

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATO DE *Ilex
paraguariensis* A. St. HILAIRE E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E
ANTIPARKINSONIANA *IN VIVO***

**Florianópolis
2017**

Carlos Henrique Blum da Silva

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATO DE *Ilex*
paraguariensis A. St. HILAIRE E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E
ANTIPARKINSONIANA *IN VIVO***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto

Coorientadora: Profa. Dra. Angela Machado de Campos

Florianópolis
2017

da Silva, Carlos Henrique Blum
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE
EXTRATO DE *Ilex paraguariensis* A. St.
HILAIRE E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE IN VITRO
E ANTIPARKINSONIANA IN VIVO / Carlos
Henrique Blum da Silva ; orientador, Flávio
Henrique Reginatto, coorientador, Angela
Machado de Campos, 2017.
161 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Erva-mate. 3. Parkinson. 4. Extratos
vegetais. I. Reginatto, Flávio Henrique.
II. de Campos, Angela Machado. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

**“CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATO DE
Ilex paraguariensis A. St. HILAIRE E AVALIAÇÃO
DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E
ANTIPARKINSONIANA *IN VIVO*.”**

POR

Carlos Henrique Blum da Silva

Tese julgada e aprovada em sua
forma final pelo(a) Orientador(a) e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores
Doutores:

Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Simone Gonçalves Cardoso (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Christiane Meyre da Silva Bittencourt (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Emílio Streck (UNESC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Flávio Henrique Reginatto (UFSC – Orientador)

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 07 de agosto de 2017.

Dedico esta tese ao meu amor Samara e ao meu filho Rafael. Pelo incentivo, ajuda e, sobretudo, compreensão e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Flávio Henrique Reginatto, pela orientação, amizade, paciência, confiança e “paternidade científica”. Obrigado por ter compartilhado seu conhecimento docente, científico e sobretudo, por me ajudar a compreender que para obter sucesso profissional, não basta ser bom tecnicamente. É preciso ter caráter e inteligência emocional para lidar com as adversidades que se apresentam ao longo da vida profissional e pessoal. Foi uma grande honra ter sido orientado por ti ao longo desses 12 anos. Mais que orientador, foste e continuarás sendo um amigo. Muitíssimo obrigado!

À minha coorientadora Prof. Angela Machado de Campos, pelo suporte na parte de desenvolvimento e caracterização do extrato, compartilhando comigo sua expertise em tecnologia de fitoterápicos.

Aos professores José Claudio Fonseca Moreira e Daniel Pens Gelain pela oportunidade de realizar meu estágio doutoral no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo da UFRGS, contribuindo significativamente com a execução deste trabalho e com minha formação.

Ao Prof. Rui Daniel Shröder Prediger, por abrir as portas do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON), permitindo a realização do modelo animal da doença de Parkinson, fundamental para alcançar os objetivos desta tese. Obrigado pelos ensinamentos, os quais ampliaram minha formação acadêmica, e que certamente me auxiliarão ao longo da vida profissional.

Ao professor Eloir Paulo Schenkel, pelo tema, pelas conversas e pelos inúmeros materiais cedidos de seu pujante acervo bibliográfico, especialmente sobre erva-mate.

À professora Cláudia Maria Oliveira Simões pelas significativas contribuições feitas na banca de minha qualificação, mas principalmente pelos ensinamentos e incentivo na busca pela excelência.

Ao Prof. Louis Pergaud Sandjo, pela contribuição nas análises por espectrometria de massas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC dos quais fui aluno nas disciplinas cursadas no doutorado, principalmente aos professores Marcos Segatto, Maique Weber Biavatti e Simone Gonçalves Cardoso, os quais compartilharam além de ensinamentos, momentos de descontração e alegria.

À técnica do laboratório de Farmacognosia Claudinha, pelos abraços, “goles de refrigerante” e boas risadas.

Aos amigos e colegas dos laboratórios de Farmacognosia, Farmacotécnica, Controle de Qualidade e LEXDON (sem citar nomes

para não ser traído pela falta de memória, cometendo alguma injustiça), pelo companheirismo, pela ajuda e pelos momentos agradáveis dos quais desfrutamos juntos.

À CAPES pela bolsa.

Ao meu irmão Leonardo, meu brother Léovis. Sou muito feliz em saber que construistes uma linda e querida família, por ter me dado uma sobrinha maravilhosa e pelo teu sucesso profissional. Para mim, tu és um exemplo de dedicação e competência. Muito obrigado por toda a força que vocês me deram nesse período.

À minha esposa Samara, minha princesa Sami, por todo amor, carinho, paciência e ajuda nestes quatro anos de doutorado. Obrigado por acreditar em mim, até mais do que eu mesmo acredito. Serei eternamente grato por tu teres abdicado do teu bom momento profissional para me acompanhar perante minhas decisões profissionais. Obrigado por sempre me dar forças para vencer as barreiras, seja com palavras, com um abraço ou apenas com sua presença.

Ao meu filho Rafael, cujo nascimento aconteceu na mesma semana em que defendi meu projeto no processo de seleção para ingressar no doutorado. Talvez tu ainda não entendas o porquê da minha ausência durante muitos dias e noites, mas tenhas a convicção de que tu foste o meu maior motivo para seguir em frente. Aliás meu filho, tu sempre serás meu principal motivo para batalhar, trabalhar e buscar a felicidade.

Aos meus pais Jorge e Bernardete, pelo amor, confiança, carinho e suporte. Vocês precisam ser estudados para elucidar de onde pode vir tanta força e tanto amor. Entretanto, nenhum protocolo experimental, nem mesmo uma tese de doutorado conseguiria reproduzir e explicar o caráter e o amor incondicional de vocês. Vocês são minha fortaleza, meu exemplo de retidão! Obrigado por tornarem isto possível, mas acima de tudo, obrigado por sempre acreditarem em mim, na minha capacidade e no meu sonho. EU AMO VOCÊS!!!

Pele-pele-peleia eu não vou fugir desta guerra não

*É mais fácil morrer estar lutando,
Eu nunca vi peão gaúcho se entregando*

Prepare a erva comece a pensar pois a peleia vai começar

*Tradição de mão em mão
Geração geração cuia erva chimarrão
Diferenças eu guardo na guaiaca
Gente pequena gente ruim gente fraca*

Prepare a erva comece pensar pois a peleia vai continuar

Sou gaúcho tô na boa toma aí um chimarrão

*Revolução na coxilha farroupilha
Mano da terra não vacila não foge da briga
Na aurora pampeana xirú da campanha
Chimarreando não se espanta ao mirar o pampa
No meu solo Rio Grande povo guerreiro se expande
Que a peleia não perde a chance*

Prepare a erva comece rezar pois a peleia vai recommear

*Não podemos se entregar pros ômi de jeito nenhum
Não tá morto quem peleia aqui sob o céu azul
Não podemos se entregar pros ômi de jeito nenhum
Pois somos todos brasileiros do Rio Grande do Sul*

(Tonho Crocco & Trovadores RS/Ultramen, 2000)

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é um transtorno neurodegenerativo caracterizada principalmente pela destruição de neurônios dopaminérgicos. O caráter progressivo da doença, e a presença de sintomas motores e não motores afetam significativamente a qualidade de vida de seus portadores. Até o presente momento, não existem fármacos disponíveis capazes de inibir a degeneração neuronal, permanecendo grande interesse na busca de agentes neuroprotetores e modificadores do curso da doença. As plantas medicinais sempre forneceram alternativas terapêuticas importantes frente a diferentes patologias. Nesse sentido, *Ilex paraguariensis* (erva-mate) apresenta significativa importância na perspectiva da obtenção de novo produto com emprego na DP, a medida que sua constituição química apresenta majoritariamente metilxantinas e compostos fenólicos, os quais estão relacionados com as propriedades benéficas frente à DP. O presente estudo teve como objetivo caracterizar quimicamente um extrato hidroetanólico (EHE) a partir das folhas de *I. paraguariensis* e investigar as atividades antioxidante e antiparkinsoniana, em modelos *in vitro* e *in vivo*. O EHE de *I. paraguariensis* apresentou nove compostos majoritários, as metilxantinas, cafeína e teobromina, os ácidos fenólicos, ácido 3-O-cafeoilquínico, ácido 5-O-cafeoilquínico, ácido 4-O-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico, e o flavonoide rutina, identificados através de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) acoplada à detector de arranjo de diodos (PDA) e à espectrometria de massas (EM). Os teores dos marcadores cafeína, ácido clorogênico e rutina foram de 29,3, 67,5 e 12,4 mg/g, respectivamente. Este extrato demonstrou alto potencial antioxidante reativo total na concentração de 5 µg/mL no ensaio do TAR (Reatividade antioxidante total) / TRAP (Potencial antioxidante reativo total). A mesma concentração do extrato foi capaz de captar o radical hidroxil, reduzindo a porcentagem de degradação da 2-desoxirribose. No modelo animal de administração intranasal da neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), os resultados indicaram que o tratamento *v.o.* com o EHE (300 mg/Kg), e com os compostos cafeína (10 mg/Kg) e ácido clorogênico (20 mg/Kg), isolados e em associação (10 mg/Kg de cafeína + 20 mg/Kg de ácido clorogênico) reverteu ou atenuou os déficits na memória social de curto prazo, e melhorou o comportamento anedônico e tipo-depressivo de ratos. Adicionalmente, com exceção do tratamento com ácido clorogênico, os demais grupos tratados reduziram o prejuízo olfatório causado pelo MPTP nos animais.

Entretanto, nenhum dos tratamentos foi capaz de atenuar os prejuízos motores causados pelo MPTP. Ainda, os tratamentos com o extrato de *I. paraguariensis*, cafeína, ácido clorogênico e a associação de cafeína + ácido clorogênico reduziram a depleção dopaminérgica causada pelo MPTP no bulbo olfatório e no estriado. Por outro lado, somente o extrato e o ácido clorogênico foram capazes de atenuar a degeneração de dopamina causada pelo MPTP no córtex pré-frontal.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*. Erva-mate. Parkinson. MPTP. Compostos fenólicos. Cafeína. Ácido clorogênico. CLUE/EM. Neuroproteção. Antioxidante.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized mainly by loss of dopaminergic neurons. The progressive character of the disease, and a presence of motors and non-motors significantly affect a quality of life of patients. Until this moment, there are no available drugs capable of inhibiting neurodegeneration, with great interest in the search for neuroprotective agents and modifiers of the course of the disease. Medicinal plants have always provided important therapeutic alternatives to different pathologies. In this context, *Ilex paraguariensis* (yerba mate) has significant importance in the perspective of obtaining a new product with use in PD, since its phytochemical composition is predominantly based in methylxanthines and phenolic compounds, which are related to the beneficial properties in PD. The present study aimed to characterize chemically a hydroethanolic extract (EHE) from leaves of *I. paraguariensis* and to investigate the *in vitro* antioxidant and *in vivo* antiparkinsonian activities. The EHE of *I. paraguariensis* leaves presented nine major compounds, the methylxanthines, caffeine and theobromine, the phenolic acids, 3-O-caffeoylquinic acid, 5-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid and 4,5-dicaffeoylquinic acid, and the flavonoid rutin, identified by ultra performance performance liquid chromatography (UPLC) coupled to diode array detector (PDA) and mass spectrometry (MS). The contents of chemical markers caffeine, chlorogenic acid and rutin were 29.3, 67.5 and 12.4 mg / g, respectively. This extract showed high total reactive antioxidant potential at the concentration of 5 µg / mL in TAR (Total antioxidant capacity) / TRAP (Total reactive antioxidant capacity) assay. The same concentration of extract was able to scavenge the hydroxyl radical, reducing the percentage of degradation of 2-deoxyribose. In the animal model of intranasal administration of the neurotoxin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), the results indicated that the oral treatment with the standardized extract (300 mg / kg) and with the compounds caffeine (10 mg / kg) and chlorogenic acid (20 mg / kg), isolated and in combination (10 mg / kg caffeine + 20 mg / kg Chlorogenic) reversed or attenuated the deficits in short-term social memory, and improved the anhedonic and depressive-like behavior of rats. Additionally, with the exception of treatment with chlorogenic acid, the other treated groups reduced the olfactory impairment caused by MPTP in the animals. However, none of the treatments were able to attenuate the motor damage caused by MPTP. Also, the treatments with the extract of *I. paraguariensis*, caffeine, chlorogenic acid and a

combination of caffeine + chlorogenic acid reduced the dopaminergic depletion caused by MPTP in the olfactory bulb and the striatum. On the other hand, only extract and chlorogenic acid, are able to attenuate the dopamine degeneration caused by MPTP in the prefrontal cortex.

Keywords: *Ilex paraguariensis*. Yerba mate. Parkinson. MPTP. Phenolic compounds. Caffeine. Chlorogenic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Neuropatologia da doença de Parkinson (DP).....	31
Figura 2 – Metabolismo enzimático da dopamina.....	34
Figura 3 – Principais características da doença de Parkinson	35
Figura 4 – Representação esquemática das estratégias farmacológicas empregadas atualmente na doença de Parkinson.....	37
Figura 5 – Folhas de <i>Ilex paraguariensis</i>	45
Figura 6 - Esquema representativo do envolvimento do estresse oxidativo no processo de neurodegeneração dopaminérgica.	58
Figura 7 - Cromatograma do extrato hidroetanólico das folhas de <i>I. paraguariensis</i> por CLUE/DAD.	65
Figura 8 – Potencial antioxidante reativo total (TRAP) e Reatividade antioxidante total (TAR) do extrato de <i>Ilex paraguariensis</i>	70
Figura 9 – Capacidade de captação do radical hidroxila (OH-)......	72
Figura 10 – Desenvolvimento da doença de Parkinson implicada pela exposição a toxinas ambientais.	75
Figura 11 - Esquema do procedimento para administração intranasal do MPTP.	80
Figura 12 - Representação esquemática dos procedimentos realizados durante o protocolo experimental.....	81
Figura 13 – Ilustração do teste de discriminação olfatória.....	82
Figura 14 - Comportamentos avaliados no teste do nado forçado.	14
Figura 15 - Efeitos dos tratamentos no tempo de permanência em cada compartimento no teste de discriminação olfatória dois dias após infusão intranasal do MPTP.....	87
Figura 16 - Efeitos dos tratamentos sobre a memória de reconhecimento social sete dias após infusão intranasal do MPTP.....	89
Figura 17 – Efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros emocionais relacionados à anedonia, no splash teste 12 dias após administração intranasal do MPTP.....	93
Figura 18 – Efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros emocionais relacionados à depressão no nado forçado 14 dias após a infusão intranasal do MPTP.....	95
Figura 19 - Efeitos dos tratamentos sobre a atividade motora no teste do campo aberto 21 dias após a administração intranasal do MPTP.....	96
Figura 20 – Efeito dos tratamentos sobre a concentração de dopamina (DA) no bulbo olfatório, estriado e córtex pré-frontal dos animais 21 dias após administração intranasal do MPTP.	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH: 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride
ACG: Ácido clorogênico
AD: aldeído desidrogenase
ANOVA: Análise de variância
ATP: Adenosina trifosfato
AUC: Área sob a curva
BHE: Barreira hemato-encefálica
BO: Bulbo olfatório
CAT: Catalase
CLUE: Cromatografia líquida de ultra eficiência
COMT: Catecol-O-metiltransferase
CPF: Córtex pré-frontal
CSC: 8-(3-clorostiril)-cafeína
DA: Dopamina
DAD: Detector de UV por arranjos de diodos
DCNT: Doenças crônicas não transmissíveis
DDC: DOPA-descarboxilase
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DOPAL: 3,4-diidroxifenilacetaldeído
DP: Doença de Parkinson
DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
E.P.M.: Erro padrão da média
EM: Espectrometria de massas
EROs: Espécies reativas de oxigênio
GPx: Glutathione peroxidase
GR: Glutathione reductase
GSH: Glutathione
HVA: Ácido homovanílico
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICH: International Conference on Harmonisation
L-DOPA: Levodopa
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
LEXDON: Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas
LLOQ: Limite de quantificação
LPO: Lipoperoxidação
MAO-A: Monoamina oxigenase-A
MAO-B: Monoamina oxigenase-B
MDA: malondialdeído

MPP+: íon 1-metil-4-fenil piperidínio
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MPV: Matéria-prima vegetal
NMDA: N-metil D-Aspartato
NO: Óxido nítrico
PDA: Detector de arranjo de diodos
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
RDI: Razão de duração da investigação
RENAME: Relação nacional de medicamentos essenciais
SNC: Sistema nervoso central
SNpc: Substância negra parte compacta
SOD: Superóxido dismutase
SUS: Sistema Único de Saúde
TAR: Reatividade antioxidante total
TBA: Ácido tiobarbitúrico
TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA: Ácido tricloroacético
TH: Tirosina hidroxilase
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
TRAP: potencial antioxidante reativo total
2-DR: 2-desoxirribose
6-OHDA: 6-hidroxidopamina

SUMÁRIO

SUMÁRIO	21
APRESENTAÇÃO	25
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: <i>Ilex paraguariensis</i> A. ST. HILAIRE E SEU POTENCIAL EMPREGO NA DOENÇA DE PARKINSON.	299
1.1 DOENÇA DE PARKINSON	29
1.1.1 Epidemiologia e etiologia	29
1.1.2 Neuropatologia	30
1.1.3 Sintomatologia	34
1.1.4 Tratamento	35
1.2 ESPÉCIES VEGETAIS E O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS	42
1.2.1 Potencial emprego de plantas medicinais em doenças neurodegenerativas	43
1.3 <i>Ilex paraguariensis</i> : ESPÉCIE VEGETAL DE INTERESSE FARMACÊUTICO	44
1.3.1 Aspectos botânicos, sociais e econômicos	444
1.3.2 Aspectos químicos e farmacológicos	46
1.4 DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS	51
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO DE <i>Ilex paraguariensis</i> A. ST. HILAIRE.	55
2.1 INTRODUÇÃO	55
2.2 OBJETIVOS	588
2.2.1 Objetivo geral	588
2.2.2 Objetivos específicos	588
2.3 METODOLOGIA	59
2.3.1 Preparação e caracterização química do extrato de <i>Ilex paraguariensis</i>	599
2.3.1.1 Coleta da matéria-prima vegetal (MPV)	59
2.3.1.2 Preparação do extrato	59
2.3.1.3 Secagem do extrato	60
2.3.1.4 Caracterização química do extrato por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) acoplada à espectrometria de massas (EM) e detector de arranjo de diodos (PDA)	60
2.3.1.5 Validação da metodologia de quantificação por CLUE- PDA	61

2.3.2	Determinação do perfil antioxidante <i>in vitro</i>	62
2.3.2.1	Avaliação do potencial antioxidante reativo total (TRAP) e da reatividade antioxidante total (TAR)	62
2.3.2.2	Avaliação da capacidade de captação do radical hidroxila.....	63
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
2.4.1	Preparação e caracterização química do extrato de <i>Ilex paraguariensis</i>	63
2.4.2	Determinação do perfil antioxidante <i>in vitro</i> do extrato de <i>Ilex paraguariensis</i>	69
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARKINSONIANA <i>in vivo</i> DO EXTRATO DE <i>Ilex paraguariensis</i> A. ST. HILAIRE.....		75
3.1	INTRODUÇÃO	75
3.2	OBJETIVOS.....	78
3.2.1	Objetivo geral	78
3.2.2	Objetivos específicos.....	78
3.3	METODOLOGIA	79
3.3.1	Animais	79
3.3.2	Administração intranasal do MPTP	80
3.3.3	Protocolo experimental	80
3.3.4	Avaliação comportamental.....	81
3.3.4.1	Discriminação olfatória	81
3.3.4.2	Reconhecimento social	82
3.3.4.3	Splash teste	82
3.3.4.4	Nado forçado	83
3.3.4.5	Campo aberto	84
3.3.5	Avaliação neuroquímica.....	84
3.3.5.1	Determinação dos níveis cerebrais de dopamina por CLUE-EM.....	84
3.3.6	Análise estatística	86
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
3.4.1	Efeitos dos tratamentos sobre a função olfatória	86
3.4.2	Efeitos dos tratamentos sobre o desempenho cognitivo.....	88
3.4.3	Efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros emocionais	92
3.4.4	Efeitos dos tratamentos sobre a atividade motora ..	96
3.4.5	Efeitos dos tratamentos nos níveis cerebrais de dopamina.....	97
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		103

CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS	109
ANEXOS	145
ANEXO A – Publicação: The anti-inflammatory effect of <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy.	145
ANEXO B: Publicação: Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of <i>Ilex paraguariensis</i> leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS.....	155

APRESENTAÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) constituem um problema mundial de saúde pública, tanto nos países ricos quanto nos de média e baixa renda. No ano de 2015, cerca de 40 milhões das mortes ocorridas mundialmente foram atribuídas às DCNT. No Brasil, estudos recentes demonstram que as DCNT foram responsáveis por aproximadamente 72,6% das causas de mortes no ano de 2013 e 75% dos gastos com atenção à saúde no Sistema Único de Saúde – SUS (BRASIL, 2015; WORLD HEALTH STATISTICS, 2017).

Entre as DCNT, a doença de Parkinson (DP) é a segunda mais prevalente entre os idosos. Esta doença caracteriza-se por ser um transtorno neurodegenerativo com sintomas que incluem tremor, rigidez e bradicinesia, afetando profundamente a qualidade de vida dos portadores, como desconforto físico, perda de relações sociais, de trabalho e de lazer (NAKABAYASHI et al., 2008; MAHAJAN et al., 2016; PARKINSON'S DISEASE FOUNDATION, 2016).

O mecanismo com maior respaldo atualmente na literatura demonstra que estes sintomas são resultantes de uma disfunção extrapiramidal pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos. Paralelamente, hipóteses têm surgido na literatura sugerindo que a patogenia da DP decorre principalmente de fatores como estresse oxidativo (BLESA et al., 2015; MANOHARAN et al., 2016; ZHAO et al., 2017), inflamação (HIRSCH et al., 2012), disfunção mitocondrial (JIN et al., 2014) e proteólise alterada (SURMEIER et al., 2017), acarretando em morte neuronal por apoptose (JENNER; OLANOW, 2006; MASSANO; BATHIA, 2012).

Com a evolução do conhecimento acerca da fisiopatologia e sintomatologia no decurso temporal da DP, atualmente já são conhecidas outras disfunções não motoras que precedem os clássicos sintomas motores. Os sintomas não motores iniciais da DP são importantes para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico mais precoce, fato que parece ser essencial para o sucesso da farmacoterapia (BRAAK et al., 2004; CHAUDHURI; SCHAPIRA 2009; GRINBERG et al., 2010; PRASHANT et al., 2014; PALMERI et al., 2017).

Até o momento não existe cura para a DP. O tratamento farmacológico atualmente utilizado tem como objetivo diminuir os sintomas motores, proporcionando melhoria na qualidade de vida dos pacientes. Estas estratégias farmacológicas consistem basicamente no restabelecimento da disfunção dopaminérgica por meio da administração

de fármacos precursores de dopamina, como a levodopa (L-DOPA), agonistas dopaminérgicos, como a bromocriptina, inibidores da degradação de dopamina, como a selegilina e o tolcapone, bem como antagonistas colinérgicos (GIROUX, 2007; CONNOLLY; LANG, 2014; RASCOL et al., 2016).

Entre os fármacos citados anteriormente, a L-DOPA, descoberta na década de 1960, permanece como o tratamento farmacológico mais efetivo na DP (CONNOLLY; LANG, 2014). Todavia, a administração crônica deste fármaco leva ao desenvolvimento de significativos efeitos colaterais como distúrbios psiquiátricos, flutuações motoras e movimentos involuntários anormais, conhecidos como discinesias. A prevalência das discinesias em pacientes parkinsonianos tratados com L-DOPA durante os primeiros cinco anos é cerca de 50%, chegando a atingir 90% após o período de nove anos de tratamento (BHIDE et al., 2013). Adicionalmente, existem diversos efeitos colaterais agudos e tardios, como efeitos periféricos, sendo eles, distúrbios gastrintestinais, bradicardia, taquicardia, arritmia, boca seca e cefaleias; bem como efeitos centrais: ataxia, distúrbios motores e do sono, e deficiências cognitivo-psiquiátricas (KARIYA et al., 2005).

Diante dos significativos efeitos adversos citados e do caráter meramente paliativo da atual farmacoterapia, é possível perceber recentemente aumento no número de trabalhos epidemiológicos, clínicos e pré-clínicos, todos visando melhorar essas limitações. Dessa forma, o desenvolvimento de novas terapias baseadas em neuroproteção torna-se relevante, visto que ainda existe grande interesse na descoberta de novas substâncias realmente efetivas para este tipo de tratamento, e que poderiam representar tratamentos alternativos ou adjuvantes para o alívio dos sintomas motores e não motores da DP, com reduzidos efeitos colaterais e, principalmente, que pudessem impedir ou retardar o avanço do processo neurodegenerativo (CAMPOS et al., 2011; KOPULLA et al., 2012; FOLLMER; NETTO, 2013; JIN et al., 2014; ZHOU et al., 2015; DE FARIAS et al., 2016).

Paralelamente ao fato mencionado acima, tem sido observada uma tendência mundial à utilização de agentes terapêuticos de origem vegetal, porém com exigências de qualidade e segurança equivalentes aos medicamentos clássicos (POLETTTO et al., 2011). Dessa forma, a caracterização química de um extrato utilizando técnicas apropriadas confere qualidade ao produto intermediário, aspecto essencial para garantir um produto final estável, seguro e terapêuticamente eficaz (CHAN, 2003; BOOKER et al., 2016). O desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos é um segmento da pesquisa farmacêutica que

vem crescendo exponencialmente em nível mundial nos últimos anos (ZÖLLNER; SCHWARZ, 2013). Aliado a isso, a imensa biodiversidade da flora nativa brasileira demonstra potencial para colocar o país em destaque neste segmento da indústria farmacêutica (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010; DUTRA et al., 2016).

Plantas medicinais sempre forneceram alternativas terapêuticas importantes frente a uma série de doenças do SNC. *Ginkgo biloba* (CHRISTEN, 2004; SHI et al., 2010), *Panax ginseng* C.A. Mey (KIM et al., 2013), e algumas espécies dos gêneros *Passiflora* (DE-PARIS et al., 2001; REGINATTO et al., 2006; SENA et al., 2009) e *Valeriana* (FERNÁNDEZ et al., 2004) são exemplos de espécies vegetais que tiveram seu potencial farmacológico sobre o SNC comprovado cientificamente. Especificamente em relação à DP, *Panax ginseng* C.A. Mey (KIM et al., 2003; VAN KAMPEN et al., 2003; HU et al., 2011; BEAMER; SHEPHERD, 2012; VAN KAMPEN et al., 2014), *Ginkgo biloba* (KIM et al., 2004; KANG et al., 2007; ROJAS et al., 2008; 2009; JESCHKE et al., 2011) e *Mucuna pruriens* L. (DC) (KATZENSCHLAGER et al., 2004; PATHAK-GANDHI; VAIDYA, 2017) apresentam potencial antiparkinsoniano relatado na literatura.

Neste contexto, *Ilex paraguariensis* A. St. Hilaire, conhecida popularmente como erva-mate é uma espécie vegetal que se destaca por apresentar relatos na literatura de potenciais atividades antioxidante (SCHINELLA et al., 2000; VALERGA; RETA; LANARI, 2012), antiinflamatória (SCHINELLA et al., 2014; LUZ et al., 2016) e antiparkinsoniana (MILIOLI et al., 2007), além de estudos epidemiológicos demonstrando associação inversa entre o consumo de erva-mate e DP (GATTO et al., 2015). Dessa forma, *I. paraguariensis* apresenta-se como uma fonte vegetal com potencial para obtenção de um novo produto neuroprotetor para o tratamento da DP.

Com base nos dados anteriormente destacados, iniciou-se pesquisa nos Laboratórios de Farmacognosia e de Farmacotécnica, ambos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com o desenvolvimento e caracterização de um extrato hidroetanólico (EHE) a partir de folhas de *I. paraguariensis*. Para isso foi realizado um planejamento fatorial, visando a obtenção de um extrato com altos teores de compostos fenólicos e pronunciado potencial antioxidante. Esta etapa do planejamento faz parte da dissertação de mestrado da aluna Larissa Probst dos Santos (SANTOS, 2016), do Programa de Pós Graduação em Farmácia da UFSC, orientada pela professora Dra. Ângela Machado de Campos e coorientadora da presente Tese.

No presente estudo, a obtenção do extrato de folhas de *I. paraguariensis* foi realizada com base nos parâmetros estudados na dissertação mencionada anteriormente. Tais condições de extração foram otimizadas, considerando as diferenças nas características da matéria-prima vegetal utilizada. Este extrato foi caracterizado quimicamente por meio de Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), acoplado à espectrometria de massas (EM) e detecção de arranjo de diodos (DAD), sendo realizada a identificação dos compostos majoritários presentes no extrato, bem como a quantificação dos marcadores químicos selecionados.

Sequencialmente, foi realizado um estágio doutoral no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), através de colaboração estabelecida com o grupo de pesquisa liderado pelos professores Dr. José Claudio Fonseca Moreira e Dr. Daniel Pens Gelain. O estágio teve início em janeiro de 2015 e término em março do mesmo ano, tendo como meta principal a avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do EHE de *I. paraguariensis*.

A partir dos dados obtidos, a etapa subsequente do trabalho consistiu na avaliação dos efeitos da administração do extrato de *I. paraguariensis* em modelo animal da DP. Para isso foi estabelecida parceria com o grupo de pesquisa coordenado pelo professor Dr. Rui Daniel Prediger. Assim, esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON), do Departamento de Farmacologia da UFSC.

Dessa forma, esta tese foi organizada em três capítulos, os quais descrevem uma revisão bibliográfica sobre os aspectos relacionados à DP e o potencial emprego farmacêutico de *I. paraguariensis* nesta patologia (Capítulo I); a caracterização química e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato de *I. paraguariensis* (Capítulo II); e, por fim, a avaliação da atividade antiparkinsoniana *in vivo* do extrato hidroetanólico de *I. paraguariensis* (Capítulo III).

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: *Ilex paraguariensis* A. ST. HILAIRE E SEU POTENCIAL EMPREGO NA DOENÇA DE PARKINSON.

Nessa revisão de literatura serão abordados, em um primeiro momento, aspectos gerais relacionados à doença de Parkinson (DP), como epidemiologia, etiologia, neuropatologia, sintomatologia e tratamento. Sequencialmente serão apresentados dados a respeito da importância de espécies vegetais no desenvolvimento de medicamentos, especialmente com potencial farmacológico no sistema nervoso central (SNC). Por fim, serão abordados dados relativos à espécie *Ilex paraguariensis*, como aspectos botânicos, sociais, econômicos, químicos e farmacológicos.

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

1.1.1 Epidemiologia e etiologia

O aumento da expectativa de vida e o envelhecimento da população mundial é notável. No Brasil, a evolução das taxas de mortalidade, natalidade e fecundidade a partir de 1950 caracterizou o processo de transição demográfica e epidemiológica. De uma população predominante jovem em um passado nem tão distante, observa-se, nos dias atuais, um contingente, cada vez mais importante, de pessoas acima dos 65 anos de idade. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), atualmente, o percentual de pessoas nessa faixa etária é de 8,46% (IBGE, 2017). Paralelamente à transição demográfica, observa-se mudança nos padrões de morbimortalidade, com predomínio das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Tal cenário de crescimento das DCNT é ainda mais preocupante na população idosa, especialmente em função das alterações biológicas e sociais intrínsecas ao envelhecimento (BRASIL, 2010; DUARTE; BARRETO, 2012; VASCONCELOS; GOMES, 2012)

A doença de Parkinson (DP) destaca-se por acometer 0,1% da população mundial e 1% dos indivíduos a partir dos 60 anos, aumentando com o avanço da idade (FRITSCH et al., 2012). Assim, a DP é a segunda patologia mais prevalente entre os idosos, sendo que no Brasil, 3,3 % dos indivíduos com mais de 65 anos apresentam esta patologia (DORSEY et al., 2007; NAKABAYASHI, et al., 2008; BRASIL, 2010).

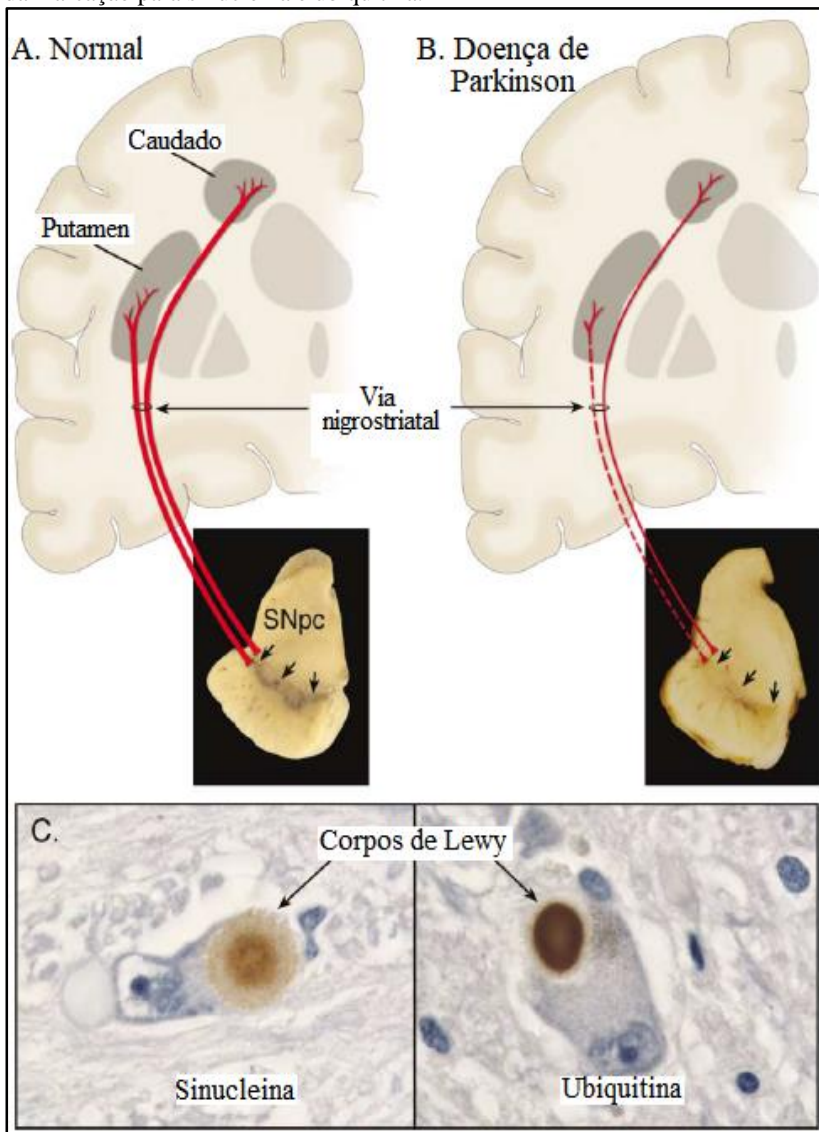
A etiologia primária da DP permanece desconhecida, entretanto, a sua característica multifatorial é consenso entre os pesquisadores. O envelhecimento representa o principal fator de risco para o surgimento da DP, e sua incidência aumenta com o avanço da idade. Além deste, outros fatores são considerados responsáveis pelo aumento desta patologia, como o histórico familiar e a exposição a contaminantes ambientais, tais como alguns tipos de metais, vírus e agrotóxicos (POSTUMA; MONTPLAISIR, 2009; COLLIER et al., 2011; POLITO et al., 2016).

1.1.2 Neuropatologia

A perda de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo é a principal característica neuropatológica da DP. Esta perda neuronal ocorre mais especificamente na região denominada substância negra parte compacta (SNpc), a qual projeta suas fibras dopaminérgicas para o estriado, localizado nos núcleos da base (Figura 1). Devido à neurodegeneração na SNpc, o estriado tem seus níveis de dopamina (DA) reduzidos, resultando em distúrbios motores (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Adicionalmente à redução de DA, pode ser observada também uma redução dos seus metabólitos, ácido homovanílico (HVA) e ácido 3,4-dihidroxiifenilacético (DOPAC), assim como na expressão de tirosina hidroxilase (TH) e DOPA-descarboxilase (DDC), enzimas envolvidas na sua síntese (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; PIFL; KISH; HORNYKIEWICZ, 2012).

De forma paralela à degeneração da via nigroestriatal, a presença de corpos de Lewy constitui um marcador neuropatológico de grande importância para o diagnóstico definitivo da DP, embora não seja específico para diferenciar as formas idiopática (sem etiologia definida) ou genética da doença. Os corpos de Lewy (Figura 1) consistem em inclusões citoplasmáticas nucleares formadas por agregados proteicos oxidados, nitrados e ubiquitinados, sendo que em sua constituição predomina a proteína α -sinucleína, além de ubiquitina, parvulina e neurofilamentos (EVERSE; COATES, 2005; GUERRERO et al., 2013). Estas inclusões citoplasmáticas também podem ser encontradas no cérebro de idosos normais, embora a presença dos corpos de Lewy tenha sido verificada em cerca de 85% dos pacientes clinicamente diagnosticados como portadores da DP. Diante disso, outras anormalidades celulares são indicadas por estarem envolvidas na neuropatologia da DP, como a excitotoxicidade glutamatérgica, disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo (YACOUBIAN; STANDAERT, 2009; CHINTA et al., 2013).

Figura 1 - Neuropatologia da doença de Parkinson (DP). Representação da via nigrostriatal A) normal; B) acometida pela DP; C) Presença de corpos de Lewy na substância negra parte compacta, evidenciados por imunohistoquímica através da marcação para sinucleína e ubiquitina.



Fonte: Adaptado de Dauer e Przedborski (2003).

O envolvimento do glutamato, um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central (SNC), tem sido apontado na neuropatologia da DP. Níveis extracelulares de glutamato superiores à taxa fisiológica ativam excessivamente os receptores N-metil D-Aspartato (NMDA), causando a excitotoxicidade glutamatérgica. Este fato envolve influxo de cálcio extracelular exacerbado, ativando enzimas dependentes de cálcio que participam do catabolismo de proteínas, fosfolípídeos e ácidos nucleicos, levando à disfunção mitocondrial, rompimento da membrana plasmática e alterações no citoesqueleto (GREENAMYRE, 2001; CAUDLE; ZHANG, 2009).

Os neurônios do corpo estriado recebem muitas aferências, predominando as glutamatérgicas, de áreas corticais, límbicas e talâmicas, além de aferências dopaminérgicas do mesencéfalo, tanto da parte compacta quanto da área tegumentar ventral da substância negra. Enquanto as sinapses glutamatérgicas servem como uma espécie de gatilho dos circuitos estriatais, as sinapses dopaminérgicas têm um papel modulatório sobre a neurotransmissão glutamatérgica (SCHIFFMANN et al., 2007).

Outro fator associado à neuropatogênese da DP é o estresse oxidativo, causado pela excessiva geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). EROs é um termo que inclui radicais livres e espécies não radicalares, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (OH^{\cdot}) e hidroperoxil (HO_2^{\cdot}). No intuito de manter sua integridade estrutural e funcional, as células aeróbicas, em seu metabolismo basal produzem constantemente EROs, as quais são continuamente inativadas pela ação de agentes antioxidantes endógenos, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa (GSH), glutationa peroxidase (GPx) e redutase (GR), além de antioxidantes exógenos, como a vitamina C e alguns compostos fenólicos. O estresse oxidativo é definido como um distúrbio no balanço pró/antioxidante, em favor do primeiro, podendo acarretar danos ao DNA, lise mitocondrial, influxo e desbalanço intracelular de cálcio, oxidação de proteínas, lipoperoxidação de membranas celulares e, conseqüentemente, danos celulares. Estes diferentes eventos celulares associados induzem a morte dos neurônios dopaminérgicos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; HALLIWELL, 2006; MOSLEY et al., 2006; HENCHCLIFFE; BEAL, 2008; ZHOU et al., 2008; JIN et al., 2014; BLESÁ et al., 2015).

