docking analysis of the interaction between ATGL (Adipose Triglyceride Lipase) and bioactive compounds. A. Three-dimensional representations of the interactions between ATGL and caffeic acid, chlorogenic acid, and rutin, highlighting conventional hydrogen bonds (green lines), π - π interactions (purple lines), and interactions with hydrogen and carbon atoms. B. Detailed interaction diagrams of each complex, illustrating the ATGL protein residues involved in the interactions with the compounds.

Figura 5 - Análise de docking molecular entre a proteína ATGL (Adipose Triglyceride Lipase) e compostos bioativos. A. Representações tridimensionais das interações entre ATGL e ácido cafeico, ácido clorogênico e rutina, destacando as ligações de hidrogênio convencionais (linhas verdes), interações π - π (linhas roxas) e interações com átomos de hidrogênio e carbono. B. Diagramas das interações detalhadas de cada complexo, com os resíduos da proteína ATGL envolvidos nas interações com os compostos.

Figures 5 and 6 were designed using Biovia Discovery Studio. / As figuras 5 e 6 foram desenhadas usando o programa Biovia Discovery Studio.

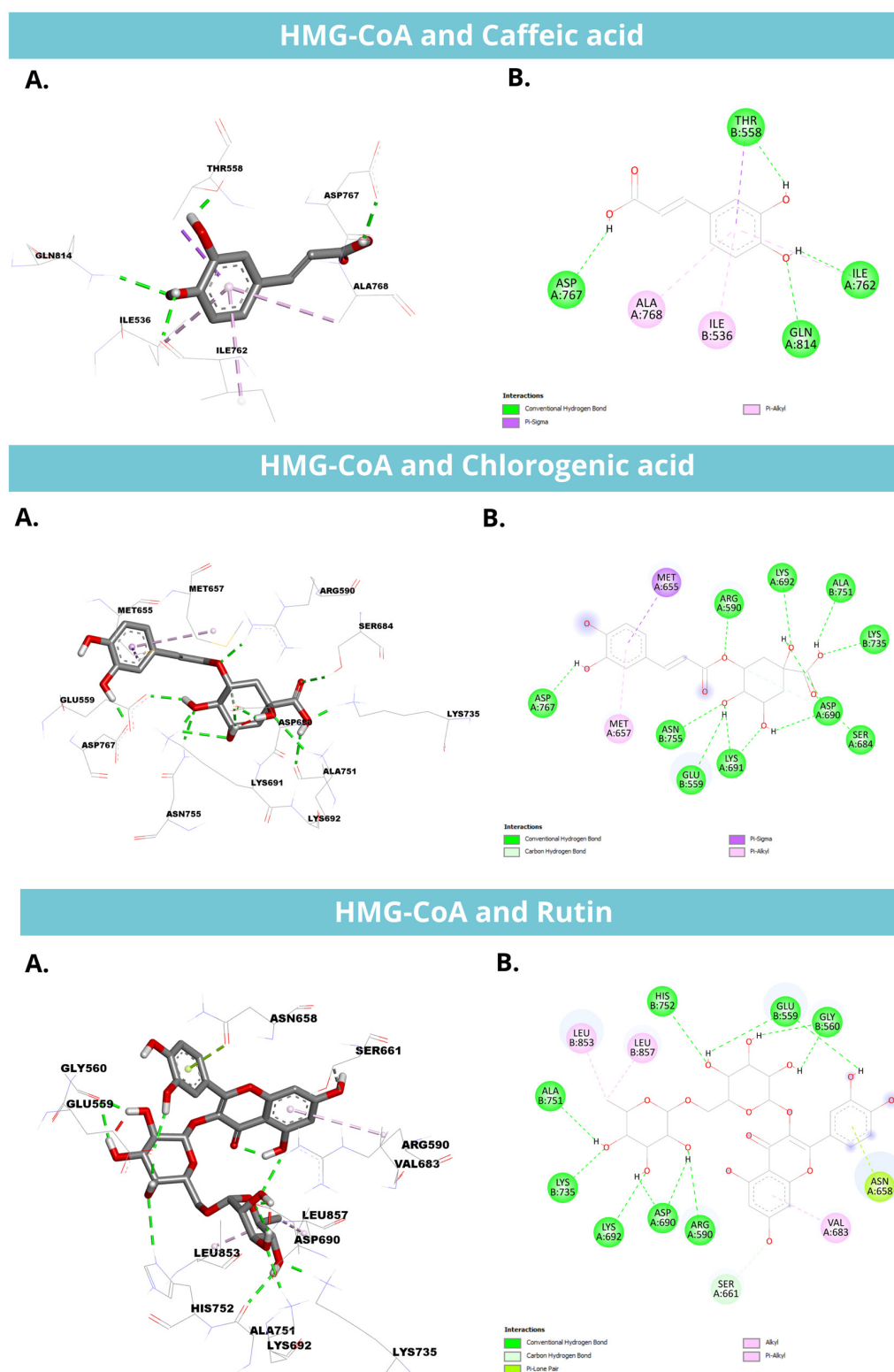


Figure 6 - Molecular docking analysis of HMG-CoA and bioactive compounds. A. Three-dimensional representations of the interactions between HMG-CoA and caffeic acid, chlorogenic acid, and rutin, highlighting conventional hydrogen bonds (green lines), π - π interactions (purple lines), and interactions with hydrogen and carbon atoms. B. Detailed interaction diagrams of each complex, showcasing the HMG-CoA protein residues involved in the interactions with the compounds.

Figura 6 - Análise de docking molecular entre HMG-CoA e compostos bioativos. A. Representações tridimensionais das interações entre HMG-CoA e ácido cafeico, ácido clorogênico e rutina, destacando as ligações de hidrogênio convencionais (linhas verdes), interações π - π (linhas roxas) e interações com átomos de hidrogênio e carbono. B. Diagramas detalhados das interações de cada complexo, evidenciando os resíduos da proteína HMG-CoA envolvidos nas interações com os compostos.

metabolism enzymes, including HMG-CoA reductase and ATGL, positioning this extract as a potential therapeutic adjuvant for dyslipidemic metabolic disorders.

Effects on glucose metabolism

Glucose disturbances are often associated with lipid metabolism perturbations. In this study, the administration of *Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis* aqueous extracts showed hypoglycemic effects in both diabetes and dyslipidemia models, with emphasis on the effects in the diabetes model. According to the literature, green tea (*Camellia sinensis*) contains over 500 chemical compounds, including polyphenols, alkaloids, flavonoids, polysaccharides, vitamins, and other bioactive substances. These compounds have demonstrated a range of medicinal benefits attributed to their biological activities (40). However, some studies in the literature present inconsistent findings regarding the specific effects of *Camellia sinensis* on glucose and lipid metabolism. In this context, epidemiological studies have demonstrated the potential of *Camellia sinensis* to reduce the risk of diabetes by up to 45% in a Chinese population (41), and it is positively associated with oral glucose tolerance test (OGTT), demonstrating a time-dependent action, along with being negatively related to insulin secretion (42).

In addition to epidemiological findings, evidence from both *in vitro* and animal models suggests multiple mechanisms through which green tea exerts its effects on glucose metabolism. In this sense, preclinical experiments have previously reported that *Camellia sinensis* exhibits hypoglycemic effects (43,44), consistent with the observations in the present study. Gawli (2024) (44) demonstrated that different fractions of green tea exert significant inhibitory effects on α -amylase, α -glucosidase, GLUT-4 expression, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Additionally, isolated EGCG has been shown to strongly inhibit digestive enzyme activity by binding to α -glucosidase through hydrogen bonding and hydrophobic interactions (45).

Polyphenols from *Camellia sinensis* have also been shown to influence key pathways directly involved in glucose metabolism. These include the suppression of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) phosphorylation (46), and activation of the 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pathway (43). Besides the polyphenolic effects, Wang et al. (2025) (47) demonstrated that isolated water-soluble green tea polysaccharide

no metabolismo lipídico, incluindo a HMG-CoA redutase e a ATGL, posicionando este extrato como um potencial adjuvante terapêutico para distúrbios metabólicos dislipidêmicos.

Efeitos sobre o metabolismo da glicose

As alterações na glicose estão frequentemente associadas a perturbações no metabolismo lipídico. Neste estudo, a administração dos extratos aquosos de *Camellia sinensis* e *Ilex paraguariensis* demonstraram efeitos hipoglicemiantes tanto nos modelos de diabetes como de dislipidemia, com maior destaque para o modelo de diabetes. Segundo a literatura, o chá verde (*Camellia sinensis*) contém mais de 500 compostos químicos, incluindo polifenóis, alcalóides, flavonóides, polissacarídeos, vitaminas e outras substâncias bioativas. Estes compostos demonstraram uma variedade de benefícios medicinais atribuídos às suas atividades biológicas (40). No entanto, alguns estudos relatam resultados inconsistentes relativamente aos efeitos específicos da *Camellia sinensis* sobre o metabolismo da glicose e dos lípidos. Neste contexto, estudos epidemiológicos demonstraram o potencial da *Camellia sinensis* para reduzir o risco de diabetes até 45% numa população chinesa (41), estando positivamente associada ao teste de tolerância oral à glicose (OGTT), com uma ação dependente do tempo, e negativamente associada à secreção de insulina (42).

Além dos achados epidemiológicos, evidências de estudos *in vitro* e em modelos animais sugerem múltiplos mecanismos pelos quais o chá verde exerce os seus efeitos sobre o metabolismo da glicose. Nesse sentido, experiências pré-clínicas já demonstraram que a *Camellia sinensis* apresenta efeitos hipoglicemiantes (43,44), consistentes com as observações do presente estudo. Gawli (2024) (44) demonstrou que diferentes frações do chá verde exercem efeitos inibitórios significativos sobre a α -amilase, α -glicosidase, expressão de GLUT-4 e captação de glicose em adipócitos 3T3-L1. Paralelamente, o EGCG isolado demonstrou inibir fortemente a atividade de enzimas digestivas, ligando-se à α -glicosidase através de ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas (45).

Adicionalmente, os polifenóis da *Camellia sinensis* demonstraram influenciar vias-chave envolvidas diretamente no metabolismo da glicose, como a supressão da fosforilação do IRS-1 (46) e a ativação da via da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) (43). Para além dos efeitos polifenólicos, Wang et al. (2025) (47) demonstraram que a fração de polissacarídeos solúveis em água do

7WA exerted modulatory effects on cyclic adenosine monophosphate-Akt (cAMP-Akt) in the Hep-G2 cell line, suggested to be one of the mechanisms involved in the hypoglycemic effects observed.

Regarding the hypoglycemic effects of *Ilex paraguariensis*, previous clinical trials have demonstrated that infusions of yerba mate leaves decrease fasting glucose and glycated hemoglobin A(1c) (HbA_{1c}) in diabetic patients (48,49) and HbA_{1c} levels in prediabetic patients (49). In the present study, on the other hand, the HFD used to experimentally induce dyslipidemia significantly increased blood glucose levels in all induced groups, similar to the findings reported by Pinton et al. (2024) (50).

Effects on lipid metabolism

Concerning the lipid profile modulatory effects, *Camellia sinensis* aqueous extract has been previously investigated in human studies (51). In this context, although some trials did not report significant changes in lipid metabolism, others align with the findings of the present study, demonstrating positive modulatory effects of green tea consumption. The literature suggests that these effects may be attributed to EGCG's ability to inhibit cholesterol biosynthesis by downregulating lipid metabolism enzyme activity and expression and interfering with lipid absorption (52). Additionally, green tea supplementation has been associated with increased fecal cholesterol excretion (19).