De acordo com os dados citados acima, as EROs podem contribuir no processo de toxicidade neuronal e estão associadas as condições neuropatológicas agudas e crônicas. Além disso, o H_2O_2 produzido durante o processo redox, além de ser altamente solúvel, difusível e capaz

de atravessar a membrana celular é utilizado como fonte exógena de EROs (ZHU et al., 2005). Diante disso, o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese de doenças neurodegenerativas, como a DP tem sido muito investigado pela comunidade científica (PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014; BLESÁ et al., 2015; HERRERA et al., 2017; ZHAO et al., 2017).

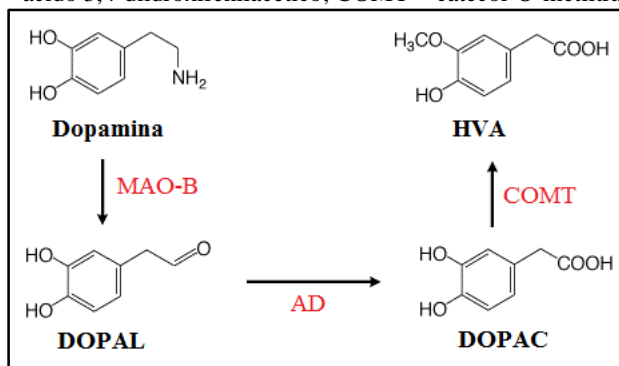
A análise de tecidos cerebrais *post-mortem* de pacientes portadores da DP forneceu evidências do estado de desbalanço oxidativo, sugerindo o estresse oxidativo como fator importante no processo de neurodegeneração da SNpc associada à DP. Anormalidades na atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e níveis de glutatona diminuídos na SNpc, por exemplo, parecem ser uma das primeiras mudanças bioquímicas observadas na doença. Também é observado um aumento da peroxidação lipídica nesta estrutura cerebral e aumento dos níveis de malondialdeído e 4-hidroxinonenal, produtos gerados pela peroxidação lipídica (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; HALD; LOTHARIUS, 2005; ZHOU et al., 2008; BLESÁ et al., 2015; MANOHARAN et al., 2016).

A longa duração de vida e o fato dos neurônios não se dividirem, podem contribuir para a vulnerabilidade seletiva das diferentes populações neuronais (GANDHI; ABRAMOV, 2012). Adicionalmente, durante o envelhecimento ocorre um desequilíbrio das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, com decorrente aumento do dano oxidativo e nitrosativo neuronal (CAMOUGRAND; RIGOULET, 2001; ROMANO et al., 2010). Outra hipótese interessante para a vulnerabilidade do cérebro, é que durante o processo de envelhecimento os neurônios dopaminérgicos da substância negra "*pars compacta*", apresentam um mecanismo autônomo que utilizam canais de cálcio, resultando em oscilações intracelulares do cálcio (WANG; MICHAELIS, 2010).

Adicionalmente, em relação à vulnerabilidade seletiva citada anteriormente, os neurônios dopaminérgicos são significativamente afetados. A dopamina, em condições fisiológicas normais, sofre oxidação não enzimática pelo oxigênio molecular transformando-se em H₂O₂ e quinonas. Enzimaticamente (Figura 2), a dopamina é majoritariamente desaminada pela monoamina oxidase-B (MAO-B), formando H₂O₂ e 3,4-dihidroxifenilacetaldéído (DOPAL). Este último, por sua vez é oxidado pela enzima aldeído desidrogenase (AD), formando DOPAC, o qual é metilado pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) originando HVA (HERRERA et al., 2017). Diante disso, a oxidação da dopamina

pode induzir vulnerabilidade seletiva dos neurônios dopaminérgicos e morte celular.

Figura 2 – Metabolismo enzimático da dopamina. MAO-B = monoamino oxidase B; DOPAL = 3,4-diidroxifenilacetaldeído; AD = aldeído desidrogenase; DOPAC = ácido 3,4-diidroxifenilacético; COMT = catecol-O-metiltransferase.



Fonte: Adaptado de Galvin (2006).

Desta forma, tanto a auto-oxidação da dopamina quanto o seu metabolismo enzimático envolvem a formação de H_2O_2 , que na presença do íon Fe^{2+} pode ser facilmente reduzido através da reação de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^-$), formando o radical hidroxila (OH^\cdot), espécie altamente reativa e capaz de reagir com macromoléculas celulares (HALD; LOTHARIUS, 2005). A catálise do radical hidroxila mediada pelo ferro pode ser um mecanismo patogênico chave que contribui com o estresse oxidativo observado na DP, visto que os níveis de ferro na SNpc não são maiores que em outras áreas do cérebro, mas estão aumentados nos pacientes com DP (AYTON et al., 2014; JIANG et al., 2017).

1.1.3 Sintomatologia

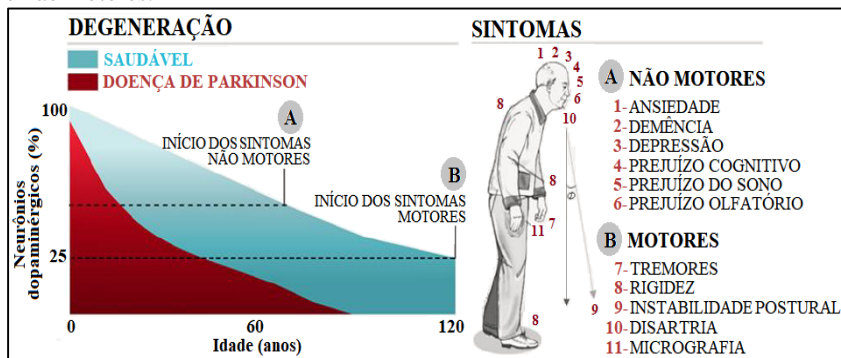
A DP caracteriza-se por apresentar sinais clínicos bastante evidentes, como distúrbios motores irreversíveis e incapacitantes, os quais incluem rigidez muscular, instabilidade postural, tremor em repouso, fraqueza muscular e escassez de movimentos voluntários. Todavia, estes critérios clínicos são desenvolvidos pelos pacientes parkinsonianos somente quando aproximadamente 60-70% dos neurônios da SNpc já estão degenerados e os níveis de DA reduzidos de 70 a 80% (PREDIGER et al., 2012). Dessa forma, o processo neurodegenerativo

está em estágio avançado quando o diagnóstico é estabelecido, fato que pode justificar a baixa eficácia clínica de substâncias e agentes neuroprotetores testados no tratamento da DP.

Embora os sintomas motores sejam os mais evidentes na DP, atualmente já são conhecidas outras disfunções e sintomas presentes em estágios mais precoces, precedendo o surgimento dos sintomas motores.

Nesse sentido, Braak e colaboradores (2003) introduziram uma nova visão sobre o decurso temporal da DP, apontando os sintomas não motores, o aparecimento dos sintomas olfatórios iniciais (hiposmia), sintomas cognitivos (perda de memórias operacionais) e emocionais (depressão e ansiedade), até o aparecimento das alterações motoras clássicas. Adicionalmente, a “*hipótese de Braak*” compreende também os processos patológicos subjacentes a cada estágio (Figura 3), além dos sintomas clínicos. Esses sintomas iniciais da DP são extremamente importantes para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico mais precoce, fato que parece ser essencial para o sucesso da farmacoterapia, sobretudo se considerarmos o avançado quadro degenerativo no aparecimento dos sintomas motores (OWEN, 2004; CHAUDHURI et al., 2011; PRASHANT et al., 2014).

Figura 3 – Principais características da doença de Parkinson: neurodegeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos e aparecimento dos sintomas motores e não motores.



Fonte: Adaptado de Aguiar; Prediger (2012).

1.1.4 Tratamento

Nos últimos 25 anos, os pacientes parkinsonianos tiveram um aumento considerável em suas opções de farmacoterapia disponíveis. O objetivo principal do tratamento farmacológico utilizado atualmente na

DP é restaurar a atividade dopaminérgica no SNC. Isso tem sido realizado através da administração de diferentes agentes farmacológicos, tais como o precursor da síntese de dopamina levodopa (L-DOPA), agonistas dos receptores dopaminérgicos (ex: bromocriptina e pramipexol), inibidores das enzimas que metabolizam a dopamina, catecol-O-metiltransferase (COMT) e monoaminoxidase B (MAO-B) (ex: entacapone e selegilina, respectivamente) e fármacos que aumentam a liberação de dopamina e/ou inibem sua recaptação, como a amantadina. Apesar de não atuarem diretamente sobre o sistema dopaminérgico, os fármacos anticolinérgicos (ex: biperideno e triexifenidil) auxiliam no restabelecimento temporário da neurotransmissão dopaminérgica por aumentarem a liberação de dopamina em terminais pré-sinápticos (GIROUX, 2007; CONNOLLY; LANG, 2014; RASCOL et al., 2016).

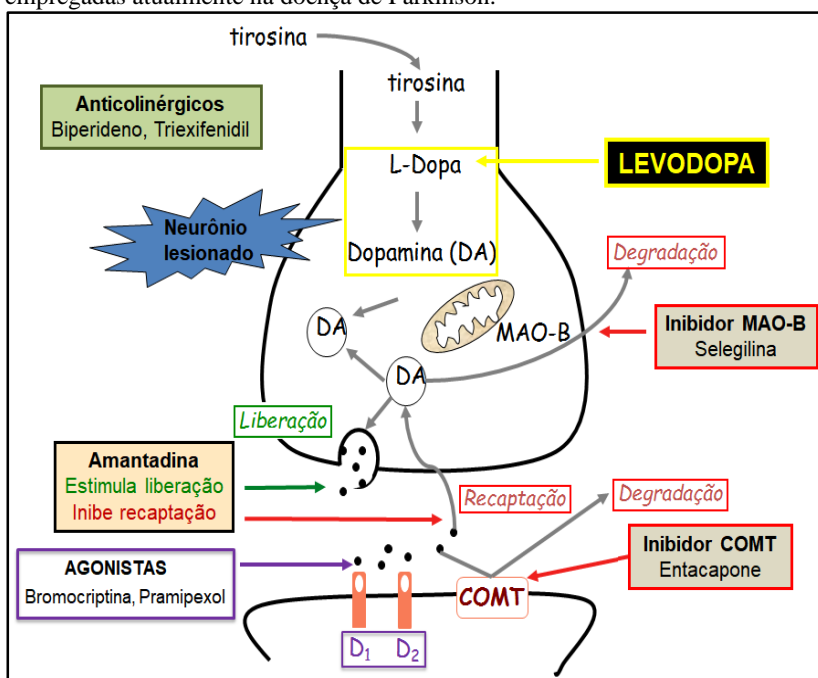
O tratamento medicamentoso, até a década de 1960, era limitado aos anticolinérgicos, os quais apresentam baixa eficácia e efeitos colaterais gastrointestinais e neuropsiquiátricos frequentes (KATZENSCHLAGER; POEWE, 2014). Um aumento impactante na qualidade de vida dos indivíduos com DP, com escores de incapacidade e mortalidade significativamente reduzidos, foi obtido com a introdução da L-DOPA em 1961. Apesar disso, existem limitações em seu emprego, pois após ser administrada, grande parte da L-DOPA sofre descarboxilação por enzimas da mucosa intestinal e em outros locais periféricos, fazendo com que apenas cerca de 1% do fármaco inalterado alcance o SNC (DURSO et al., 2000). Diante desse fato, a L-DOPA é geralmente associada a outros fármacos no tratamento farmacológico empregado na DP. Exemplos de sucesso dessa associação envolvem os fármacos carbidopa ou benserazida, os quais inibem a degradação periférica da L-DOPA pela enzima dopa descarboxilase. Tal associação permite uma redução da dose de L-DOPA necessária para atingir a concentração terapêutica adequada (FREITAS et al., 2016; KIANIRAD; SIMUNI, 2016; AQUILONIUS; NYHOLM, 2017).

A administração da L-DOPA está associada a um grande número de efeitos indesejáveis, como náuseas, vômitos e arritmia cardíaca, causados por sua degradação periférica. Efeitos importantes observados em longo prazo são o surgimento de discinesias (movimentos involuntários de contração muscular) e flutuações motoras. A indução de discinesias pode ser mais debilitante que a doença em si e faz com que muitos pacientes abandonem o tratamento com L-DOPA (RASCOL et al., 2003; GIROUX, 2007; RASCOL, 2010; OLANOW, 2015).

Os agonistas dopaminérgicos, como a bromocriptina e o pramipexol, usados como monoterapia tratam de forma eficaz os sintomas

motores. Estudos clínicos já evidenciaram que o uso precoce dessa classe de fármacos pode reduzir ou retardar as complicações motoras observadas com o uso da L-DOPA (RASCOL et al., 2010; 2011; STAYTE; VISSEL, 2014). Dessa forma, os agonistas dopaminérgicos podem ser considerados um tratamento inicial eficaz. No entanto, eles também apresentam alguns efeitos adversos como náuseas, vômitos, sonolência, quadros de alucinação e delírio (GIROUX, 2007; RASCOL, 2011; RIZEK et al., 2016).

Figura 4 – Representação esquemática das estratégias farmacológicas empregadas atualmente na doença de Parkinson.



Fonte: Adaptado de Singh; Pillay; Choonara (2007).

É possível destacar também a amantadina, um antagonista dos receptores NMDA para glutamato, que facilita a transmissão dopaminérgica no estriado, melhora os sintomas motores e reduz a severidade das discinesias. No entanto, este fármaco promove um grande número de efeitos colaterais como perda da libido, tonturas e confusão mental (RASCOL et al., 2014; PAHWA et al., 2015)

No Brasil, através das estratégias dos Componentes Básico e Especializado da Assistência Farmacêutica, a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (BRASIL, 2015) contempla alguns medicamentos para o tratamento da DP. Na Atenção Básica, no Anexo I da RENAME estão presentes as associações de levodopa/carbidopa e levodopa/benserazida. No Anexo III, por sua vez, são contemplados os fármacos amantadina, bromocriptina, entacapona e tolcapona, pramipexol e selegilina.

Cabe ressaltar que os medicamentos atualmente disponíveis apresentam-se como alternativa terapêutica paliativa da DP, pois a função dopaminérgica no SNC é restabelecida temporariamente. Os fármacos atuais não apresentam ação neuroprotetora sobre o processo de neurodegeneração, o qual continua sua progressão (GIROUX, 2007; CONNOLLY; LANG, 2014). Diante disso, outros tratamentos estão sendo investigados com o intuito de alcançar alternativas terapêuticas com maior eficácia. Alguns exemplos podem ser citados como os antagonistas dos receptores para adenosina, antagonistas dos receptores glutamatérgicos, agonistas dos receptores para serotonina, antagonistas dos receptores adrenérgicos, bloqueadores de canais de cálcio, quelantes de ferro, anti-inflamatórios, antioxidantes, entre outros (STAYTE; BRYCEVISSSEL, 2014).

Diante das evidências do envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da DP, a terapia com antioxidantes ou sua combinação com métodos de tratamento clássicos pode representar uma estratégia atrativa para a prevenção ou tratamento da neurodegeneração dopaminérgica estriatal (NAKAMURA; CHO; LIPTON, 2012; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014; BLESÁ et al., 2015; HERRERA et al., 2017; ZHAO et al., 2017).

A proteção conferida por antioxidantes exógenos, como as vitaminas C, D e E, as metilxantinas, os flavonoides e os ácidos fenólicos frente aos radicais livres pode ocorrer em diferentes aspectos. O primeiro mecanismo de defesa é impedir a geração dessas espécies, principalmente através da inibição das reações em cadeia com os íons metálicos (ferro e cobre), impedindo o dano lipídico, mitocondrial, proteico e do DNA, evitando assim a consequente morte celular. Adicionalmente, os antioxidantes podem atuar promovendo o reparo das lesões produzidas por espécies reativas, como reparo da molécula do DNA e a reconstituição de membranas celulares danificadas (KARDANI; ROY, 2015; KUMAR; ANILAKUMAR; NAVEEN, 2015; ARROZI et al., 2016; COSTA et al., 2016; CALVELLO et al., 2017; McBEAN; LÓPEZ; WALLNER, 2017; REGLODI et al., 2017).

Vários estudos já comprovaram que a cafeína e seus metabólitos possuem a capacidade de inibir o dano oxidativo induzidos por espécies reativas do oxigênio (COSTA et al., 2010; LEE, 2000; JOGHATAIE et al., 2004; PALACIOS et al., 2012; KARDANI; ROY, 2015; KHADRAWY et al., 2017). A cafeína, apontada como a substância psicoativa mais consumida no mundo, tem sido muito estudada em relação às suas propriedades sobre o SNC. No contexto do presente trabalho, estudos epidemiológicos têm demonstrado a relação inversa entre o consumo de cafeína e o risco de desenvolvimento da DP (ROSS et al., 2000; ASCHERIO et al., 2001; ASCHERIO et al., 2004; XU et al., 2006; COSTA et al., 2010; LIU et al., 2012; PALACIOS et al., 2012; QI; LI, 2013).

Baseado nesses resultados, muitos pesquisadores têm investigado os efeitos da cafeína na DP em estudos pré-clínicos. Em modelos animais utilizando a neurotoxina MPTP, o potencial neuroprotetor da cafeína foi demonstrado por diversos estudos (CHEN et al., 2001; 2007; 2008; 2010; PREDIGER, 2010; XU et al., 2002; 2010; 2016; BAGGA; PATEL, 2016). Chen e colaboradores (2001), por exemplo, demonstraram que a cafeína (5-30 mg/kg) reduziu de maneira dose-dependente a perda neuronal dopaminérgica no estriado de camundongos expostos ao MPTP, em diferentes protocolos (dose única e múltiplas doses de exposição à toxina). Adicionalmente, XU e colaboradores (2002) verificaram os efeitos da cafeína em camundongos lesionados com MPTP tratados diariamente com cafeína ou salina por mais de uma semana e os resultados obtidos mostraram que a administração diária de cafeína, em condições que produzem tolerância locomotora, não reduziu o efeito protetor da cafeína contra a toxicidade neuronal induzida pelo MPTP.

Em algumas das hipóteses apresentadas, a cafeína parece exercer uma ação central que melhora a atividade do sistema dopaminérgico. Segundo Chen e colaboradores (2007) a ação neuroprotetora da cafeína em modelo experimental da doença de Parkinson utilizando camundongos tratados com MPTP, induziu uma redução da perda dos neurônios dopaminérgicos estriatais, efeito que parece estar relacionado também ao bloqueio dos receptores de adenosina do tipo A2A.

Estudos fornecem fortes evidências experimentais de que os receptores A2A podem contribuir para a degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais enquanto, por outro lado, antagonistas desses receptores, como a cafeína, apresentam propriedades neuroprotetoras (XU et al., 2005; KALDA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2015; RIOS et al., 2016; XU et al., 2016).

O interesse na pesquisa de antagonistas de receptores de adenosina do tipo A2A como possível estratégia terapêutica não dopaminérgica para a DP tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, tanto em estudos pré-clínicos, como clínicos e epidemiológicos (CHEN et al., 2007; PREDIGER, 2010; PREDIGER et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015; XU et al., 2016).

Muitos antagonistas dos receptores A2A desenvolvidos exibem propriedades antiparkinsonianas, melhorando a atividade motora em modelos animais da DP e, em pacientes portadores da doença (LEWITT et al., 2008). A distribuição dos receptores A2A no estriado, o antagonismo molecular e as interações comportamentais entre os receptores da adenosina e da dopamina proporcionam uma base anatômica e neuroquímica para a observação clínica de que os antagonistas A2A melhoram a atividade motora na DP (CHEN et al., 2007; QI; LI, 2014).

Nesse sentido, é possível verificar a existência de estudos clínicos recentes avaliando a eficácia de alguns antagonistas de receptores A2A na terapia de algumas doenças. Embora alguns resultados tenham demonstrado algum sucesso, inúmeros fármacos falharam nesses ensaios clínicos. Especificamente para o tratamento da DP, até o momento, o único exemplo de sucesso é o fármaco Istradefylline, análogo da cafeína que está sendo testado no Japão e encontra-se em testes clínicos de fase 3 (para revisão ver STOCKWELL et al., 2017).

Behan e Stone (2002) demonstraram que o 8-(3-clorostiril)-cafeína (CSC), um antagonista específico dos receptores A2A derivado da xantina, assim como a cafeína, possui atividade protetora frente a danos excitotóxicos e danos causados por radicais livres, sugerindo que esses compostos podem agir prevenindo os danos neuronais resultantes de uma variedade de estímulos lesivos presentes na DP.

Em sua revisão, Pohanka (2015) descreve alguns efeitos farmacológicos previamente relatados para a cafeína, os quais sugerem o possível emprego dessa metilxantina na DP. Entre as atividades estão a inibição da enzima acetilcolinesterase (POHANKA; DOBES, 2013; POHANKA, 2014), o antagonismo de receptores de adenosina (SULLIVAN et al., 1995; PREDIGER 2010), e a inibição da enzima monoaminaoxidase (PETZER; PIENAR; PETZER, 2013; PETZER et al., 2014). Adicionalmente, o emprego da cafeína no tratamento da DP foi avaliada em estudo clínico de fase 3 (NCT01738178) (para revisão ver STOCKWELL et al., 2017).

Outro composto que tem sido estudado em relação às suas propriedades sobre o SNC é o ácido clorogênico (ACG). Mikami e

Yamazawa (2015) demonstraram a capacidade do ACG em inibir a morte neuronal induzida por glutamato em culturas celulares primárias do córtex cerebral de ratos. Adicionalmente, o ACG preveniu o aumento de concentrações intracelulares de Ca^{2+} causada pela adição de glutamato à cultura celular neuronal.

Teraoka e colaboradores (2012) avaliaram o potencial efeito protetor *in vitro* do ácido clorogênico na toxicidade dopaminérgica relacionada à α -sinucleína em cultura de células PC12 (derivadas de uma linhagem de tumor neuroendócrino da glândula adrenal de ratos, que exibem características de neurônios). Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que o ACG inibiu a oxidação da DA e a interação direta da DA oxidada a α -sinucleína, além de inibir a oligomerização da α -sinucleína em células.

Adicionalmente, Kwon e colaboradores (2010) demonstraram potencial neuroprotetor do ácido clorogênico nos déficits de memória e aprendizado induzidos por escopolamina (0,5 mg/kg, *i.p.*) em camundongos. No mesmo trabalho, em ensaios *in vivo* e *ex vivo*, o ACG inibiu a atividade da enzima acetilcolinesterase no hipocampo e córtex frontal, além de apresentar significativa atividade de captação de radicais livres e inibição da lipoperoxidação.

A neurodegeneração oxidativa induzida por H_2O_2 é conhecidamente um dos fatores envolvidos na etiologia da DP. Kim e colaboradores (2012) demonstraram que os pré-tratamentos com café, café descafeinado ou ácido clorogênico inibiram a apoptose neuronal induzida por H_2O_2 . O efeito neuroprotetor apresentado pelo café descafeinado foi similar ao café cafeinado, indicando que o ACG e outros compostos presentes no café exercem papel importante em tais benefícios sobre os neurônios.

A produção de quimiocinas pró-inflamatórias e ativação da micróglia contribui para a progressão da DP (MACHADO et al., 2016). Nesse sentido, Shen e colaboradores (2012), em ensaios *in vitro* e *in vivo*, evidenciaram que o ácido clorogênico suprimiu significativamente a produção de óxido nítrico e TNF- α na ativação da micróglia estimulada por lipopolissacarídeo, prevenindo a neurodegeneração dopaminérgica.

Considerando os dados apresentados anteriormente, o ácido clorogênico apresenta potencial benefício frente à degeneração de neurônios dopaminérgicos na DP.

Diante do exposto, o desenvolvimento de abordagens neuroprotetoras ou modificadoras da DP, paralelamente ao alívio sintomático permanecem relevantes. Todavia, é essencial enfatizar a complexidade envolvida no desenvolvimento de qualquer tipo de

abordagem para a DP, diante de sua natureza progressiva, do conjunto de sintomas motores e não motores, e dos próprios efeitos adversos do tratamento farmacológico.

1.2 ESPÉCIES VEGETAIS E O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

As espécies vegetais são utilizadas com finalidades terapêuticas desde os primórdios da humanidade. Apesar da produção de fármacos sintéticos ter impulsionado uma revolução na indústria farmacêutica, os medicamentos de origem natural continuam demonstrando sua importância médica e econômica. Ácido salicílico, atropina, efedrina, morfina, digoxina, taxol, vincristina e vimblastina são alguns exemplos de fármacos de amplo uso na prática clínica, ratificando a importância dos estudos com espécies vegetais (VERPOORTE, 2000; GILANI; RAHMAN, 2005; CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007; SHEN, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016).

O interesse em medicamentos derivados de plantas aumentou significativamente em todo o mundo. Entretanto, este interesse ocorre majoritariamente nos países desenvolvidos, com destaque para alguns países europeus, asiáticos e os EUA. Estima-se que o mercado global para esta classe de medicamentos alcance o montante aproximado de 27 bilhões de dólares por ano (DUTRA et al., 2016).

O Brasil está entre os dez maiores mercados farmacêuticos, tendo movimentado cerca de 28 bilhões de dólares em 2014, constituindo-se, portanto, em mercado atrativo para os sistemas nacional e internacional. Além disso, um fato a ser considerado é que o Brasil possui um grande diferencial competitivo: sua biodiversidade, a qual compreende mais de 55 mil espécies de plantas superiores (20-22% do total existente no planeta). Apesar dessa abundante biodiversidade e o grande interesse da população no uso da medicina tradicional, o mercado brasileiro de fitoterápicos é responsável por apenas cerca de 5% do mercado farmacêutico brasileiro. Portanto, a exploração desses recursos é uma estratégia para o desenvolvimento de produtos inovadores, especialmente se considerarmos que produtos naturais são a base da farmacoterapia moderna (DUTRA et al., 2016; NEWMAN; CRAGG, 2016).

1.2.1 Potencial emprego de plantas medicinais em doenças neurodegenerativas

A etnofarmacologia é uma ciência multidisciplinar que estuda a utilização de espécies vegetais para fins terapêuticos por parte de comunidades tradicionais, transformando em conhecimento científico o saber popular/tradicional. (ELISABETSKY, 2002; RODRIGUES; CARLINI, 2002; HEINRICH, 2014).

O potencial terapêutico de ação sobre o SNC demonstrado por algumas plantas por meio do conhecimento popular tem sido estudado por pesquisadores no mundo todo em diferentes modelos experimentais. Neste contexto, *Ginkgo biloba*, *Panax ginseng* e *Mucuna pruriens* L. (DC) podem ser citadas como exemplos de espécies vegetais com potencial frente a doenças neurodegenerativas como a DP (KIM et al., 2003; VAN KAMPEN et al., 2003; CHRISTEN, 2004; KATZENSCHLAGER et al., 2004; KIM et al., 2004; KANG et al., 2007; ROJAS et al., 2008; 2009; SHI et al., 2010; JESCHKE et al.; HU et al., 2011; BEAMER; SHEPHERD, 2012; VAN KAMPEN et al., 2014; PATHAK-GANDHI; VAIDYA, 2017).

No entanto, grande parte das plantas utilizadas tradicionalmente e que apresentam atividade no SNC permanecem sem a identificação do composto ou classe de compostos responsáveis por tal efeito, sendo que em alguns casos, pode ser atribuída a um sinergismo entre os diferentes metabólitos presentes na espécie (GURIB-FAKIM, 2006; CAMPOS et al., 2011).

É preciso destacar que uma grande parcela dos fármacos e medicamentos atualmente disponíveis para tratamento de desordens no SNC possuem efeitos colaterais indesejáveis, como hipotensão e sedação, além de potencial para dependência e abuso (FAVA; KENDLER, 2000; NESTLER et al., 2002; BROWN et al., 2007; NESTLER, 2013). Considerando também que doenças neurodegenerativas como a DP constituem um grande desafio social e econômico, com alto impacto sobre os sistemas de saúde pública em todo o mundo, o uso de espécies vegetais com ação no SNC, como propriedades ansiolíticas, por exemplo, já foram descritas como adjuvantes no tratamento dessas doenças, proporcionando melhora na qualidade de vida dos pacientes (CAMPOS et al., 2011).

Dessa forma, é importante ressaltar que a procura por novas terapias por parte da indústria farmacêutica mundial mantém-se relevante, especialmente porque o mercado de fitoterápicos é um mercado atrativo (CRAGG et al., 2012; MCCHESENEY et al., 2012; BOOKER et al., 2016; DUTRA et al., 2016).

1.3 *Ilex paraguariensis*: ESPÉCIE VEGETAL DE INTERESSE FARMACÊUTICO

Ilex paraguariensis, conhecida popularmente como erva-mate, é uma espécie vegetal que vem sendo utilizada há séculos por parcelas significativas das populações do sul do Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e, em menor escala, do Chile, na forma de infusão (chimarrão e chá-mate) ou maceração (tererê). Sua utilização popular está intimamente ligada ao fato dela apresentar propriedades diuréticas, digestivas e estimulantes do SNC (PIO-CORRÊA, 1978; ANTONI, 1995; BLUMENTHAL; BRINCKMANN, 2000; WICHTL, 2003).

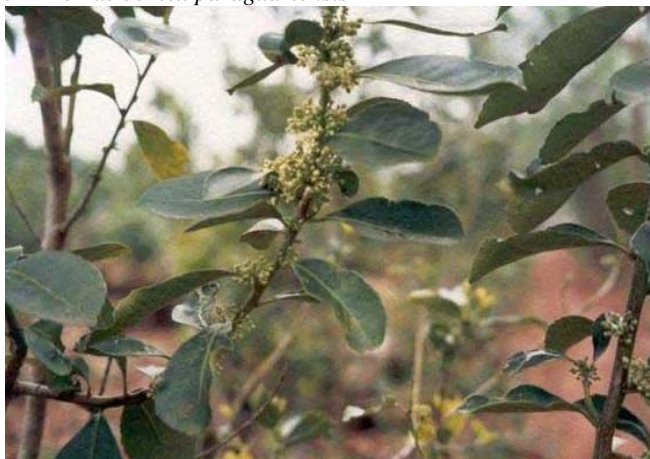
Sob o ponto de vista de inovação e desenvolvimento, a condução de estudos com extratos de erva-mate é bastante promissora. No mercado internacional, a oferta de matéria-prima para fins de produção em escala industrial é um dos gargalos enfrentados no desenvolvimento de um medicamento fitoterápico. Com isso, a existência de cultivo já amplamente estabelecido no sul do Brasil é outro fator que torna a erva-mate uma espécie vegetal promissora, com demanda garantida de matéria-prima para o setor industrial (VASCONCELOS, 2012).

1.3.1 Aspectos botânicos, sociais e econômicos

Ilex paraguariensis A. St. Hilaire (Aquifoliaceae) (Figura 5) é uma espécie arbórea classificada pelo naturalista francês August Saint Hilaire, em uma publicação de 1825, conforme documentado na obra Memórias do Museu de História Natural de Paris (CARVALHO, 1994). Amplamente distribuída pela América do Sul, esta espécie vegetal cresce em regiões subtropicais e temperadas da Argentina, Brasil, Paraguai e isoladamente em algumas regiões no Uruguai. No Brasil, *I. paraguariensis* tem ocorrência nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, mas sua maior área de distribuição ocorre no Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul (PIO-CORRÊA, 1978; CARVALHO, 1994; GIBERTI, 1995; TORMEN, 1995).

A erva-mate apresenta-se como uma árvore que cresce lenta ou moderadamente, podendo atingir até 25 metros de altura em seu habitat natural. Árvores com uma média de três a cinco metros de altura são encontradas em cultivo agrícola (PIO-CORRÊA, 1978; CARVALHO, 1994).

Figura 5 – Folhas de *Ilex paraguariensis*



Fonte: www.tropicos.org

A cultura agrícola da erva-mate é altamente relevante no sul do Brasil, Paraguai e Argentina, tendo em vista que suas folhas e ramos são matéria-prima para bebidas e chás, especialmente nas formas tradicionais de chimarrão e tererê. Descoberta pelos índios e adotada posteriormente por colonizadores, a cultura de utilização da erva-mate representa uma forte expressão cultural nas regiões onde é nativa. Estima-se que mais de um litro dessas bebidas por dia seja ingerido por aproximadamente 30% da população na América do Sul (PASINATO, 2004; HECK; DE MEJIA, 2007).

O mercado da erva-mate, até pouco tempo, era limitado às regiões produtoras, visto que o setor ervateiro comercializava a matéria-prima vegetal quase que exclusivamente na sua forma tradicional de chimarrão (VALDUGA, 2002; VASCONCELOS, 2012; OLIVEIRA; WAQUIL, 2015). Mais recentemente, a indústria ervateira passou a concentrar esforços na ampliação do mercado da erva-mate lançando novos produtos, como os compostos de erva-mate e o chá aromatizado. Adicionalmente, as indústrias química e farmacêutica passaram a demandar maiores quantidades desta matéria-prima, visando à obtenção de produtos de higiene e beleza, os quais utilizam a essência de erva-mate em formas farmacêuticas e cosméticas, tais como cremes e sabonete líquido (DE MEJIA, 2007; CARDOZO-JUNIOR; MORAND, 2016).

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015), o valor da produção de *I. paraguariensis* no extrativismo vegetal brasileiro atingiu em 2015 um montante de

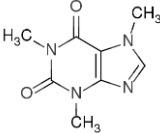
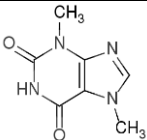
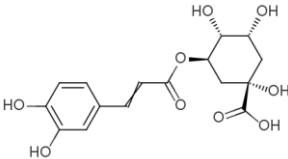
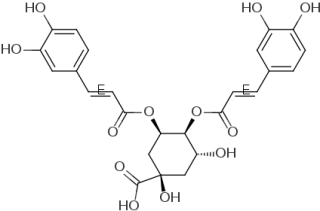
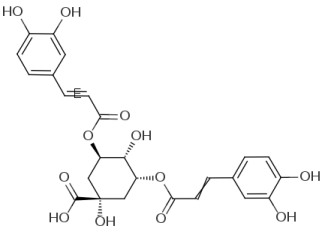
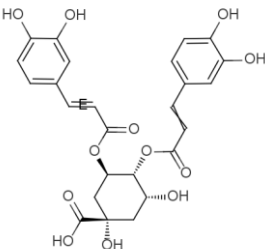
aproximadamente 400 milhões de reais. Considerando também que 99,9% da produção está concentrada na região sul do Brasil, este valor denota a importância econômica da cultura da erva-mate nesta região, especialmente se considerarmos que é esta espécie é cultivada por pequenos agricultores.

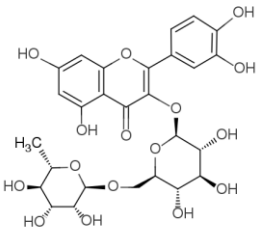
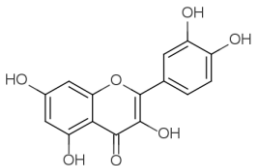
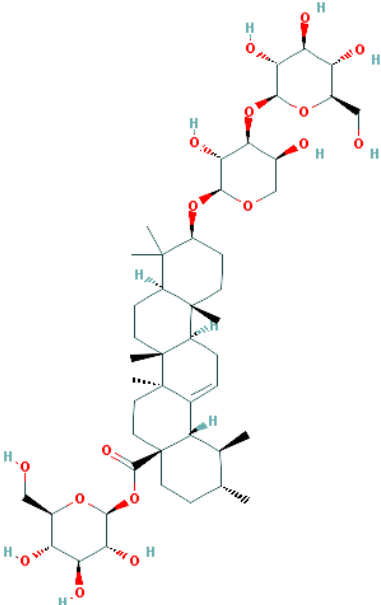
Outro fato a ser destacado é que a cadeia produtiva de plantas medicinais é altamente agregadora de valor. Esta cadeia produtiva apresenta um preço médio de USD 41,10 por kg no comércio exterior, enquanto que um bom referencial, que é a soja e derivados, tem valor de USD 0,23 por kg. Um método comparativo de potencial do setor, empregado em economia, é o coeficiente de agregação de valor na cadeia, que medido para estes dois itens, plantas medicinais e soja, é respectivamente, de 16,24 e 2,22 (ZUANAZI; MAYORGA, 2010). Considerando que a cadeia produtiva do mate é realizada basicamente por pequenos agricultores, a possibilidade de aumentar o valor agregado ao produto, além da importância econômica, pode gerar uma melhora na qualidade de vida desses produtores.

1.3.2 Aspectos químicos e farmacológicos

A composição química de *I. paraguariensis* é bastante complexa, sendo que diversos grupos de metabólitos secundários já foram descritos para a espécie (Quadro 1), como as metilxantinas, cafeína e teobromina (FILIP et al., 1998; REGINATTO et al., 1999) e os ácidos fenólicos, os quais encontram-se em grande concentração nesta espécie vegetal (FILIP et al., 2001; DE SOUZA et al., 2011), como o ácido clorogênico, neoclorogênico, os ácidos 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico, além do ácido tricafeoilquínico. Adicionalmente, estão presentes os flavonoides rutina, quercetina e glicosídeos de quercetina (RICCO; WAGNER; GURNI, 1991; FILIP et al., 2001; DE SOUZA et al., 2011) e as saponinas (SCHENKEL; MONTANHA; GOSMANN, 1996; SUGIMOTO et al., 2009; DE SOUZA et al., 2011).

Quadro 1 - Principais metabólitos secundários das folhas de *Ilex paraguariensis*

CLASSE	COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA
Metilxantinas	Cafeína	
	Teobromina	
Ácidos fenólicos	Ácido clorogênico	
	Ácido 3,4-dicafeoilquínico	
	Ácido 3,5-dicafeoilquínico	
	Ácido 4,5-dicafeoilquínico	

Flavonoides	Rutina	
	Quercetina	
Saponinas	Matesaponina 1	

Além das propriedades estimulantes do SNC ligadas ao uso popular, cabe destacar que outras atividades farmacológicas já foram investigadas para *I. paraguariensis*, tais como as atividades antioxidante (GUGLIUCCI; STAHL, 1995; SCHINELLA et al., 2000; FILIP et al., 2000; 2007; VALERGA; RETA; LANARI, 2012; BOAVENTURA et al., 2015; OH et al., 2016); antiparkinsoniana (MILIOLI et al., 2007), anti-

inflamatória (PIMENTEL et al., 2013; SCHINELLA et al., 2014; LUZ et al., 2016; MUÑOZ-CULLA et al., 2016), antiviral (MÜLLER et al., 2007; LÜCKEMEYER et al., 2012); antiobesidade (STEIN et al., 2005; PANG; CHOI; PARK, 2008; GAMBERO; RIBEIRO, 2015; KIM et al., 2015); antidiabética (OLIVEIRA et al., 2008; GUGLIUCCI et al., 2009; KLEIN et al., 2011; PEREIRA et al., 2012; BOAVENTURA et al., 2013) e anticarcinogênica (RAMIREZ-MARES; CHANDRA; DE MEJIA, 2004; DE MEJIA et al., 2010; PÉREZ et al., 2014). A literatura também tem demonstrado que o consumo de erva-mate pode evitar a dislipidemia, reduzindo o colesterol sérico e os triglicerídeos, contribuindo para a prevenção de aterosclerose (WILHELM-FILHO; DA SILVA, 2006; BRACESCO et al., 2011; GOSMANN et al., 2012; MOSIMANN).