Similar to green tea, yerba mate has been investigated for its potential hypolipidemic effects, and human trials have already suggested a positive modulation of lipid metabolism in regard of *Ilex paraguariensis* consumption in some reports (48). In contrast, others observed no significant effects on this parameter (53,54). Fujii et al. (2014) (55) observed a significant reduction in blood cholesterol of Wistar rats that were administered with HFD for 12 weeks and treated with yerba mate aqueous extract (1 g/kg/day) for 4 weeks. Complementary, Kudo et al. (2024) (56) observed a significant intracellular lipid accumulation suppression in 3T3-L1 adipocytes treated with yerba mate, while also observing a significant activation in AMPK, which in turn, is directly involved in phosphorylation and inhibition of AMPK-dependent pathways related to lipid metabolism, as for the observed improvement of lipid metabolism of HFD-fed rats.

chá verde (7WA) exerce efeitos moduladores sobre a via cAMP-Akt na linha celular Hep-G2, sendo sugerida como um dos mecanismos envolvidos nos efeitos hipoglicemiantes observados.

Quanto aos efeitos hipoglicemiantes do *Ilex paraguariensis*, ensaios clínicos já demonstraram que a infusão das folhas de erva-mate reduz a glicemia em jejum e a hemoglobina glicada A1c (HbA1c) em indivíduos diabéticos (48,49), bem como os níveis de HbA1c em indivíduos pré-diabéticos (49). No presente estudo, por outro lado, a HFD utilizada para induzir experimentalmente a dislipidemia aumentou significativamente os níveis de glicose no sangue em todos os grupos induzidos, de forma semelhante aos achados reportados por Pinton et al. (2024) (50).

Efeitos sobre o metabolismo lipídico

Relativamente à modulação do perfil lipídico, o extrato aquoso de *Camellia sinensis* já foi previamente investigado em estudos com humanos (51). Embora alguns ensaios não tenham reportado alterações significativas, outros alinham-se com os achados deste estudo, demonstrando efeitos moduladores positivos do consumo de chá verde. A literatura sugere que estes efeitos podem ser atribuídos à capacidade do EGCG em inibir a biossíntese de colesterol, através da redução da atividade e expressão de enzimas do metabolismo lipídico e da interferência na absorção de lipídios (52). Adicionalmente, a suplementação com chá verde foi associada ao aumento da excreção fecal de colesterol (19).

Tal como o chá verde, a erva-mate tem sido investigada pelo seu potencial efeito hipolipidêmico, e ensaios clínicos já sugeriram uma modulação positiva do metabolismo lipídico com o consumo de *Ilex paraguariensis* em alguns relatórios (48), embora outros não tenham observado efeitos significativos neste parâmetro (53,54). Fujii et al. (2014) (55) observaram uma redução significativa do colesterol sanguíneo em ratos Wistar submetidos a HFD durante 12 semanas e tratados com extrato aquoso de erva-mate (1 g/kg/dia) durante 4 semanas. Complementary, Kudo et al. (2024) (56) observaram uma supressão significativa da acumulação lipídica intracelular em adipócitos 3T3-L1 tratados com erva-mate, bem como uma ativação significativa da AMPK, que por sua vez está diretamente envolvida na fosforilação e inibição de vias AMPK-dependentes relacionadas com o metabolismo lipídico, o que explica a melhoria observada do metabolismo lipídico em ratos alimentados com HFD.

Molecular docking and mechanistic insights

The enzyme HMGR is crucial in regulating lipid metabolism. It catalyzes the conversion of HMG-CoA to mevalonate, a key step in hepatic cholesterol biosynthesis, making it a primary target for statins, which inhibit its activity (25). Similarly, ATGL is implicated in dyslipidemias due to its role in lipolysis within white and brown adipose tissues, releasing free fatty acids into the bloodstream (32). In this sense, to evaluate the potential effects of the bioactive compounds present in yerba mate extract on enzymes involved in lipid metabolism, we selected three major compounds - caffeic acid, chlorogenic acid and rutin- based on their characterization (16) to conduct an *in silico* analysis in order to investigate the potential binding activity of each compound on the enzymes activities.

According to the literature, key residues involved in critical HMGR activity interactions include Arg590, Ser684, Asp690, Lys691, Lys692, Lys735, Asp755, Glu559, and Asp767 (52). All analyzed compounds exhibited strong affinity for the HMGR catalytic site, forming interaction networks with these residues or nearby ones. The molecular docking analyses in this study were focused specifically on the catalytic site, as this region plays a central role in substrate binding and enzymatic activity. The binding energy affinity of HMGR with chlorogenic acid has been reported to range from -3.4 kcal/mol to -5.7 kcal/mol, while caffeic acid showed binding energies between -6.7 kcal/mol and -6.9 kcal/mol (31,58). Additionally, rutin's binding energy was previously noted as -6.5 kcal/mol (31). In this regard, it was possible to observe that the analyses conducted yielded results even more significant than those reported in the literature, with binding energies of -9.14 kcal/mol, -7.28 kcal/mol, and -7.16 kcal/mol for chlorogenic acid, caffeic acid, and rutin, respectively.

Although the specific amino acid residues or binding sites of ATGL remain undefined (59), and the pathways of its inhibition and activation are still poorly understood (60), mutagenesis studies have highlighted the critical role of the proposed catalytic dyad residues, Ser47 and Asp166 (61). These residues demonstrated interactions with the compounds or nearby residues. Furthermore, it is worth highlighting that the observed results indicated a significant inhibitory activity of the three analyzed compounds against the ATGL enzyme. The inhibition energy observed was -8.37 kcal/mol, -13.65 kcal/mol, and

Molecular docking e perspectivas mecanísticas

A enzima HMGR é crucial na regulação do metabolismo lipídico. Catalisa a conversão de HMG-CoA em mevalonato, um passo fundamental na biossíntese hepática do colesterol, sendo, por isso, um alvo principal das estatinas, que inibem a sua atividade (25). De forma semelhante, a ATGL está implicada em dislipidemias devido ao seu papel na lipólise nos tecidos adiposos branco e castanho, promovendo a libertação de ácidos gordos livres para a corrente sanguínea (32). Neste sentido, para avaliar os potenciais efeitos dos compostos bioativos presentes no extrato de erva-mate sobre enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, foram selecionados três compostos principais — ácido cafeico, ácido clorogénico e rutina — com base na sua caracterização prévia (16), para a realização de uma análise *in silico* com o objetivo de investigar a potencial afinidade de ligação de cada composto às atividades enzimáticas em estudo.

Segundo a literatura, resíduos chave envolvidos na atividade crítica da HMGR incluem Arg590, Ser684, Asp690, Lys691, Lys692, Lys735, Asp755, Glu559 e Asp767 (52). Todos os compostos analisados apresentaram forte afinidade pelo sítio catalítico da HMGR, formando redes de interação com estes resíduos ou com resíduos adjacentes. As análises de acoplamento molecular realizadas neste estudo centraram-se especificamente no sítio catalítico, uma vez que esta região desempenha um papel fundamental na ligação ao substrato e na actividade enzimática. A energia de ligação da HMGR com o ácido clorogénico foi previamente reportada entre -3.4 kcal/mol e -5.7 kcal/mol, enquanto o ácido cafeico apresentou valores entre -6.7 kcal/mol e -6.9 kcal/mol (31,58). A energia de ligação da rutina foi anteriormente reportada como -6.5 kcal/mol (31). Neste estudo, os valores observados foram ainda mais expressivos, com energias de ligação de -9.14 kcal/mol, -7.28 kcal/mol e -7.16 kcal/mol para o ácido clorogénico, ácido cafeico e rutina, respetivamente.

Embora os resíduos específicos de aminoácidos ou locais de ligação da ATGL permaneçam mal definidos (59) e as vias da sua inibição ou ativação ainda não estejam totalmente compreendidas (60), estudos de mutagénese destacam a importância dos resíduos da díade catalítica Ser47 e Asp166 (61), que demonstraram interações com os compostos ou resíduos adjacentes. Importa referir que os resultados observados demonstraram uma atividade inibitória significativa dos três compostos analisados sobre a enzima ATGL, com energias de inibição de -8.37 kcal/mol, -13.65 kcal/mol e -4.64 kcal/mol para o ácido

-4.64 kcal/mol for chlorogenic acid, caffeic acid, and rutin, respectively. To the best of our knowledge, this is the first study investigating the interactions between rutin, caffeic acid, and chlorogenic acid with ATGL activity using *in silico* assays, highlighting the need for further research and suggesting that these compounds may exhibit significant modulatory effects on ATGL enzyme activity.

Furthermore, it is important to highlight that the *in vivo* modulation of the lipid profile observed in this study can be attributed, at least partially, to the findings from the *in silico* simulations. Although *in vivo* enzyme activity was not directly measured in the present study, the docking data support the mechanisms that align with known pathways related to lipid metabolism. In this context, chlorogenic acid emerged as a potent inhibitor of both enzymes, aligning with previous studies that attribute its diverse biological activities to its influence on lipid metabolism, thereby supporting the present study's results. Chlorogenic acid significantly suppresses mRNA expression associated with free fatty acid synthesis and acetyl-CoA (62). Additionally, it impacts the activity of the ATGL enzyme, leading to reduced lipid bioavailability, as well as decreased hepatic lipogenesis and adipogenesis, while simultaneously promoting lipolysis. It also limits dietary lipid digestion and absorption by forming complexes with lipids (63).

Conclusion

In summary, this study demonstrates that aqueous extracts of *Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis* significantly improved glycemic control and modulated lipid metabolism in experimental models of diabetes and dyslipidemia. Additionally, *in silico* simulations provide evidence that the major constituents of yerba mate extract, particularly chlorogenic acid, may interact with key enzymes involved in lipid metabolism. Nevertheless, further studies are necessary to evaluate their long-term safety and to optimize dosage strategies to support their development as effective natural therapeutic agents. The limitations of this research were the lack of detailed analysis of the specific bioactive compounds present in the extracts, as well as the absence of metabolomic profiling to identify circulating metabolites; these will be the objective of future communications. Collectively, these findings suggest

clorogénico, ácido cafeico e rutina, respetivamente. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a investigar as interações entre rutina, ácido cafeico e ácido clorogénico com a atividade da ATGL usando ensaios *in silico*, destacando a necessidade de mais investigações e sugerindo que estes compostos podem ter efeitos moduladores significativos sobre a atividade da ATGL.

Além disso, é importante salientar que a modulação *in vivo* do perfil lipídico observada neste estudo pode, pelo menos parcialmente, ser atribuída aos achados das simulações *in silico*. Embora a atividade enzimática *in vivo* não tenha sido medida diretamente no presente estudo, os dados de *docking* sustentam os mecanismos que se alinham com vias já conhecidas relacionadas ao metabolismo lipídico. Neste contexto, o ácido clorogénico destacou-se como um potente inibidor de ambas as enzimas, corroborando estudos anteriores que lhe atribuem diversas atividades biológicas pela sua influência no metabolismo lipídico, o que sustenta os resultados do presente estudo. O ácido clorogénico suprime significativamente a expressão de mRNA associado à síntese de ácidos gordos livres e acetil-CoA (62), impactando também a atividade da ATGL, reduzindo a biodisponibilidade de lípidos, assim como a lipogénese hepática e adipogénese, enquanto promove simultaneamente a lipólise. Também limita a digestão e absorção de lípidos alimentares através da formação de complexos com lípidos (63).