Apesar da ampla produção, da complexidade química já estabelecida, assim como dos relatos de diversas propriedades farmacológicas, existem poucos estudos que descrevam propriedades neurofarmacológicas de *I. paraguariensis*. Um destes estudos foi realizado por nosso grupo de pesquisa (SANTOS et al., 2015), no qual foram demonstradas as atividades tipo-ansiolítica, estimulante e nootrópica do extrato hidroetanólico de folhas de erva-mate administrados via oral. Os resultados obtidos no tratamento crônico com o extrato hidroetanólico indicaram um efeito tipo-ansiolítico, aumento da atividade motora e da atividade da acetilcolinesterase. Além disso, o tratamento agudo com o extrato aquoso foi capaz de prevenir o déficit de memória induzido por escopolamina no teste tipo *step-down*.

Colpo e colaboradores (2007) verificaram efeito neuroprotetor e redução da discinesia orofacial do extrato aquoso de *I. paraguariensis* em ratos submetidos ao modelo de indução de déficit de memória induzida por haloperidol. Os animais receberam tratamento crônico (sem restrição) com o extrato preparado por infusão de amostra comercial de erva-mate.

O efeito tipo-antidepressivo de *I. paraguariensis* foi demonstrado em estudo realizado por Reis e colaboradores (2014), onde ratos Wistar que receberam extrato aquoso (dose estimada em 2,31g/Kg/dia *ad libitum*) durante quatro semanas apresentaram redução significativa do tempo de imobilidade no teste do nado forçado, semelhante ao grupo tratado com selegilina (10 mg/Kg, *i.p.*). Os autores descartaram um possível envolvimento da inibição da MAO no efeito tipo-antidepressivo observado, visto que a atividade da enzima não foi alterada pelo tratamento. Adicionalmente, os resultados obtidos no teste do campo aberto permitiu aos autores inferir que tal efeito não estava associado à atividade locomotora.

A presença dos compostos fenólicos é referenciada como responsável pela atividade antioxidante observada para a erva mate (FILIP et al., 2000; PERES et al., 2013; BOADO et al., 2015). Além do efeito antioxidante, compostos fenólicos parecem exercer atividade do tipo ansiolítica em camundongos (VIGNES et al., 2006; BOUAYED et al., 2007; BOUAYED, 2010). Kwon e colaboradores (2010) demonstraram efeito antioxidante e neuroprotetor do ácido clorogênico em camundongos com prejuízo de memória de curta duração induzida por escopolamina (0,5 mg/kg, *i.p.*), avaliada no teste do labirinto em Y e no teste do labirinto aquático de Morris. O ácido fenólico inibiu significativamente a atividade da enzima acetilcolinesterase e diminuiu os níveis de malondialdeído no hipocampo e córtex frontal em ensaio *ex vivo*. Adicionalmente, os autores demonstraram inibição *in vitro* da atividade da acetilcolinesterase ($IC_{50}=98,17$ ug/mL) e atividade de captação de radicais livres ($IC_{50}=3,09$ ug/mL) de maneira dose-dependente.

Considerando que o ácido clorogênico é um dos compostos majoritários da erva-mate, os resultados demonstrados no parágrafo anterior sugerem o envolvimento deste ácido fenólico na pronunciada ação antioxidante relatada para esta espécie vegetal.

No que tange à atividade antiparkinsoniana, Milioli e colaboradores (2007) constataram que o extrato hidroalcoólico (50%) de erva-mate apresentou atividade antiparkinsoniana em dois modelos animais de DP. No modelo comportamental de tratamento com a neurotoxina MPTP (40 mg/kg *s.c.*), o extrato administrado via *i.p.* em camundongos foi capaz de prevenir a hipolocomoção induzida pela neurotoxina nas doses de 250 e 500 mg/kg. No modelo de catalepsia induzida por reserpina, o extrato administrado via *i.p.* foi capaz de reverter os efeitos de enrijecimento dos membros também nas duas doses testadas (250 e 500 mg/kg). Os autores sugeriram que o efeito observado estaria relacionado a alta concentração de fenólicos totais presentes no extrato. Diante dos resultados observados, os pesquisadores sugeriram que o extrato hidroalcoólico de *I. paraguariensis* poderia proteger a degeneração neuronal que ocorre na DP, através de sua capacidade antioxidante, atribuída ao teor de compostos fenólicos totais, o que inclui os flavonoides rutina e quercetina.

No ano seguinte, Prediger e colaboradores (2008) demonstraram melhora cognitiva em roedores após a administração oral e intraperitoneal de extrato hidroalcoólico (50%) de erva-mate nas doses de 62,5, 125 e 250mg/Kg, verificando diferente modulação na aprendizagem e memória de curto e longo prazo. Os resultados indicaram melhora da memória de

curto prazo em doses intermediárias e prejuízo da memória de longo prazo ou nenhum efeito em doses mais elevadas. Os autores sugeriram ainda que essa diferença poderia estar associada à ação do extrato em diferentes estruturas cerebrais e/ou à interação com diferentes sistemas neurotransmissores. Por outro lado, os autores sugeriram a necessidade de pesquisas adicionais para determinar exatamente os mecanismos moleculares e sítios anatômicos envolvidos na mediação dos efeitos do extrato hidroalcoólico de *I. paraguariensis* nos processos de aprendizagem e memória. Apesar disso, os autores especularam que a cafeína, através do bloqueio não específico de receptores de adenosina, possa ter sido responsável pelos resultados observados, uma vez que a administração de cafeína isoladamente (1 ou 10mg/Kg) e em associação com o extrato (1mg/Kg de cafeína e 62,5mg/Kg de extrato) apresentou resultados semelhantes sobre memória social dos animais.

Considerando ainda o papel do estresse oxidativo na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas como a DP, assim como a alta concentração de compostos fenólicos em *I. paraguariensis*, é importante lembrar da potencial atividade antioxidante demonstrada pela erva-mate em diversas investigações tanto *in vitro* quanto *in vivo* (GUGLIUCCI; STAHL, 1995; SCHINELLA et al., 2000; FILIP et al., 2000; 2007; VALERGA; RETA; LANARI, 2012). Os efeitos antioxidantes verificados nestes estudos também demonstraram correlação com a presença de compostos fenólicos, que constituem algumas das principais classes de compostos fenólicos presentes em espécies vegetais, e são amplamente conhecidos por seus efeitos benéficos relacionados ao estresse oxidativo (MUSHTAQ; WANI, 2013).

Kang e colaboradores (2013) verificaram que o flavonoide quercetina inibe fortemente a metilação de levodopa mediada pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) *in vitro*. Considerando que entre as novas estratégias terapêuticas propostas para alcançar a neuroproteção na DP, estão incluídas substâncias captadoras de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e moléculas anti-inflamatórias, como os compostos fenólicos, espécies ricas nesses compostos constituem ferramentas promissoras para o tratamento da DP (AQUILANO et al., 2008).

1.4 DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

A caracterização e padronização de um medicamento fitoterápico agrega valor tecnológico ao desenvolvimento de formas farmacêuticas à base de plantas medicinais, garantindo a qualidade e a eficácia do

medicamento, além de diferenciá-las daquelas formas farmacêuticas contendo somente o material vegetal moído. A padronização do extrato por processos tecnológicos adequados é um passo crucial na manutenção dos seus ativos na produção em larga escala, garantindo consequentemente, a constância da ação farmacológica desejada (CHAN, 2003; BOOKER et al., 2016).

O processo extrativo é, literalmente, o processo de retirada das substâncias e frações ativas contidas na matéria-prima vegetal (MPV), obtendo-se a solução extrativa ou extrato. Padronizar e controlar a etapa de extração é essencial para garantir efetividade e reprodutibilidade, uma vez que esta delimita a constituição química do produto preparado. Entre os diversos métodos extrativos existentes e que podem ser empregados em escala industrial, estão a maceração e a percolação, os quais são os mais utilizados em decorrência da sua simplicidade e baixo custo de execução (BASSANI; PETROVICK, 2016). Por outro lado, é possível observar a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de extração, mais rápidos e eficientes, mediante a crescente demanda por produtos fitofarmacêuticos.

Nesse contexto, o processo de extração por força de cisalhamento, também conhecido por turboextração deve ser considerado. Este método utiliza força mecânica para facilitar a extração através de dois mecanismos: redução do tamanho de partícula da matéria-prima e quebra das células vegetais. A redução do tamanho de partícula facilita o acesso do solvente à matéria-prima vegetal pelo aumento da área de superfície disponível para extração sólido-líquido. Já a quebra das células vegetais facilita o processo de difusão dos componentes químicos do interior das células para o meio extrativo. Isso permite a preparação de extratos altamente concentrados em um curto período de tempo, quando comparado a métodos tradicionais como a maceração. A turboextração pode ser realizada em equipamentos denominados ultra homogeneizadores. Este é constituído por um sistema rotor-estator, onde o rotor está localizado na parte interna da haste de extração, o qual promove a sucção mecânica da suspensão planta-solvente por pequenas aberturas do estator fixo (DE SOUZA et al., 2010).

Outra ferramenta tecnológica amplamente utilizada no contexto do delineamento de fitoterápicos é a transformação das soluções extrativas em produtos secos. A produção de extratos secos representa um atrativo para a indústria farmacêutica, uma vez que conferem ao material maior estabilidade físico-química e microbiológica, e maior facilidade de manuseio e estocagem. Através da modificação de algumas características do processo de secagem, e também do uso de adjuvantes,

é possível alterar e controlar algumas propriedades do pó obtido, como: aparência, tamanho médio das partículas, distribuição do tamanho, densidade aparente, densidade da partícula, porosidade, fluidez, estabilidade, solubilidade, retenção de atividade, aroma e sabor. Os extratos secos podem ser obtidos por diversas técnicas de secagem, dentre as quais se destaca a liofilização, o qual realiza a remoção da água por sublimação, através do congelamento do extrato fluido e o emprego de vácuo (BASSANI; PETROVICK, 2016).

A determinação de marcadores químicos apresenta importância significativa para o controle de qualidade dos produtos e processos na cadeia de produção de um medicamento fitoterápico. A RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, define marcador como uma substância ou classe de substâncias utilizada como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do fitoterápico, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico. O marcador pode ser do tipo ativo, quando relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo, ou analítico, quando não demonstrada, até o momento, sua relação com a atividade terapêutica.

Entre as diferentes metodologias analíticas existentes para a avaliação dos marcadores químicos, destacam-se as técnicas cromatográficas, as quais são altamente sensíveis, como a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, empregadas tanto para fins de identificação dos componentes da matriz, quanto para o doseamento.

Outro requisito é que o método escolhido deve ser validado para demonstrar que é apropriado para a finalidade pretendida. Para o registro de fitoterápicos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014, exige dos fabricantes os métodos para o controle de qualidade. De acordo com a Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, a validação deve demonstrar, de forma documentada e mediante critérios objetivos, que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade que se destina. Para tanto, o método deve ter definido os seguintes parâmetros: linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limites de quantificação e de detecção, exatidão e especificidade. Além da legislação brasileira, outros documentos oficiais, como os descritos pelo ICH (International Conference on Harmonisation) Q2 (R1) (2005) descrevem os parâmetros que devem ser avaliados para validação de um método analítico.

CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO EXTRATO DE *Ilex paraguariensis* A. ST. HILAIRE.

2.1 INTRODUÇÃO

Devido à grande diversidade química de sua composição, as plantas medicinais permanecem sendo amplamente estudadas como importante fonte de produtos para a saúde humana. O avanço terapêutico dos fitoterápicos é grande, principalmente pelo fato de associarem o conhecimento popular ao desenvolvimento tecnológico. Seguindo este pensamento, o futuro dos fármacos, oriundos de espécies vegetais, requer a caracterização química e desenvolvimento de métodos qualitativos e quantitativos que possam contribuir para uma eficiente descoberta, desenvolvimento e comercialização de fitoterápicos (CHAN, 2003; CRAGG et al., 2012; BOOKER et al., 2016).

Para a caracterização de um material vegetal, técnicas cromatográficas são as mais utilizadas, com a execução de múltiplas determinações, para que possa garantir com exatidão a estabilidade da composição química dos extratos, garantindo também a constância da atividade do extrato. Para isso, a validação do processo analítico deve garantir, através de evidências experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados gerados (RENGER, 2000; KLEIN et al., 2009).

Nesse contexto, a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) pode ser considerada para inúmeras possibilidades. Um dos focos principais dos estudos sobre erva-mate envolve o conhecimento de compostos presentes em extratos produzidos a partir das suas folhas, e a avaliação de suas propriedades antioxidantes. A ampla gama de efeitos benéficos reportados, principalmente o antioxidante, tornam os extratos de *I. paraguariensis* uma potencial alternativa terapêutica futura no tratamento de desordens que contemplam o estresse oxidativo na sua patogênese (SCHINELLA et al., 2000; VALERGA; RETA; LANARI, 2012).

A relação entre o estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas tem sido bastante abordado pela comunidade científica (BLESA et al., 2015; COBB; COLE, 2015; KENNEDY et al., 2012; MANOHARAM et al., 2016; ZHAO et al., 2017). O consumo de O₂ apresentado pelo cérebro é cerca de 10 vezes maior que outros tecidos, bem como a presença de defesas antioxidantes insuficientes, são apontadas como possíveis causas deste órgão ser um dos principais alvos do estresse oxidativo

(HALLIWELL, 2006; SULTANA et al., 2013). Assim, o SNC necessita de alternativas de defesa antioxidante principalmente de origem exógena. A elevada quantidade de mitocôndrias, com alta capacidade oxidativa, responsáveis pelo aumento da produção de EROs, apresenta-se como outra razão que comprova a necessidade de uma maior proteção antioxidante para o cérebro (KUDIN et al., 2005; HERRERA et al., 2017). No processo de ativação da fosforilação oxidativa mitocondrial ocorre uma liberação aumentada do radical ânion superóxido (O_2^-) o qual sofre a ação da enzima superóxido dismutase (SOD) produzindo H_2O_2 , alterando, conseqüentemente, o balanço redox das células neuronais (MALINSKA et al., 2010).

As enzimas MAO-A e MAO-B desempenham um papel muito importante no catabolismo oxidativo dos neurotransmissores incluindo a serotonina, dopamina e epinefrina (EDMONDSON et al., 2009). A dopamina e seus precursor (L-DOPA), bem como a serotonina e norepinefrina, sofrem auto-oxidação, aumentando O_2^- , H_2O_2 , quinonas e semiquinonas que induzem a diminuição dos níveis de glutathione reduzida (GSH) (WANG; MICHAELIS, 2010).

Adicionalmente ao aumento do H_2O_2 decorrente da disfunção mitocondrial e do metabolismo de neurotransmissores, o tecido neuronal apresenta elevadas quantidades de ferro, fato que torna favorável a Reação de Fenton, onde o H_2O_2 é convertido em radical hidroxil ($HO\cdot$), uma das EROs mais deletérias aos sistemas biológicos (HALLIWELL, 2006; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010). Vale ressaltar que ferro é um cofator essencial para muitas proteínas envolvidas na função normal do neurônio. Entretanto, alterações no metabolismo desse metal de transição, contribuem para o aumento do dano oxidativo, agregação de proteínas, principalmente α -sinucleína, bem como a formação de produtos finais de glicação avançada nas células neuronais (ZHANG et al., 2016). Esses metais de transição também aceleram a lipoperoxidação (LPO) (HALLIWELL, 2006). Dessa forma, o aumento da formação de radicais livres e ERs associado à excitotoxicidade e inflamação contribuem para a progressão das doenças neurodegenerativas (ZHANG et al., 2016).

As reações citadas anteriormente, aliadas aos altos níveis de ácido graxos poli-insaturados nas membranas neuronais contribuem para iniciação e propagação do processo de LPO. Tal processo facilita a formação de radicais livres que atacam diretamente as membranas neuronais e induzem a oxidação de produtos dos ácidos graxos poli-insaturados, especialmente o ácido araquidônico e o ácido docosaenoico (HALLIWELL, 2006; SULTANA et al., 2013). A peroxidação desses compostos produz uma série de compostos, como o

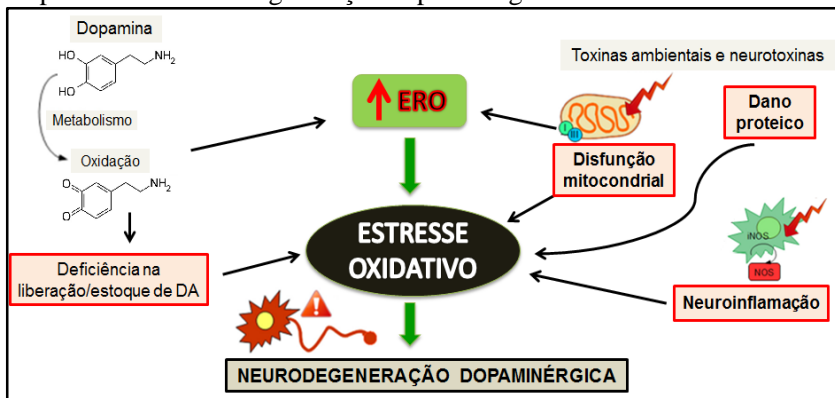
malondialdeído e o 4- hidroxinonal os quais afetam diretamente a homeostase neuronal contribuindo assim para a disfunção cerebral (PERLUIGI et al., 2012).

É amplamente aceito pela literatura científica que a eficácia terapêutica de uma espécie vegetal geralmente está relacionada não somente a um simples composto ou grupo de compostos, mas por vários grupos de constituintes, e até mesmo o sinergismo entre eles. Neste caso a análise química deve ser confirmada não somente por um simples composto, mas caracterizada de forma mais completa possível (CAPASSO et al., 2000; GERTSCH, 2011).

Conforme previamente descrito na revisão da literatura, apresentada no Capítulo 1 da presente tese, os compostos fenólicos e as metilxantinas são os metabólitos de maior importância identificados na espécie vegetal *I. paraguariensis*, sendo apontados como responsáveis pelas atividades farmacológicas de interesse para esse trabalho. Dessa forma, a caracterização química do extrato desenvolvido, bem como a quantificação dos compostos majoritários, torna-se relevante para o controle de qualidade e para a melhor compreensão acerca da atividade farmacológica detectada.

Vale ressaltar também o envolvimento do estresse oxidativo na evolução da DP (Figura 6), o qual é decorrente do aumento da produção de EROs causado por múltiplos fatores, tais como: metabolismo dopaminérgico; deficiência na liberação e/ou estoque de dopamina; toxinas ambientais e neurotoxinas; disfunção mitocondrial; dano proteico e neuroinflamação. Diante disso, espécies vegetais com pronunciada ação antioxidante apresentam potencial para serem estudadas em modelos experimentais da DP, na busca de agentes capazes de cessar ou atenuar o progresso da neurodegeneração (RAMASSAMY, 2006; HENCHCLIFFE; BEAL, 2008; ZHOU et al., 2008; KOPULLA et al., 2012; JIN et al., 2014; BLESÁ et al., 2015; DEY et al., 2015).

Figura 6 - Esquema representativo do envolvimento do estresse oxidativo no processo de neurodegeneração dopaminérgica.



Fonte: Adaptado de Blesa e colaboradores (2015).

Diante disso, este capítulo aborda a caracterização fitoquímica do extrato hidroetanólico das folhas de *I. paraguariensis*, bem como o desenvolvimento e validação da metodologia analítica empregada na quantificação dos marcadores químicos escolhidos.

Adicionalmente, o presente capítulo descreve a investigação do perfil antioxidante *in vitro* do EHE extrato de *I. paraguariensis*. Esta parte do trabalho foi realizada em um estágio doutoral no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob supervisão do Professor Dr. Daniel Pens Gelain.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Caracterizar quimicamente o extrato hidroetanólico (EHE) de folhas de *Ilex paraguariensis* e investigar seu potencial *in vitro* sobre parâmetros de estresse oxidativo.

2.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente o EHE das folhas de *I. paraguariensis* em relação aos perfis qualitativo e quantitativo

por cromatografia líquida de ultra eficiência, com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas;

- Desenvolver e validar metodologia de CLUE/PDA e CLUE/EM para identificar e quantificar os compostos majoritários no EHE das folhas de *I. paraguariensis*.
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato de *I. paraguariensis* através dos ensaios do potencial antioxidante reativo total (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR), e atividade de captação do radical hidroxila;

2.3 METODOLOGIA

2.3.1 Preparação e caracterização química do extrato de *Ilex paraguariensis*

2.3.1.1 Coleta da matéria-prima vegetal (MPV)

Partes aéreas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. foram coletadas no município de Erechim, Rio Grande do Sul, em outubro de 2012. A identificação botânica foi realizada pela Professora Branca Maria Aimi Severo e material testemunho está depositado no Herbário da Universidade de Passo Fundo (RSPF 11074). As folhas foram imediatamente congeladas, liofilizadas e moídas em moinho de facas. Posteriormente, a MPV foi fracionada de acordo com a faixa granulométrica usando tamises com abertura de malha de 1,0 mm. A MPV resultante desta fração granulométrica foi armazenada a -20 °C até o momento da preparação do extrato.

2.3.1.2 Preparação do extrato

A matéria prima vegetal (MPV) foi extraída por turbulização durante 5 minutos, utilizando como líquido extrator (LE) etanol 20° GL com uma relação MPV:LE de 1:5 (m/v). Após a filtração, o etanol foi eliminado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, sendo posteriormente dividido em duas partes. Uma parte foi congelada e submetida à liofilização para secagem completa, originando o extrato hidroetanólico (EHE), ou extrato bruto (EB) A outra parte foi particionada com *n*-butanol, originando as frações butanólica (FrBuOH) e residual aquosa (FrRAq). Vale ressaltar que, somente o EHE foi o extrato utilizado em todos os ensaios realizados e descritos na presente tese. As frações

FrRAq e FrBuOH, oriundas do fracionamento descrito anteriormente, bem como o EB foram utilizadas no estudo que avaliou a atividade anti-inflamatória em um modelo animal de pleurisia, realizado em coautoria com a Farmacêutica Ana Beatriz Gobbo Luz (LUZ et al., 2016). Este trabalho foi publicado (Anexo A) e fez parte da dissertação de mestrado também desenvolvida e já apresentada no Programa de Pós-graduação em Farmácia da UFSC.

2.3.1.3 Secagem do extrato

O etanol presente no extrato líquido foi eliminado sob pressão reduzida em evaporador rotatório. Essa solução foi congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e liofilizada durante 48 horas (LD1500, Terroni) a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob pressão constante, após estabilização do sistema. Posteriormente, o extrato seco EHE foi armazenado em dessecador.

2.3.1.4 Caracterização química do extrato por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas e detector de arranjo de diodos

O perfil químico do extrato do EHE foi determinado por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), em sistema Acquity™ (Waters, MA, USA), acoplada à espectrometria de massas (EM) de alta resolução (Xevo G2 QToF model), equipado com fonte de ionização eletro spray. Os dados foram adquiridos pelo software MassLynx v.4.1. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram ajustados da seguinte maneira: ionização em modo negativo; voltagem do capilar, 2,0 kV; temperatura da fonte, $90\text{ }^{\circ}\text{C}$; temperatura de dessolvatação, $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, fluxo do gás de nebulização, 30 L/h; fluxo do gás de dessolvatação, 600 L/h e voltagem do cone de 40 V. Os espectros foram adquiridos na faixa entre 100 a 1000 m/z com tempo de intervalo de aquisição de 0,5 s.

Adicionalmente à CLUE/EM, a identificação dos compostos majoritários foi realizada através de CLUE com detector de arranjo de diodos (DAD) em sistema Acquity™ (Waters, MA, USA), bomba quaternária, desgaseificador e injetor automático. O método empregou uma coluna Waters BEH C18 ($1,7\text{ }\mu\text{m}$, $50 \times 2,1\text{ mm}$) mantida a 40°C , com um gradiente de fase móvel de ácido fórmico/água, pH 2,5 (A) e acetonitrila (B), programado da seguinte maneira: de 0 a 5 min, gradiente linear de A-B (97:3 v/v) para A-B (90:10 v/v); de 5 a 6 min, isocrático A-B (90:10) v/v); de 6-9 min, gradiente linear para A-B (80:20 v/v) e de 9-

10 min, gradiente linear para A-B (10:90 v/v). O fluxo foi mantido constante em 0,3 mL/min e o volume de injeção foi de 5 µL.

Os picos foram caracterizados pela comparação do tempo de retenção, espectro de UV e por co-injeção da amostra com substâncias químicas de referência. Como amostras autênticas foram utilizadas as metilxantinas cafeína e teobromina, os ácidos fenólicos, ácido clorogênico, ácido 4-O-cafeoilquínico, e o flavonoide rutina. Todas as substâncias químicas de referência foram adquiridas da Sigma-Aldrich® Co. (St. Louis, EUA). Através de CLUE/DAD foram quantificados os compostos cafeína, ácido clorogênico e rutina. A cafeína foi quantificada a 280 nm, enquanto os compostos fenólicos ácido clorogênico e rutina foram quantificados a 320 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a área do pico foi mensurada. Os extratos foram analisados na concentração de 500 µg/mL, e os resultados foram expressos em miligramas do composto por grama de extrato (mg composto/g extrato).

2.3.1.5 Validação da metodologia de quantificação por CLUE-PDA

Os procedimentos analíticos foram validados de acordo com diretrizes internacionais preconizadas (ICH-GUIDELINE, 2005). Os parâmetros avaliados foram especificidade, faixa de linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD).

A especificidade foi avaliada utilizando-se a co-injeção com as substâncias de referência disponíveis, e através da ferramenta pureza do pico determinada pelo espectro fornecido pelo detector por arranjos de diodos.

A faixa de linearidade compreende o intervalo no qual é possível obter resultados dequados para o componente da amostra e proporcionais à concentração do analito, levando em consideração a precisão e a exatidão do método. Foram construídas curvas de calibração das substâncias químicas de referência, em triplicata, utilizando oito diferentes concentrações, nas faixas: 0,05 – 50 µg/mL para a cafeína; 0,05 – 100 µg/mL para o ácido clorogênico; e 0,25 - 50 µg/mL para a rutina. As equações de regressão foram “ $y = 39,320x + 2074,9$ ” para a cafeína, “ $y = 46,696x - 1896$ ” para o ácido clorogênico, e “ $y = 15,618x + 178,92$ ” para a rutina. Dessa forma, a linearidade foi avaliada pelo cálculo de regressão linear baseado no coeficiente de correlação linear (r^2).

Em relação à precisão, foram determinadas a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade foi obtida através da injeção em triplicata, no mesmo dia, de três concentrações dos padrões, sendo uma

concentração do extremo inferior, uma do extremo superior e uma intermediária da curva analítica. A precisão intermediária foi avaliada em triplicata, em três dias diferentes através da injeção de uma concentração intermediária da faixa da curva de calibração. Os dois níveis avaliados demonstram seus resultados através do desvio padrão relativo (DPR) em porcentagem.

A exatidão foi avaliada através de ensaio de recuperação, que consiste na adição da substância de referência ao extrato. Para isso, amostras foram contaminadas com os padrões em concentrações intermediária considerando a faixa de trabalho da curva analítica de cada substância de referência. Os padrões, as amostras sem a adição dos padrões e as amostras contaminadas foram analisadas em triplicata. O cálculo da porcentagem (%) de recuperação foi realizado através da aplicação da equação 1, onde $A_{Am + Pad}$ corresponde à área do pico da amostra contaminada com o padrão; A_{Am} é a área do pico da amostra não contaminada e A_{Pad} corresponde à área do pico do padrão.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{A_{Am + Pad} - A_{Am}}{A_{Pad}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

O parâmetro de sensibilidade compreende a determinação do limite de quantificação e detecção. O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser medida com uma precisão especificada. Usualmente, é avaliado pelo desvio padrão relativo (DPR). O limite de detecção é a menor concentração do analito que produz resposta considerada detectável. Normalmente é avaliada através da relação sinal:ruído, em uma proporção 3:1 (CASS; DEGANI, 2001; ICH, 2005).

2.3.2 Determinação do perfil antioxidante *in vitro*

2.3.2.1 Avaliação do potencial antioxidante reativo total (TRAP) e da reatividade antioxidante total (TAR)

O potencial antioxidante reativo total (TRAP) foi determinado de acordo com Dresch et al. (2009) e Lissi et al. (1995), por meio da reação entre uma fonte geradora de radical peróxil, o AAPH e luminol, produzindo quimioluminescência. Uma solução de reação contendo AAPH (10 mM) e luminol (4 mM) em tampão glicina (100 mM, pH 8,6) foi incubada a 21 °C por duas horas. Posteriormente, o extrato de *I. paraguariensis* (5 µg/mL), Trolox (1 µM) ou veículo (água destilada)

foram adicionados ao sistema. O perfil do TRAP foi obtido pela medida da quimioluminescência em um cintilador líquido. Para calcular a área sob a curva, os resultados foram transformados em porcentagem. Uma menor área significa um maior potencial antioxidante total. O TAR, índice determinado pela medida do decaimento inicial da quimioluminescência, foi calculado pela razão entre I_0 e I , onde I_0 é a emissão inicial de quimioluminescência e I a medida da instantânea quimioluminescência após a adição das amostras ou Trolox.

2.3.2.2 Avaliação da capacidade de captura do radical hidroxila (OH⁻)

O efeito do extrato de *I. paraguariensis* na captura do radical hidroxila (OH⁻) proveniente da degradação da 2-desoxirribose foi avaliada de acordo com Lopes e colaboradores (1999). O extrato foi adicionado ao sistema reacional, constituído por 2-desoxirribose (2-DR), sulfato ferroso (60 mM), H₂O₂ (1 mM) e tampão fosfato (20 mM, pH 7,2), sendo incubado à temperatura ambiente durante 10 minutos. Em seguida, foram adicionados ácido fosfórico (4%) e ácido- 2-tiobarbiturico (TBA 1%) em solução hidróxido de sódio (50 mM). A reação foi aquecida a 95 °C em banho maria por 15 minutos. Após resfriamento, foi realizada leitura em comprimento de onda de 532 nm. As análises foram efetuadas em triplicata, e os resultados expressos em percentual de degradação da 2-desoxirribose (% 2-DR) comparados ao controle.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção e caracterização química do extrato de *I. paraguariensis*, bem como a validação da metodologia analítica para quantificação dos marcadores químicos encontram-se publicadas nos periódicos *International Immunopharmacology* (Volume 36, 2016, Páginas 165-172) (Anexo A) e *Data in Brief* (Volume 8, 2016, Páginas 295-29) (Anexo B).

2.4.1 Preparação e caracterização química do extrato de *Ilex paraguariensis*

A caracterização do extrato torna-se um passo crucial no direcionamento e manutenção das suas propriedades farmacológicas,

considerando a complexidade química da erva-mate e a influência da variabilidade quali e quantitativa (CHAN, 2003).

Na cadeia produtiva de fitoterápicos, uma das mais importantes etapas é o processo de transformação da matéria-prima vegetal (MPV) em insumo farmacêutico ativo, o extrato. O processo extrativo tem por finalidade a retirada, da forma mais seletiva e completa possível, dos compostos biologicamente ativos contidos na MPV. Diante disso, a escolha de um líquido extrator eficiente, seletivo e adequado tecnologicamente é essencial, sendo facilmente eliminado, além de apresentar baixa toxicidade para o ser humano.

Neste trabalho, empregou-se o processo de extração por força de cisalhamento, a turboextração. Este método utiliza força mecânica para facilitar a extração através de dois mecanismos: redução do tamanho de partícula da MPV e quebra das células vegetais. Isso permite a preparação de extratos altamente concentrados em um curto período de tempo, quando comparado a métodos tradicionais como a maceração (DE SOUZA et al., 2010). Arend e colaboradores (2011) utilizaram a maceração como método extrativo de folhas *Cecropia glaziovii* visando extrair altos teores de ACG. Entretanto, mantendo constantes todos os outros parâmetros de extração, os autores observaram uma redução nos níveis do ACG com o aumento do tempo de extração de 4 para 8 dias. De fato, o longo período de contato entre o solvente e o material vegetal, característicos desta técnica de extração, pode resultar em degradação química, enzimática ou microbiológica desse composto. Adicionalmente, Da Silveira e colaboradores (2014), utilizando a infusão como método de extração, avaliaram a extração do flavonoide rutina a partir de folhas de erva-mate. Entre outros fatores, os autores avaliaram em seu trabalho, o tempo de extração (3 a 15 min) e a temperatura (58 a 90 °C), evidenciando que o aumento de ambos os fatores resulta em menor teor de rutina nas soluções extrativas.

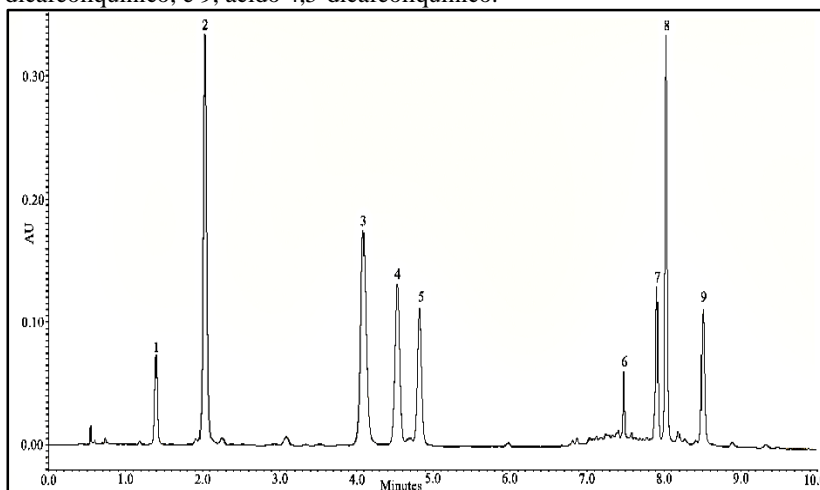
Outro parâmetro de qualidade considerado importante na obtenção de extratos vegetais é a granulometria. A extração dos metabólitos presentes em diferentes MPVs tem relação direta com a área superficial e, conseqüentemente, com o contato com o líquido extrator. O elevado cisalhamento, característico da turbo-extração, reduz e padroniza o tamanho das partículas durante o processo extrativo, diminuindo a influência deste parâmetro sobre a qualidade da extração. Neste estudo, a amplitude de tamanho de partícula da MPV foi minimizada, diante do fracionamento de acordo com a faixa granulométrica, sendo descartada a fração de partículas da MPV com diâmetro superior a 1,0 mm.

Uma das principais formas de secagem de extratos é a liofilização, cujo mecanismo envolvido é a sublimação da água do extrato líquido congelado através da utilização de vácuo. Considerando sua utilização como forma farmacêutica intermediária, os extratos secos apresentam inúmeras vantagens quando comparados aos extratos líquidos, como aumento da estabilidade, aumento na homogeneidade de distribuição dos constituintes da preparação e maior precisão na pesagem.

A caracterização do extrato seco foi realizada através da identificação da composição química e quantificação das substâncias majoritárias, etapa importante para o controle de qualidade de extratos vegetais (LI et al., 2008).

A Figura 7 mostra o cromatograma do EHE das folhas de *I. paraguariensis*, com detecção em 280 nm, enquanto os parâmetros de identificação de cada composto estão sintetizados na Tabela 1.

Figura 7: Cromatograma do EHE das folhas de *I. paraguariensis* por CLUE/DAD com detecção em 280nm. 1, teobromina; 2, ácido 3-*O*-cafeoilquínico; 3, ácido 5-*O*-cafeoilquínico; 4, cafeína; 5, ácido 4-*O*-cafeoilquínico; 6, rutina; 7, ácido 3,4-dicafeoilquínico; 8, ácido 3,5-dicafeoilquínico, e 9, ácido 4,5-dicafeoilquínico.



Fonte: desenvolvido pelo autor.

As análises realizadas por CLUE-PDA e CLUE-EM permitiram a identificação de nove compostos majoritários no extrato de *I. paraguariensis*, as metilxantinas, cafeína e teobromina, os ácidos fenólicos, ácido 3-*O*-cafeoilquínico, ácido 5-*O*-cafeoilquínico (ácido

clorogênico), ácido 4-*O*-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico, e o flavonoide rutina.

Tabela 1: Características de identificação dos compostos fenólicos e metilxantinas do EHE de *Ilex paraguariensis*.

Pico	Identificação	TR (min)	λ_{\max}	[M-H]	Erro/mDa	^a Referência
1	Teobromina	1.4	272	n.d.		SQR
2	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	2.05	325-296	353.0903	-3,1	(An et al, 2013; Dartora et al, 2011)
3	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	4.1	325-296	353.0903	-1.3	SQR; (Granica et al, 2015; Dartora et al, 2011)
4	Cafeína	4.55	273	n.d.		SQR
5	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico	4.85	325-296	353.0903	0.3	SQR; (Granica et al, 2015; Dartora et al, 2011)
6	Rutina	7.5	353-255	609.1376	-5,4	SQR; (An et al, 2013; Dartora et al, 2011)
7	Ácido 3,4-dicafeoilquínico	7.91	325-296	515.1198	-2.0	(Li et al, 2015; Dartora et al, 2011)
8	Ácido 3,5-dicafeoilquínico	8.05	325-296	515.1152	-6.9	(Li et al, 2015; Dartora et al, 2011)
9	Ácido 4,5-dicafeoilquínico	8.52	325-296	515.1105	-10.2	(Li et al, 2015; Dartora et al, 2011)

n.d. – não detectado

^a Identificação baseada no espectro de massas, perfil cromatográfico e dados da literatura.

SQR – Substância química de referência

A determinação de um marcador químico é significativamente importante com vistas ao controle de qualidade, tanto de produtos intermediários como os extratos secos, quanto para a forma farmacêutica final de um medicamento fitoterápico. A escolha do marcador químico está relacionada a diversos fatores e, preferencialmente, mas não obrigatoriamente, à atividade farmacológica pretendida ao fitomedicamento (LI et al., 2008). Neste trabalho, a escolha dos

marcadores químicos para o extrato hidroetanólico de *I. paraguariensis* levou em consideração os compostos majoritários de cada uma das classes apontadas como responsáveis pelas principais propriedades farmacológicas de interesse para esse trabalho, como as atividades antioxidante e sobre o SNC, sendo eles a cafeína, o ácido clorogênico e a rutina. Os teores dos marcadores químicos presentes no extrato estão apresentados na Tabela 2, e serão apresentados em forma de Anexo por estarem publicados em um artigo (Anexo A) realizado em coautoria e serem parte de dissertação de mestrado também desenvolvida e já apresentada no Programa de Pós-graduação em Farmácia da UFSC pela Farmacêutica Ana Beatriz Gobbo Luz (LUZ et al., 2016).

Tabela 2 – Teor dos marcadores químicos no extrato de *Ilex paraguariensis*.

	Cafeína (mg/g)	Ácido clorogênico (mg/g)	Rutina (mg/g)
Extrato	29,3 ± 0,06	67,5 ± 0,3	12,4 ± 0,04

Os teores foram determinados por CLUE-PDA e os dados são valores de média ± D.P (N = 3) expressos como mg/g de extrato.

Adicionalmente à escolha dos marcadores químicos, outro requisito essencial para o controle de qualidade, é a validação dos métodos analíticos empregados. A validação fornece uma evidência documentada de que o método é confiável para aquilo que se aplica (LANÇAS, 2008). Neste trabalho, por se tratar de métodos analíticos que empregam matrizes vegetais, a validação consistiu em uma série de procedimentos onde os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de quantificação e limite de detecção (CASS; DEGANI, 2001; ICH, 2005). Os parâmetros avaliados estiveram de acordo com o preconizado pela literatura (Tabela 3).

A faixa de linearidade foi calculada a partir dos coeficientes de correlação linear, obtidos através da equação da reta da curva analítica, a partir de injeções em triplicata das oito diferentes concentrações de cada substância de referência, nas faixas: 0,05 – 50 µg/mL para a cafeína ($r^2 = 1$); 0,05 – 100 µg/mL para o ácido clorogênico ($r^2 = 0,9999$); e 0,25 - 50 µg/mL para a rutina ($r^2 = 0,9999$). As equações de regressão foram “ $y = 39,320x + 2074,9$ ” para a cafeína, “ $y = 46,696x - 1896$ ” para o ácido clorogênico, e “ $y = 15,618x + 178,92$ ” para a rutina. Todos os coeficientes de correlação linear obtidos demonstram que o método apresenta faixa linear satisfatória e dentro da especificação, demonstrando que os

resultados são proporcionais às concentrações da faixa testada, o que garante a eficiência da metodologia desenvolvida.