Conclusões

Em suma, este estudo demonstra que os extratos aquosos de *Camellia sinensis* e *Ilex paraguariensis* melhoraram significativamente o controlo glicémico e modularam o metabolismo lipídico em modelos experimentais de diabetes e dislipidemia. Adicionalmente, as simulações *in silico* fornecem evidências de que os principais constituintes do extrato de erva-mate, particularmente o ácido clorogénico, podem interagir com enzimas-chave envolvidas no metabolismo lipídico. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar a sua segurança a longo prazo e para otimizar estratégias de dosagem que sustentem o seu desenvolvimento como agentes terapêuticos naturais eficazes. As limitações desta investigação incluem a ausência de uma análise detalhada dos compostos bioativos específicos presentes nos extratos, bem como a falta de perfil metabolómico para identificar os metabolitos circulantes; estes serão o objetivo de futuras comunicações. Coletivamente, estes

that these plant-based extracts possess therapeutic potential for managing the risks associated with metabolic disorders and provide significant scientific support for the traditional use of *Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis*, two species widely employed in folk medicine.

Authors Contributions Statement

RCP - study design, data analysis, writing, figures and graphics; DVA - drafting, editing and reviewing, RGT - conceptualization, study design, supervision and final revision

Funding

This study did not receive specific funding. The general funding was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES – Finance Code 001).

Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no financial or personal relationship that could present a potential conflict of interests. The editors involved in this manuscript's authorship had no participation in the review or decision process.

resultados sugerem que estes extratos de origem vegetal possuem potencial terapêutico para a gestão de riscos associados a distúrbios metabólicos, fornecendo suporte científico significativo ao uso tradicional da *Camellia sinensis* e *Ilex paraguariensis*, duas espécies amplamente utilizadas na medicina tradicional.

Declaração de Contribuições dos Autores

RCP - concepção do estudo, análise de dados, redação, figuras e gráficos; DVA - elaboração, edição e revisão; RGT - conceptualização, concepção do estudo, supervisão e revisão final.

Financiamento

Este estudo não recebeu financiamento específico. O financiamento geral foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES – Código de Financiamento 001).

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Conflito de Interesses

Os autores declaram não existir qualquer relação financeira ou pessoal que possa representar um potencial conflito de interesses. Os editores envolvidos na autoria desses manuscritos não tiveram participação no processo de revisão ou decisão.

References / Referências

- Chang, E. & Kim, C. Y. (2019). Natural Products and Obesity: A Focus on the Regulation of Mitotic Clonal Expansion during Adipogenesis. *Molecules*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061157>
- Gasmi, A., Mujawdiya, P. K., Noor, S., Lysiuk, R., Darmohray, R., Piscopo, S., Lenchyk, L., Antonyak, H., Dehtiarova, K., Shanaida, M., Polishchuk, A., Shanaida, V., Peana, M., & Björklund, G. (2022). Polyphenols in Metabolic Diseases. *Molecules*, 27(19), 6280. <https://doi.org/10.3390/molecules27196280>
- Wang, L., Gou, Y., Ding, Y., Liu, J., Wang, Y., Wang, Y., Zhang, J., Du, L., Peng, W., & Fan, G. (2023). The interplay between herbal medicines and gut microbiota in metabolic diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1105405>
- World Obesity Federation, *World Obesity Atlas 2023*, <https://data.worldobesity.org/publications/?cat=19>
- Soedono, S., Julietta, V., Nawaz, H., & Cho, K. W. (2024). Dynamic Roles and Expanding Diversity of Adipose Tissue Macrophages in Obesity. *Journal of Obesity & Metabolic Syndrome*. 33(3): 193-212. <https://doi.org/10.7570/jomes24030>
- Jakab, J., Mišić, B., Mikšić, S., Juranić, B., Čosić, V., Schwarz, D., & Včev, A. (2021). Adipogenesis as a Potential Anti-Obesity Target: A Review of Pharmacological Treatment and Natural Products. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: targets and therapy*. 8(14), 67-83. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S281186>
- Kim, H., Bartley, G.E., Arvik, T., Lipson, R., Nah, S., Seo, K., & Yokoyama, W. (2014). Dietary supplementation of chardonnay grape seed flour reduces plasma cholesterol concentration, hepatic steatosis, and abdominal fat content in high-fat diet induced obese hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(8), 1919-1925. <https://doi.org/10.1021/jf404832s>
- Cogoi, L., Marrassini, C., Martin, E. M. S., Alonso, M. R., Filip, R., & Anesini, C. (2023). Inhibition of Glycation End Products Formation and Antioxidant Activities of *Ilex paraguariensis*: comparative study of fruit and leaves extracts. *Journal of Pharmacopuncture*, 26(4): 338-347. <https://doi.org/10.3831/KPI.2023.26.4.338>
- Santos, D., Vargas, B. K., Frota, E. G., Biduski, B., Lopes, S. T., Gutkoski, J. P., Santos, L. F., Ritterbusch, G. A., Barcelos, R. P., Somacal, S., Emanuelli, T., & Bertolin, T. E. (2023). Gut Microbiota Modulation by Bioactive Compounds from *Ilex paraguariensis*: an *In Vivo* Study. *Plant Foods for Human Nutrition* 78, 796–802. <https://doi.org/10.1007/s11130-023-01117-y>
- Mayer, M. S., Portella, A. F., Maçalai, C., Zambra, A. L., Mori, N. C., Nunes, V. C. K., Bortolotto, J. W., Azzolin, G. B., & Parisi, M. M. (2024). Yerba Mate as a Protectant against Lipoproteins Oxidation, *Chemistry & Biodiversity*. 21(4). <https://doi.org/10.1002/cbdv.202301770>
- Walton, C.M., Saito, E.R., Warren, C. E., Larsen, J. G., Remund, N.P., Reynolds, P.R., Hansen, J. M., & Bikman, B. T. (2023). Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) Supplement Exerts Beneficial, Tissue-Specific Effects on Mitochondrial Efficiency and Redox Status in Healthy Adult Mice. *Nutrients*, 15(20), 4454. <https://doi.org/10.3390/nu15204454>
- Maitzegui, B., Villagarcia, H. G., Román, C. L., Flores, L. E., Prieto, J. M., Castro, M. C., Massa, M. L., Schinella, G. R., & Francini, F. (2023). Dietary Supplementation with Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Infusion Increases IRS-1 and PI3K mRNA Levels and Enhances Insulin Sensitivity and Secretion in Rat Pancreatic Islets. *Plants* 2023, 12(14), 2620. <https://doi.org/10.3390/plants12142620>
- Olate-Briones, A., Albornoz-Muñoz, S., Rodríguez-Arriaza, F., Rodríguez-Vergara, V., Aguirre, J.M., Liu, C., Peña-Farfa, C., Escobedo, N., & Herrada, A. A. (2024). Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Reduces Colitis Severity by Promoting Anti-Inflammatory Macrophage Polarization. *Nutrients*, 16(11), 1616. <https://doi.org/10.3390/nu16111616>
- Valença, H.M., Silva, C.P.E., Gitirana, L.B., Valença, S.S., & Lanzetti, M. (2022). Beneficial effects of *Ilex paraguariensis* in the prevention of obesity-associated metabolic disorders in mice. *Phytotherapy Research*, 36(2), 1032-1042. <https://doi.org/10.1002/ptr.7377>
- Masson, W., Barbagelata, L., Lobo, M. Nogueira, J.P., Corral, P., & Lavalle-Cobo, A. (2022). Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) on Lipid Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plant Foods for Human Nutrition*, 77, 353–366. <https://doi.org/10.1007/s11130-022-00991-2>
- Blum-Silva, C. H., Luz, A. B. G., Nascimento, M. V. P. S., Facchin, B. M. C., Baratto, B., Fröde, T. S. Sandio, L. P., Dalmarco, E. M., & Reginato, F. H. (2016). Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of *Ilex paraguariensis* leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS. *Data in Brief*, 8, 295-299. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.05.022>
- Bastos, D.H.M., Oliveira, D.M., Matsumoto, R.L.T., Carvalho, P.O., & Ribeiro, M.L. (2007). Yerba maté: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 1(1), 37-46.
- Mesquita, M., Santos, E., Kassuya, C.A., & Salvador, M.J. (2021). Chimarrão, terere and mate-tea in legitimate technology modes of preparation and consume: A comparative study of chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-anxiety properties of the mostly consumed beverages of *Ilex paraguariensis* St. Hil.. *Journal of Ethnopharmacology*, 279:114401. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114401>
- Samanta, S. (2020). Potential Bioactive Components and Health Promotional Benefits of Tea (*Camellia sinensis*). *Journal of the American Nutrition Association*, 41(1), 65–93. <https://doi.org/10.1080/07315724.2020.1827082>
- Angel-Isaza, J., Carmona-Hernandez, J.C., González-Correa, C. H., & Narváez-Solarte, W.V. (2023). Potential Hypoglycemic and Antilipidemic Activity of Polyphenols from *Passiflora ligularis* (Granadilla). *Molecules*, 28(8):3551. <https://doi.org/10.3390/molecules28083551>
- Alboulwafa, M. M., Youssef, F. S., Gad, H. A., Altyar, A.E., Al-Azizi, M. M., & Aschour, M.L. (2019). A Comprehensive Insight on the Health Benefits and Phytoconstituents of *Camellia sinensis* and Recent Approaches for Its Quality Control. *Antioxidants*, 8(10), 455. <https://doi.org/10.3390/antiox8100455>
- Peng X, Zhou R, Wang B, Yu X, Yang X, Liu K, & Mi M. (2014). Effect of green tea consumption on blood pressure: a meta-analysis of 13 randomized controlled trials. *Scientific Reports*, 4(1):6251. <https://doi.org/10.1038/srep06251>
- Rasaei, N., Asbaghi, O., Samadi, M., Setayesh, L., Bagheri, R., Gholami, F., Soveid, N., Casazza, K., Wong, A., Suzuki, K., & Mirzaei, K. (2021). Effect of Green Tea Supplementation on Antioxidant Status in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Antioxidants*, 10(11), 1731. <https://doi.org/10.3390/antiox10111731>
- Ng, T. K., Chu, K. O., Wang, C. C., & Pang, C. P. (2023). Green Tea Catechins as Therapeutic Antioxidants for Glaucoma Treatment. *Antioxidants*, 12(7), 1320. <https://doi.org/10.3390/antiox12071320>
- Kanu, V. R., Pulakuntla, S., Kuruvalli, G., Aramgam, S. L., Marthadu, S. B., Pannuru, P., Hebbani, A. V., Desai, P. P. D., Badri, K. R., & Vaddi, D. R. (2024). Anti-atherogenic role of green tea (*Camellia sinensis*) in South Indian smokers. *Journal of Ethnopharmacology*, 332. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118298>