Tabela 3: Parâmetros validados no métodos analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência para quantificação de cafeína, ácido clorogênico e rutina no extrato hidroetanólico de *I. paraguariensis*.

Composto	Precisão ^a				Exatidão ^b (Recuperação)		LQ ^c (µg/mL)	LD ^c (µg/mL)
	Repetibilidade		Precisão intermediária		Média (%)	D.P.R. (%)		
	Média (µg/mL)	D.P.R. (%)	Média (µg/mL)	D.P.R. (%)				
Cafeína	0.05	3.17	10.00	1.01	100.9	1.07	0.05	0.015
	10.00	0.26						
	50.00	0.34						
Ácido clorogênico	0.05	4.77	50.00	1.02	99.5	1.17	0.05	0.01
	50.00	3.49						
	100.00	0.18						
Rutina	0.25	4.07	10.00	1.68	97.6	1.53	0.25	0.01
	10.00	3.37						
	50.00	0.82						

^a: Limite: Desvio Padrão Relativo (D.P.R.) < 5%

^b: A porcentagem de recuperação foi determinada através da injeção em triplicata de amostras contaminadas com soluções de referência.

^c: LQ = limite de quantificação; LD = limite de detecção

A precisão é utilizada para avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, tendo como resultado o desvio padrão relativo (DPR) entre as análises. A precisão foi determinada em dois níveis, repetibilidade e precisão intermediária. A partir da análise dos resultados expressos na tabela 3, é possível verificar que todos encontram-se abaixo de 5%, limite considerado pela AOAC (2002) adequado para a concentração em questão. Sendo assim, é possível considerar o método preciso perante as exigências estabelecidas.

A exatidão foi avaliada a partir do ensaio de recuperação, o qual utilizou as concentrações 10, 50 e 10 µg/mL de cafeína, ácido clorogênico e rutina, respectivamente para realizar as análises. Os resultados obtidos expressos na tabela 5 demonstram a exatidão do método. Segundo AOAC (2002), a faixa de recuperação recomendada para analitos de origem vegetal com alguma atividade biológica ou nutricional, em concentração na faixa de 10 µg.mL⁻¹, encontra-se entre 80 e 115%.

A especificidade do método foi avaliada a partir da co-injeção da amostra com as substâncias químicas de referência. Dessa forma, foi

possível observar o aumento proporcional das áreas dos picos correspondentes a cada padrão. Outra forma utilizada para a determinação do mesmo parâmetro foi a verificação do grau de pureza dos picos relativos aos padrões, a qual é possível devido à utilização do detector DAD. O detector referido fornece informações a partir da análise do espectro de UV-Vis dos picos, possibilitando concluir sobre sua pureza. Com base nas duas técnicas descritas, foi possível verificar que o método possui especificidade para as substâncias de interesse, ou seja, o método é capaz de quantificar o composto de interesse sem a interferência de outras substâncias (co-eluição).

O limite de detecção é responsável por determinar a menor quantidade de analito detectável em uma amostra com confiabilidade, enquanto que o limite de quantificação se refere à menor concentração do analito presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis como base em condições preestabelecidas (ICH - GUIDELINE, 2005). Os resultados encontrados (Tabela 3) demonstram que o método apresenta boa sensibilidade.

2.4.2 Determinação do perfil antioxidante *in vitro* do extrato de *Ilex paraguariensis*

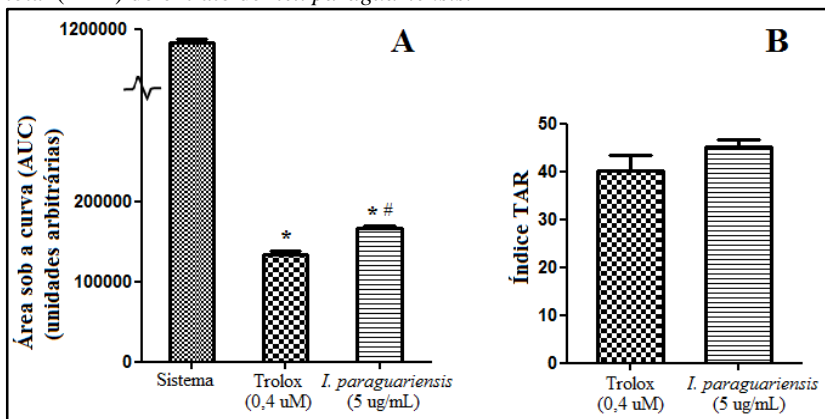
O estresse oxidativo é um dos principais mecanismos propostos para a neurodegeneração ocorrida na DP (JENNER, 2003; ZHOU; HUANG; PRZEDBORSKI, 2008). Este fenômeno é resultante da excessiva produção de EROs, excedendo a capacidade antioxidante celular. O metabolismo da dopamina, por exemplo, origina inúmeras moléculas pró-oxidantes, causando grande exposição dos neurônios dopaminérgicos, principalmente da substância negra ao estresse oxidativo. Adicionalmente, fatores como o envelhecimento do cérebro, predisposição genética, disfunção mitocondrial e exposição a toxinas ambientais desencadeiam grande produção de espécies reativas, diminuindo os níveis de antioxidantes endógenos como a glutatona, causando dano ao DNA, a proteínas e lipídeos na SNpc (LOTHARIUS et al., 2005; HENCHCLIFFE; BEAL, 2008; ZHOU; HUANG; PRZEDBORSKI, 2008; HERRERA et al., 2017).

O TRAP do extrato de *I. paraguariensis* foi avaliado através da quantificação da intensidade da quimiluminescência gerada pela reação de termólise entre radicais peroxilas e o luminol. Nesta técnica, a decomposição térmica do AAPH resulta na formação de radicais peroxilas, os quais reagem com o luminol adicionado ao meio reacional. Dessa forma, a luminescência produzida é diretamente proporcional à

concentração desses radicais. Portanto, quando compostos com capacidade antioxidante são adicionados ao sistema de reação em solução tampão, eles promovem a captura dos radicais peróxilas formados, levando à diminuição da quimiluminescência, sendo esta proporcional à capacidade antioxidante da amostra (LISSI; PASCUAL; DEL CASTILLO, 1992).

Através da análise da área sob a curva dos valores de quimiluminescência ao longo do tempo foi possível avaliar a capacidade não enzimática do extrato em reduzir a produção de EROs. No TRAP, quando a perda da quimiluminescência se estende ao longo do tempo, o valor de área sob a curva (AUC) torna-se baixo maior a atividade antioxidante. Os resultados ilustrados na Figura 8A demonstraram que o extrato de *I. paraguariensis* reduziu significativamente o valor da AUC na concentração de 5 µg/mL em relação ao sistema (considerado neste ensaio como 100% de produção de radicais). Embora a redução evidenciada tenha sido menor ao apresentado para o Trolox (400 nM), este resultado demonstra a alta capacidade de captação de radicais livres do extrato em uma baixa concentração (5 µg/mL).

Figura 8 - Potencial antioxidante reativo total (TRAP) e Reatividade antioxidante total (TAR) do extrato de *Ilex paraguariensis*.



Valores de área sob a curva (AUC) representando o potencial antioxidante (A). Dados expressos como média \pm E.P.M. (* $P \leq 0,05$ comparado ao sistema, # $P \leq 0,05$ comparado ao Trolox, ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls). Valores de Reatividade antioxidante total (TAR = razão entre a emissão inicial de quimiluminescência e imediatamente após a adição do extrato ou controle), representando o potencial antioxidante (B). Dados expressos como média \pm E.P.M. (* $P \leq 0,05$, teste t de student).

A duração e o perfil de redução na luminescência podem variar para diferentes compostos. Para o Trolox, a diminuição da quimiluminescência é imediata, mas a eficiência desta capacidade decresce com o tempo, não sendo duradoura (LISSI et al., 1992). Enquanto o TRAP mede o tempo que a amostra mantém o sequestro do radical livre, o índice TAR reflete a capacidade e rapidez de uma substância ou de uma mistura delas em participar do processo de transferência de elétrons aos radicais derivados do luminol (DESMARCHELIER et al., 1997), medindo a capacidade em reagir frente ao aumento de radicais livres.

Os resultados obtidos para o índice TAR (Figura 8B) não demonstraram diferença estatisticamente significativa ($P=0,2248$) entre o Trolox (400 nM) e o extrato de *I. paraguariensis* na concentração de 5 µg/mL, evidenciando a potencial capacidade na reatividade antioxidante inicial para o extrato de *I. paraguariensis*, semelhante ao Trolox.

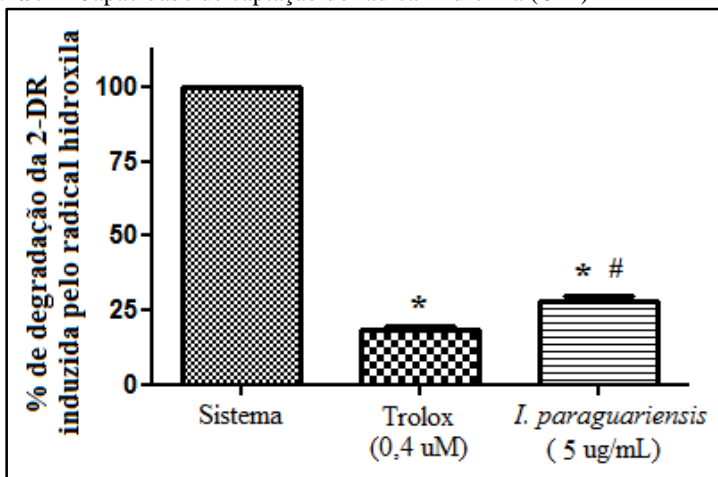
De forma resumida, é possível verificar que o comportamento verificado para o extrato de *I. paraguariensis* nos parâmetros TRAP e TAR indicam importante potencial no sequestro de espécies reativas, com início rápido e grande duração de ação.

Outro ensaio que avalia o potencial antioxidante de uma amostra é a capacidade de captação do radical hidroxila, o qual é considerado o mais reativo entre as EROs, e sua formação ocorre a partir do ânion superóxido e H_2O_2 na presença de íons metálicos. Este radical pode reagir com lipídios, proteínas e moléculas de DNA, acarretando em danos celulares que podem ser irreversíveis (LEE et al., 2004).

A atividade de captação do radical OH^\cdot foi avaliada através da degradação oxidativa da 2-DR por um sistema gerador do radical (LOPES; SCHULMAN; HERMES-LIMA, 1999). Esta degradação resulta na formação de MDA, o qual se condensa com o TBA, formando um produto final de coloração rósea, mensurado através de espectrofotometria na região do Visível.

Na Figura 9 estão ilustrados os valores de porcentagem de degradação da 2-DR induzida pelo radical OH^\cdot obtidos no ensaio. Os resultados demonstram a capacidade do extrato de *I. paraguariensis* na captura do radical hidroxila em baixa concentração (5 µg/mL).

Figura 9 – Capacidade de captação do radical hidroxila (OH[•])



Valores de porcentagem de degradação da 2-desoxirribose, representando o potencial de captura do radical hidroxila. Dados expressos como média \pm E.P.M. (* $P \leq 0,05$ comparado ao sistema, # $P \leq 0,05$ comparado ao Trolox, ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls)

Através do ensaio do ABTS, Peres e colaboradores (2013) avaliaram a capacidade antioxidante de infusões de *Ilex paraguariensis*, bem como dos principais compostos fenólicos isoladamente. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que a atividade antioxidante apresentada não era proporcional ao teor de cada metabólito. Os compostos majoritários do extrato avaliado no estudo, o ácido 4,5-dicafeoilquínico e ácido 5-*O*-cafeoilquínico apresentaram menor capacidade antioxidante, embora em concentrações 10 vezes superior aos glicosídeos de quercetina e o ácido 3-*O*-cafeoilquínico, os quais apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante equivalente ao Trolox.

As evidências acerca do envolvimento do estresse oxidativo na evolução da DP impulsionaram o desenvolvimento de estudos com compostos antioxidantes, na busca de agentes capazes de cessar ou atenuar o progresso da neurodegeneração. Nesse contexto, os compostos de origem natural como os compostos fenólicos e as metilxantinas, apresentam grande potencial para serem estudados em modelos experimentais da DP (RAMASSAMY, 2006; HENCHCLIFFE; BEAL, 2008; ZHOU et al., 2008; KOPULLA et al., 2012; JIN et al., 2014; BLESÁ et al., 2015; DEY et al., 2015).

O estudo da erva-mate quanto à sua habilidade em captar ERO tem sido correlacionado com a atividade tipo peroxidase, a qual é diretamente proporcional aos teores de compostos fenólicos de *I. paraguariensis*. Do ponto de vista biológico, isto significa que estes metabólitos podem atuar de maneira similar ao sistema antioxidante enzimático natural, funcionando como mecanismo de defesa (ANESINI; FERRARO; FILIP, 2006). Adicionalmente, Anesini e colaboradores (2012) demonstraram que o ácido clorogênico e a rutina presentes nos extratos aquosos das amostras de *I. paraguariensis* investigadas, contribuem diretamente para a atividade antioxidante detectada para a espécie através da captação de radicais DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e prevenção da peroxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) induzida por radicais livres, inibindo consequentemente a oxidação de DNA (GUGLIUCCI; STAHL 1995; GUGLIUCCI 1996; BRACESCO et al., 2003).

Em 2016, Valduga e colaboradores avaliaram o potencial de captação do radical DPPH de diferentes progênies de erva-mate. Os autores demonstraram que a atividade antioxidante apresentada pelo extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* estava relacionada aos teores de ácido clorogênico.

Conforme previamente citado, o sistema nervoso central (SNC) é especialmente sensível ao estresse oxidativo. Uma das razões é o alto consumo de oxigênio, devido à alta quantia de adenosina trifosfato (ATP) necessária na manutenção da homeostase intracelular neuronal. Adicionalmente, a lipoperoxidação é favorecida pela presença de grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, alvos preferenciais no processo de peroxidação lipídica e pelas baixas concentrações de antioxidantes, tornando os neurônios mais susceptíveis aos danos induzidos por EROs (HALLIWELL, 2006). Assim, o estresse oxidativo está associado à neurodegeneração presente em desordens neurológicas como a doença de Parkinson (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; BLESÁ et al., 2015).

Em resumo, o conjunto de resultados demonstrados neste capítulo demonstrou o pronunciado potencial do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* frente ao estresse oxidativo, apresentando-se como agente promissor contra a neurodegeneração envolvida na doença de Parkinson e justificando a avaliação do seu efeito em modelo animal experimental.

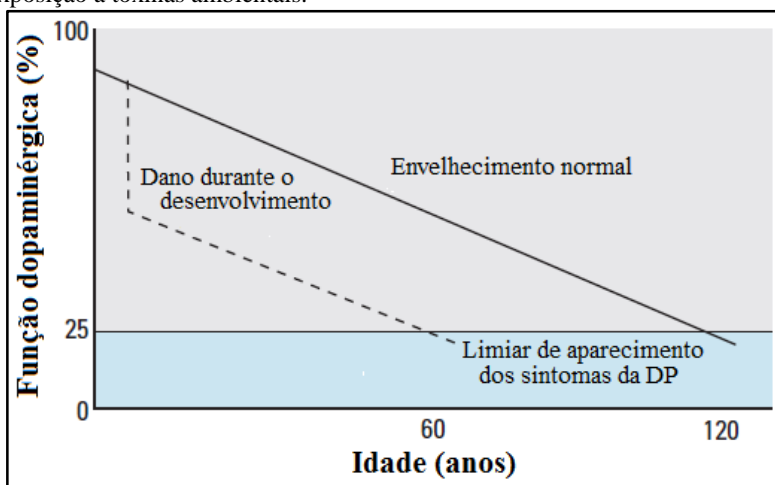
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARKINSONIANA *in vivo* DO EXTRATO DE *Ilex paraguariensis* A. ST. HILAIRE.

3.1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma patologia neurodegenerativa caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos e está entre as DCNT de maior incidência, afetando significativamente a qualidade de vida de seus portadores. Embora a idade continue sendo o fator de risco mais importante documentado até o momento, parece consenso entre os pesquisadores a etiologia multifatorial da DP, sendo apontados fatores de risco genéticos e ambientais, incluindo exposição a pesticidas e outros compostos tóxicos, além de histórico familiar positivo (MASSANO; BATHIA, 2012; POLITO et al., 2016).

A exposição a toxinas ambientais durante o desenvolvimento ou mesmo na idade adulta tem sido indicada como causadora de neurodegeneração dopaminérgica significativa em longo prazo. Dessa forma, o número de neurônios dopaminérgicos alcançaria níveis inferiores ao necessário para manter a função motora normal. A Figura 10 ilustra esse quadro, que associado ao envelhecimento, desencadearia o aparecimento da DP (LANDRIGAN et al., 2005).

Figura 10 – Desenvolvimento da doença de Parkinson implicada pela exposição a toxinas ambientais.



Fonte: Adaptado de Landrigan e colaboradores (2005).

Nos últimos anos, percebe-se um aumento no número de estudos (pré-clínicos e clínicos) com o intuito de identificar fatores ambientais que podem estar envolvidos na etiologia da DP (PRIYADARSHI et al., 2001; PREDIGER et al., 2006; PREDIGER et al., 2012; GOLDMAN, 2014). Dentre os contaminantes ambientais tóxicos, o derivado da meperidina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) é capaz de matar seletivamente os neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc). Esta constatação obtida em 1976, na Califórnia, marcou o início da teorização sobre o envolvimento de toxinas ambientais no desenvolvimento da DP, e foi obtida diante da observação de heroína contaminada com o MPTP, cujos usuários desenvolveram sintomas característicos da doença ainda jovens (LANGSTON et al., 1983; LANGSTON et al., 1984). A partir da constatação acerca dos efeitos do MPTP, este passou a ser administrado em animais de laboratório, principalmente roedores e primatas, e tem sido utilizado como um modelo para o estudo da DP (BLANDINI; ARMENTERO, 2012; BINUKUMAR; PANT, 2016; MACHADO et al., 2016).

A neurotoxicidade induzida pelo MPTP tem seu mecanismo relacionado, inicialmente, à facilidade de sua passagem pela barreira hemato-encefálica (BHE), em decorrência da sua elevada lipofilicidade (MARKEY et al., 1984). Através da ação da enzima monoamina oxidase B (MAO-B) no cérebro, principalmente nas células da glia, ocorre a conversão do MPTP no íon 1-metil-4-fenil piperidínio (MPP⁺), o qual é então captado pelo sistema de transporte da dopamina nos terminais dopaminérgicos nigroestriatais. Este fator é determinante para a relativa seletividade dopaminérgica apresentada pelo MPTP.

Uma das principais hipóteses sobre o mecanismo de neurotoxicidade induzido pelo acúmulo do íon MPP⁺ em neurônios dopaminérgicos em modelos animais, seria o envolvimento de estresse oxidativo nesse processo, de forma semelhante à observada na DP. A inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial pelo íon MPP⁺, além de reduzir a produção de ATP, estimula a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (HASEGAWA et al., 1990; SRIRAM et al., 1997). Corroborando com esta hipótese, camundongos transgênicos apresentando expressão aumentada das enzimas Cu/Zn-superóxido dismutase e Mn-superóxido dismutase são mais resistentes aos danos oxidativos induzidos pelo MPTP (PRZEDBORSKI et al., 1992). Em contrapartida, os efeitos neurotóxicos do MPTP são exacerbados em camundongos que apresentam deficiência destas enzimas.

Além disso, o tratamento com diferentes antioxidantes, como a vitamina E, betacaroteno e ácido ascórbico, demonstrou capacidade de atenuação na neurotoxicidade induzida pelo MPTP (40 mg/kg) em camundongos, diminuindo significativamente a perda de dopamina estriatal (PERRY et al, 1985).

Conforme mencionado anteriormente o envolvimento de fatores ambientais na etiologia da DP já é bem conhecido. Neste sentido, a cavidade nasal é hipotetizada como uma das portas de entrada para as toxinas ambientais no organismo (“teoria da vetorização olfatória”) (DOTY, 2008). Dessa maneira, o modelo da administração *i.n.* de MPTP desenvolvido no Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON) da UFSC, tem sido capaz de reproduzir, tanto a via de contato entre as toxinas e o organismo humano, quanto às características de toxicidade do MPTP com o avanço do processo neurodegenerativo e sintomas da DP (PREDIGER et al., 2006; PREDIGER et al., 2009; PREDIGER et al., 2010; PREDIGER et al., 2012).

Reproduzindo o quadro clínico da DP principalmente nas fases iniciais, ratos submetidos à administração *i.n.* de MPTP apresentam uma disfunção precoce na discriminação olfatória, reconhecimento social e memória operacional no labirinto aquático de Morris. Adicionalmente, evidenciando neurodegeneração, a infusão *i.n.* de MPTP em ratos Wistar, causa significativa redução nos níveis da enzima tirosina hidroxilase no bulbo olfatório, estriado e substância negra, além de reduzir as concentrações de dopamina em áreas cerebrais como bulbo olfatório, estriado e córtex pré-frontal (PREDIGER et al., 2012).

Considerando o exposto, os potenciais antioxidante (SCHINELLA et al., 2000; VALERGA; RETA; LANARI, 2012), anti-inflamatório (SCHINELLA et al., 2014; LUZ et al., 2016) e antiparkinsoniano (MILIOLI et al., 2007) descritos para *Ilex paraguariensis*, além da associação epidemiológica inversa entre o consumo de erva-mate e DP (GATTO et al., 2015), realizou-se a investigação dos efeitos do tratamento com o extrato hidroetanólico (EHE) de *I. paraguariensis*, e com os compostos majoritários cafeína e ácido clorogênico, isolados e em associação, sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração *i.n.* de MPTP em ratos Wistar.

Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON) do Departamento de Farmacologia da UFSC, sob supervisão do Professor Dr. Rui Daniel Schröder Prediger.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis*, e dos compostos cafeína e ácido clorogênico sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração intranasal de MPTP em um modelo animal da doença de Parkinson.

3.2.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito do tratamento com o EHE de *I. paraguariensis*, e com os compostos cafeína e ácido clorogênico, isolados e em associação, no prejuízo olfatório induzido pela administração *i.n.* de MPTP em ratos, através do teste de discriminação olfatória.
- Avaliar o efeito do tratamento com o extrato EHE de *I. paraguariensis*, e com os compostos cafeína e ácido clorogênico, isolados e em associação, sobre o dano na memória de curta duração, causado pela infusão *i.n.* de MPTP em ratos, por meio do teste de reconhecimento social.
- Estudar o efeito do tratamento com o EHE de *I. paraguariensis*, e com os compostos cafeína e ácido clorogênico, isolados e em associação, sobre os prejuízos emocionais causados pela administração *i.n.* de MPTP em ratos, através do splash teste e nado forçado.
- Avaliar o efeito do tratamento com o EHE de *I. paraguariensis*, e com os compostos cafeína e ácido clorogênico, isolados e em associação, sobre o déficit motor induzido pela infusão *i.n.* de MPTP em ratos, através do teste do campo aberto.
- Investigar o efeito do tratamento com o EHE de *I. paraguariensis*, e com os compostos cafeína e ácido clorogênico, isolados e em associação, sobre a diminuição das concentrações de dopamina induzida pela administração *i.n.* de MPTP no bulbo olfatório, estriado e córtex pré-frontal de ratos através de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) acoplada à espectrometria de massas (EM).

3.3 METODOLOGIA

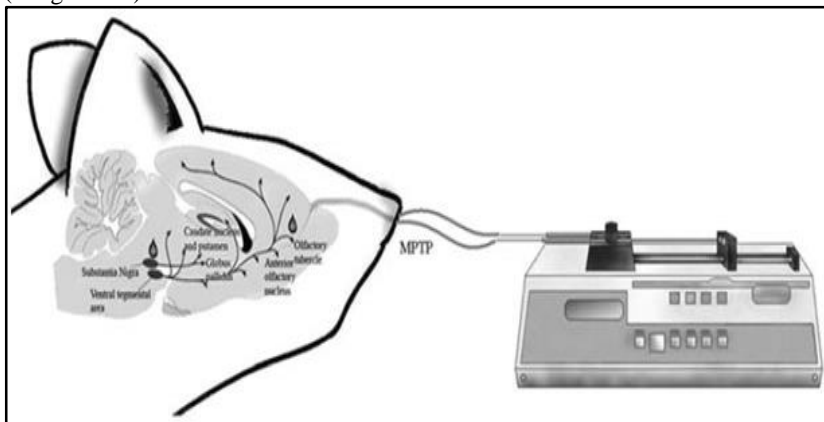
3.3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com aproximadamente três meses de idade e peso corporal variando entre 270 e 340 g provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para o teste de reconhecimento social, foram utilizados além desses animais, ratos Wistar machos jovens com aproximadamente um mês de idade e peso corporal variando entre 100 e 150 g. Os animais foram alojados em grupos de cinco animais por caixa (42 x 34 x 17 cm) e mantidos em condições controladas de umidade e temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 7:00 às 19:00 h), tendo livre acesso à água e à comida. Todos os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram conduzidos cuidadosamente de acordo com as normas previstas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC - Protocolo PP830).

3.3.2 Administração intranasal do MPTP

A administração intranasal de MPTP em ratos foi realizada através de procedimento semelhante ao descrito por Prediger e colaboradores (2010). Os animais foram levemente anestesiados com isoflurano a 0,96% (0,75 CAM; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda, RJ, Brasil) utilizando um sistema vaporizador (SurgiVet Inc., WI, EUA) e um tubo PE-10 de 7 mm inserido pelas narinas. O tubo foi conectado a uma bomba peristáltica programada para realizar uma infusão de $12,5 \mu\text{l}/\text{min}$, como pode ser observado na Figura 11. O MPTP-HCl (Cloridrato de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) (Sigma Chemical Co., USA) foi dissolvido em NaCl 0,9% na concentração de 20 mg/ml, após o qual foi infundido durante quatro min (1 mg/narina). O controle consistiu de solução salina administrada pela via intranasal. Após intervalo de um minuto para os animais recuperarem a função respiratória normal esse procedimento foi repetido com infusão através da narina contralateral.

Figura 11 - Esquema do procedimento para administração intranasal do MPTP (1 mg/narina).



Fonte: Prediger e colaboradores (2010).

3.3.3 Protocolo experimental

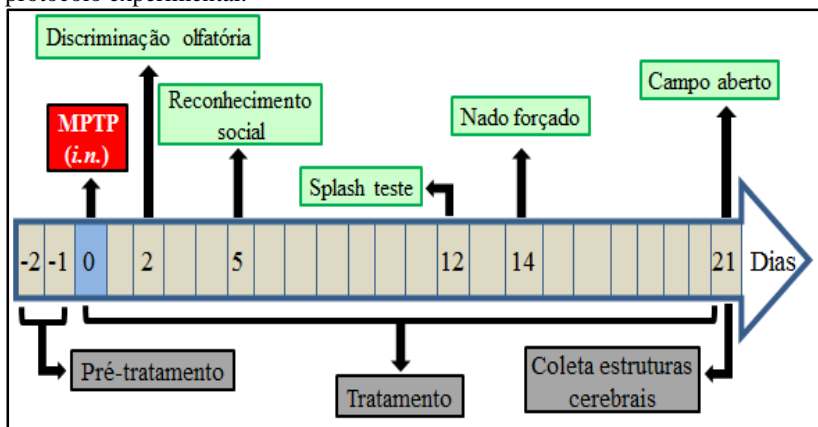
O protocolo experimental consistiu na administração por via oral (gavagem) de um volume constante de 0,1mL/100g de peso corporal das soluções com dois dias de pré-tratamento. Após a administração *i.n.* do MPTP, os animais foram submetidos a 21 dias consecutivos de tratamento, sendo que os testes comportamentais tiveram início no segundo dia e foram encerrados no 21º dia de tratamento (Figura 12). Todos os testes comportamentais foram conduzidos entre a manhã e início da tarde (8:00 – 14:00h), enquanto os tratamentos foram realizados no final da tarde (16:00 – 18:00h).

A sequência de execução dos testes comportamentais foi a seguinte: discriminação olfatória (dia 2), reconhecimento social (dia 5); splash teste (dia 12); nado forçado (dias 13 e 14) e campo aberto (dia 21). Para tanto, os animais foram subdivididos em seis grupos experimentais de acordo com o tratamento: (I) controle, (II) controle MPTP, (III) *I. paraguariensis* (300 mg/kg), (IV) cafeína (10 mg/kg), (V) ácido clorogênico (20 mg/kg) e (VI) cafeína (10 mg/kg) + ácido clorogênico (20 mg/kg). Cafeína (Sigma Chemical Co., USA), ácido clorogênico (Sigma Chemical Co., USA) e o EHE de *Ilex paraguariensis* foram dissolvidos em água destilada. Os controles (I e II) receberam água destilada;

Imediatamente após o último teste comportamental os animais foram eutanasiados por decapitação, seus cérebros foram removidos e as

estruturas, bulbo olfatório, estriado e córtex pré-frontal isoladas e armazenadas a -80°C , para o doseamento de dopamina por CLUE-EM.

Figura 12 - Representação esquemática dos procedimentos realizados durante o protocolo experimental.



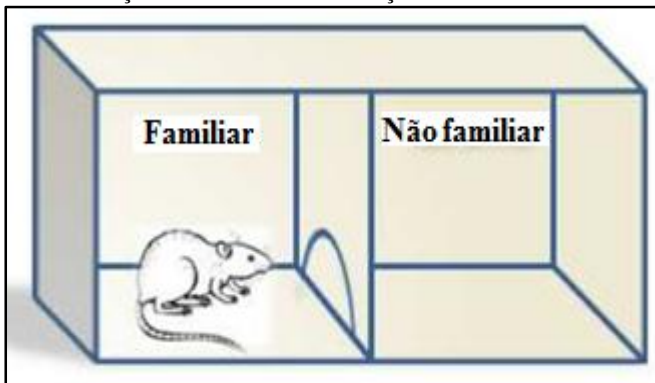
Fonte: Autor.

3.3.4 Avaliação comportamental

3.3.4.1 Discriminação olfatória

A função olfatória dos animais foi avaliada dois dias após a administração *i.n.* do MPTP através do teste de discriminação olfatória realizado seguindo o protocolo previamente descrito por Prediger e colaboradores (2006, 2009). A caixa de discriminação olfatória consiste em dois compartimentos idênticos (30 x 30 x 20 cm) separados por uma abertura que permite o acesso dos animais aos dois compartimentos (Figura 13). O chão de um dos compartimentos foi forrado com a serragem retirada da gaiola na qual o rato ficou isolado por 48 horas, enquanto que o outro compartimento foi forrado com serragem limpa e inodora. O experimento consiste em colocar o animal na caixa de discriminação olfatória e registrar, durante um período de cinco minutos, o tempo dispendido pelo animal investigando cada um dos compartimentos. As porcentagens de permanência foram calculadas através do tempo de permanência em um dos compartimentos dividido pela soma do tempo de permanência nos dois compartimentos, multiplicado por 100.

Figura 13 – Ilustração do teste de discriminação olfatória.



Fonte: Adaptado de Tadaiesky (2010).

3.3.4.2 Reconhecimento social

A memória social de curto prazo foi avaliada cinco dias após administração *i.n.* do MPTP através do teste de reconhecimento social, o qual foi realizado de acordo com procedimento previamente descrito (PREDIGER; TAKAHASHI, 2005; LOPES et al., 2016). Os ratos jovens foram isolados por 20 minutos em caixas plásticas antes do experimento. O teste consistiu em duas apresentações sucessivas (cinco min cada) de um rato jovem (um mês de idade), separadas por um intervalo de 30 minutos. Durante a primeira apresentação, um rato jovem foi colocado na caixa-moradia do rato adulto, sendo registrado o tempo que o rato adulto investigou o rato jovem. Ao final da primeira apresentação, o rato jovem foi retirado da caixa do rato adulto, ficando isolado por 30 min. A seguir, o mesmo rato jovem foi reapresentado ao rato adulto, registrando-se novamente o tempo de investigação utilizado pelo rato adulto durante a segunda apresentação.

Os resultados foram expressos através da razão do tempo na segunda apresentação pelo tempo na primeira apresentação, parâmetro denominado de Razão de duração da investigação (RDI).

3.3.4.3 Splash teste

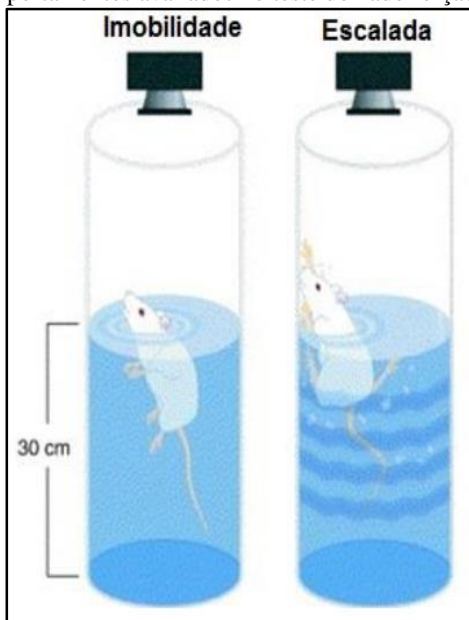
O splash teste foi realizado 12 dias após a administração *i.n.* do MPTP, de acordo com o procedimento descrito por Matheus e colaboradores (2016), com pequenas modificações. O teste consistiu em

borrifar por duas vezes uma solução de sacarose 10% sobre o dorso do rato. Posteriormente, os animais foram colocados em caixas de acrílico para a avaliação comportamental durante cinco minutos. Foram registrados os tempos de latência (tempo para o início da autolimpeza) e o tempo total de autolimpeza direcionado ao dorso, como medidas de autocuidado e comportamento motivacional (WILLNER, 2005). Ao final de cada teste, a caixa de acrílico foi cuidadosamente limpa com solução de etanol 10% e seca.

3.3.4.4 Nado forçado

O teste do nado forçado foi realizado 14 dias após a administração do MPTP de acordo com o procedimento previamente descrito por Porsolt, Le Pichon & Jalfre (1977). Os ratos foram colocados individualmente em cilindros de cloreto de polivinila (PVC) individuais medindo 60 cm de altura e 30 cm de diâmetro, os quais estavam preenchidos até a metade com água a 25 ± 1 °C. Foram realizadas duas sessões de natação, uma inicial de 15 min (pré-teste), seguida por outra de teste após 24 horas com duração de apenas cinco minutos. A duração total dos comportamentos de imobilidade e de escalada foi aferida manualmente e continuamente durante todo o período da sessão de teste. O animal foi considerado imóvel quando flutuava ou fazia apenas os movimentos necessários para manter a sua cabeça acima do nível da água. O comportamento de escalada foi considerado quando o animal realizava movimentos com as patas anteriores em direção ao topo das paredes do cilindro. A figura 14 ilustra os comportamentos avaliados durante a sessão de teste do nado forçado. Os experimentos foram executados com iluminação de 40 lux e a água foi trocada após o final de cada sessão.

Figura 14 - Comportamentos avaliados no teste do nado forçado.



Fonte: Adaptado de Cryan; Markou; Lucki (2002).

3.3.4.5 Campo aberto

O teste do campo aberto foi realizado 21 dias após a administração *i.n.* do MPTP para determinar a atividade locomotora horizontal espontânea dos animais (LEMOS et al., 2016). Este teste foi realizado durante 5 minutos de livre exploração dos ratos em uma arena de madeira e fórmica (100 x 100 cm). Cada animal foi colocado no centro do campo aberto e as imagens registradas por um sistema de câmera de vídeo. A distância total percorrida (m) pelos animais foi avaliada com o auxílio do programa analisador de imagens ANY-Maze™.

3.3.5 Avaliação neuroquímica

3.3.5.1 Determinação dos níveis cerebrais de dopamina por CLUE-EM

Com o objetivo de verificar possíveis alterações nos níveis de dopamina (DA) após o tratamento intranasal com MPTP, os níveis endógenos de DA foram analisados por cromatografia líquida de ultra

eficiência (CLUE) acoplada à espectrometria de massas (EM). Esta metodologia foi adaptada de estudo realizado previamente por nosso grupo de pesquisa (CUNHA et al., 2016).

Para isso, 21 dias após administração *i.n.* de MPTP os ratos foram submetidos à eutanásia por decapitação e seus cérebros foram removidos. As estruturas bulbo olfatório, estriado e córtex pré-frontal foram dissecados em placa de Petry cercada por gelo seco, pesados e armazenados em freezer a -80 °C.

Os tecidos cerebrais foram homogeneizados com água purificada (1:5 m/v) e submetidos à sonicação durante 15 minutos em banho ultrassônico resfriado. Posteriormente, os homogenatos foram centrifugados (14000 rpm, 4 °C) por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação de DA.

Para estas análises foi utilizado cromatógrafo Waters® modelo Acquity®, equipado com desgaseificador on line e amostrador automático. A fase estacionária empregada foi uma coluna Waters BEH C18 (50 x 2,1 mm – 1,7 µm), mantida a 40 °C. Como fase móvel foi utilizado um gradiente linear composto por água ultrapurificada (A) e acetonitrila (B) para a análise de dopamina, programado da seguinte maneira: 99% A de 0 a 3,0 min, de 99 a 10% A de 3,0 a 4,5 min, 10% A de 4,5 a 7,0 min, de 10 a 99% A de 7,0 a 8,5 min, e 99% A de 8,5 a 10,0 min. O fluxo foi de 0,2 mL/min e o volume de injeção de 5 µL.

A quantificação foi realizada por CLUE acoplada a detector de espectrometria de massas de alta resolução tipo quadrupolo-tempo de voo (QToF) modelo Xevo G2-XS® (Waters®). A fonte de ionização utilizada foi electrospray (ESI), modo positivo, e os dados foram processados através do software MassLynx v.4.1. A faixa de aquisição foi de 50 – 1000 Da, com temperatura da fonte de 90°C. O fluxo do gás de dessolvatação foi de 900 L/h a 350 °C. A voltagem do capilar foi de 1.2 kV, enquanto o fluxo de nitrogênio no cone foi de 200 L/h. Para assegurar a exatidão e reprodutibilidade da massa, as análises foram registradas utilizando o modo "lockspray" com composto de referência Leucina (m/z 556,2771 Da). As áreas foram medidas a partir dos picos dos íons extraídos a m/z 154,0860 Da, com tolerância para os parâmetros tempo de retenção e exatidão de massa de 0,4 minutos e 0,02 Da, respectivamente. A curva de calibração para o cloridrato de dopamina (Sigma-Aldrich®) foi obtida na faixa linear de 50-2000 ng/mL, resultando na equação "y = 1.7388x - 42.069" (r² = 0,999). O limite de quantificação (LLOQ) de dopamina foi de 50 ng/mL, o qual foi definido por uma relação sinal:ruído de 10:1. Os resultados foram expressos em nanogramas de dopamina por grama de tecido cerebral (ng/g).

3.3.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As comparações estatísticas dos resultados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste post-hoc de Newman-Keuls. A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi $P \leq 0,05$. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0.

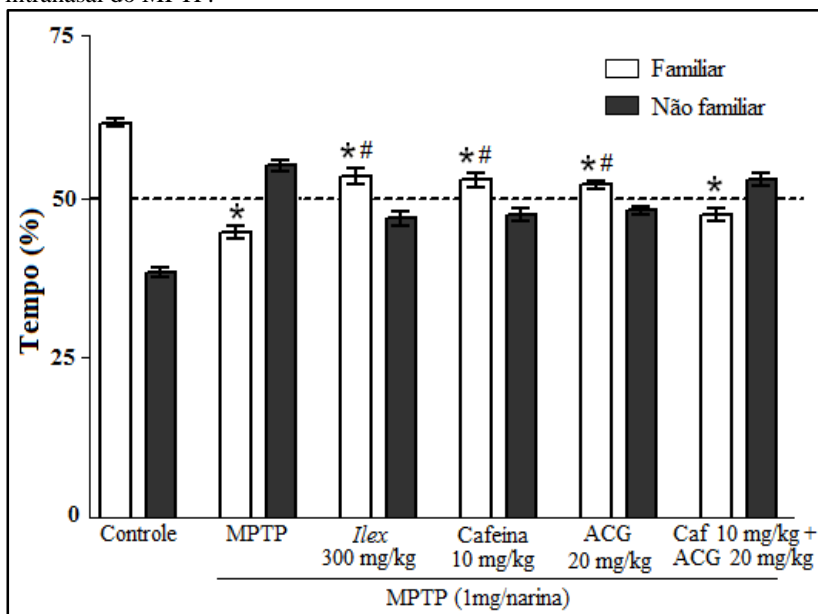
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Novas estratégias terapêuticas visando cessar ou atenuar o avanço da neurodegeneração encontrada na DP podem apresentar um grande impacto no tratamento desta doença. Neste contexto, o uso terapêutico de compostos com pronunciada ação antioxidante pode ser benéfico frente a desordens neurodegenerativas. Dessa forma, compostos de origem natural que apresentam propriedades neuroprotetoras, como os compostos fenólicos e as metilxantinas (RAMASSAMY, 2006; ZHOU et al., 2008; CALVELLO et al., 2017; REGLODI et al., 2017), constituem potenciais modelos estruturais para estudos mais específicos frente a esta patologia.

3.4.1 Efeitos dos tratamentos sobre a função olfatória

Para verificar a capacidade olfatória dos animais, o teste de discriminação olfatória foi realizado 48 horas após a administração *i.n.* do MPTP, sendo avaliada pela preferência do rato em permanecer no compartimento impregnado com o seu odor (compartimento familiar) em relação ao compartimento inodoro (não familiar), visto que ratos machos adultos preferem permanecer em ambientes impregnados com seu próprio odor (PREDIGER et al., 2006, 2010). A Figura 15 apresenta os efeitos dos tratamentos no teste de discriminação olfatória dois dias após infusão *i.n.* do MPTP.

Figura 15 - Efeitos dos tratamentos no tempo de permanência em cada compartimento no teste de discriminação olfatória dois dias após infusão intranasal do MPTP.



Dados expressos como média \pm E.P.M (n = 8 animais por grupo). * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle; # $P \leq 0,05$ comparado ao grupo MPTP (ANOVA de uma via, seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls).

A análise estatística (ANOVA de uma via) revelou efeito significativo dos tratamentos ($F_{5,42} = 39,22$, $p < 0,0001$) sobre a capacidade de discriminação olfatória dos ratos. Como esperado, os animais do grupo controle foram capazes de discriminar os dois compartimentos, permanecendo tempo significativamente maior no compartimento familiar. Por outro lado, os animais que receberam a infusão *i.n.* do MPTP (grupo controle MPTP) apresentaram significativo déficit olfatório, haja vista que permaneceram maior tempo no compartimento não familiar.

A utilização do teste post-hoc de Newman-Keuls indicou que os tratamentos com o extrato de *I. paraguariensis*, cafeína e ácido clorogênico atenuaram o déficit olfatório causado pelo MPTP. Por outro lado, o tratamento com a associação de cafeína e ácido clorogênico não apresentou diferença no tempo de permanência no compartimento familiar quando comparado ao grupo MPTP, sendo incapaz de diminuir

o prejuízo olfatório dos animais, característico deste modelo, e previamente demonstrado por outros trabalhos em decorrência de lesão de neurônios dopaminérgicos (PREDIGER et al., 2006; 2010).

A perda da capacidade olfatória é uma alteração amplamente descrita na DP, caracterizada por ser um dos sintomas mais precoces da doença, podendo alcançar níveis de até 95% de comprometimento da função olfatória (ZIEMSEN; REICHMANN, 2007).

Até o momento, o efeito de *I. paraguariensis* sobre o déficit olfatório precoce presente na DP, avaliado sob o paradigma do teste de discriminação olfatória não é relatado na literatura. Por outro lado, Prediger, Batista e Takahashi (2005) demonstraram que o tratamento agudo com cafeína em ratos foi capaz de reverter o prejuízo olfatório relacionado ao envelhecimento, através do antagonismo de receptores de adenosina do tipo A2A.

Embora em nosso trabalho tenha sido utilizado o modelo do MPTP para induzir o dano olfatório, o efeito de atenuação demonstrado pela cafeína encontra respaldo nos resultados previamente descritos pelos autores. Contudo, é importante destacar que o benefício olfatório evidenciado para o extrato de *I. paraguariensis* parece não ser exclusivamente mediado pela cafeína, haja vista que o ácido clorogênico administrado isoladamente também apresentou capacidade de atenuação do dano olfatório.

Dessa forma, é possível sugerir que o efeito observado possa não ser resultante unicamente do antagonismo dos receptores A2A, bem como pode estar associado à diminuição de estresse oxidativo mediado pelo ácido clorogênico, cujo potencial antioxidante é amplamente comprovado, conforme previamente descrito na revisão bibliográfica apresentada no capítulo 1 da presente tese.

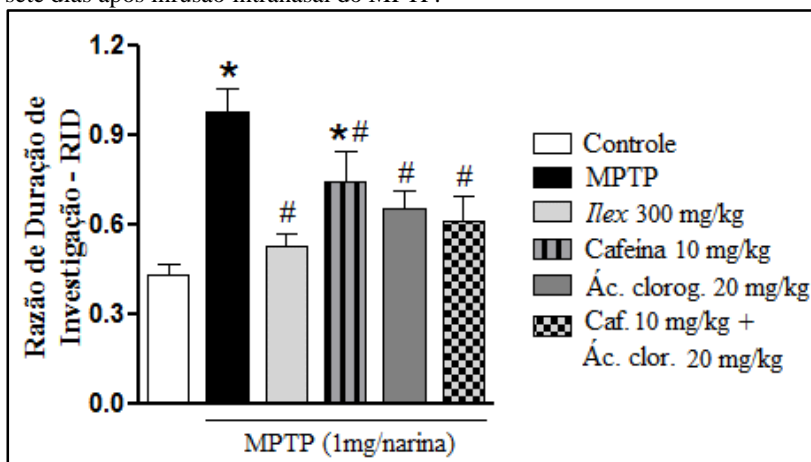
Entretanto, para que essas sugestões sejam elucidadas, ensaios adicionais precisam ser conduzidos, como por exemplo a avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo nas estruturas cerebrais avaliadas neste trabalho, especialmente no bulbo olfatório.

3.4.2 Efeitos dos tratamentos sobre o desempenho cognitivo

O efeito dos tratamentos sobre o desempenho dos animais no teste do reconhecimento social foi realizado sete dias após a administração *i.n.* do MPTP e o resultado está apresentado na Figura 16. A análise dos dados pelo teste de ANOVA de uma via demonstrou efeito significativo dos tratamentos na memória social dos animais ($F_{5,42} = 7,419, p < 0,0001$).

Adicionalmente, foi identificada uma redução significativa nos valores de RDI em todos os tratamentos, quando comparados ao grupo do MPTP. Por fim, foi possível observar que, com exceção da cafeína, os demais tratamentos apresentaram valores de RDI semelhantes ao grupo controle, evidenciando o potencial de reversão do déficit causado pelo MPTP na memória de curta duração dos animais.

Figura 16 - Efeitos dos tratamentos sobre a memória de reconhecimento social sete dias após infusão intranasal do MPTP.



Dados expressos como média ± E.P.M. (n = 8 animais por grupo) da RID (razão entre a segunda exposição e a primeira exposição) quando o mesmo rato jovem foi exposto por 5 min com um intervalo de 30 min. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle; # $P \leq 0,05$ comparado ao grupo MPTP (ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls).

Dentre as amostras investigadas, o ácido clorogênico parece ser o principal componente químico relacionado ao efeito observado, uma vez que a cafeína administrada isoladamente não reduziu o valor de RDI ao nível do controle. Entretanto, quando em associação com ácido clorogênico é possível visualizar redução da RDI semelhante ao controle, assim como o tratamento com ácido clorogênico isoladamente.

De acordo com a hipótese de Braak e colaboradores (2003) e reproduzindo o quadro clínico da DP, ratos e camundongos submetidos a administração *i.n.* de MPTP apresentaram uma disfunção precoce na memória de reconhecimento social (PREDIGER et al., 2006; 2012).

A memória social, avaliada através do teste de reconhecimento social, é um modelo específico de memória olfatória de curto prazo, tendo

como base a capacidade de discriminação olfatória em roedores, a qual pode ser facilitada por compostos que melhorem os processos de aprendizado e memória. Por outro lado, este tipo de memória pode ser prejudicada por processos fisiopatológicos como o envelhecimento, que sabidamente interfere no aprendizado e memória (TERRANOVA et al., 1994; PREDIGER et al., 2005). Na reapresentação do mesmo rato jovem (familiar) após um intervalo de 30 minutos, o rato adulto tem a capacidade de reconhecer este rato jovem, sendo possível demonstrar os efeitos do tratamento na memória social dos animais. Valores de razão de duração da investigação (RDI) próximos de um (1) sugerem prejuízos nesse tipo de memória, pois indicam tempos de investigação semelhantes durante as duas apresentações. Em contrapartida, valores de RDI abaixo de um (1) sugerem que o animal idoso foi capaz de reconhecer o jovem (DANTZER et al., 1987; PREDIGER et al., 2004; LOPES et al., 2016).

Nossos resultados evidenciaram a proteção ou atenuação frente aos prejuízos na memória social de curto prazo causados pelo MPTP, à medida que no teste de reconhecimento social, os animais dos grupos tratados com o extrato e com os compostos isolados apresentaram tempo menor de investigação ao animal jovem na segunda apresentação. Este comportamento foi demonstrado por uma razão na duração de tempo de investigação (RDI) significativamente menor quando comparados ao grupo MPTP.

Outros trabalhos utilizando modelos experimentais diferentes do realizado em nosso trabalho demonstraram previamente o potencial efeito de *I. paraguariensis* sobre déficits na memória. Santos e colaboradores (2015), através do teste tipo *step-down*, demonstraram que o tratamento agudo com extrato aquoso de *I. paraguariensis* na dose de 300 mg/kg foi capaz de prevenir o prejuízo de memória induzido por escopolamina. Adicionalmente, Colpo e colaboradores (2007) verificaram melhora significativa nos déficits de memória induzidos por haloperidol através do tratamento crônico com extrato aquoso de *I. paraguariensis*. Os animais receberam tratamento crônico (sem restrição) com o extrato preparado por infusão de amostra comercial de erva-mate.

O déficit cognitivo é um sintoma comum em pacientes com DP, ocorrendo nos estágios iniciais da doença, antes mesmo do aparecimento dos sintomas motores clássicos. Cabe ressaltar que com o progresso da doença a magnitude desses sintomas aumenta (BRAAK et al., 2003; CHAUDHURI; SCHAPIRA 2009; GRINBERG et al., 2010; GARCIA-RUIZ; CHAUDHURI; MARTINEZ-MARTIN, 2014; PALMERI et al., 2017).

Resultados positivos acerca do potencial efeito benéfico sobre a memória de roedores foram obtidos por Prediger e colaboradores (2008) com a administração de extrato hidroalcoólico (50%) de *I. paraguayensis*. Administradas via intraperitoneal, doses inferiores à utilizada em nosso trabalho (62,5, 125 e 250 mg/Kg) demonstraram diminuição do tempo de investigação ao animal jovem na segunda exposição após um período de 120 minutos. Contudo, quando administrado por via oral, somente a dose de 125 mg/Kg demonstrou o mesmo efeito. Adicionalmente, a administração via *i.p.* de cafeína na dose de 10 mg/mL melhorou a memória de reconhecimento social dos animais. Embora as vias de administração tenham sido diferentes, os resultados obtidos em nosso trabalho demonstraram a capacidade da cafeína em reverter o dano causado pelo MPTP na memória social de curto prazo na mesma dose.

Já é bem estabelecido que as metilxantinas, como a cafeína, produzem melhora do processo cognitivo em distintos modelos animais e em humanos, bem como efeito neuroprotetor (RIEDEL et al., 1995; ANGELUCCI et al., 1999; PREDIGER et al., 2005; CUNHA; AGOSTINHO, 2010; KUMRAL et al., 2010). Adicionalmente, estudos tem sugerido o uso da cafeína como uma possível abordagem terapêutica para doenças neurodegenerativas (MAIA; MENDONÇA, 2002; DALL'IGNA et al., 2007).

Outro fato a ser destacado é que a cafeína vem sendo apontada como um composto promissor por reverter comprometimentos e prejuízos da memória associados a diferentes condições, demonstrando capacidade de oferecer proteção contra prejuízos cognitivos em modelos experimentais de envelhecimento, das doenças de Parkinson e de Alzheimer (PREDIGER et al., 2005 a, b; CUNHA, 2008; TAKAHASHI et al., 2008; PANDOLFO et al., 2013).

Em relação aos mecanismos envolvidos, vem sendo demonstrado que a maioria dos efeitos da cafeína no SNC é decorrente do antagonismo não seletivo dos receptores para adenosina (A1, A2A, A2B e A3), os quais pertencem à família de proteínas acopladas a proteínas G. A cafeína se liga com maior afinidade aos receptores adenosinérgicos do tipo A1 (acoplados a proteína G inibitória) e A2A (acoplados a proteína G estimulatória) sendo que estes representam os receptores para adenosina mais amplamente expressos no encéfalo de mamíferos. A adenosina, produzida em vários tecidos como um subproduto da degradação do ATP desempenha diferentes funções na modulação da atividade de tecidos periféricos e centrais. Uma das ações da adenosina no SNC consiste na inibição da liberação de vários neurotransmissores, principalmente

glutamato, através de receptores pré-sinápticos. Adicionalmente, o antagonismo de adenosina pode levar ao aumento da liberação de neurotransmissores incluindo noradrenalina, serotonina, acetilcolina (NEHLIG; DAVAL; DEBRY, 1992; DAVAL et al., 1996; FREDHOLM, 2003; FREDHOLM; SVENNINGSSON, 2003; FREDHOLM et al., 2005). É interessante ressaltar a interação entre cafeína e dopamina, sendo que o sistema dopaminérgico está envolvido em diversos processos biológicos como atividade motora e ainda, associado ao aprendizado e memória (JAY et al., 2004; JAY; DUNNETT, 2007).

O ácido clorogênico, um dos compostos majoritários do EHE de *Ilex paraguariensis* caracterizado em nosso trabalho, é outro representante da classe dos polifenóis cujo efeito benéfico sobre a função cognitiva já foi investigado. Corroborando com os resultados do presente trabalho, Kwon e colaboradores (2010) evidenciaram a melhora do déficit cognitivo na memória de trabalho e de curta duração induzido por escopolamina em camundongos tratados *v.o.* com ácido clorogênico nas doses de 6 e 9 mg/Kg.

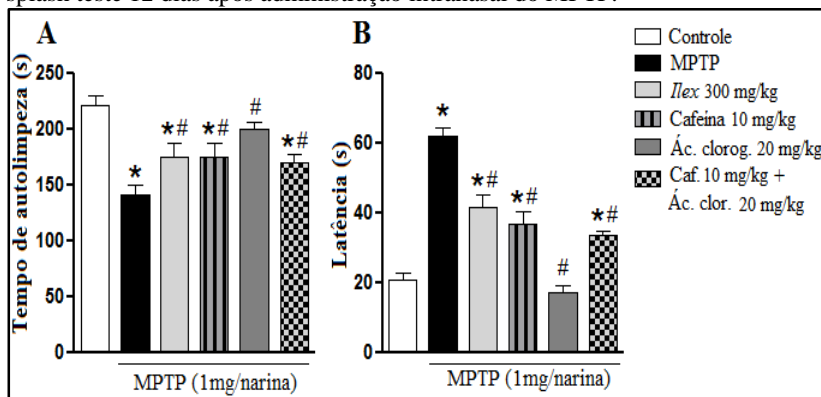
Adicionalmente, trabalhos apontam para o potencial benéfico de plantas ricas em flavonoides que levam a uma melhora da função cognitiva. Esses compostos são capazes de afetar diversos processos do aprendizado e memória, como memória de trabalho, de curta e longa duração. Pu e colaboradores (2007) relatam o efeito neuroprotetor da quercetina e da rutina, flavonoides capazes de melhorar o prejuízo na memória espacial e a morte neuronal no modelo de isquemia cerebral repetida. Em virtude da potencial atividade antioxidante destes compostos é possível observar o efeito benéfico em doenças neurodegenerativas, uma vez que um dos mecanismos envolvidos na patologia dessas doenças é o estresse oxidativo. Embora se acredite que a atividade antioxidante dos flavonoides seja um mecanismo de ação que explique o efeito benéfico sobre diversos aspectos do aprendizado e memória, outros fatores também são apontados como responsáveis por tal efeito, como ativação da sinalização sináptica e melhora do fluxo vascular cerebral e periférico, inibindo a apoptose desencadeada por espécies neurotóxicas, e promovendo proteção e diferenciação neuronal (SPENCER, 2010; MANDEL et al., 2012; COSTA et al., 2016).

3.4.3 Efeitos dos tratamentos sobre parâmetros emocionais

O efeito dos tratamentos sobre o desempenho dos animais no splash teste foi avaliado 12 dias após a administração *i.n.* do MPTP e estão ilustrados na Figura 17. A análise estatística mostrou efeito significativo

dos tratamentos ($F_{5,42} = 8,119$; $P < 0,0001$) sobre o tempo de autolimpeza dos animais (Fig. 17A). Quando comparados ao grupo MPTP, o teste post-hoc de Newman-Keuls revelou que os tratamentos aumentaram o tempo de autolimpeza dos animais.

Figura 17 – Efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros emocionais relacionados à anedonia, tempo de autolimpeza (A) e tempo de latência (B) no splash teste 12 dias após administração intranasal do MPTP.



Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 8$ animais/grupo). * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle; # $P \leq 0,05$ comparado ao grupo MPTP (ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls).

A ANOVA de uma via também revelou efeito significativo dos tratamentos ($F_{5,42} = 38,24$; $P < 0,0001$) sobre o tempo de latência dos animais para início da autolimpeza (Figura 16B), enquanto o teste de Newman-Keuls novamente demonstrou que os tratamentos reduziram o tempo de latência quando comparados ao grupo MPTP e foram capazes de melhorar o comportamento dos animais relacionado à anedonia. Os resultados obtidos em nosso trabalho sugerem que tanto o extrato de *I. paraguariensis* como a cafeína melhoraram o comportamento tipo-depressivo relacionado à anedonia.

A anedonia pode ser definida como a diminuição na capacidade de sentir prazer e também como a falta de reatividade a estímulos prazerosos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Adicionalmente, a anedonia pode ser avaliada em modelos pré-clínicos através do comportamento de autolimpeza no splash teste, permitindo ser inferidos possíveis mecanismos neurobiológicos envolvidos com a anedonia e a depressão (ISINGRINI et al., 2010; OVERSTREET, 2012).

No modelo animal utilizado neste trabalho, o efeito dos tratamentos sobre o comportamento anedônico, avaliado através do splash teste, foi baseado no fato de que, devido à sua viscosidade, a solução de sacarose fica aderida aos pelos dos ratos, os quais iniciam o comportamento de autolimpeza considerados semelhantes a alguns sintomas de anedonia e comportamento apático, os quais estão presentes na depressão (WILLNER, 2005; VURAL et al., 2007; ISINGRINI et al., 2010; OVERSTREET, 2012).

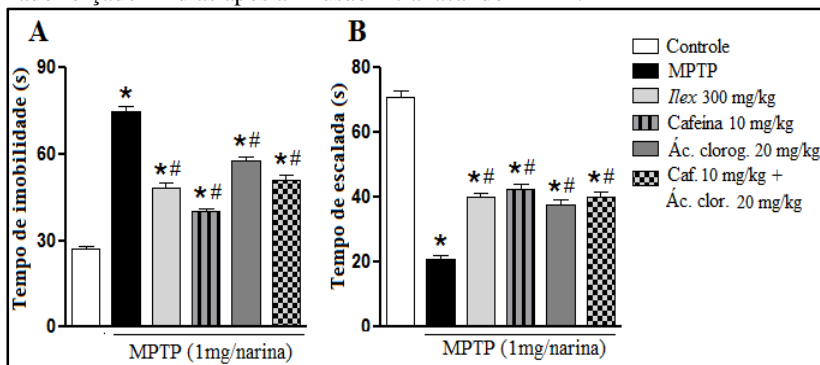
Além dos déficits na memória discutidos anteriormente, comumente ocorrem desordens depressivas em pacientes com DP, afetando consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes nos estágios iniciais da doença (MARTINEZ-MARTIN, 2011). Embora os sintomas motores sejam aliviados pelos tratamentos farmacológicos atualmente empregados na DP, os prejuízos na cognição e emoção causados pela doença, são pouco responsivos a esses tratamentos (HEMMERLE; HERMAN; SEROOGY, 2012; GARCIA-RUIZ; CHAUDHURI; MARTINEZ-MARTIN, 2014).

Nesse sentido, o efeito dos tratamentos sobre o comportamento tipo-depressivo dos animais foi avaliado através do teste do nado forçado, ensaio realizado 14 dias após a administração *i.n.* do MPTP. Os resultados demonstraram que o comportamento tipo-depressivo foi atenuado tanto pelo tratamento com o extrato, quanto pela cafeína, ácido clorogênico, e a associação dos dois compostos. Esse efeito pode ser ilustrado pela diminuição no tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado, e também pelo aumento no tempo de escalada, quando ambos foram comparados aos animais do grupo MPTP. A análise estatística revelou que os tratamentos influenciaram significativamente ($F_{5,42} = 109,5$; $P < 0,0001$) o tempo de imobilidade dos animais (Figura 18A), sendo possível observar também que todos os tratamentos diminuíram o tempo de imobilidade quando comparados ao grupo MPTP, sugerindo uma redução no comportamento tipo-depressivo dos animais, dados que corroboram os resultados obtidos no ensaio do *splash teste*.

Adicionalmente, foi verificada influência significativa ($F_{5,42} = 121,3$; $P < 0,0001$) no tempo de escalada dos animais (Figura 18B). A redução causada pelos tratamentos no comportamento depressivo dos ratos demonstrada pela diminuição do tempo de imobilidade é corroborada pelo aumento significativo do tempo de escalada, quando comparado ao grupo MPTP. Este aumento significativo no tempo de escalada, também foi utilizado como parâmetro de avaliação da atividade motora dos animais, sugerindo uma redução nos prejuízos motores

causados pela administração do MPTP em todos os grupos tratados com as amostras testes.

Figura 18 – Efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros emocionais relacionados à depressão tempo de imobilidade (A) e tempo de escalada (B) no nado forçado 14 dias após a infusão intranasal do MPTP.



Dados expressos como média \pm E.P.M. ($n = 8$ animais por grupo). * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle; # $P \leq 0,05$ comparado ao grupo MPTP (ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls).

Embora não tenha sido em um modelo que mimetize a DP, resultados semelhantes aos demonstrados neste trabalho foram descritos por Reis e colaboradores (2014), em um estudo onde ratos Wistar que receberam extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (dose estimada em 2,31 g/Kg/dia *ad libitum*) durante quatro semanas demonstraram redução no tempo de imobilidade semelhante à selegilina (10 mg/Kg, *i.p.*) no teste do nado forçado tanto em 24 horas como quatro semanas após o início do tratamento. O efeito observado pelos autores não demonstrou associação com atividade locomotora, visto que o extrato não apresentou efeito sobre os parâmetros avaliados no teste do campo aberto.

Recentemente, Ludka e colaboradores (2016), utilizando o teste de suspensão pela cauda, demonstraram efeito tipo-antidepressivo, após administração oral do extrato hidroalcoólico de *I. paraguariensis* em camundongos nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/Kg, sendo observado efeito semelhante para a dose de 1mg/Kg de cetamina via intraperitoneal, e para a cafeína (2,7 μ g/Kg, *v.o.*). O efeito tipo-antidepressivo mostrou-se dependente da modulação via óxido nítrico dos receptores para glutamato do tipo NMDA, uma vez que os autores observaram um efeito combinatório utilizando doses sub-efetiva do extrato (0,01 mg/Kg, *v.o.*) e cetamina (0,1 mg/Kg, *i.p.*) ou MK-801 (0,001 mg/Kg, *i.p.*), ambos

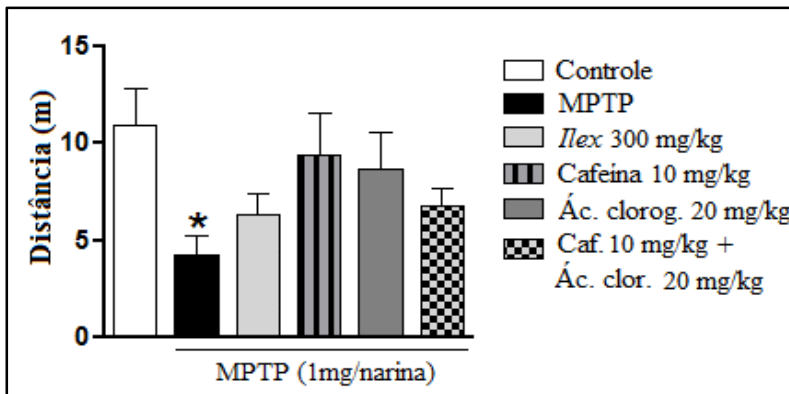
antagonistas de receptores NMDA. No mesmo estudo foi sugerido efeito neuroprotetor do extrato frente à toxicidade do glutamato (10 mmol/L), não sendo observada diminuição na viabilidade celular em fatias de hipocampo ou córtex de ratos tratados com o extrato, embora a administração de cafeína (2,7 µg/Kg, *v.o.*) não tenha produzido o mesmo efeito de neuroproteção observado para o extrato.

3.4.4 Efeitos dos tratamentos sobre a atividade motora

Considerando que os sintomas motores não são observados nos estágios iniciais da DP, aparecendo somente com o progresso da doença quando a neurodegeneração dopaminérgica na SNpc encontra-se bastante avançada (CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006), a atividade locomotora dos animais foi avaliada no teste do campo aberto 21 dias após a infusão *i.n.* do MPTP (Figura 19).

A análise estatística dos dados de distância percorrida (m), permitiu verificar os prejuízos motores ($F_{5,36} = 2,875$; $P < 0,05$) tardios característicos desse modelo causados pela administração da neurotoxina, previamente demonstrados (PREDIGER et al., 2010). Adicionalmente, os tratamentos com o EHE de *I. paraguariensis*, cafeína, ácido clorogênico e a associação de cafeína + ácido clorogênico não foram capazes de atenuar o dano causado pelo MPTP na atividade locomotora dos animais.

Figura 19 - Efeitos dos tratamentos sobre a atividade motora na distância percorrida pelos animais no campo aberto 21 dias após a administração intranasal do MPTP.



Dados expressos como média ± E.P.M. (n = 7 animais por grupo). ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls).

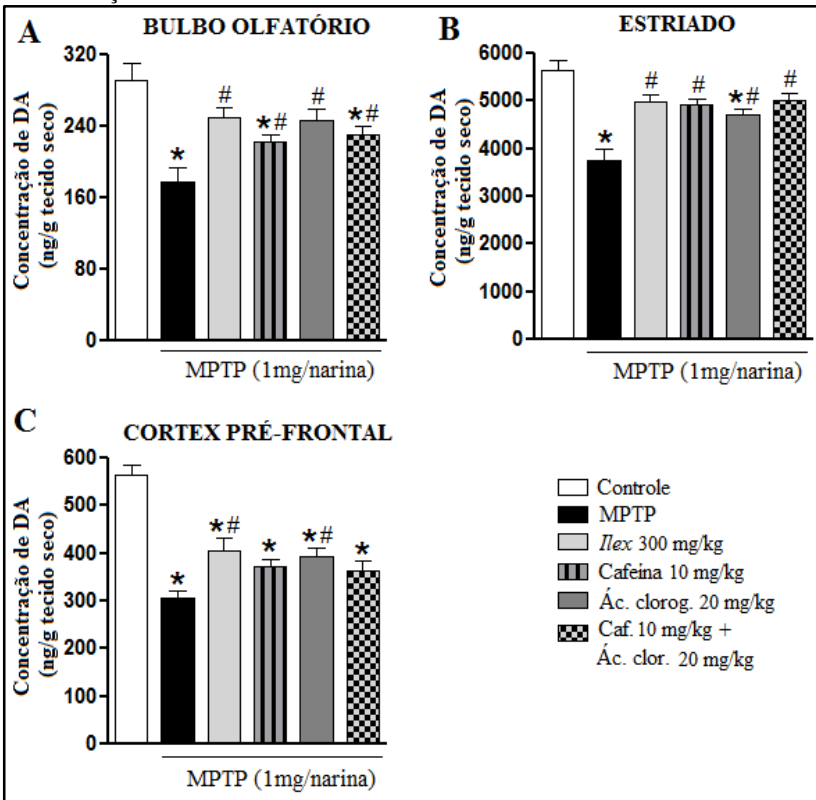
Contrariamente aos resultados obtidos neste trabalho, Milioli e colaboradores (2007) demonstraram o potencial efeito de *I. paraguariensis* sobre os sintomas motores da DP em outro modelo da doença. Doses de 250 e 500 mg/Kg do extrato hidroalcoólico (50%) de erva-mate via *i.p.* preveniram a hipolocomoção induzida pela administração subcutânea de MPTP (40 mg/Kg) em camundongos, 30 minutos após a realização dos tratamentos. Cabe ressaltar que a avaliação comportamental na caixa de atividades foi realizada 30 e 60 minutos após a toxina ter sido administrada. Considerando o protocolo de administração e o envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de toxicidade induzida pelo MPTP, o alto potencial antioxidante demonstrado pelo extrato frente a espécies reativas de nitrogênio e ao radical hidroxil foi sugerido que esta propriedade seria um dos principais mecanismos dos efeitos observados. No mesmo trabalho o extrato também reverteu o enrijecimento dos membros de camundongos no modelo da catalepsia induzida por reserpina nas doses de 250 e 500 mg/Kg via *i.p.*, corroborando o potencial sobre a atividade locomotora.

3.4.5 Efeitos dos tratamentos nos níveis cerebrais de dopamina

O efeito dos tratamentos sobre os níveis cerebrais de dopamina foi avaliado 21 dias após administração *i.n.* do MPTP nos animais e estão ilustrados na Figura 20. A análise estatística demonstrou efeito significativo dos tratamentos sobre os níveis de dopamina no bulbo olfatório ($F_{5,24} = 7,74$; $P < 0,002$) (Figura 20A), no estriado ($F_{5,24} = 12,67$; $P < 0,0002$) (Figura 20B) e no córtex pré-frontal ($F_{5,24} = 17,94$; $P < 0,0001$) (Figura 20C).

Com o intuito de determinar a relação entre as alterações comportamentais induzidas pelo MPTP em ratos e as alterações neuroquímicas na neurotransmissão dopaminérgica, as concentrações de DA no bulbo olfatório (BO), estriado e córtex pré-frontal (CPF) foram avaliados 21 dias após a administração intranasal de MPTP.

Figura 20 – Efeito dos tratamentos sobre a concentração de dopamina (DA) no bulbo olfatório (A), estriado (B) e córtex pré-frontal (C) dos animais 21 dias após administração intranasal do MPTP.



Dados expressos como média \pm E.P.M. das concentrações de dopamina (ng/g tecido cerebral) (n = 5 animais por grupo). * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle; # $P \leq 0,05$ compared to MPTP group (ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls).

Os animais do grupo controle MPTP tiveram uma redução de 38,9% nos níveis dopaminérgicos no bulbo olfatório, ilustrando a neurodegeneração significativa causada pela administração *i.n.* de MPTP nessa estrutura cerebral. Através do pos teste de Newman-Keuls foi possível observar que os tratamentos com o extrato de *I. paraguariensis* e com ACG reverteram a degeneração dopaminérgica no BO causada pelo MPTP nos ratos, apresentando uma depleção de DA de 14% e 15,7%, respectivamente. Os tratamentos com cafeína e com a associação de

caféina + ACG não demonstraram reversão, mas foram capazes de atenuar a degeneração dopaminérgica, considerando que as porcentagens de depleção foram de 23,4 e 20,7, respectivamente.

Esses resultados podem explicar o comportamento evidenciado nos testes de discriminação olfatória e reconhecimento social. Para os roedores, as informações de natureza olfatória são importantes para reconhecer indivíduos da mesma espécie e para a capacidade de memória social (PREDIGER et al., 2005; 2012). Na DP o bulbo olfatório é a primeira estrutura cerebral a exibir a patologia (BRAAK et al., 2004). Esta disfunção ocorre porque a DA parece ser necessária para a memória olfatória, uma vez que a sua liberação aumenta durante o aprendizado olfatório (COOPERSMITH et al., 1991), enquanto os antagonistas de receptores de DA ou tratamentos que reduzem a neurotransmissão dopaminérgica como o MPTP inibem a memória olfatória (PREDIGER et al., 2004, 2005, 2012).

Diferentes linhas de evidência sugerem o envolvimento da dopamina em processos cognitivos e olfativos, tanto em humanos quanto em roedores. Em ratos, estruturas cerebrais relacionadas aos processos de aprendizado e memória, como o hipocampo, o córtex pré-frontal e o estriado, são inervadas por neurônios dopaminérgicos (SEAMANS et al., 1998). A disfunção dopaminérgica nestas áreas está relacionada ao prejuízo seletivo das memórias espacial, operacional e de procedimento (ou hábitos), respectivamente (GASBARRI et al., 1996; DA CUNHA et al., 2001, 2003; MIYOSHI et al., 2002). Além disso, o bulbo olfatório de mamíferos contém um grande número de interneurônios dopaminérgicos que são muito importantes no processamento de odores (DOTY e RISSER, 1989; DAVILA et al., 2003).

Em roedores, estudos prévios têm demonstrado um prejuízo nas funções olfativas em consequência de tratamentos que reduzem a neurotransmissão dopaminérgica, como MPTP (PREDIGER et al., 2012). A DA parece ser também importante para os processos de aprendizado e memória olfativa, uma vez que seus níveis cerebrais aumentam durante o aprendizado olfativo (COOPERSMITH et al., 1991; KEVERNE et al., 1993), enquanto a depleção de DA ou a administração de antagonistas dopaminérgicos prejudicam a memória olfativa (PREDIGER et al., 2012).

Vale ressaltar que a interpretação dos resultados obtidos no teste do reconhecimento social acerca dos processos de memória precisam ser realizados com cautela, considerando que esta memória social está envolvida com a capacidade olfatória dos animais, e de acordo com que foi previamente mencionado, a administração intranasal de MPTP induz

pronunciados déficits olfatórios que podem comprometer o reconhecimento do rato jovem na segunda apresentação.

Nesse sentido, é possível observar que os animais tratados com a associação de cafeína + ACG apresentaram déficit olfatório, não sendo capaz de discriminar os odores entre os compartimentos familiar e não familiar. Por outro lado, estes mesmos animais reverteram o dano causado pelo MPTP sobre a memória social avaliada no teste do reconhecimento social. Este resultado sugere que o olfato parece não ser o único componente envolvido no reconhecimento do rato jovem na segunda apresentação.

Contudo, é preciso considerar que os testes de discriminação olfatória e reconhecimento social foram realizados no segundo e sétimos dia após a administração do MPTP, sendo que as concentrações de dopamina nas estruturas cerebrais foram quantificadas 21 dias após a infusão da neurotoxina.

Estudo realizado por Tadaiesky e colaboradores (2008) avaliou o déficit na memória social de ratos tratados com 6-OHDA no teste do reconhecimento social, sugerindo que este dano estaria relacionado com a depleção dopaminérgica evidenciada no córtex pré-frontal. Entretanto, estes resultados podem ser contraditórios, visto que foram acompanhados por alterações nos níveis de dopamina no estriado dos animais.

Os resultados obtidos em nosso trabalho relacionados aos níveis de DA no CPF, demonstraram que os ratos que receberam a infusão *i.n.* de MPTP apresentaram depleção dopaminérgica de 45,9% nessa estrutura cerebral, quando comparados aos animais do grupo controle. Por outro lado, a análise dos dados revelou que os tratamentos com o extrato de *I. paraguariensis* e com o ACG foram capazes de atenuar significativamente a diminuição das concentrações de DA no CPF, apresentando porcentagens de degeneração dopaminérgica de 28 e 30%, respectivamente. Por fim, é importante destacar também que os tratamentos com cafeína e com a associação de cafeína + ACG não demonstraram capacidade significativa de reverter ou atenuar o dano dopaminérgico causado pelo MPTP nos animais.

A ação do sistema dopaminérgico sobre o controle das funções comportamentais é bastante complexa, pois a atividade reduzida ou ampliada desse sistema pode gerar prejuízos funcionais (COOLS, 2016). O desequilíbrio do sistema dopaminérgico pode impactar sobre sintomas relacionados à depressão. Outro ponto que adiciona complexidade a esse cenário é o processo degenerativo progressivo. Níveis variados de degeneração dopaminérgica podem causar alterações diversificadas na

sinalização dopaminérgica em diferentes regiões do cérebro (DREYER, 2014).

A conexão entre o CPF e o estriado (via corticoestriatal) está envolvida no controle de motivação, de recompensa e de comportamentos relacionados à depressão (VOLMAN et al., 2013). Em pacientes parkinsonianos pode ocorrer um perfil semelhante de sequência de eventos com relação à degeneração parcial, aparecimento de sintomas não motores e preservação das funções motoras (BRAAK et al., 2004; CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os tratamentos com o EHE de *Ilex paraguariensis*, cafeína e com a associação de cafeína + ACG reverteram a depleção dopaminérgica causada pela administração *i.n.* de MPTP nos animais, apresentando uma redução dopaminérgica no estriado de 11,4%, 12,5% e 10,7%, respectivamente. Em contrapartida, a redução das concentrações estriatais de DA nos animais do grupo controle MPTP foi de 33,6%. O tratamento com ACG, por sua vez, apresentou capacidade de atenuar a redução dopaminérgica, reduzindo em 16,4% a depleção dopaminérgica comparada ao grupo controle MPTP.

Diante disso, é possível sugerir que o efeito dos tratamentos observados no comportamento tipo-depressivo dos animais pode estar associado à capacidade de reversão ou atenuação frente à depleção dopaminérgica do estriado.

Os déficits motores significativos observados 21 dias após a administração *i.n.* de MPTP em ratos parece estar associado à depleção dopaminérgica no estriado. Entretanto, é preciso avaliar com cautela essa correlação, uma vez que os tratamentos com o extrato de *I. paraguariensis* e com as substâncias isoladas não foram capazes de reduzir significativamente os prejuízos motores causados pelo MPTP avaliado no campo aberto, embora tenham demonstrado capacidade de reverter a degeneração de DA no estriado.

É importante destacar que a avaliação da expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) torna-se extremamente importante para melhor compreensão da neurodegeneração dopaminérgica verificada na análise direta da concentração da catecolamina. A TH, enzima que catalisa a conversão da tirosina a L-DOPA é a primeira etapa e também um passo limitante na biossíntese da dopamina. A atividade da TH reflete uma combinação do ritmo de renovação e da densidade de terminais nervosos catecolaminérgicos em algumas regiões cerebrais. A marcação de TH vem sendo amplamente utilizada como marcação de morte neuronal da via nigroestriatal induzida pelo MPTP (PREDIGER et al., 2011;

MATHEUS et al., 2015). Através da técnica da imunohistoquímica, por exemplo, é possível demonstrar exatamente as diferentes regiões cerebrais de síntese da dopamina, bem como as vias neuronais de projeção dopaminérgicas (JÖHREN et al., 1997). Adicionalmente, o ensaio de imunodeteção de proteínas (*western blot*) pode fornecer importantes dados quantitativos de TH que auxiliam no entendimento do processo de neurodegeneração dopaminérgica nas diferentes regiões cerebrais e seu envolvimento na fisiopatologia da DP.