26. Fujiki H, Watanabe T, Sueoka E, Rawangkan A, & Suganuma M. (2018). Cancer prevention with green tea and its principal constituent, EGCG: from early investigations to current focus on human cancer stem cells. *Molecules and Cells*, 41(2):73–82. <http://dx.doi.org/10.14348/molcells.2018.2227>
27. Miyata Y, Shida Y, Hakariya T, & Sakai H. (2019). Anti-cancer effects of green tea polyphenols against prostate cancer. *Molecules*, 24(1):193. <https://doi.org/10.3390/molecules24010193>
28. Gao, Y., Han, Z., Xu, Y., & Yin, J. (2023). Chemical composition and anti-cholesterol activity of tea (*Camellia sinensis*) flowers from albino cultivars. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1142971>
29. Xu, R., Bai, Y., Yang, K., & Chen, G. (2020). Effects of green tea consumption on glycemic control: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition & Metabolism*, 17, 56. <https://doi.org/10.1186/s12986-020-00469-5>
30. Wan, C. C., Hu, X., Li, M., Rengasamy, K. R. R., Cai, Y., & Liu, Z. (2023). Potential protective function of green tea polyphenol EGCG against high glucose-induced cardiac injury and aging. *Journal of Functional Foods*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105506>
31. Alameen, A. A., Alothman, M. R., Al Wahibi, M. S., Abdullah, E. M., Ali, R., Abdalla, M., Fattiny, S. Z. A., & Elsayim, R. (2023). Potential Effect of Baobab's Polyphenols as Antihyperlipidemic Agents: In Silico Study. *Molecules*, 28(16), 6112. <https://doi.org/10.3390/molecules28166112>
32. Schreiber, R., Xie, H., & Schweiger, M. (2019). Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL). *Biochimica et Biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*. 1864(6):880-899. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.008>
33. Felippi, R. (2005). Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na reatividade vascular: enfoque na aterosclerose experimental [dissertation]. Federal University of Santa Catarina, Post Graduation program in Pharmacy, from <http://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/102984>
34. Mustata, G.T., Rosca, M., Biemel, K.M., Reihl, O., Smith, M.A., Viswanathan, A., Strauch, C., Du, Y., Tang, J., Kern, T.S., Lederer, M.O., Brownlee, M., Weiss, M.F., & Monnier, V.M. (2005). Paradoxical Effects of Green Tea (*Camellia Sinensis*) and Antioxidant Vitamins in Diabetic Rats: Improved Retinopathy and Renal Mitochondrial Defects but Deterioration of Collagen Matrix Glycoxidation and Cross-Linking. *Diabetes*, 54 (2): 517–526. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.2.517>
35. Ramadan, G., El-Beih, N.M., & Abd El-Ghffar, E.A. (2009). Modulatory effects of black v. green tea aqueous extract on hyperglycaemia, hyperlipidaemia and liver dysfunction in diabetic and obese rat models. *British Journal of Nutrition*, 102(11):1611-1619. doi:10.1017/S000711450999208X
36. Rocha, D.S., Casagrande, L., Model, J.F.A., Santos, J.T., Hoefel, A.L., & Kucharski, L.C. (2018). Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on the metabolism of diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 370-376. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.132>
37. Lerco, M. M., Spadella, C. T., Machado, J. L. M., Schellini, S. A. & Padovani, C. R. (2003). Experimental alloxan diabetes-induced: a model for clinical and laboratory studies in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 18 (2): 132-142. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502003000200010>
38. Cavalli, V. L. L. O., Sordi, C., Tonini, K., Grando, A., Muneron, T., Guigi, A., & Roman, W. A. J. (2007). In vivo study of the hypoglycemic effect of extracts from the root and leaf of the bardana Arctium minus (Hill.) Bernh. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1): 64-70. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100014>
39. Estadella, D., Oyama, L. M., Dâmaso, A. R., Ribeiro, E. B., & Nascimento, C. M. O., (2004). Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats, *Nutrition*, 20(2), 218-224. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2003.10.008>
40. Luo, Q., Luo, L., Zhao, J., Wang, Y., & Luo, H. (2024). Biological potential and mechanisms of Tea's bioactive compounds: An Updated review, *Journal of Advanced Research*, 65, 345-363. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.12.004>
41. Chen, Y., Li, W., Qiu, S., Vladimir C., Xu, X., Wang, X., Nian, X., Chen, Q., Wang, Q., Tu, P., Zhang, L., Yan, S., Li, K., Chen, J., Wu, H., Wang, X., Wang, x., Liu, J., Cai, M., Wang, Z., Wang, B., & Sun, Z. (2020). Tea consumption and risk of diabetes in the Chinese population: a multi-centre, cross-sectional study. *British Journal of Nutrition*, 123(4), 428-436. doi:10.1017/S000711451900299X
42. Zang, Y., Bian, Z., Lu, H., Wang, L., Xu, J., & Wang, C. (2023). Association between tea consumption and glucose metabolism and insulin secretion in the Shanghai High-risk Diabetic Screen (SHIDS) study. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 11(2). <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2022-003266>
43. Tian, B., Pan, Y., Zhou, X., Jiang, Y., Zhang, X., Luo, X., & Yang, K. (2024). Yellow leaf green tea modulates the AMPK/ACC/SREBP1c signaling pathway and gut microbiota in high-fat diet-induced mice to alleviate obesity, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104, 5882–5895. https://doi.org/10.1002/jsfa.13413open_in_new
44. Gawli, K. (2024). Catechin inhibits glycosidases, ameliorates glucose uptake and Glut-4 expression in 3T3-L1 adipocytes. *Natural Product Research*, 1–7. <https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2439007>
45. Dai, T., Li, T., He, X., Li, X., Liu, C., Chen, J., & McClements, D. J. (2020). Analysis of Inhibitory Interaction between Epigallocatechin Gallate and Alpha-Glucosidase: A Spectroscopy and Molecular Simulation Study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 230, 118023. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.118023>
46. Ma, J., Li, Z., Xing, S., Ho, W.-T. T., Fu, X., & Zhao, Z. J. (2011). Tea Contains Potent Inhibitors of Tyrosine Phosphatase PTP1B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 407 (1), 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.116>
47. Wang, H., Shi, S., Bao, B., Li, X., & Wang, S. (2015). Structure characterization of an arabinogalactan from green tea and its anti-diabetic effect. *Carbohydrate Polymers*, 124, 98-108. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.070>
48. Klein, G. A., Stefanuto, A., Boaventura, B. C. B., de Moraes, E. C., Cavalcante, L. da S., de Andrade, F., Wazlawik, E., Di Pietro, P.F., Maraschin, & M. da Silva, E. L. (2011). Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Improves Glycemic and Lipid Profiles of Type 2 Diabetes and Pre-Diabetes Individuals: A Pilot Study. *Journal of the American College of Nutrition*, 30(5), 320–332. <https://doi.org/10.1080/07315724.2011.10719975>
49. Boaventura, B.C., Pietro, P.F., Klein, G.A., Stefanuto, A., Moraes, E.C., Andrade, F., Wazlawik, E., & Silva, E.L. (2013). Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. *Journal of Functional Foods*, 5, 1057-1064. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.03.001>
50. Pinton, G., Perucca, M., Gigliotti, V., Mantovani, E., Clemente, N., Malecka, J., Chrostek, G., Dematteis, G., Lim, D., Moro, L., & Chiazza, F. (2024). EZH2-Mediated H3K27 Trimethylation in the Liver of Mice Is an Early Epigenetic Event Induced by High-Fat Diet Exposure. *Nutrients*, 16(19), 3260. <https://doi.org/10.3390/nu16193260>