Diante disso, é importante assumirmos neste momento que a ausência de uma avaliação da expressão da enzima TH representa uma importante limitação do presente estudo, sendo que estes experimentos já se encontram em andamento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho exploramos pela primeira vez os efeitos comportamentais e neuroquímicos de um extrato hidroetanólico (EHE) de *Ilex paraguariensis*, em um modelo animal da doença de Parkinson (DP) induzido pela administração intranasal da neurotoxina MPTP.

Inicialmente, desenvolvemos e caracterizamos quimicamente um extrato hidroetanólico a partir das folhas de *I. paraguariensis*. Para isso, a granulometria da matéria-prima vegetal (MPV) foi padronizada, aumentando a superfície de contato com o líquido extrator, permitindo maior eficiência na extração. Para a preparação do extrato utilizamos a turboextração, processo extrativo por força de cisalhamento, o qual permitiu a obtenção de um extrato com altos teores de compostos fenólicos e metilxantinas, em curto período de tempo. Considerando sua utilização como forma farmacêutica intermediária, efetuamos a secagem do extrato por liofilização, visando maior estabilidade, homogeneidade na distribuição da composição química na preparação, e maior precisão na pesagem em relação a extratos líquidos.

Posteriormente, realizamos a caracterização do EHE através da identificação da composição química e quantificação das substâncias majoritárias, etapa importante para o controle de qualidade de extratos vegetais. Para isso utilizamos a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) acoplada à espectrometria de massas (EM) e detector de arranjo de diodos (PDA).

Através de métodos desenvolvidos pelas técnicas citadas, foram identificados nove compostos majoritários no EHE de *I. paraguariensis*, as metilxantinas, cafeína e teobromina, os ácidos fenólicos, ácido 3-*O*-cafeoilquínico, ácido 5-*O*-cafeoilquínico (ácido clorogênico), ácido 4-*O*-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico, e o flavonoide rutina.

Visando o controle de qualidade do extrato, realizamos a quantificação dos marcadores químicos por CLUE-PDA. Considerando sua relação direta com os efeitos farmacológicos comprovados pela literatura científica, escolhemos como marcadores, um composto de cada uma das principais classes de metabólitos da erva-mate. Dessa forma, foram quantificados os teores da metilxantina cafeína, do ácido fenólico ácido clorogênico, e do flavonoide rutina. A validação dos parâmetros analíticos demonstrou que o método desenvolvido foi sensível, preciso e exato, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Considerando o envolvimento do estresse oxidativo na etiologia da DP, e a composição química do EHE de *I. paraguariensis* rica em

compostos antioxidantes, realizamos uma triagem *in vitro* do potencial antioxidante do extrato. O EHE demonstrou alto potencial antioxidante reativo total, com rápido início e grande duração da capacidade de sequestro de espécies reativas no ensaio do TRAP/TAR. Nesse sentido, o extrato apresentou grande capacidade de captação do radical hidroxila, espécie considerada como a mais reativa e altamente capaz de reagir com macromoléculas celulares, causando dano oxidativo.

Por fim, investigamos os efeitos do EHE de *I. paraguariensis*, e dos compostos cafeína e ácido clorogênico sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração *i.n.* de MPTP, em um modelo animal da doença de Parkinson. O aparecimento de déficits olfatórios iniciais, sintomas cognitivos (como perda de memórias operacionais) e emocionais (como depressão e ansiedade) é consenso na literatura científica atual. Nesse sentido, o protocolo experimental realizado neste modelo reproduziu o decurso temporal da DP, contemplando tais sintomas, bem como os clássicos sintomas motores.

O EHE de *I. paraguariensis* demonstrou efeitos benéficos frente aos sintomas não motores da DP, e sugerem o envolvimento da cafeína e do ácido clorogênico, cujas doses administradas nos animais são proporcionais às suas concentrações no extrato. Os principais benefícios proporcionados pelo EHE de erva-mate sobre os parâmetros avaliados estão discutidos a seguir:

- *Sintomas olfatórios*: Redução do dano olfatório precoce no teste de discriminação olfatória. O efeito observado para o extrato pode estar relacionado com o antagonismo de receptores A₂A mediado pela cafeína, bem como parece ter o envolvimento do potencial antioxidante conferido pelo ácido clorogênico, diminuindo o estresse oxidativo. Todavia, para elucidar os mecanismos sugeridos, é preciso avaliar por exemplo, parâmetros de estresse oxidativo nas estruturas cerebrais estudadas neste trabalho.
- *Sintomas cognitivos*: Melhora na memória social de curto prazo no teste de reconhecimento social. Embora o tipo de memória avaliada pelo teste do reconhecimento social tenha influência olfativa, os resultados sugerem que há outros mecanismos cognitivos envolvidos no efeito do extrato de erva-mate sobre a memória.
- *Sintomas emocionais*: Melhora no comportamento tipo-depressivo no splash teste e no teste do nado forçado. O efeito positivo do EHE de *I. paraguariensis* parece ter maior envolvimento do ácido clorogênico, o qual apresentou melhor atividade sobre

comportamentos como falta de sensação de prazer e apatia, conhecidos como anedonia. Apesar disso, a cafeína também demonstrou atenuar o prejuízo emocional presente na DP.

É difícil estabelecer seguramente uma correlação entre os efeitos do extrato de *I. paraguariensis* sobre a neurodegeneração dopaminérgica e os sintomas não motores da DP. Tal limitação decorre do fato de que os níveis dopaminérgicos cerebrais foram avaliados somente no último dia do protocolo experimental. Dessa forma, a magnitude da neurodegeneração nos dias em que foram realizados os testes comportamentais é desconhecida.

Em relação aos sintomas motores da DP, o extrato foi capaz de atenuar o prejuízo motor precoce avaliado no teste do nado forçado, no 14º dia de tratamento. Por outro lado, o EHE não demonstrou o mesmo efeito sobre o déficit motor tardio, quando realizamos o teste do campo aberto, ao final do protocolo experimental (21º dia de tratamento).

A neurodegeneração dopaminérgica na região cerebral do estriado está, conhecidamente relacionada com os danos motores presentes na doença de Parkinson. Contudo, em nosso trabalho esta relação não foi verificada, a medida que o extrato de erva-mate, bem como a cafeína e o ácido clorogênico, protegeu frente à degeneração de DA no estriado, sem atenuar o prejuízo motor. Conforme discutido anteriormente, a avaliação da expressão da enzima tirosina hidroxilase deve ser realizada para compreender melhor esta questão.

Por fim, é preciso destacar que os benefícios do extrato de erva-mate demonstrados neste trabalho são significativos, especialmente quando avaliamos as alternativas farmacoterapêuticas atualmente empregadas no tratamento da DP. A levodopa, fármaco mais utilizado para este fim, apresenta boa resposta sobre os sintomas motores, entretanto apresenta diversos efeitos colaterais. Dessa forma, a atenuação da neurodegeneração dopaminérgica oferecida pelo extrato, e a diminuição dos prejuízos não motores precoces da doença de Parkinson, sugere o potencial de emprego do EHE de *I. paraguariensis* como adjuvante para o alívio dos sintomas não motores, retardando o processo neurodegenerativo.

CONCLUSÕES

- As análises por CLUE-PDA e CLUE-EM permitiram a caracterização química quali e quantitativa do extrato hidroetanólico (EHE) das folhas de *Ilex paraguariensis* desenvolvido, sendo identificados nove compostos majoritários: as metilxantinas, cafeína e teobromina, os ácidos fenólicos, ácido 3-O-cafeoilquínico, ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico), ácido 4-O-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico, e o flavonoide rutina.
- A caracterização química do EHE de *I. paraguariensis* foi realizada, resultando em teores elevados de metilxantinas e compostos fenólicos. Os teores de cafeína, ácido clorogênico e rutina presentes no extrato foram de 29,3, 67,5 e 12,4 miligramas por grama de extrato, respectivamente.
- O EHE na concentração de 5 µg/mL demonstrou potencial antioxidante reativo total, reduzindo significativamente os valores de área sob a curva de quimiluminescência do luminol no ensaio do TRAP.
- A concentração de 5 µg/mL do EHE demonstrou capacidade de captação do radical hidroxila, reduzindo a porcentagem de degradação da 2-desoxirribose.
- Os tratamentos *v.o.* com o EHE de *Ilex paraguariensis* (300 mg/kg), cafeína (10 mg/kg), ácido clorogênico (20 mg/kg) atenuaram os prejuízos olfatórios causados pela administração *i.n.* de MPTP em ratos no teste da discriminação olfatória.
- Os tratamentos *v.o.* com o EHE de *Ilex paraguariensis* (300 mg/kg), ácido clorogênico (20 mg/kg) e a associação de cafeína (10 mg/kg) + ácido clorogênico (20 mg/kg) reverteram o dano na memória de curta duração causado pela infusão *i.n.* de MPTP em ratos, no teste de reconhecimento social. A cafeína (10 mg/kg) atenuou os danos sobre a memória em ambos os testes.
- Os prejuízos emocionais causados pelo MPTP em ratos foram atenuados pelos tratamentos *v.o.* com o EHE de *I. paraguariensis*, cafeína, ácido clorogênico e associação de cafeína + ácido clorogênico, no splash teste e nado forçado.
- O EHE de *I. paraguariensis*, bem como os compostos cafeína e ácido clorogênico, isolados ou em associação,

administrados por *v.o.*, não foram capazes de reverter o dano motor causado pelo MPTP no teste do campo aberto.

- Os tratamentos com o EHE de *I. paraguariensis*, cafeína, ácido clorogênico e a associação de cafeína + ácido clorogênico reduziram a depleção nas concentrações de dopamina causada pelo MPTP no bulbo olfatório e no estriado. Por outro lado, somente o extrato e o ácido clorogênico reduziram a depleção dopaminérgica causada pelo MPTP no córtex pré-frontal.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. S.; PREDIGER, R. D. **Frontiers in Parkinson's Disease Research**. 1. ed. Florianopolis: Nova Science Publishers, Inc. (September 4, 2012), 2012.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM)**. 2013. 5. ed. Arlington, VA.

ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. **Food Chemistry**, v.97 (3), p.459-464, 2006.

ANGELUCCI, M.E.M. et al. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. **European Journal of Pharmacology**, v. 373, n. 2-3, p. 135-140, 1999.

ANTONI, V. L. **Estrutura competitiva da Indústria Ervateira no Rio Grande do Sul**, Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

AOAC. Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. **Association of Official Analytical Chemists International**, 2002.

AQUILANO, K. et al. Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: A review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 12, p. 2416-2426, 2008.

AQUILONIUS, S. M.; NYHOLM, D. Development of new levodopa treatment strategies in Parkinson's disease - from bedside to bench to bedside. **Uppsala Journal of Medical Sciences**, v. 122, n. 2, p. 71-77, 2017.

ARROZI, A., et al. Antioxidant modulation in restoring mitochondrial function in neurodegeneration. **International Journal of Neuroscience**, v. 127, n. 3, p. 218-235, 2017.

ASCHERIO, A. et al. Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. **Annals of Neurology**, v. 50, n. 1, p. 56-63, 2001.

ASCHERIO, A. et al. Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. **American Journal of Epidemiology**, v. 160, p. 977-984, 2004.

AYTON, S., Iron accumulation confers neurotoxicity to a vulnerable population of nigral neurons: Implications for Parkinson's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 9, n. 27, 2014.

BAGGA, P., PATEL, A.B. Pretreatment of caffeine leads to partial neuroprotection in MPTP model of Parkinson's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 11 n. 11, p. 1750-1751, 2016.

BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de produtos farmacêuticos a partir de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2016. V. 1. p.129.

BEAMER, C. A.; SHEPHERD, D. M. Inhibition of TLR ligand- and interferon gamma-induced murine microglial activation by Panax notoginseng. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, p. 465–476, 2012.

BEHAN, W. M.; STONE, T. W. Enhanced neuronal damage by co-administration of quinolinic acid and free radicals, and protection by adenosine A2A receptor antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1435-1442, 2002.

BHIDE, N. et al. The effects of BMY-14802 against l-DOPA- and dopamine agonist-induced dyskinesia in the hemiparkinsonian rat. **Psychopharmacology**, v. 227, n. 3, p. 533-544, 2013.

BINUKUMAR, B.K., PANT, H.C. TFP5/TP5 peptide provides neuroprotection in the MPTP model of Parkinson's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 11, n. 5, p. 698-701, 2016.

BIXBY, M. et al. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Science**, v.77, p.345-358, 2005.

BLESA, J. et al. Oxidative stress and Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, n. 91, 2015.

BLANDINI, F., ARMENTERO, M. T. Animal models of Parkinson's disease. **FEBS Journal**, v. 279, n. 7, p. 1156-1166, 2012.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. Herbal medicine: expanded comission and monographs. **American Botanical Council**, p. 249-252, 2000.

BOAVENTURA, B.C.B., et al. Effect of in vitro digestion of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract on the cellular antioxidant activity, antiproliferative activity and cytotoxicity toward HepG2 cells. **Food Research International**, v. 77, p. 257-263, 2015.

BOAVENTURA, B.C.B. et al. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) infusion obtained by freeze concentration technology on antioxidant status of healthy individuals. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 948-954, 2015.

BOADO, L.S., FRETES, R.M., BRUMOVSKY, L.A. Bioavailability and antioxidant effect of the *Ilex paraguariensis* polyphenols. **Nutrition and Food Science**, v. 45, n. 2, p. 326-335, 2015.

BOOKER, A., JOHNSTON, D., HEINRICH, M. The Welfare Effects of Trade in Phytomedicines: A Multi-Disciplinary Analysis of Turmeric Production. **World Development**, v. 77, p. 221-230, 2016.

BORGONOVO, J., et al. Changes in neural circuitry associated with depression at pre-clinical, pre-motor and early motor phases of Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 35, p. 17-24, 2017.

BOUAYED, J. Polyphenols: A potential new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. **Current Nutrition and Food Science**, v. 6, n. 1, p. 13-18, 2010.

BOUAYED, J., et al. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 262, n. 1-2, p. 77-84, 2007.

BRAAK, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease, **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, 2003.

BRAAK H, et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Research**, v. 318, p. 121-134, 2004.

BRACESCO, N. et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.9, p.379-387, 2003.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2014.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. **Vigitel: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Vol. 1. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas** : volume 3 / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 604 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : RENAME 2014** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – 9. ed. rev. e atual. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015. 230 p.

BROWN, M.G., et al. How effective are disease-modifying drugs in delaying progression in relapsing-onset MS? **Neurology**, v. 69, n. 15, p. 1498-1507, 2007.

CALVELLO, R. et al. Vitamin D Treatment Attenuates Neuroinflammation and Dopaminergic Neurodegeneration in an Animal Model of Parkinson's Disease, Shifting M1 to M2 Microglia Responses. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. 327-339, 2017.

CAMOUGRAND, N., RIGOULET, M. Aging and oxidative stress: Studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. **Respiration Physiology**, v. 128, n. 3, p. 393-401, 2001.

CAMPOS, H. C. et al. The Role of Natural Products in the Discovery of New Drug Candidates for the Treatment of Neurodegenerative Disorders I: Parkinson's Disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 10, p. 239-250, 2011.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITO BELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, 71, 58-65, 2000.

CARDOZO JUNIOR, E.L., MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440-454, 2016.

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: CNPF/EMBRAPA, p. 280-287, 1994.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação**, ed. UFSCar: São Carlos, Brasil, 2001.

CAUDLE, W. M.; ZHANG, J. Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in parkinson disease. **Experimental Neurology**, v. 220, n. 2, p. 230-233, 2009.

CHAN, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. **Chemosphere**, v. 52, n. 9, p. 1361-1371, 2003.

CHATTOPADHYAY, D., NAIK, T.N. Antivirals of ethnomedicinal origin: Structure-activity relationship and scope. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 275-301, 2007.

CHAUDHURI, K.R., RIZOS, A., SETHI, K.D. Motor and nonmotor complications in Parkinson's disease: An argument for continuous drug delivery? **Journal of Neural Transmission**, v. 120, n. 9, p. 1305-1320, 2013.

CHAUDHURI, K.R., et al. Parkinson's disease: The non-motor issues. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 17, n. 10, p. 717-723, 2011.

CHAUDHURI, K.R., SCHAPIRA, A.H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 5, p. 464-474, 2009.

CHEN, J. F. et al. Adenosine A2A receptors and brain injury: broad spectrum of neuroprotection, multifaceted actions and "fine tuning" modulation. **Progress in Neurobiology**, v. 83, p. 310-331, 2007.

CHEN, J. F. et al. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience**; v. 21, n. 10, p. 143, 2001.

CHEN, X., GHRIBI, O., GEIGER, J.D. Caffeine protects against disruptions of the blood-brain barrier in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n.1, p. 127-141, 2010.

CHEN, X. et al. Caffeine protects against MPTP-induced blood-brain barrier dysfunction in mouse striatum. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, n. 4, p. 1147-1157, 2008.

CHINTA, S.J., et al. Environmental stress, ageing and glial cell senescence: A novel mechanistic link to Parkinson's disease? **Journal of Internal Medicine**, v. 273, n. 5, p. 429-436, 2013.

CHRISTEN, Y. *Ginkgo biloba* and neurodegenerative disorders. **Frontiers in bioscience: A journal and virtual library**, v. 9, p. 3091-3104, 2004.

COBB, C.A., COLE, M.P. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. **Neurobiology of Disease**, v. 84, p. 4-21, 2015.

COLLIER, T.J., KANAAN, N.M., KORDOWER, J.H. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: Evidence from studies of non-human primates. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, 6, p. 359-366, 2011.

COLPO, G. et al. *Ilex paraguariensis* has antioxidant potential and attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and memory dysfunction in rats. **Neurotoxicity Research**, v. 12, n. 3, p. 171-180, 2007.

CONNOLLY, B.S.; LANG, A.E. Pharmacological treatment of Parkinson disease: A review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 16, p. 1670-1683, 2014.

COOLS, R. The costs and benefits of brain dopamine for cognitive control. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science**, 7 (5), pp. 317-329(2016).

COOPERSMITH, R. et al. Extracellular dopamine increase in neonatal olfactory bulb during odor preference training. **Brain Research**, v. 564, p. 149–153, 1991.

COSTA, J. et al. Caffeine exposure and the risk of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. 1, p. 221-238, 2010.

COSTA, S.L., et al. Impact of Plant-Derived Flavonoids on Neurodegenerative Diseases. **Neurotoxicity Research**, v. 30, n. 1, p. 41-52, 2016.

CRAGG, G.M., GROTHAUS, P.G., NEWMAN, D.J. Natural Products in Drug Discovery: Recent Advances. **Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives**, p. 1-42, 2012.

CRYAN, J.F., MARKOU, A., LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238-245, 2002.

DA CUNHA, C. et al. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. **Behavioral Brain Research**, v. 124, p. 9-18, 2001.

DA CUNHA, C. et al. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 79, p. 236-242, 2003.

DALL'IGNA, O.P. et al. Caffeine and adenosine A2A receptor antagonists prevent β -amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. **Experimental Neurology**, v. 203, n. 1, p. 241-245, 2007.

DANTZER, R. et al. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology**, v. 91, n. 3, p. 363-368, 1987.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, p. 889-909, 2003.

DAVAL, J.-L., NICOLAS, F., DORIAT, J.-F. Adenosine physiology and pharmacology: How about A₂ receptors? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 71, n. 3, p. 325-335, 1996.

DAVILA, N.G.; BLAKEMORE, L.J.; TROMBLEY, P.Q. Dopamine modulates synaptic transmission between rat olfactory bulb neurons in culture. **Journal of Neurophysiology**, v. 90, p. 395–404, 2003.

DE LIMA, M.E., et al. Protective effect of Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) against oxidative damage in vitro in rat brain synaptosomal/mitochondrial P2 fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 447-452, 2017.

DE MEJIA, E. G. et. al. Effect of Yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1966-1973, 2005.

DE MEJIA, E. G. et. al. Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 23-34, 2010.

DE-PARIS, F., et al. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 5-8, 2002.

DE SOUZA, A. P. T. B. et al. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas hidroetanólicas das flores de *Calendula officinalis* L. empregando planejamento fatorial. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 13-21, 2010.

DE SOUZA L. M. et al. Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: Development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7307– 7315, 2011.

DESMARCHELIER, C.; et al. Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in southwest Amazonia (Bolivia and Peru). **In Pharmacognosy**, v. 35, p. 288-296, 1997.

DEY, A.; NATH, J. Neuroprotective therapeutics from botanicals and phytochemicals against Huntington's disease and related neurodegenerative disorders. **Journal of herbal medicine**, v. 5, p. 1–19, 2015.

DORSEY, E.R. et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 384-386, 2007.

DOTY, R.L.; RISSER, J.M. Influence of the D2 dopamine receptor agonist quinpirole on the odor detection performance of rat before and after spiperone administration. **Psychopharmacology**, v. 98, p. 310–315, 1989.

DOTY, R.L. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: Is it viable? **Annals of Neurology**, v. 63, n. 1, p. 7-15, 2008.

DRESCH, M.T.K., et al. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. **Analytical Biochemistry**, v. 385, n. 1, p. 107-114, 2009.

DREYER, J.K. Three mechanisms by which striatal denervation causes breakdown of dopamine Signaling. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 37, p. 12444-12456, 2014.

DUARTE, E.C., BARRETO, S.M. Transição demográfica e epidemiológica: a Epidemiologia e Serviços de Saúde revisita e atualiza o tema. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 21, p. 529-32, 2012.

DUTRA, R.C., et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

ELISABETSKY, E. Traditional medicines and the new paradigm of psychotropic drug action. **Advances in Phytomedicine**, v. 1, p. 133-144, 2002.

EVERSE, J., COATES, P.W. Role of peroxidases in Parkinson disease: A hypothesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 10, p. 1296-1310, 2005.

FAVA, M., KENDLER, K.S. Major depressive disorder. **Neuron**, v. 28, n. 2, p. 335-341, 2000.

FERNÁNDEZ, S., et al. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, n. 2, p. 399-404, 2004.

FILIP, R. et al. Mate substitutes or adulterants: Study of xanthine content. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 2, p. 129-131, 1998.

FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, p. 1437-1446, 2000.

FILIP, R. et al. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774-778, 2001.

FILIP, R. et. al. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibulary glands. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 649-655, 2007.

FOLLMER, C., NETTO, H.J.C.B. Multifunctional drugs: Monoamine oxidase and α -Synuclein as targets for the treatment of Parkinson's disease [Fármacos multifuncionais: Monoamina oxidase e α -sinucleína como alvos terapêuticos na doença de parkinson]. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 306-313, 2013.

FREDHOLM, B.B., ET AL. Adenosine and Brain Function. **International Review of Neurobiology**, v. 63, p. 191-270, 2005.

FREDHOLM, B.B., SVENNINGSSON, P. Adenosine-dopamine interactions: Development of a concept and some comments on therapeutic possibilities. **Neurology**, v. 61, p. 5-9, 2003.

FREDHOLM, B.B. Adenosine receptors as targets for drug development. **Drug News and Perspectives**, v.16, n.5, p.283-289, 2003.

FREITAS, M.E., RUIZ-LOPEZ, M., FOX, S.H. Novel Levodopa Formulations for Parkinson's Disease. **CNS Drugs**, v. 30, n. 11, p. 1079-1095, 2016.

- FRITSCH, T. et al. Parkinson Disease: Research Update and Clinical Management. **Southern Medical Association**, p. 650-656, 2012.
- GAMBERO, A., RIBEIRO, M.L. The positive effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) in obesity. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 730-750, 2015.
- GASBARRI, A. et al. Spatial memory impairment induced by lesions of the mesohippocampal dopaminergic system in the rat. **Neuroscience**, v. 74, p. 1037-1044, 1996.
- GARCIA-RUIZ, P.J., CHAUDHURI, K.R., MARTINEZ-MARTIN, P. Non-motor symptoms of Parkinson's disease. A review from the past. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 338, (1-2), p. 30-33, 2014.
- GATTO, E.M., et al. Inverse association between yerba mate consumption and idiopathic Parkinson's disease. A case-control study. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 356 (1-2), p. 163-167, 2015.
- GANDHI, S., ABRAMOV, A.Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxidative medicine and cellular longevity**, p. 428010, 2012.
- GERTSCH, J. Botanical Drugs, Synergy, and Network Pharmacology: Forth and Back to Intelligent Mixtures. **Planta medica**. v. 77, p. 1086-98, 2011.
- GUERRERO, E., et al. Recent advances in α -synuclein functions, advanced glycation, and toxicity: implications for Parkinson's disease. **Molecular neurobiology**, v. 47, n. 2, p. 525-536, 2013.
- GIBERTI, G. C. Los parientes silvestres de la yerba mate y el problema de su adulteracion. **Dominguezia**, v.7, n.1, p.1-22, Buenos Aires, 1989.
- GILANI, A. H.; RAHMAN, A. U. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.43-49, 2005.
- GIROUX, M.L. Parkinson disease: Managing a complex, progressive disease at all stages. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, 74 (5), pp. 313-328(2007).

GOLDMAN, S.M. Environmental toxins and Parkinson's disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 54, p. 141-164, 2014.

GOLDMAN, J.G., POSTUMA, R. Premotor and nonmotor features of Parkinson's disease. **Current Opinion in Neurology**, v. 27, n. 4, p. 434-441, 2014.

GREENAMYRE, J.T., et al. Complex I and Parkinson's disease. **IUBMB Life**, v. 52, n. 3-5, p. 135-141, 2002.

GREENAMYRE, J.T. Glutamatergic influences on the basal ganglia. **Clinical Neuropharmacology**, v. 24, n. 2, p. 65-70, 2001.

GRINBERG, L.T., et al. Brainstem pathology and non-motor symptoms in PD. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 289, n. (1-2), p. 81-88, 2010.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.224, p.338-344, 1996.

GUGLIUCCI, A. et al. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. **Fitoterapia**, v.80, p.138–142, 2009.

GUGLIUCCI, A. et al. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v.80, p.339–344, 2009.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A. J. C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry & Molecular Biology International**, v.35, n.1, p 47-56, 1995.

GURIB-FAKIM, A. Traditional roles and future prospects for medicinal plants in health care. **Asian Biotechnology and Development Review**, v. 13, n. 3, p. 77-83, 2011.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, n.1, p. 1-93, 2006.

- GUTTERIDGE, J.M.C., HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 561-564, 2010.
- HALD, A. L.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? **Experimental Neurology**, v. 193, n. 2, p. 279-90, 2005.
- HALEAGRAHARA, N., PONNUSAMY, K. Neuroprotective effect of *Centella asiatica* extract (CAE) on experimentally induced Parkinsonism in aged Sprague–Dawley rats. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 35, p. 41–47, 2010.
- HALLIWELL, B., et al. Lipid peroxidation in brain homogenates: The role of iron and hydroxyl radicals (multiple letters). **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 3, p. 1330-1331, 1997.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634-58, 2006.
- HASEGAWA, E., et al. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 170, n. 3, p. 1049-1055, 1990.
- HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review and chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v.72, n.9, p.138-151, 2007.
- HEINRICH, M. Ethnopharmacology: Quo vadis? Challenges for the future. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 2, p. 99-102, 2014.
- HEMMERLE, A.M., HERMAN, J.P., SEROOGY, K.B. Stress, depression and Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 233, n. 1, p. 79-86, 2012.

HENCHCLIFFE, C.; BEAL, M. F. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. **Nature clinical practice neurology**, v. 4, n. 11, 2008.

HERRERA, A., et al. Are Dopamine Oxidation Metabolites Involved in the Loss of Dopaminergic Neurons in the Nigrostriatal System in Parkinson's Disease? **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 702-711, 2017.

HIRSCH, E.C., VYAS, S., HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 18, v. 1, p. S210-S212, 2012.

HODGES, D.M., et al. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, n. 4, p. 604-611, 1999.

HU, S., et al. Protection against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺)-induced apoptosis by water extract of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) in SH-SY5Y cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 1, p. 34-42, 2011.

IBGE - Banco de dados. IBGE – Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA 2015. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 25 junho 2017.

ICH, **International Conference on Harmonization**. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Q2 (R1), London, 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>

ISINGRINI, E. et al. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: A model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. 10404, 2010.

JAY, J.R., DUNNETT, S.B. An operant serial implicit learning task (SILT) in rats: Task acquisition, performance and the effects of striatal lesions. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 163, n. 2, p. 235-244, 2007.

JAY, T.M., et al. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses is impaired by loss of dopamine and stress: Importance for psychiatric diseases. **Neurotoxicity Research**, v. 6, n. 3, p. 233-244, 2004.

JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 53, n. 3, p. 26-38, 2003.

JENNER, P., OLANOW, C.W. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 66, n. 10, p. 24-30, 2006.

JESCHKE E, et al. Prescribing patterns in dementia: a multicentre observational study in a German network of CAM physicians. **BMC Neurology**, v. 11, n. 99, 2011.

JIANG, H. et al. Brain Iron Metabolism Dysfunction in Parkinson's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 4, p. 3078-3101, 2017.

JIN, H. et al. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: Preclinical and clinical outcomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, p. 1282–1294, 2014.

JOGHATAIE, M.T., et al. Protective effect of caffeine against neurodegeneration in a model of Parkinson's disease in rat: Behavioral and histochemical evidence. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 10, n. 8, p. 465-468, 2004.

JÖHREN, O., et al. Angiotensin II AT(1A) receptor mRNA expression is induced by estrogen- progesterone in dopaminergic neurons of the female rat arcuate nucleus. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 21, p. 8283-8292, 1997.

KALDA, A. et al. Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A(2A) receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 248, p. 9-15, 2006.

KANG, X. et al. Protective effects of *Ginkgo biloba* extract on paraquat-induced apoptosis of PC12 cells. **Toxicology In Vitro**, v. 21, p. 1003–1009, 2007.

KANG, J.-T. et al. Quercetin improves the in vitro development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels. **Journal of Veterinary Science**, v. 14, n. 1, p. 15-20, 2013.

KANG, K.S. et al. Beneficial effects of natural phenolics on levodopa methylation and oxidative neurodegeneration. **Brain Research**, v. 1497, p. 1-14, 2013.

KARDANI, J., ROY, I. Understanding Caffeine's Role in Attenuating the Toxicity of α -Synuclein Aggregates: Implications for Risk of Parkinson's Disease. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 6, n. 9, p. 1613-1625, 2015.

KARIYA, S., et al. Increased vulnerability to L-DOPA toxicity in dopaminergic neurons from VMAT2 heterozygote knockout mice. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 27, n. 3, p. 277-279, 2005.

KATZENSCHLAGER, R. et al. *Mucuna pruriens* in Parkinson's disease: A double blind clinical and pharmacological study. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, v. 75, 1672-1677, 2004.

KATZENSCHLAGER, R., POEWE, W. Intestinal levodopa infusion in PD - the first randomized trial. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 3, p. 128-129, 2014.

KATZENSCHLAGER, R. Parkinson's disease: Recent advances. **Journal of Neurology**, v. 261, n. 5, p. 1031-1036, 2014.

KENNEDY, K.A.M. et al. Reactive oxygen species and the neuronal fate. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 2, p. 215-221, 2012.

KEVERNE, E.B. et al. Influence of birth and maternal experience on olfactory bulb neurotransmitter release. **Neuroscience**, v. 56, p. 557-565, 1993.

KHADRAWY, Y.A., et al. Neuroprotective and Therapeutic Effect of Caffeine on the Rat Model of Parkinson's Disease Induced by Rotenone. **Journal of Dietary Supplements**, v. 14, n. 5, p. 553-572, 2017.

KIANIRAD, Y., SIMUNI, T. Novel Approaches to Optimization of Levodopa Therapy for Parkinson's Disease. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 16, n. 4, p. 1-6, 2016.

KIM E. H. et al. Protective effect of aqueous extract of ginseng radix against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in PC12 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 1668–1673, 2003.

KIM M. S. et al. Neuroprotective effect of *Ginkgo biloba* L. extract in a rat model of Parkinson's disease. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 663–6, 2004.

KIM, H.J., KIM, P., SHIN, C.Y. A comprehensive review of the therapeutic and pharmacological effects of ginseng and ginsenosides in central nervous system. **Journal of Ginseng Research**, v. 37, n. 1, p. 8-29, 2013.

KLEIN, G.A. et al. 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**, v. 30, n. 5, p. 320-332, 2011.

KOPULLA, S. et al. Recent advances on the Neuroprotective Potential of Antioxidants in Experimental Models of Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 10608-10629, 2012.

KUMAR, G.P., ANILAKUMAR, K.R., NAVEEN, S. Phytochemicals having neuroprotective properties from dietary sources and medicinal herbs. **Pharmacognosy Journal**, v. 7, n. 1, p. 1-17, 2015.

KUMRAL, A. et al. Protective effects of methylxanthines on hypoxia-induced apoptotic neurodegeneration and long-term cognitive functions in the developing rat brain. **Neonatology**, v. 98, n. 2, p. 128-136, 2010.

KWON, S.-H., et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 649, n. (1-3), p. 210-217, 2010.

- LANDRIGAN, P.J., et al. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 9, p. 1230-1233, 2005.
- LANGSTON, J.W. et al. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 979-980, 1983.
- LANGSTON, J.W. et al. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): Identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. **Neuroscience Letters**, v. 48, n. 1, p. 87-92, 1984.
- LEE C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. **Clinica Chimica Acta.**, v. 295, p. 141–154, 2000.
- LEE, J.H., KIM, I.S., PARK, J.-W. The use of N-t-butyl hydroxylamine for radioprotection in cultured cells and mice. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 8, p. 1435-1442, 2004.
- LEMOS, C. et al. High sucrose consumption induces memory impairment in rats associated with electrophysiological modifications but not with metabolic changes in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 315, p. 196-205, 2016.
- LEWITT, P. A. et al. Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline (KW-6002) reduces "off" time in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, multicenter clinical trial (6002-US-005). 6002-US-005 Study Group. **Annals of Neurology**, v. 63, p. 295-302, 2008.
- LI, S. et al. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. **Chinese Medicine**, v. 3, n. 7, p. 1-16, 2008.
- LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D. Luminol Luminescence Induced by 2,2'-Azo-Bis(2-Amidinopropane) Thermolysis. **Free Radical Research Communications**, v. 17, n. 5, p. 299-311, 1992.
- LISSI, E. et al. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence

measurements. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 153-158, 1995.

LIU, R., et al. Caffeine intake, smoking, and risk of Parkinson disease in men and women. **American Journal of Epidemiology**, v. 175, n. 11, p. 1200-1207, 2012.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1472, n. 1–2, p. 142-152, 1999.

LOPES, M.W. et al. Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 55, p. 92–100, 2016.

LOTHARIUS, J. et al. Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-lineage kinase pathway. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 27, p. 6329-6342, 2005.

LÜCKEMEYER, D.D. et al. Effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on herpes simplex virus types 1 and 2 replication. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 4, p. 535-540, 2012.

LUDKA, F.K. et al. *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract exerts antidepressant-like and neuroprotective effects: Involvement of the NMDA receptor and the L-arginine-NO pathway. **Behavioural Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 384-392, 2016.

LUZ, A.B.G. et al. The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. **International Immunopharmacology**, v. 36, p. 165-172, 2016.

MACHADO, V. et al. Microglia-mediated neuroinflammation and neurotrophic factor-induced protection in the MPTP mouse model of parkinson's disease-lessons from transgenic mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, 151, 2016.

MAIA, L., DE MENDONÇA, A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? **European Journal of Neurology**, v.9, n.4, p. 377-382, 2002.

MANDEL, S.A. et al. Molecular mechanisms of the neuroprotective/neurorescue action of multi-target green tea polyphenols. **Frontiers in Bioscience - Scholar**, v. 4, n. 2, p. 581-598, 2012.

MARKEY, S.P., et al. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. **Nature**, v. 311, n. 5985, p. 464-467, 1984.

MATHEUS, F.C. et al. Temporal Dissociation of Striatum and Prefrontal Cortex Uncouples Anhedonia and Defense Behaviors Relevant to Depression in 6-OHDA-Lesioned Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 6, p. 3891-3899, 2016.

MCDOWELL, K.; CHESSELET M. F. Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. **Neurobiology od Disease**. v. 46, n. 3, p. 597-606, 2012.

MAHAJAN, A. et al. Epidemiology of inpatient stay in Parkinson's disease in the United States: Insights from the Nationwide Inpatient Sample. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 31, p. 162-165, 2016.

MANOHARAN, S. et al. The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, n. 8590578, 2016.

MALINSKA, D., et al. Complex III-dependent superoxide production of brain mitochondria contributes to seizure-related ROS formation. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1797, (6-7), p. 1163-1170, 2010.

MARTINEZ-MARTIN P. The importance of non-motor disturbances to quality of life in Parkinson's disease. **Journal of Neurological Sciences**, v. 310, (1-2), p. 12-16, 2011.

MASSANO, J., BHATIA, K.P. Clinical approach to Parkinson's disease: Features, diagnosis, and principles of management. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 6, 2012.

MCBEAN, G.J., LÓPEZ, M.G., WALLNER, F.K. Redox-based therapeutics in neurodegenerative disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 12, p. 1750-1770, 2017.

MCCHESENEY, J.D., COOPER, R., VOUGHT, K. Phytotherapeutics-Intellectual Property Rights, Global Market, and Global Regulatory Guidelines. **Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives**, p. 499-527, 2012.

MCDOWELL, K., CHESSELET, M.-F. Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 46, n. 3, p. 597-606, 2012.

MIKAMI, Y.; YAMAZAWA, T. Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. **Life Sciences**, v. 139, p. 69-74, 2015.

MILIOLI, E. M. et al. Effect of acute administration of hydroalcohol extract of *Ilex paraguariensis* St Hilaire (Aquifoliaceae) in animal models of Parkinson's disease. **Phytotherapy Research**, v.21, p.771-776, 2007.

MIYOSHI, E.; et al. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Research Bulletin**, v. 58, p. 41-47, 2002.

MOSLEY, R., et al. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Clinical Neuroscience Research**, v. 6, n. 5, p. 261-281, 2006.

MUÑOZ-CULLA, M., ET AL. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) inhibits lymphocyte activation in vitro. **Food and Function**, v.7, n.11, p. 4556-4563, 2016.

MUSHTAQ, M., WANI, S.M. Polyphenols and human health- A review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.4, n.2, p. B338-B360, 2013.

NAKABAYASHI, T.I.K., et al. Prevalence of depression in Parkinson's disease [Prevalência de depressão na doença de Parkinson]. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 35, n. 6, p. 219-227, 2008.

NAKAMURA, T., CHO, D.-H., LIPTON, S.A. Redox regulation of protein misfolding, mitochondrial dysfunction, synaptic damage, and cell death in neurodegenerative diseases. **Experimental Neurology**, v. 238, n. 1, p. 12-21, 2012.

NEHLIG, A; DAVAL, J. L.; DEBRY, G. Caffeine and the centralnervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. **Brain Research**, v.17, p.139-170, 1992.

NESTLER, E.J. Cellular basis of memory for addiction. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 431-443, 2013.

NESTLER, E.J., et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n.1, p. 13-25. 2002.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

OH, M.; CAREY, E. E.; RAJASHEKAR, C. B. Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 578–583, 2009.

OLANOW, C. W. Levodopa: Effect on cell death and the natural history of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v.30, n.1, p. 37–44, 2015.

OLIVEIRA, S. V.; WAQUIL, P. D. Dinâmica de produção e comercialização da erva-mate no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural** [online]. 2015, vol.45, n.4, p.750-756. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782015000400750&lng=en&nrm=iso>. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140276>.

OVERSTREET DH. Modeling depression in animal models. **Methods in Molecular Biology**, v. 829, p. 125-144, 2012.

OWEN, A.M. Cognitive dysfunction in Parkinson's disease: The role of frontostriatal circuitry. **Neuroscientist**, v.10, n. 6, p. 525-537, 2004.

PAHWA, R., et al. Amantadine extended release for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASED Study). **Movement Disorders**, v. 30, n. 6, p. 788-795, 2015.

PALACIOS, N., et al. Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women. **Movement Disorders**, v. 27, n. 10, p. 1276-1282, 2012.

PALMERI, R., et al. Nonmotor Symptoms in Parkinson Disease: A Descriptive Review on Social Cognition Ability. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 30, n. 2, p. 109-121, 2017.

PANDOLFO, P., et al. Caffeine regulates frontocortico-striatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 4, p. 317-328, 2013.

PASINATO, R. **Aspectos etnoentomológicos, socioeconômicos e ecológicos relacionados à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), no município de Lontra, Paraná, Brasil.** 2004. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

PATHAK- GANDHI, N., VAIDYA, A.D.B. Management of Parkinson's disease in Ayurveda: Medicinal plants and adjuvant measures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 197, p. 46-51, 2017.

PEREIRA, D.F., et al. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v. 19, n.10, p. 868-877, 2012.

PERES, R.G., et al. HPLC-DAD-ESI/MS identification and quantification of phenolic compounds in *Ilex paraguariensis* beverages and on-line evaluation of individual antioxidant activity. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 3859-3871, 2013.

PÉREZ, J.M., et al. Comparative antioxidant, antiproliferative and apoptotic effects of *Ilex laurina* and *Ilex paraguariensis* on colon cancer cells. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 8, p. 1279-1286, 2014.

PERLUIGI, M., COCCIA, R., ALLAN BUTTERFIELD, D. 4-hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: A toxic combination illuminated by redox proteomics studies. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 17, n. 11, p. 1590-1609, 2012.

PERRY, T.L. et al. Partial protection from the dopaminergic neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by four different antioxidants in the mouse. **Neuroscience Letters**, 60: 109-114, 1985.

PETZER A, PIENAAR A, PETZER JP. The interactions of caffeine with monoamine oxidase. **Life Sciences**, v. 93, n. 7, p. 283–287, 2013.

PETZER A, et al. Inhibition of monoamine oxidase by selected phenylalkylcaffeine analogues. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 5, p. 677–687, 2014.

PIECHOTA-POLANCZYK, A., FICHNA, J. Review article: The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 387, n. 7, p. 605-620, 2014.

PIFL, C., KISH, S.J., HORNYKIEWICZ, O. Thalamic noradrenaline in Parkinson's disease: Deficits suggest role in motor and non-motor symptoms. **Movement Disorders**, v. 27, n. 13, p. 1618-1624, 2012.

PIMENTEL, G.D., et al. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 5, p. 809-818, 2013.

PIO-CORRÊA, M. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, Rio de Janeiro: **Imprensa Nacional**, v. 4, 1978, p. 138-143.

POHANKA M, DOBES P. Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 9873–9882, 2013.

POHANKA M. The effects of caffeine on the cholinergic system. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 543–549, 2014.

POLITO, L., GRECO, A., SERIPA, D. Genetic Profile, Environmental Exposure, and Their Interaction in Parkinson's Disease. **Parkinson's Disease**, art. no. 6465793, 2016.

PORSOLT, R.D., LE PICHON, M., JALFRE, M. Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-732, 1977.

POSTUMA, R.B., et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 30, n. 12, p. 1591-1601, 2015.

POSTUMA, R.B., MONTPLAISIR, J. Predicting Parkinson's disease - why, when, and how? **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 15 (SUPPL. 3), p. S105-S109, 2009.

PREDIGER, R.D.S., et al. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 153, n. 1, p. 149-157, 2004.

PREDIGER, R.D.S., DA CUNHA, C., TAKAHASHI, R.N. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 16, n. 4, p. 209-218, 2005.

PREDIGER, R.D.S., BATISTA, L.C., TAKAHASHI, R.N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats: Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiology of Aging**, 26 (6), pp. 957-964, 2005.

PREDIGER, R. D. S. et al. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) - The spontaneously hypertensive rat (SHR). **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.8, n. 4, p. 583-594, 2005.

PREDIGER, R. D. et al. The risk is in the air: intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 202, p. 391–403, 2006.

PREDIGER, R. D. S. et al. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.465–473, 2008.

PREDIGER, R.D.S et al. Risk is in the air: an intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) rat model of Parkinson's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1170, p. 629–636, 2009.

PREDIGER, R. D. S. Effects of caffeine in Parkinson's disease: From neuroprotection to the management of motor and non-motor symptoms. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.20, n.1, p.S205-S220, 2010.

PREDIGER, R.D.S et al. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 17, n. 2, p. 114-129, 2010.

PREDIGER, R.D.S., et al. The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): A new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for parkinson's disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 5, p. 489-507, 2011.

PREDIGER, R.D.S., et al. Intranasal administration of neurotoxins in animals: Support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 21, n. 1, p. 90-116, 2012.

PREDIGER, R D; MATHEUS, F C; DE OLIVEIRA, P A; RIAL, D; MORETTI, M; DE SOUZA, A C G; AGUIAR, A S; CUNHA, R A. Adenosine A2A Receptor-Mediated Control of Non-Motor Functions in Parkinson's Disease. In: Micaela Morelli, Nicola Simola, Jadwiga Wardas. (Org.). **Current Topics in Neurotoxicity**. Ied.Londres: Springer International Publishing, 2015, v. 10, p. 183-205.

PRINGSHEIM, T. et al. The Prevalence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. **Movement Disorders**, v. 29, n. 13, 2014.

PRIYADARSHI, A., et al. Environmental risk factors and parkinson's disease: A metaanalysis. **Environmental Research**, v. 86, n. 2, p. 122-127, 2001.

QI, H.; LI, S. Dose-response meta-analysis on coffee, tea and caffeine consumption with risk of Parkinson's disease. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 14, n. 2, p. 430-9, 2014.

PRZEDBORSKI, S., et al. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. **Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 5, p. 1658-1667, 1992.

PU, F., et al. Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 104, n. 4, p. 329-334, 2007.

RAMASSAMY, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. **European Journal of Pharmacology**, v. 545, p. 51–64, 2006.

RASCOL, O., et al. Limitations of current Parkinson's disease therapy. **Annals of Neurology**, v. 53, n. 3, p. S3-S15, 2003.

RASCOL, O. Disease-modifying therapies in PD. **Clinical Neurology**, v. 50, n. 11, p. 831, 2010.

RASCOL, O., et al. Efficacy, safety, and tolerability of overnight switching from immediate- to once daily extended-release pramipexole in early Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 25, n. 14, p. 2326-2332, 2010.

RASCOL, O. Drugs and drug delivery in PD: Optimizing control of symptoms with pramipexole prolonged-release. **European Journal of Neurology**, v. 18, n. 1, p. 3-10, 2011.

- RASCOL, O., et al. Use of metabotropic glutamate 5-receptor antagonists for treatment of levodopa-induced dyskinesias. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 20, n. 9, p. 947-956, 2014.
- RASCOL, O., et al. Long-term effects of rasagiline and the natural history of treated Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 31, n. 10, p. 1489-1496, 2016.
- REGINATTO, F. H. et al. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species - caffeine and theobromine in *ervamate (Ilex paraguariensis)* and other *Ilex* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.10, n.6, p.443-446, 1999.
- REGINATTO, F.H., et al. Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two south Brazilian *Passiflora* species. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 5, p. 348-351, 2006.
- REGLODI, D., et al. Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: Role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. **Progress in Neurobiology**, v. 155, p. 120-148, 2017.
- REIS, E. M. et al. Antidepressant-Like Effect of *Ilex paraguariensis* in Rats. **BioMed Research International**, Article ID 958209, 9 pages 2014.
- RENGER, B. System performance and variability of chromatographic techniques used in pharmaceutical quality control. **Journal of Chromatography**, v. 746, p. 167-176, 2000.
- RICCO, R. A. et al. Estudio comparativo de flavonoides em seis especies austrosudamericana del gênero *Ilex*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.10, n.1, p.29-35, 1991.
- RIEDEL, W. et. al. Caffeine attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. **Psychopharmacology**, v.122, n. 2, p.158-168, 1995.
- RIOS, J. L. et al. Medicinal Plants and Natural Products as Potential Sources for Antiparkinson Drugs. **Planta Medica**, v.82, p. 942–951, 2016.

RIZEK, P.; KUMAR, N.; JOG, M. S. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. *CMAJ*, p. 1–9, 2016.

RODRIGUES, E., CARLINI, E.A. Ritual use of plants with possible action on the central nervous system by the Krahô Indians, Brazil.

Phytotherapy Research, v. 19, n. 2, p. 129-135, 2005.

ROJAS P, et al. EGb761 protects against nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice: role of oxidative stress. **European Journal of Neurosciences**, v. 28, p. 41–50, 2008.

ROJAS P, et al. Effect of EGb761 supplementation on the content of copper in mouse brain in an animal model of Parkinson's disease.

Nutrition, v. 25, p. 482–5, 2009.

ROMANO, A.D., et al. Oxidative stress and aging. **Journal of Nephrology**, v. 23, n. 15, p. S29-S36, 2010.

ROSS, G.W. et al. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. **JAMA**. 24-31;283(20):2674-9, 2000.

SANTOS, E.C.S., et al. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, v. 292, p. 13-21, 2015.

SANTOS, L. P. Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo extrato padronizado de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. visando à obtenção de produto fitoterápico tópico com atividade antioxidante. 2016. Dissertação (MESTRADO) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 2016.

SCHENKEL, E. P.; MONTANHA, J. A.; GOSMANN, G. Triterpene saponins from mate, *Ilex paraguariensis*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.405, p.47-56, 1996.

SCHINELLA, G. R. et al. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.269, n.2, p.357-360, 2000.

SCHINELLA, G., et al. An aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reduces carrageenan-induced edema and inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in animal models of inflammation. **Planta Medica**, v. 80, n. 12, p. 961-968, 2014.

SCHIFFMANN, N. et al. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. **Progress in Neurobiology**, v. 83, p. 277-292, 2007.

SEAMANS, J.K.; FLORESCO, S.B.; PHILLIPS, A.G. D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. **Journal of Neurosciences**, v. 18, p. 1613-1621, 1998.

SENA, L.M., et al. Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis* flavicarpa Degener: Putative involvement of C-glycosylflavonoids. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n.8, p. 967-975, 2009.

SHEN, W., et al. Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons. **Brain Research Bulletin**, v. 88, n.5, p. 487-494, 2012.

SHEN, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, v. 163, n.6, p. 1297-1300, 2015.

SHI, C., et al. *Ginkgo biloba* extract in Alzheimer's disease: From action mechanisms to medical practice. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, n.1, p. 107-123, 2010.

SCHULZ, V. The psychodynamic and pharmacodynamic effects of drugs: a differentiated evaluation of the efficacy of phytotherapy. **Phytomedicine**, v. 7, n. 1, p. 73-81, 2000.

SPENCER, J.P.E. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 3, p. S40-S47, 2010.

SRIRAM, K., et al. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: In vitro and in vivo studies in mice. **Brain Research**, v. 749, n. 1, p. 44-52, 1997.

STAYTE, S.; VISSEL, B. Advances in non-dopaminergic treatments for Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. 8, p. 1–29, 2014.

STEIN, F.L.P., et al. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biological Research for Nursing**, v. 7, n. 2, p. 146-156, 2005.

STOCKWELL, J., JAKOVA, E., CAYABYAB, F.S. Adenosine A1 and A2A receptors in the brain: Current research and their role in neurodegeneration. **Molecules**, v.22, n.4, art. no. 676, 2017.

SUGIMOTO, S. et al. Brazilian Natural Medicines. III. Structures of triterpene oligoglycosides and lipase inhibitors from Mate, leaves of *Ilex paraguariensis*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.57, n.3, p.257-261, 2009.

SULLIVAN GW, et al. Methylxanthines with adenosine alter tnf-alpha-primed pmn activation. **Immunopharmacology**, v.31, n. 1, p. 19–29, 1995.

SULTANA, R., PERLUIGI, M., BUTTERFIELD, D.A. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: A redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 157-169, 2013.

SURMEIER, D.J., OBESO, J.A., HALLIDAY, G.M. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 101-113, 2017.

TADAIESKY, M. T., et al. Emotional, Cognitive and Neurochemical Alterations in a Premotor Stage Model of Parkinson's Disease. **Neuroscience**, v. 156, p. 830-840, 2008.

TERAOKA, M. et al. Cytoprotective effect of chlorogenic acid against α -synuclein-related toxicity in catecholaminergic PC12 cells. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. v. 51, n. 2, p. 122–127, 2012.

TERRANOVA, J.P. et al. Social olfactory recognition in rodents: Deterioration with age, cerebral ischaemia and septal lesion. **Behavioural Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 90-98, 1994.

TORMEN, M. J. Economia ervateira brasileira. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G., et al (Eds.). Erva-mate: Biologia e cultura no Cone Sul. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Editora da UFRGS, 1995. p. 27-40.

VALDUGA, A. T. Uso sustentado e processamento de *Ilex paraguariensis* St Hill (Erva-mate). 2002. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos UFSCar, São Carlos, SP. 2002.

VALDUGA, A. T. et al . Phytochemical profile of morphologically selected yerba-mate progenies. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 1, p. 114-120, 2016 .

VALERGA, J.; RETA, M.; LANARI, M. C. Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n.1, p. 28–35, 2012.

VANKAMPEN J, et al. Neuroprotective actions of the ginseng extract G115 in two rodent models of Parkinson’s disease. **Experimental Neurology**, v. 184, p. 521–529, 2003.

VANKAMPEN JM, et al. *Panax ginseng* is neuroprotective in a novel progressive model of Parkinson’s disease. **Experimental Gerontology**, v. 50, p. 95–105, 2014.

VASCONCELLOS, F. C. F. **Os impactos da criação do Mercosul no mercado de erva-mate no Rio Grande do Sul**. 2012. 66 f. Monografia (Graduação em Ciências Econômicas) –Curso de Graduação em Ciências Econômicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

VASCONCELOS A, GOMES M. Transição demográfica: a experiência brasileira. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 21, p. 539-48, 2012.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the New Millennium: Leadfinding and Biotechnology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, n.3, p.253-262, 2000.

VIGNES, M., et al. Anxiolytic properties of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate (EGCG). **Brain Research**, v. 1110, n.1, p. 102-115, 2006.

VOLMAN, S.F., et al. New insights into the specificity and plasticity of reward and aversion encoding in the mesolimbic system. **Journal of Neuroscience**, v.33, n. 45, p. 17569-17576, 2013.

WANG, X., MICHAELIS, E.K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 2, n. 12, 2010.

WICHTL, M. **Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A handbook for practice on a scientific basis**. 3. ed. Boca Raton: CRC, 2003, p. 366-368.

WILLNER P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n.2, p. 90–110, 2005.

World health statistics: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2017.

XU, K. et al. Caffeine's neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity shows no tolerance to chronic caffeine administration in mice. **Neuroscience Letters**, v. 322, p.13-16, 2002.

XU, K.; BASTIA, E.; SCHWARZSCHILD, M. A. Therapeutic potential of adenosine A2A receptor antagonists in Parkinson's disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 105, p. 267-310, 2005.

XU, K.; et al. Neuroprotection by caffeine: Time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson Disease. **Neuroscience**, v. 167, n. 2, p. 475–481, 2010.

XU, K. et al. Neuroprotection by caffeine in the MPTP model of Parkinson's disease and its dependence on adenosine A2A receptors. **Neuroscience**, v. 322, p. 129–137, 2016.

YACOUBIAN, T.A., STANDAERT, D.G. Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v.1792, n. 7, p. 676-687, 2009.

ZHANG, X.-F., THOMPSON, M., XU, Y.-H. Multifactorial theory applied to the neurotoxicity of paraquat and paraquat-induced mechanisms of developing Parkinson's disease. **Laboratory Investigation**, v. 96, n. 5, p. 496-507, 2016.

ZHAO, J., et al. Oxidative Modification and Its Implications for the Neurodegeneration of Parkinson's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 2, p. 1404-1418, 2017.

ZHOU, C.; HUANG, Y.; PRZEDBORSKI, S. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1147, p. 93-104, 2008.

ZHU, D., et al. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 16, p. 3695-3703, 2005.

ZIEMSEN, T., REICHMANN, H. Non-motor dysfunction in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v.13, n. 6, p. 323-332, 2007.

ZÖLLNER, T., SCHWARZ, M. Herbal reference standards: Applications, definitions and regulatory requirements. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 1-21, 2013.

ZUANAZZI, J.A.S., MAYORGA, P. Phytoproducts and economic development [Fitoprodutos e desenvolvimento econômico]. **Quimica Nova**, v. 33, n. 6, p. 1421-1428, 2010.

ANEXOS**ANEXO A – Publicação: The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy.**

Ana Beatriz Gobbo Luz, Carlos Henrique Blum-Silva, Marcus Vinicius P.S. Nascimento, Bruno Matheus de Campos Facchin, Bruna Baratto, Tânia Silvia Fröde, Flávio Henrique Reginatto, Eduardo Monguilhott Dalmarco.

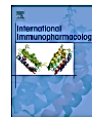
International Immunopharmacology, v. 36, p. 165-172, 2016.
(ISSN 1567-5769)

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.027>



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp

The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy



Ana Beatriz Gobbo Luz^a, Carlos Henrique Blum da Silva^b, Marcus Vinicius P.S. Nascimento^a, Bruno Matheus de Campos Facchin^a, Bruna Baratto^a, Tânia Silvia Fröde^a, Flávio Henrique Reginatto^b, Eduardo Monguilhott Dalmarco^{a,c,*}

^a Department of Clinical Analysis, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Brazil

^b Department of Pharmaceutical Science, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Brazil

^c Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University of Torino, 10124 Torino, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2016

Received in revised form 12 April 2016

Accepted 18 April 2016

Available online xxx

Keywords:

Ilex paraguariensis

Carageenan

Pleurisy

Th1/Th17 polarization

Anti-inflammatory

ABSTRACT

Ilex paraguariensis is a native plant from Southern America, where it is used as a beverage. In traditional medicine, it is used to treat many diseases including inflammation. However, we do not yet know precisely how this effect occurs. We therefore evaluated its anti-inflammatory effect in a murine model of pleurisy. The standardized CE, BF and ARF fractions, Caf, Rut and CGA were able to reduce leukocyte migration, exudate concentration, MPO and ADA activities and NOx levels. Moreover, *I. paraguariensis* also inhibited the release of Th1/Th17 pro-inflammatory cytokines, while increasing IL-10 production and improving the histological architecture of inflamed lungs. In addition, its major compounds decreased p65 NF- κ B phosphorylation. Based on our results, we can conclude that *I. paraguariensis* exerts its anti-inflammatory action by attenuating the Th1/Th17 polarization in this model. This fact suggests that the use of this plant as a beverage can protect against Th1/Th17 inflammatory diseases.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ilex paraguariensis A. St. Hil. (Aquifoliaceae), popularly known as yerba mate, is a native species from Southern Latin America, where it is used as a beverage and has great economic and social importance. In traditional medicine, it is used to treat arthritis, fatigue, obesity, and liver and intestinal affections [1]. The bioactive properties of *I. paraguariensis* are related to its phytochemical composition, especially methylxanthines [2], saponins and phenolic compounds [1]. In the last 15 years, several studies of *I. paraguariensis* have been performed, demonstrating interesting biological effects like anti-obesity [3], anti-diabetic [3], neuroprotective [4], antioxidant [5], antimicrobial [6], and anti-inflammatory [7] effects. However, as far as we know, there have been no studies to explore whether this anti-inflammatory effect is due to a possible effect on the cytokine environment involved in *in vivo* inflammatory process.

The non-resolving inflammatory process involves on a lack of immune system control and, in most cases, leads to chronic disease that require a long-term treatment and often result in loss of function of the affected organ. Notably, the disruption of normal balance of pro- and anti-inflammatory cytokines is a shared characteristic of these diseases e.g. neutrophilic asthma, rheumatoid arthritis, systemic erythematous lupus, and many others [8,9]. In this context, the growing understanding about the immune modulation, Th1/Th2/Th17 balance and the intricate cell signaling related to these diseases had been leading researchers to take a different approach to deal with these conditions.

It is well known that adhesion to patient therapy in long-term treatments for non-self-resolving inflammatory process is very weak, which contributes to the high percentage of related disabilities and deaths [10]. For this reason, the discovery of natural source-derived compounds, specially from plants commonly used as food intake like *I. paraguariensis*, seems to have great potential in the treatment of these conditions [11,12].

In order to better clarify this point, in the present study, we focused on evaluating whether the anti-inflammatory property of this plant is related to its ability to change the cytokine environment. For this purpose, *I. paraguariensis* standardized crude extract (CE), its related fractions – buthanolic (BF) and aqueous residue (ARF) fractions – and its major compounds caffeine (Caf), rutin (Rut) and chlorogenic acid (CGA) were tested in an *in vivo* model of pleurisy. We also investigated the effects on leukocyte migration and plasma exudation, myeloperoxidase (MPO)

* Corresponding author at: Department of Clinical Analysis, Centre of Health Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário - Trindade, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil.

E-mail addresses: anaabiaz@gmail.com (A.B.G. Luz), carlosblum@gmail.com (C.H.B. da Silva), mmnascimento@gmail.com (M.V.P.S. Nascimento), brunomatheusfacchin@gmail.com (B.M. de Campos Facchin), bruhls90@gmail.com (B. Baratto), tania.frode@ufsc.br (T.S. Fröde), flavio.reginatto@ufsc.br (F.H. Reginatto), eduardo.dalmarco@ufsc.br, edaldalmarco@gmail.com (E.M. Dalmarco).

and adenosine deaminase (ADA) activities, oxide nitric metabolite (NOx) concentration, pro- and anti-inflammatory cytokine levels, histological lung parameters, and finally, the action of its major compounds on phosphorylation of the p65 subunit of NF- κ B (p-p65 NF- κ B).

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Ilex paraguariensis A. St. Hil. leaves were harvested in October/2012 in Erechim (27°38'03" S and 52°16'26" W), in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. A voucher specimen was identified by Dr. Branca Maria Severo and deposited in the Herbarium of Universidade de Passo Fundo (RSPF 11074). The leaves were immediately frozen, lyophilized, crushed and stored at -20°C until required for the preparation of extracts.

2.2. Extract preparation

The *I. paraguariensis* extracts were prepared by turboextraction in an Ultra-Turrax. Briefly, 200 g of leaves were extracted for five minutes, with 1000 mL of ethanol 20° GL (Gay Lussac) as the liquid extractor (1.5 m/v), yielding the hydroethanolic extract. After filtration, the ethanol was eliminated under reduced pressure, the volume was adjusted to 800 mL with distilled water, and the preparation was separated into two fractions. One fraction was evaporated under reduced pressure to dryness to obtain the crude extract (CE). The second fraction was then partitioned with *n*-BuOH, yielding the *n*-BuOH fraction (BF) and aqueous residual fraction (ARF). The *n*-BuOH of BF was evaporated under reduced pressure and all the samples, CE, BF and ARF, were dried by lyophilization.

2.3. Chromatographic separation

Chromatographic separation was performed using an Acquity-UPLC™ (Waters, MA, USA) system equipped with a quaternary pump, degasser and autosampler. Detection was carried out using a photodiode array detector (PDA). The column used was a Waters BEH C18 column, 1.7 μm , 50 \times 2.1 mm at 40 °C. The method used a gradient combining solvent A (formic acid/water, pH 2.5) and solvent B (acetonitrile), programmed as follows: 0–5 min, linear change from A-B (97:3 v/v) to A-B (90:10 v/v); 5–6 min, isocratic A-B (90:10 v/v); 6–9 min, linear change to A-B (80:20 v/v) and 9–10 min, linear change to A-B (10:90 v/v). The flow rate was kept constant at 0.3 mL min^{-1} and the injection volume was 5 μL . The peaks were characterized by comparing the retention time, UV spectra and by co-injection of the sample with the reference standards. Quantification was performed by external calibration, using their corresponding standards. Caffeine was quantified at 280 nm, while the phenolic compounds chlorogenic acid and rutin were quantified at 320 nm. All the analyses were performed in triplicate, and the peak area measured. The standard solutions were analyzed in different ranges: 0.05–50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the caffeine (Sigma-Aldrich®); 0.05–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the chlorogenic acid (Fluka®) and 0.25–50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the rutin (Sigma-Aldrich®). Quantification was performed using six to eight-point regression curves (caffeine, $r^2 = 1$; chlorogenic acid, $r^2 = 0.9999$; rutin, $r^2 = 0.9999$). The regression equations were "y = 39.320x + 2074.9" for caffeine, "y = 46.696x – 1896" for chlorogenic acid, and "y = 15.618x + 178.92" for rutin. The extracts were analyzed at a concentration of 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The results were expressed as milligrams per gram of extract (mg compound/g $^{-1}$ E).

2.4. LC-MS analysis

In addition to LC/PDA analysis, the identification was carried out by liquid chromatography (UPLC, Waters Acquity mode) coupled to a high-resolution mass spectrometer (Xevo G2 QToF model), equipped

with an electrospray ionization source and controlled by Masslynx v.4.1 software for data acquisition. The mass spectrometer parameters were set as follows: ionization mode, electrospray negative ion; capillary voltage, 2.0 kV; source block temperature, 90 °C; desolvation temperature, 350 °C; nebulizer nitrogen flow rate, 30 L h^{-1} ; desolvation nitrogen gas flow, 600 L h^{-1} ; and cone voltage, 40 V. The spectra were recorded by scanning the mass range from *m/z* 100 to 1000 with scan time of 0.5 s.

2.5. LC-PDA validation procedure

The LC-PDA quantification method was validated according to the ICH guidelines (2005) to comply with the requirements for specificity, linearity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision), limit of quantification (LOQ) and limit of optical detection (LOD).

2.6. Animals

In this experimental protocol, we used female Swiss mice (18–22 g), housed under standardized and controlled conditions ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 h light/dark periods) with free access to chow and water. All experiments were designed to minimize animal suffering and to use the minimum number of animals required to achieve a valid statistical evaluation. The experiments were performed according to the regulations of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and are in accordance with the rules of the Committee for Ethics in Animal Research of the Federal University of Santa Catarina (CEUA - PP00965).

2.7. Experimental design of the murine model of pleurisy

The pleurisy was performed as previously reported [13]. Briefly, the experimental protocol was divided into two steps. First, to establish a dose–response curve, animals were randomly divided in different groups ($n = 6$) and challenged with Evans Blue dye solution (25 mg/kg) administered by the intravenous route (iv). After 10 min, different groups were treated with different doses of CE (10–50 mg/kg), BF (0.1–10 mg/kg), ARF (0.1–10 mg/kg), Caf (0.1–5 mg/kg), Rut (0.01–1 mg/kg), CGA (0.01–1 mg/kg) or dexamethasone (0.5 mg/kg) (Dex) by the oral route (p.o.). Shortly after 0.5 h, pleurisy was induced by a single injection of 0.1 mL of sterile saline containing λ -carrageenan 1% (w/v) (Cg) administered by the intra-pleural route (i.pl). The animals were euthanized after 4 h with an overdose of pentobarbital (120 mg/kg) administered by the intraperitoneal route (i.p.), and the pleural cavity was exposed and washed with 1.0 mL of sterile phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brazil) containing heparin (20 IU/mL). The pleural fluid was used to measure the primary inflammatory parameters: total and differential leukocyte count and exudate concentration. In order to determine the time-course response of the plant material, other groups of animals were pre-treated with the lowest effective dose of CE obtained above (25 mg/kg) at 0.5, 1 and 2 h before pleurisy induction.

In another set of experiments, previously selected doses were used to perform the MPO, ADA and NOx assays and quantification of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pleural fluid. Also, p65 NF- κ B phosphorylation and histological changes were performed on lung tissue samples. For these experiments, the animals were orally treated with CE (25 mg/kg), BF (1 mg/kg), ARF (1 mg/kg), Caf (5 mg/kg), Rut (1 mg/kg) or CGA (0.1 mg/kg), followed by induction of pleurisy by Cg 1% (i.pl). In parallel with all the experiments, a group of animals was challenged with 0.1 mL of Cg 1% (i.pl) only, and was named as a positive control group, while another group received 0.1 mL of saline (0.9% NaCl) (i.pl), and was considered a negative control group.

2.8. Quantification of the leukocyte content

To quantify the leukocyte content, pleural fluid samples were submitted to a veterinarian automatic counter (BC-2800 Vet, Mindray, Nanshan, Shenzhen, China). For the differential leukocyte count, cytospin preparations from exudates were stained with May–Grünwald–Giemsa. The results were expressed as the total number of cells ($\times 10^6$ cells/mL).

2.9. Quantification of exudate concentration

The quantification of exudate concentration was performed indirectly by measuring the amount of Evans blue dye in the pleural cavity. The fluid sample was centrifuged (at $300 \times g$ for 5 min) (SorvallTM ST 40, ThermoScientific®, Swedesboro, New Jersey, USA) and an aliquot (200 μ L) of supernatant was transferred to a 96-well-ELISA plate. The amount of dye was estimated by colorimetric measurement at 620 nm, using an ELISA plate reader (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, USA). The results were expressed in μ g/mL by interpolation from an Evans blue dye standard curve ranging from 0.01 to 50 μ g/mL.

2.10. Determination of myeloperoxidase (MPO) and adenosine-deaminase (ADA) activities

To evaluate the effects on MPO and ADA activities, the collected pleural fluid samples were centrifuged (300 $\times g$ for 5 min) and in-house assays were performed according to the methods previously described [14,15]. With the support of an ELISA plate reader (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, USA) colorimetric measurements were made at 450 nm and 620 nm, respectively. The MPO activity was estimated by an interpolation from a standard curve of MPO from human neutrophils (0.7–140 mU/mL), and the results were expressed in mU/mL. An ammonium sulfate solution, measured in triplicate as a standard point of 20 U/L, was used to estimate ADA activity expressed in U/L.

2.11. Measurement of nitric oxide products (NOx)

Nitric oxide was quantified using the Griess assay and vanadium chloride III, as previously reported [16]. After centrifugation of pleural fluid samples (300 $\times g$ for 5 min), the colorimetric measurement was determined at 540 nm using an ELISA plate reader (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, USA). The NO amount was indirectly determined by interpolation from the nitrite standard curve (0–20 μ M), and the results were expressed in μ M.

2.12. Pro- and anti-inflammatory cytokine quantification

Cytokine quantification was done using the Mouse Th1/Th2/Th17 CBA kit (BD Biosciences, San Jose, California, USA) for the detection of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and IL-17A. CBA analysis was performed as per the manufacturer's instructions. The calibration curves were drawn using a set of diluted cytokine standards (0–5000 pg/mL) to determine the protein concentrations. Briefly, a volume of 50 μ L of capture bead mixture was added to 50 μ L of sample and standards. To this mixture was added 50 μ L of phycoerythrin-conjugated detection antibody followed by incubation for 2 h in the dark. The samples were washed with 1 mL of wash buffer, centrifuged (at 200 $\times g$ for 5 min), and the pellet resuspended in 300 μ L of wash buffer. Samples were acquired using a BD FACVerse flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, California, USA) and analyzed by the software FACP Array v3.0.

The quantification of TNF- α was performed using an ELISA kit with monoclonal specific antibody (eBioscience, Inc, San Diego, California, USA). The whole process was conducted according to the manufacturer's instructions. The cytokine concentration was estimated through an interpolation from a standard curve, and the colorimetric measurement was performed at 450 nm, supported by an ELISA plate reader (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, USA).

2.13. Histological analysis

Mice lungs were removed 4 h after Cg injection, washed in PBS, and fixed in formalin solution 10% (v/v) for 48 h. The tissues were dehydrated in a series of ethanol solutions of increasing concentrations in graded series followed by xylene, then included in paraffin and sliced into 3- μ m sections (LEICA-Instruments CM3050, Nussloch, Germany). The slices were stained with hematoxylin–eosin and analyzed under light microscopy (200 \times). The classification was performed using the scores reported in a previous study [17], based on the degree of parenchymal distortion in the alveolar tissue. The scores used were: 0 = normal; 1 = increased thickness in <50% of interalveolar septa (IAS) due to edema and/or neutrophil infiltration; 2 = increased thickness in >50% of IAS; 3 = increased thickness in >50% of IAS and the presence of neutrophils within the alveolar space; and 4 = consolidated infiltration of neutrophils with distortion of normal alveolar architecture. The mean score was reported for each microscopic section.

2.14. Analysis of p65 phosphorylation (p-p65 NF- κ B)

Mice lung tissues were collected, to evaluate the effects of *I. paraguayensis* major compounds on p65 NF- κ B phosphorylation. The quantity of total proteins was measured by the Lowry assay, and the samples were adjusted to 60 μ g protein/sample [18]. A commercial kit (PathScan® Phospho-NF- κ B p65 Ser536, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA) was used in accordance with manufacturer's protocol. The colorimetric obtained in an ELISA plate reader (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, USA) at 450 nm. The results were expressed as relative fold change in comparison with saline group, which represents the baseline p-p65 NF- κ B level.

2.15. Reagents and drugs

The following chemicals used were obtained from: i) Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA): adenosine, carrageenan (degree IV), Evans blue dye, formalin, hydrogen peroxide, hexadecyltrimethylammonium bromide, human neutrophil myeloperoxidase, o-dianisidine \cdot 2HCl (3,3'-dimethoxybenzidine), α -naphthylethylenediamide \cdot 2HCl, phenol, sodium azide, sodium dodecyl sulfate, sodium hypochlorite, sodium nitroprussiate, sulfanilamide, vanadium chloride (III) and xylene, ii) Synth (Diadema, São Paulo, Brazil); ethanol, iii) Aché Pharmacological Laboratories S.A (Guarulhos, São Paulo, Brazil); dexamethasone, iv) Vetec (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil); sodium hydrogen phosphate, zinc sulfate, v) BioTech (São Paulo, São Paulo, Brazil); hydrogen peroxide 30%, vi) Reagen (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil); sodium hydroxide, vii) Roche (São Paulo, São Paulo, Brazil); heparin, viii) Newprov (Pinhais, Paraná, Brazil); May-Grunwald dye, ix) Laborclin (Pinhais, Paraná, Brazil); Giemsa dye, x) BD Bioscience (San Jose, California, USA); Mouse Th1/Th2/Th17 CBA kit, xi) eBioscience Inc. (San Diego, California, USA.); ELISA kit Insta One Phospho-NF- κ B p-65 (Ser536). The other reagents used were of analytical grade and were obtained from several commercial sources.

2.16. Data analysis

All data were expressed as mean \pm SEM. Statistical differences between groups were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls post-hoc test. The results were analyzed using GraphPad Prism v5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) and the values of $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Phytochemical characterization of bioactive compounds

In the *I. paraguariensis* extracts and its related fractions, nine major compounds were identified by using LC-PDA and LC-MS, which were reported as previously [19–22]. Theobromine (peak 1), chlorogenic acid (peak 3), caffeine (peak 4), 4-O-caffeoylquinic acid (peak 5) and rutin (peak 6) were identified based on their retention times, UV absorption spectra, and mass spectra, and by the comparison with authentic samples. Fig. 1 shows the comparison of LC-PDA chromatograms of *I. paraguariensis* CE, BF and ARF with detection at 280 nm. The retention time, maximum UV absorption and detected mass ions for each compound are summarized in Table 1 in Ref. [23]. Table 1 shows the different content of quantified compounds of *I. paraguariensis* extract and fractions. Caffeine and rutin showed higher concentration in the BF. On the other hand, the BF presented lower contents of chlorogenic acid.

3.2. LC-PDA validation procedure

The validation parameters data are summarized in Table 2 in Ref. [23].

3.3. Effects of *I. paraguariensis* on leukocytes influx and exudate concentration

When compared with the positive control group, the CE significantly decreased the leukocyte content in the pleural cavity (% inhibition: 10 mg/kg: 45.48 ± 4.28; 25 mg/kg: 49.15 ± 1.64 and 50 mg/kg: 55.37 ± 3.08) ($P < 0.01$), neutrophil influx (% inhibition: 0.1 mg/kg: 24.15 ± 6.26; 1 mg/kg: 61.39 ± 1.76 and 10 mg/kg: 61.91 ± 3.38) ($P < 0.01$) and also on exudate concentrations (% inhibition: 0.1 mg/kg:

Table 1
Contents of phenolic compounds and methylxanthines of *Ilex paraguariensis* extract and fractions.

Sample	Caffeine (mg/g)	Chlorogenic acid (mg/g)	Rutin (mg/g)
CE	293 ± 0.06 ^a	675 ± 0.3 ^a	12.4 ± 0.04 ^a
BF	1017 ± 0.4 ^b	58.4 ± 0.1 ^b	42.0 ± 0.09 ^b
ARF	3.9 ± 0.02 ^c	68.3 ± 0.1 ^c	2.2 ± 0.01 ^c

Caffeine (Caf), chlorogenic acid (CGA) and rutin (Rut) content were determined by CLAE-PDA and the data are mean ± S.D. values expressed as mg/g extract (N = 3). Different letters indicate significant differences (ANOVA and Tukey's post test, $P < 0.05$)

20.59 ± 5.61; 1 mg/kg: 21.10 ± 3.96 and 10 mg/kg: 26.77 ± 2.90) ($P < 0.01$) (Table 2). Another fraction, ARF, was also effective in reducing leukocyte total content (% inhibition: 0.1 mg/kg: 46.89 ± 9.35; 1 mg/kg: 54.24 ± 8.84 and 10 mg/kg: 38.14 ± 5.77) ($P < 0.01$), neutrophil influx (% inhibition: 0.1 mg/kg: 57.78 ± 4.75; 1 mg/kg: 68.20 ± 2.64 and 10 mg/kg: 49.68 ± 2.97) ($P < 0.01$), and exudate concentration (% inhibition: 1 mg/kg: 31.21 ± 5.87 and 10 mg/kg: 25.62 ± 2.44) ($P < 0.01$) (Table 2).

The major compounds of *I. paraguariensis* tested in this study also demonstrated potential anti-inflammatory properties. First, the major compound Caf was effective in inhibiting the leukocyte content in the pleural fluid (% inhibition: 1 mg/kg: 40.96 ± 5.86 and 5 mg/kg: 50.28 ± 3.76) ($P < 0.01$), due to its ability to decrease the migration of neutrophils (% inhibition: 0.1 mg/kg: 47.07 ± 1.03; 1 mg/kg: 55.38 ± 4.28 and 5 mg/kg: 67.78 ± 2.01) ($P < 0.01$). Moreover, Caf only showed a significant reduction in the exudate concentration at the dose of 5 mg/kg (% inhibition: 23.17 ± 8.74) ($P < 0.05$) (Table 2).

Finally, CGA demonstrated significant inhibition in leukocyte content (% inhibition: 0.1 mg/kg: 48.59 ± 5.47 and 1 mg/kg: 48.14 ± 4.27) ($P < 0.01$), neutrophil content (% inhibition: 0.01 mg/kg:

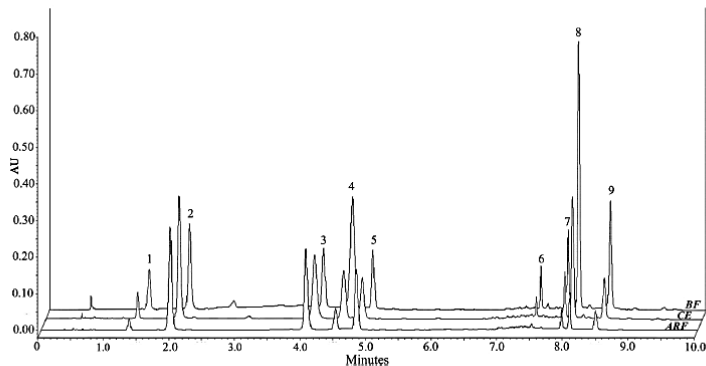


Fig. 1. UPLC-PDA chromatograms of *I. paraguariensis* extract and fractions with detection at 280 nm. 1, theobromine; 2, 3-O-caffeoylquinic acid; 3, 5-O-caffeoylquinic acid; 4, caffeine; 5, 4-O-caffeoylquinic acid; 6, rutin; 7, 3,4-dicafeoylquinic acid; 8, 3,5-dicafeoylquinic acid; 9, 4,5-dicafeoylquinic acid. ARF, aqueous residual fraction; CE, enude extract; BF, n-BuOH fraction.