51. Yazdanpanah, Z., Salehi-Abargouei, A., Mozaffari, Z., & Hemayati, R. (2023). The effect of green tea (*Camellia sinensis*) on lipid profiles and renal function in people with type 2 diabetes and nephropathy: a randomized controlled clinical trial. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1253275>
52. Xu, Y., Jia, X., Zhang, W., Xie, Q., Zhu, M., Zhao, Z., Hao, J., Li, H., Du, J., Liu, Y., Feng, H., He, J., & Li, H. (2023). The effects of *Ascophyllum nodosum*, *Camellia sinensis*-leaf extract, and their joint interventions on glycolipid and energy metabolism in obese mice. *Frontiers in nutrition*, 10, 1242157. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1242157>
53. Kim, S.Y., Oh, M.R., Kim, M.G., Chae, H.J., & Chae, S.W. (2015). Anti-obesity effects of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*): a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15, 338. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0859-1>
54. Veiga, D.T.A., Brighenti, R., Copes, R., Tatsch, E., Moresco, R.N., Comim, F.V., & Premaor, M.O. (2018). Protective effect of yerba mate intake on the cardiovascular system: a *post hoc* analysis study in postmenopausal women. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(6):e7253. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20187253>
55. Fujii, T.M.M., Jacob, P.S., Yamada, M., Borges, M.C., Norde, M.M., Pantaleão, L.C., Oliveira, D.M., Tirapegui, J., Castro, I.A., Borelli, P., Fock, R.A., & Rogero, M.M. (2014). Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) modulated NF-kappaB pathway and AKT expression in the liver of rats fed on a high-fat diet. *Food Sciences and Nutrition*, 65(8), 967-976. <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.945153>
56. Kudo, M., Gao, M., Hayashi, M., Kobayashi, Y., Yang, J., & Liu, T. (2024). *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. improves lipid metabolism in high-fat diet-fed obese rats and suppresses intracellular lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes via the AMPK-dependent and insulin signaling pathways. *food & nutrition research*, 68. <https://doi.org/10.29219/fnr.v68.10307>
57. Paravati, M. R., Procopio, A. C., Milanović, M., Scarlata, G. G. M., Milošević, N., Ružić, M., Milić, N., & Abenavoli, L. (2024). Onion Polyphenols as Multi-Target-Directed Ligands in MASLD: A Preliminary Molecular Docking Study. *Nutrients*, 16(8), 1226. <https://doi.org/10.3390/nu16081226>
58. Ram, H., Kala, C., Sen, K., Sakarwal, A., Charan, J., Sharma, P., Roy, R., & Ghosh, S. (2022). In-vitro and in-silico determinations of HMG-CoA reductase inhibition potential of caffeic acid for therapeutics of hypercholesterolemia. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 12(01), 190-198. DOI: 10.7324/JAPS.2021.120119
59. Kohlmayr, J.M., Grabner, G.F., Nusser, A., Höll, A., Manojlović, V., Halwachs, B., Masser, S., Jany-Luig, E., Engelke, H., Zimmermann, R., & Stelzl, U. (2024). Mutational scanning pinpoints distinct binding sites of key ATGL regulators in lipolysis. *Nature Communications* 15, 2516. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46937-x>
60. Kulinskaya, N. Gamez, C.F.R. Hofer, P., Cerik, I.K., Dubey, N., Viertlmayr, R., Sagmeister, T., Pavkov-Keller, T., Zechner, R., & Obere, M. (2024). Unmasking crucial residues in adipose triglyceride lipase for coactivation with comparative gene identification-58. *Journal of Lipid Research*, 65(1) 100491. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2023.100491>
61. Cornaciu I, Boeszoermenyi A, Lindermuth H, Nagy HM, Cerik IK, Ebner C, Salzburguer, B., Gruber, A., Schweiger, M., Zechner, R., Lass, A., Zimmermann, R., & Oberer, M. (2011). The Minimal Domain of Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Ranges until Leucine 254 and Can Be Activated and Inhibited by CGI-58 and G0S2, Respectively. *PLoS ONE* 6(10): e26349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026349>
62. Liu, L. Zhang, C., Zhai, M., Yu, T., Pei, M., Du, P., Li, A., Yan, J., Li, C., & Zhang, G. (2023). Effect of chlorogenic acid on lipid metabolism in 3T3-L1 cells induced by oxidative stress, *Food Bioscience*, 51:102330. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102330>
63. Dzah, C.S., Donyinah, D.A., Letsyo, E., Dzikunoo, J., & Adams, Z.S. (2023). Dietary Polyphenols and Obesity: A Review of Polyphenol Effects on Lipid and Glucose Metabolism, Mitochondrial Homeostasis, and Starch Digestibility and Absorption. *Plant Foods for Human Nutrition*, 78(1):1-12. <https://doi.org/10.1007/s11130-022-01034-6>