Table 2

Effects of *Ilex paraguariensis* crude extract, its derived fractions and major compounds upon leukocyte migration, exudate concentration in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan.

Groups (mg/kg)	Leukocytes ($\times 10^6$)	Neutrophils ($\times 10^6$)	Exudation ($\mu\text{g/mL}$)
Sal ^a	0.46 ± 0.09	0.46 ± 0.03	0.53 ± 0.15
Cg ^a	5.90 ± 0.33	5.18 ± 0.39	9.62 ± 0.74
Dex (0.5) ^b	2.48 ± 0.41**	2.08 ± 0.32**	5.04 ± 0.27**
CE (10) ^b	3.22 ± 0.25*	1.80 ± 0.24*	8.58 ± 0.65
CE (25) ^b	3.00 ± 0.10**	1.95 ± 0.23**	7.05 ± 0.39*
CE (50) ^b	2.82 ± 0.15**	2.06 ± 0.15**	6.80 ± 0.43*
BF (0.1) ^b	5.17 ± 0.40	3.93 ± 0.32**	7.64 ± 0.54**
BF (1) ^b	2.97 ± 0.22**	1.99 ± 0.09**	7.59 ± 0.38**
BF (10) ^b	2.63 ± 0.18**	2.10 ± 0.16**	7.05 ± 0.28**
ARF (0.1) ^b	3.13 ± 0.55**	2.19 ± 0.24**	9.61 ± 0.80
ARF (1) ^b	2.70 ± 0.52**	1.65 ± 0.14**	6.62 ± 0.56**
ARF (10) ^b	3.22 ± 0.24**	2.60 ± 0.15**	7.16 ± 0.23**
Caf (0.1) ^b	4.83 ± 0.50	2.74 ± 0.21**	12.70 ± 0.83
Caf (1) ^b	3.48 ± 0.34**	2.31 ± 0.22**	9.67 ± 0.67
Caf (5) ^b	2.93 ± 0.22**	1.67 ± 0.10**	7.39 ± 0.84*
Rut (0.01) ^b	3.75 ± 0.25*	2.62 ± 0.18**	8.51 ± 0.26
Rut (0.1) ^b	3.63 ± 0.49**	1.96 ± 0.06**	7.97 ± 0.28*
Rut (1) ^b	3.15 ± 0.33**	2.31 ± 0.17**	6.87 ± 0.34**
GGA (0.01) ^b	5.12 ± 0.23	2.60 ± 0.13**	8.32 ± 0.54*
GGA (0.1) ^b	3.03 ± 0.32**	1.75 ± 0.31**	7.25 ± 0.23**
GGA (1) ^b	3.06 ± 0.25**	1.78 ± 0.12**	7.48 ± 0.42**

Crude extract (CE: 50–10 mg/kg), buthanoic fraction (BF: 10–1 mg/kg), aqueous residue fraction (ARF: 10–1 mg/kg), caffeine (Caf: 5–0.1 mg/kg), rutin (Rut: 1–0.01 mg/kg) and chlorogenic acid (CGA: 1–0.01 mg/kg) were administered 0.5 h before carrageenan-induced pleurisy. Sal = negative control group treated only with sterile saline (0.9% NaCl); Cg = the positive control group treated only with carrageenan (1%); Dex = response in animals pre-treated with dexamethasone (0.5 mg/kg) 0.5 h before pleurisy induction. Each group represents the mean ± SEM, N = 6 animals. * Administered by intra-pleural route (i.p.l.), ^b Administered by oral route (p.o.). * P < 0.05; ** P < 0.01.

49.70 ± 2.45; 0.1 mg/kg; 66.29 ± 5.97 and 1 mg/kg; 65.53 ± 2.38) (P < 0.01), and pleural fluid leakage concentration (% inhibition: 0.1 mg/kg; 23.59 ± 2.37 and 1 mg/kg; 22.20 ± 4.35) (P < 0.05) (Table 2).

As expected, Dex presented anti-inflammatory effect by reducing the total leukocyte content in the pleural fluid (% inhibition: 57.91 ± 6.99) (P < 0.01), due to neutrophil inhibition (% inhibition: 59.82 ± 6.32) (P < 0.01), and also reduced the exudate concentration (% inhibition: 47.60 ± 2.82) (P < 0.01) (Table 2).

3.4. Effects of *I. paraguariensis* on MPO and ADA activities

The selected doses of CE (25 mg/kg), BF (1 mg/kg), ARF (1 mg/kg), Caf (5 mg/kg), Rut (1 mg/kg) and CGA (0.1 mg/kg), from the experiments described above, were used to perform the MPO and ADA assays, since these enzymes are closely linked to leukocyte activation and transmigration. All the treated groups showed a significant decrease in MPO activity (% inhibition of CE: 30.29 ± 4.58; BF: 28.73 ± 1.74; ARF: 24.94 ± 4.52; Caf: 37.21 ± 2.51; Rut: 29.01 ± 4.93 and CGA: 30.29 ± 4.78) (P < 0.01), likewise on the ADA activity (% inhibition of CE: 29.00 ± 11.97; BF: 41.93 ± 0.73; ARF: 49.56 ± 4.22; Caf: 38.11 ± 11.26; Rut: 51.25 ± 11.02 and CGA: 32.52 ± 8.70) (P < 0.05) (Table 3). Under the same experimental conditions, the reference drug Dex also inhibited MPO and ADA activities (% inhibition: 29.83 ± 4.96 and 60.40 ± 8.30, respectively) (P < 0.01) (Table 3).

3.5. Effects of *I. paraguariensis* on Nox concentration

Because exudation is closely related to nitric oxide levels, we performed the nitrite/nitrate dosage to confirm the hypothesis that this inhibition caused by *I. paraguariensis* on exudation, could be directly associated with a decrease in nitric oxide levels. A significant reduction in nitrate/nitrite levels was observed in all the tested groups (% inhibition of CE: 43.71 ± 3.40; BF: 61.11 ± 2.23; ARF: 23.26 ± 5.56; Caf:

Table 3

Effects of crude extract, fractions and major compounds of *I. paraguariensis* on myeloperoxidase (MPO), adenosine-deaminase (ADA) and nitrate/nitrite levels (NOx) in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan.

Groups (mg/kg)	MPO (mU/mL)	ADA (U/L)	NO _x (μM)
Sal ^a	64.74 ± 2.21	1.51 ± 0.03	8.44 ± 1.26
Cg ^a	133.8 ± 9.18	9.00 ± 1.25	28.80 ± 1.26
Dex (0.5) ^b	93.88 ± 6.64**	3.57 ± 0.75**	13.21 ± 0.73**
CE (25) ^b	93.27 ± 6.12	6.39 ± 1.08*	16.21 ± 0.98**
BF (1) ^b	95.37 ± 2.32**	5.23 ± 0.07*	11.20 ± 0.64**
ARF (1) ^b	104.3 ± 6.05**	4.54 ± 0.38**	22.10 ± 1.52**
Caf (5) ^b	84.02 ± 3.36**	5.57 ± 1.02**	15.75 ± 1.58**
Rut (1) ^b	96.33 ± 6.59**	4.39 ± 0.99*	18.38 ± 2.21**
CGA (0.1) ^b	93.27 ± 6.40**	6.08 ± 0.78*	18.62 ± 1.26**

Crude extract (CE: 25 mg/kg), buthanoic fraction (BF: 1 mg/kg), aqueous residue fraction (ARF: 1 mg/kg), caffeine (Caf: 5 mg/kg), rutin (Rut: 1 mg/kg) and chlorogenic acid (CGA: 0.1 mg/kg) were administered 0.5 h before carrageenan-induced pleurisy. Sal = negative control group treated only with sterile saline (0.9% NaCl); Cg = the positive control group treated only with carrageenan (1%); Dex = response in animals pre-treated with dexamethasone (0.5 mg/kg) 0.5 h before pleurisy induction. Each group represents the mean ± SEM, N = 6 animals. * P < 0.05; ** P < 0.01. * Administered by intra-pleural route (i.p.l.), ^b Administered by oral route (p.o.).

45.30 ± 5.50; Rut: 36.18 ± 7.68 and CGA: 35.34 ± 4.36) (P < 0.01), as well in Dex group (% inhibition: 54.12 ± 2.54) (P < 0.01) (Table 3).

3.6. Effects of *I. paraguariensis* on IL-6, IL-17 A, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-2 and IL-4 concentrations

In addition to the anti-inflammatory effect associated with the decrease in leukocyte migration, exudate concentration, MPO and ADA activities and NOx levels, *I. paraguariensis* also caused significant changes in the production of some anti- and pro-inflammatory cytokines that are the keys of the immune system.

In our experiments, CE, BF and ARF showed significant inhibition on IL-6 (% inhibition of CE: 91.63 ± 1.05; BF: 76.10 ± 2.97 and ARF: 40.75 ± 0.95) (P < 0.01), on IL-17 A (% inhibition of CE: 66.57 ± 1.32; BF: 38.94 ± 3.13 and ARF: 46.44 ± 9.55) (P < 0.01), on IFN- γ (% inhibition of CE: 48.67 ± 1.30; BF: 47.94 ± 10.66 and ARF: 42.95 ± 2.85) (P < 0.01) and also upon TNF- α (% inhibition of CE: 23.20 ± 6.27; BF: 55.27 ± 9.26 and ARF: 17.25 ± 3.29) (Table 4). In addition, CE and ARF increased the production of anti-inflammatory cytokine IL-10 levels when compared with the inflamed group (% increase in CE: 42.38 ± 30.43; ARF: 45.61 ± 15.53) (P < 0.05); However, the BF fraction, was not able to increase the levels of IL-10 (P > 0.05) (Table 4).

The major compounds also showed important effects on the studied cytokines. Rut inhibited the IL-6 levels (% inhibition: 64.19 ± 1.59) (P < 0.01), and CGA caused a massive reduction of IL-6 levels, to values below the detection limit of the kit (<1.4 pg/mL) (P < 0.01). The exception was the isolated compound Caf, which was not able to reduce the IL-6 levels (P > 0.05) (Table 4). The concentrations of IL-17A, IFN- γ and TNF- α in the fluid leakage were significantly decreased by pretreatment with Caf (% of inhibition: IL-17A: 38.84 ± 5.42; IFN- γ : 45.01 ± 10.24 and TNF- α : 40.75 ± 6.90) (P < 0.01) and Rut (% of inhibition: IL-17A: 48.32 ± 4.74; IFN- γ : 45.54 ± 4.10 and TNF- α : 28.56 ± 2.19) (P < 0.01). However, the pretreatment with CGA was only able to decrease the levels of IL-17A and TNF- α (% inhibition IL-17A: 18.24 ± 3.85 and TNF- α : 39.24 ± 3.55) (P < 0.05) (Table 4).

Additionally, the pretreatments with Rut and Caf did not change the IL-10 levels (P > 0.05), while the pretreatment with CGA showed a positive effect on IL-10 concentration, increasing their levels (% increase: 358.60 ± 18.53) (P < 0.05) (Table 4).

As expected, Dex showed the expected profile through the inhibition of all pro-inflammatory cytokines (% inhibition on IL-6: 98.96 ± 0.17; IL-17A: 74.14 ± 1.52; IFN- γ : 58.52 ± 2.93 and TNF- α : 58.69 ± 6.48) (P < 0.05), and increased the levels of anti-inflammatory cytokine IL-10 (% of increase: 83.62 ± 19.97) (P < 0.01) (Table 4).

Table 4
Effects of *I. paraguariensis* crude extract, its derived fractions and major compounds on pro- and anti-inflammatory cytokine levels in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan.

Cytokines	IL-6 (ng/mL)	IL-17A (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
Sal ^a	0.01 \pm 0.01	0.82 \pm 0.29	1.21 \pm 0.29	17.20 \pm 3.59	85.05 \pm 8.35
Cg ^a	544.3 \pm 56.29	8988 \pm 3.55	11.82 \pm 1.02	35.12 \pm 3.79	898.10 \pm 44.7
Dex (0.5) ^b	5.68 \pm 0.94 **	23.35 \pm 1.36 **	4.90 \pm 0.35 **	72.03 \pm 1.22 **	371.00 \pm 58.24 **
CE (25) ^b	45.57 \pm 5.71 **	30.05 \pm 1.18 **	6.07 \pm 0.15 **	61.60 \pm 9.45 *	689.70 \pm 56.30*
BF (1) ^b	130.1 \pm 16.19 **	5488 \pm 2.81 **	6.15 \pm 1.26 **	44.85 \pm 2.16	401.7 \pm 83.24 **
ARF (1) ^b	322.5 \pm 5.18 **	48.14 \pm 8.59 **	6.74 \pm 0.34 **	71.28 \pm 5.64 **	743.10 \pm 29.56*
Caf (5) ^b	443.7 \pm 97.84	5497 \pm 4.87 **	6.50 \pm 1.21 **	55.87 \pm 4.93	532.10 \pm 61.98*
Rut (1) ^b	194.9 \pm 8.66 **	46.45 \pm 4.26 **	6.44 \pm 0.48 **	50.67 \pm 6.49	641.60 \pm 19.63**
CGA (0.1) ^b	<0.0014 *	79.38 \pm 5.13 *	10.45 \pm 1.27	161.10 \pm 6.51 **	545.70 \pm 31.85**

Crude extract (CE: 25 mg/kg), buthanoic fraction (BF: 1 mg/kg), aqueous residue fraction (ARF: 1 mg/kg), caffeine (Caf: 5 mg/kg), rutin (Rut: 1 mg/kg) and chlorogenic acid (CGA: 0.1 mg/kg) were administered 0.5 h before carrageenan-induced pleurisy. Sal = negative control group treated only with sterile saline (0.9% NaCl); Cg = the positive control group treated only with carrageenan (1%); Dex = response in animals pre-treated with dexamethasone (0.5 mg/kg) 0.5 h before pleurisy induction. Each group represents the mean \pm SEM, N = 6 animals. * P < 0.05; ** P < 0.01; * All tested samples showed values under the detection limit. * Administered by intra-peritoneal route (i.p.). * Administered by oral route (p.o.).

In our experiments, none of the tested groups, including the control group (Sal and Cg), were able to significantly change the levels of IL-2 and IL-4 cytokines to detectable levels (Data not shown).

3.7. Effect of *I. paraguariensis* on the histological architecture of the lungs

The induction of pleurisy by carrageenan provided a significant lung injury with massive infiltration of neutrophils into the alveolar space, and significant distortion of normal alveolar architecture. Treatment with CE, BF, ARF, Caf, Rut or even CGA, administered 0.5 h before induction of pleurisy, significantly decreased the thickness of the interalveolar septa and neutrophil infiltration when compared with the positive control group (% inhibition of CE: 31.58 \pm 6.45; BF: 36.84 \pm 6.45; ARF: 36.84 \pm 10.53; Caf: 31.58 \pm 6.45; Rut: 42.11 \pm 5.26 and CGA: 63.16 \pm 6.45) ($P < 0.05$) (Fig. 2). Dex treatment also significantly reduced the histological parameters studied (% inhibition: 52.63 \pm 9.85) ($P < 0.01$) (Fig. 2).

3.8. Effects of *I. paraguariensis* major compounds on p-p65 NF- κ B

Since NF- κ B plays a crucial role in the synthesis of pro- and anti-inflammatory mediators, we investigated the effects of Caf, Rut and CGA on p65 phosphorylation. All the studied compounds, and Dex,

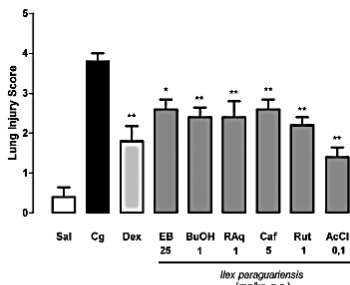


Fig. 2. Effects of *I. paraguariensis* on mice lung histology following induction of pleurisy by carrageenan. Graphic comparative analysis of histology scores. CE (25 mg/kg, p.o.); BF (1 mg/kg, p.o.); ARF (1 mg/kg, p.o.); Caf (5 mg/kg, p.o.); Rut (1 mg/kg, p.o.) or CGA (0.1 mg/kg, p.o.) were administered 0.5 h before carrageenan-induced pleurisy. Sal = negative control group treated only with sterile saline (0.9% NaCl); Cg = positive control group treated only with carrageenan (1%); Dex = animals pre-treated with dexamethasone (0.5 mg/kg) 0.5 h before pleurisy induction. Each group represents the mean \pm SEM, N = 6 animals. * P < 0.05; ** P < 0.01.

were able to reduce the phosphorylation of the p65 subunit when compared with the Cg control group, which represents the positive group of p-p65 NF- κ B (% inhibition of Caf: 54.53 \pm 1.55; Rut: 60.73 \pm 1.26; CGA: 61.48 \pm 1.40 and Dex: 55.85 \pm 1.89) ($P < 0.01$) (Fig. 3).

4. Discussion

Although pleurisy induced by carrageenan is not an asthma model, the administration of carrageenan into the pleural cavity provides an inflammatory environment similar to that observed in patients with neutrophilic asthma phenotype, characterized by a Th1/Th17 polarization. The imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokine production, pro-inflammatory enzyme activities, and histological changes in the lung tissue are the most notable similarities [13,24]. The actual approach to handling asthma, based on suppression of pro-inflammatory mediators with the use of corticosteroids, has not been producing good results, and is often inefficient. Thus, the search for compounds that act by reestablishing the natural balance of the immune system seems to be a good goal to treat this condition.

In view of the above, and considering the preliminary data obtained in our laboratory, we decided to study the anti-inflammatory efficacy of *I. paraguariensis* using the murine model of pleurisy. Our data demonstrated that pretreatment with *I. paraguariensis* CE, fractions (BF and

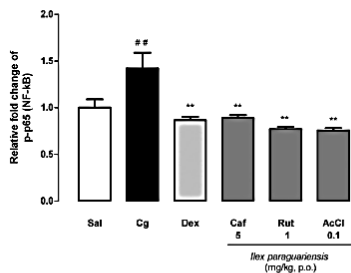


Fig. 3. Effects of *I. paraguariensis* major compounds on p65 phosphorylation (p-p65 NF- κ B). Caffeine (Caf: 5 mg/kg, p.o.), rutin (Rut: 1 mg/kg, p.o.) and chlorogenic acid (CGA: 0.1 mg/kg, p.o.) were administered 0.5 h before carrageenan-induced pleurisy. Sal = group treated only with sterile saline (0.9% NaCl); Cg = group treated only with carrageenan (1%); Dex = response in animals pre-treated with dexamethasone (0.5 mg/kg, p.o.) 0.5 h before pleurisy induction. The results were expressed as a relative fold change compared with the negative saline group which represents a p65 phosphorylation basal expression. N = 4 animals. ** P < 0.01 statistical comparative analyses between the Cg group and saline group. ** P < 0.01 statistical comparative analyses between the treated group and the Cg group.

ARF) and major compounds (Caf, Rut and CGA) were effective in inhibiting leukocyte migration to the inflammatory site, both in the analysis of fluid leakage and lung tissue, and this effect was due to ability of this plant to inhibit the neutrophil influx. Moreover, *I. paraguariensis* was also able to inhibit neutrophil activation in fluid leakage, since all the plant material tested decreased the activity of MPO, an enzyme that is located in the azurophilic granules of these cells, and released through its activation. Similar results for this effect on the leukocytes were obtained by Schinella and co-workers (2014), who analyzed the effect of *I. paraguariensis* on acute and chronic 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced mouse ear edema and acute carrageenan-induced mouse paw edema, and also showed an important decrease in leukocyte influx, also due to neutrophil inhibition [7].

According to our findings, one possible explanation for the effect of *I. paraguariensis* on neutrophil influx to the site of inflammation may be the ability of the plant material to suppress ADA activity. ADA is an enzyme responsible for inosine generation through adenosine deamination. Among many functions, adenosine, when it is available in the inflammatory environment, acts on the A_{2A} receptors of the neutrophils, downregulates the expression of adhesion proteins, and decreases their degranulation and oxidant activity [25–27].

The other signal of inflammation evaluated was the exudate concentration, which was also significantly reduced by treatment with yerba mate. The exudation levels are directly linked to the increase in the amount of NO produced by the activation of induced nitric oxide synthase (iNOS). The released NO plays an important role as a vasodilator and contributes to exudation [28]. This fact may explain the ability of *I. paraguariensis* to reduce these inflammatory parameters, as it significantly decreased exudate concentration and NO levels in the pleural cavity. In accordance with our results, it was recently demonstrated that yerba mate exerts its anti-inflammatory profile in carrageenan-induced paw edema in mouse through its ability to decrease the formation of edema, and this result was directly correlated with the reduction of COX-2 and iNOS expression [7].

The imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines plays a marked role in inflammatory diseases, particularly in non-self-resolved disease. Among the pro-inflammatory cytokines, IL-6, TNF- α , IFN- γ and IL-17 play an important role in the pleurisy model of inflammation induced by carrageenan [29]. The increase of these cytokines induced by carrageenan administration was significantly inhibited by all tested samples of *I. paraguariensis*. Similarly, other researchers have demonstrated the potential effect of yerba-mate on major pro-inflammatory cytokines. E.g. Lim and colleagues (2015), who showed, in a recent study, that yerba-mate is effective in decreasing IFN- γ and IL-6 levels in a spared nerve injury rat model [30]. In addition, a study by Carmo and co-workers (2013) showed that consumption of *I. paraguariensis* reduced IL-6 and TNF- α production by the bone marrow cells in rats fed a high-fat diet [31], and the positive impact of yerba-mate on TNF- α concentration was also reported in a cigarette smoke-exposed mouse model [32]. To our knowledge, there is no published study to date that reports the effect on this plant of IL-17A levels, a relevant cytokine involved in this model and also in the neutrophilic phenotype of asthma. This result needs to be highlighted, given that refractory and severe asthma produces a Th1/Th17 phenotype, in which IL-17 assumes an important role. Of note is the fact that Latin Americans who consume a higher amount of yerba-mate in the form beverages called “chimarrão” or “tereré” exhibit lowest prevalence of severe asthma characterized by Th1/Th17 polarization, when compared with people who do not drink this beverage in large amounts [24,33].

The levels of two other pro-inflammatory cytokines, IL-2 and IL-4, were not detected in our experiments, given that these are not primordial and characteristic cytokines in the carrageenan model, which produces a massive polarization to Th1/Th17 axis. In contrast, *I. paraguariensis* produced an increase in IL-10 production, a Th2 cytokine with immunosuppressive characteristic responsible for leading the balance of Th1/Th2/Th17 to baseline levels, providing an immunoregulatory profile [34,35].

This outcome on IL-10 levels was due to CGA effect, and it is the same effect demonstrated by ARF and CE, where this compound was most available. Corroborating this result, the study conducted by Pimentel and colleagues (2013) shows an increase in IL-10/TNF- α ratio in rat liver and muscle due yerba-mate supplementation on a diet-induced obesity model [36].

The effects on cytokine levels involve a complex intracellular process. To summarize, Cg triggers the intracellular signaling pathways by Toll-like receptor 4 (TLR4) activation and oxygen reactive species (ROS) production [37]. NF- κ B is therefore an important player in the control of cytokine expression. Its classical inducible form consists of the p65/p50 heterodimer, in which the p65 subunit phosphorylation activates this factor and culminates in the production of many mediators [38]. The NF- κ B is the most important transcription factor involved in the inflammatory process, it regulates various gene encoding inflammatory mediators with highlight to pro-inflammatory cytokines [39,40]. This transcription factor is activated by stimuli such as carrageenan and LPS, through TLR4 activation which induce the I κ B phosphorylation resulting in transmigration of NF- κ B activated form to the nucleus, where gene expression of pro-inflammatory mediators is triggered [41]. Over-activation of this nuclear factor is present in all inflammatory diseases, and its inhibition has been of great interest to researchers [42, 43]. In our study, *I. paraguariensis* major compounds were able to inhibit p65 phosphorylation. This corroborates with previously published data which demonstrates that Caf [44], Rut [16] and CGA [45] both attenuate NF- κ B activation. As consequence, the plant produced an improvement in inflammatory environment, reducing neutrophil accumulation and edema in the pleural space and lung tissues, as demonstrated in our experiments.

In summary, our results allow us to conclude that *I. paraguariensis* exerts anti-inflammatory action through its ability in attenuating Th1/Th17 polarization. Furthermore, we can hypothesize that the high consumption of yerba mate among the Southern Latin America people may be a factor that explains the lower levels of neutrophilic asthma in this population.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments

This study was granted and financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC/PRONEM - 2771/2012) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). FHR are also grateful to CNPq for their research fellowship. The authors also are grateful to Fiona Robson for her assistance in proofreading and correcting the English language of this text.

References

- [1] C.I. Heck, E.G. de Mejia, Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations, *J. Food Sci.* 72 (2007) R138–R151, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x>.
- [2] F.H. Reginaldo, M.L. Athayde, G. Gosmann, E.P. Schenkel, Methylxanthines accumulation in *Ilex* species – caffeine and theobromine in yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species, *J. Braz. Chem. Soc.* 10 (1999) 443–446, <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50521999010600004>.
- [3] Y.-R. Kang, H.-Y. Lee, J.-H. Kim, D.-I. Moon, M.-Y. Seo, S.-H. Park, et al., Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6j mice fed a high-fat diet, *Lab. Anim. Res.* 28 (2012) 23–29, <http://dx.doi.org/10.5625/lar.2012.28.123>.
- [4] E.C.S. Santos, M.A. Bicca, C.H. Blum-Silva, A.P.R. Costa, A.A. Dos Santos, E.P. Schenkel, et al., Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice, *Neuroscience* 292 (2015) 13–21, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.004>.
- [5] M. Barg, G.T. Rezini, D.D. Leffa, F. Balbinot, L.M. Gomes, M. Carvalho-Silva, et al., Evaluation of the protective effect of *Ilex paraguariensis* and *Camellia sinensis* extracts on the prevention of oxidative damage caused by ultraviolet radiation, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37 (2014) 195–201, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.11.028>.

- [6] J.G. Prado Martín, E. Porto, S.M. de Alencar, E.M. da Glória, C.B. Corrêa, I.S. Ribeiro Calcei, Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens, *Rev. Argent. Microbiol.* 45 (2013) 93–98, [http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70006-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70006-0).
- [7] G. Schiella, E. Neyret, G. Cónsole, H. Tournier, J.M. Prieto, J.-L. Riou, et al., An aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reduces edema and inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in animal models of inflammation, *Planta Med.* 80 (2014) 961–968, <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1382876>.
- [8] G. Peñal, A. Varello, M.T. Busceti, L. Gallucci, C. Calabrese, R. Terracciano, et al., Cellular mechanisms underlying eosinophilic and neurogenic airway inflammation in asthma, *Mediat. Inflamm.* 2015 (2015) 1–8, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/879783>.
- [9] I.R. McIntire, G. Schett, The pathogenesis of rheumatoid arthritis, *N. Engl. J. Med.* 365 (2011) 2205–2219, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMa1004965>.
- [10] E. Sabatí (Ed.), Adherence to Long-Term Therapies: Evidence for Action, World Health Organization, Geneva, 2003 (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42632/1/9241545992.pdf>).
- [11] Zhen, T.S. Villán, Y. Guo, Y. Qi, K. Chin, M.-H. Pan, et al., Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves, *Food Chem.* 190 (2016) 673–680, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.000>.
- [12] A. García-Lafuente, C. Moreno, M. Marchón, A. González-Ruiz, A. Villares, E. Guillamón, et al., In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans, *Food Chem.* 161 (2014) 216–223, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.004>.
- [13] T.S. Saleh, J.B. Calixto, Y.S. Medeiros, Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy, *Br. J. Pharmacol.* 118 (1996) 811–819, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15472.x>.
- [14] T.S. Rao, J.L. Currie, A.F. Shaffer, P.C. Isacson, Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and tetraenoic/omega-3 acetate (TPA)-induced dermal inflammation, *Inflammation* 17 (1993) 723–741, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00920477>.
- [15] G. Giusti, B. Galanti, Adenosine Deaminase: Colorimetric Method, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Weinheim, Germany 1984, pp. 315–323.
- [16] F. Arruda-Silva, M.V.P.S. Nascimento, A.B.G. Luz, D. Venzke, G.S. Queiroz, T.S. Fróde, et al., Polygala molluginifolia A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF- κ B activation, *Int. Immunopharmacol.* 19 (2014) 324–341, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.02.010>.
- [17] M.-W. Liu, M.-X. Su, L.-F. Qin, X. Liu, M.-L. Tian, W. Zhang, et al., Effect of salidroside on lung injury by upregulating peroxisome proliferator-activated receptor γ expression in septic rats, *Exp. Ther. Med.* 7 (2014) 1446–56, doi:<http://dx.doi.org/10.3892/etm.2014.1628>.
- [18] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>) (accessed May 23, 2014).
- [19] H. An, H. Wang, Y. Lan, Y. Hathi, S. Chen, Simultaneous qualitative and quantitative analysis of phenolic acids and flavonoids for the quality control of *Apocynum venetum* L. leaves by HPLC-DAD-ESI-TOF-MS and HPLC-DAD, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 85 (2013) 295–304, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.07.005>.
- [20] N. Dattora, L.M. de Souza, A.P. Santana-Hilho, M. Iaconini, A.T. Valduza, P.A.J. Gorin, et al., UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing, *Food Chem.* 129 (2011) 1453–1461, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.112>.
- [21] S. Gianica, U. Lohwasser, K. Böhner, C. Zidom, Qualitative and quantitative analyses of secondary metabolites in aerial and subaerial of *Scorzonera hispanica* L. (black salify), *Food Chem.* 173 (2015) 321–331, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.066>.
- [22] M.-N. Li, X. Dong, W. Gao, X.-G. Liu, R. Wang, P. Li, et al., Global identification and quantitative analysis of chemical constituents in traditional Chinese medicinal formula Qi-Fu-Yin by ultra-high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 114 (2015) 376–389, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.05.030>.
- [23] C.H. Blum-Silva, A.B.G. Luz, M.V.P.S. Nascimento, B.M. de C. Facchin, B. Baratto, T.S. Fróde, et al., Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of *Ilex paraguariensis* leaves by UPLC/PDA and QTOF-MS, *Data in Bri.* (2016) submitted.
- [24] B.N. Lambrecht, H.ammad, The immunology of asthma, *Nat. Immunol.* 16 (2015) 45–56, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3049>.
- [25] L. Antoniali, B. Csáka, M. Fornal, R. Colucci, E. Kófal, C. Blandizzi, et al., Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discov. Today* 19 (2014) 1051–1068, <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.02.010>.
- [26] K.E. Barletta, K. Ley, B. Mehrad, Regulation of neutrophil function by adenosine, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (2012) 856–864, <http://dx.doi.org/10.1161/ATVaha111.226845>.
- [27] T. Yago, H. Tsukamoto, Z. Liu, Y. Wang, L.F. Thompson, R.P. McEver, Multi-inhibitory effects of A2A adenosine receptor signaling on neutrophil adhesion under flow, *J. Immunol.* 185 (2013) 2880–2889, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1300775>.
- [28] S. Cuzzocrea, E. Mazon, G. Calabro, L. Dugo, A. De Sarro, F.A.J. van de Loo, et al., Inducible nitric oxide synthase—knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162 (2000) 1859–1866, <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.162.9.99125>.
- [29] S.F. Ahmad, K.M.A. Zohair, H.E. Abdel-Hamid, I. Alrahshi, S.M. Attia, S.A. Bakheet, et al., Role of a histamine 4 receptor as an anti-inflammatory target in carrageenan-induced pleurisy in mice, *Immunology* 142 (2014) 374–383, <http://dx.doi.org/10.1111/imm.12257>.
- [30] D.W. Lim, J.G. Kim, T. Han, S.K. Jung, E.Y. Lim, D. Han, et al., Analgesic effect of *Ilex paraguariensis* extract on postoperative and neurogenic pain in rats, *Biol. Pharm. Bull.* 38 (2015) 1573–1579, <http://dx.doi.org/10.1248/bpb15-00360>.
- [31] L.S. Carro, M.M. Rogero, M. Cortez, M. Yamada, P.S. Jacob, D.H.M. Bastos, et al., The effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) consumption on IL-1, IL-6, TNF- α and IL-10 production by bone marrow cells in Wistar rats fed a high-fat diet, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 83 (2013) 26–35, <http://dx.doi.org/10.1024/0300-9831/a000142>.
- [32] M. Izanetti, F.S. Bezerra, A. Romana-Souza, A.C. Brando-Lima, V.L.G. Koza, L.C. Porto, et al., Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke, *Nutrition* 24 (2008) 375–381, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2008.01.022>.
- [33] E. Forno, M. Gogna, A. Gapeda, A. Yañez, D. Sok, P. Cooper, et al., Asthma in Latin America, *Thorax* 70 (2015) 898–905, <http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207193>.
- [34] I. Raphael, S. Nalawade, T.N. Eagar, T.G. Forsthuber, T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases, *Cytokine* 74 (2014) 5–17, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyt.2014.09.011>.
- [35] A. Chaudhry, R.M. Samstein, P. Treuting, Y. Liang, M.C. Pils, J.M. Heinrich, et al., Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation, *Immunity* 34 (2011) 566–578, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.018>.
- [36] G.D. Pinneim, F.S. Liu, J.C. Rosa, A.V. Caris, F. Pinheiro, E.B. Ribeiro, et al., Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats, *J. Nutr. Biochem.* 24 (2013) 809–818, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.04.016>.
- [37] S. Bhattacharya, P.K. Dudeja, J.K. Toelman, Carrageenan-induced NF κ B activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10, *Biochim. Biophys. Acta* 1780 (2008) 973–982, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.019>.
- [38] C.M. Avira, Nuclear factor-kappa-B signaling in lung development and disease: one pathway, numerous functions, *Birth Defects Res. C Clin. Mol. Teratol.* 100 (2014) 202–216, <http://dx.doi.org/10.1002/bdra.22323>.
- [39] J.-N. Dai, Y. Zong, L.-M. Zhong, Y.-M. Li, W. Zhang, L.-G. Bian, et al., Gastrin inhibits expression of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and proinflammatory cytokines in cultured LPS-stimulated microglia via MAPK pathways, *PLoS One* 6 (2011), e21891, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021891>.
- [40] P.A. Bauerle, D. Baltimore, NF- κ B: ten years after, *Cell* 87 (1996) 13–20, [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81918-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81918-5).
- [41] W. Cho, J.-W. Nam, H.-J. Kang, T. Windono, E.-K. Seo, K.-T. Lee, Zedaronilid isolated from the rhizoma of *Curatema heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF- κ B pathway in LPS-stimulated murine macrophages, *Int. Immunopharmacol.* 9 (2009) 1049–1057, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2009.04.012>.
- [42] G. Diamant, R. Dikstein, Transcriptional control by NF- κ B: elongation in focus, *Biochim. Biophys. Acta* 1829 (2013) 937–945, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.007>.
- [43] M. Galzudo, S. Bacher, M.L. Schmitz, NF- κ B inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer, *Curr. Med. Chem.* 14 (2007) 367–376, <http://dx.doi.org/10.2174/09398870779941113>.
- [44] C.-H. Kang, K.C.P.T. Jayasinghe, M.G. Dilsara, Y.H. Choi, Y.-K. Jeong, N.D. Kim, et al., Caffeine suppresses lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells by suppressing Akt-mediated NF- κ B activation and ERK phosphorylation, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 4270–4276, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodtox.2012.08.041>.
- [45] S.J. Hwang, Y.-W. Kim, Y. Park, H.-J. Lee, K.-W. Kim, Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 2647 cells, *Inflamm. Res.* 63 (2014) 81–90, <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-013-0674-4>.

ANEXO B – Publicação: Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of *Ilex paraguariensis* leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS.

Carlos Henrique Blum-Silva, Ana Beatriz Gobbo Luz, Marcus Vinicius P.S. Nascimento, Bruno Matheus de Campos Facchin, Bruna Baratto, Tânia Silvia Fröde, Louis Pergaud Sandjo, Eduardo Monguillott Dalmarco, Flávio Henrique Reginatto.

Data in Brief, v.8, p. 295-299, 2016.

(ISSN 2352-3409)

doi:10.1016/j.dib.2016.05.022



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Data in Brief

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dib

Data Article

Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of *Ilex paraguariensis* leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS



Carlos Henrique Blum-Silva^a, Ana Beatriz Gobbo Luz^b,
 Marcus Vinicius P.S. Nascimento^b,
 Bruno Matheus de Campos Facchin^b, Bruna Baratto^b,
 Tânia Silvia Fröde^b, Louis Pergaud Sandjo^a,
 Eduardo Monguilhott Dalmarco^{b,c},
 Flávio Henrique Reginatto^{a,*}

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Brasil

^b Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Brasil

^c Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University of Torino, 10124 Torino, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2016

Received in revised form

7 May 2016

Accepted 13 May 2016

Available online 20 May 2016

Keywords:

Ilex paraguariensis

Mate

Chemical composition

LC-PDA

LC-MS

ABSTRACT

Ilex paraguariensis A. St. Hil. is a native plant of South America widely consumed as beverages for its ethno pharmacological properties, such as antioxidant, anti-inflammatory, hypocholesterolemic as well as its benefits on the cardiovascular system. Since these properties are related to its chemical composition, the identification and quantification of the major compounds of *I. paraguariensis* extracts still remains relevant. The data described in this article supports previous results on the anti-inflammatory effect of *I. paraguariensis* A. St. Hil (Mate). "The anti-inflammatory effect of *I. paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy" [1]. The present data article reports on nine major compounds identified in *I. paraguariensis* extracts and its related

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2016.04.027>

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 5075.

E-mail addresses: carloshblum@gmail.com (C.H. Blum-Silva), anaaabia@gmail.com (A.B.G. Luz), mmmarcusster@gmail.com (M.V.P.S. Nascimento), brunomatheusfacchin@gmail.com (B.M. de Campos Facchin), bruhb90@gmail.com (B. Baratto), tania.frode@ufsc.br (T.S. Fröde), p.l.sandjo@ufsc.br (L.P. Sandjo), edalmarco@gmail.com (E.M. Dalmarco), flavio.reginatto@ufsc.br, freginatto@hotmail.com (F.H. Reginatto).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2016.05.022>

2352-3409/© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

fractions by using UPLC-PDA and UPLC-QTOF. Identification of the constituents was based on their retention times, UV absorption spectra and mass spectra data, as well as by comparison with authentic samples. The validated parameters show that the quantification by UPLC-PDA methodology developed is sensitive, precise and accurate.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Specifications Table

Subject area	Pharmaceutical sciences
More specific subject area	Natural product chemistry; Pharmacognosy
Type of data	Figure and tables
How data was acquired	Ultra performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometry detection using an Acquity-UPLC™ (Waters, MA, USA) coupled to a high-resolution mass spectrometer (Xevo G2-S QToF model), equipped with an electrospray ionization source and controlled by MassLynx v4.1 software.
Data format	Analyzed
Experimental factors	Hydroethanolic extract of <i>Ilex paraguariensis</i> leaves was prepared by turboextraction. The extract was dried (CE) and a portion was poured onto water and partitioned with <i>n</i> -BuOH, yielding the <i>n</i> -BuOH fraction (BF) and aqueous residual fraction (ARF). For the LC analysis, the samples were dissolved in the mobile phase and filtered through a 0.22 μm membrane before the injection in UPLC.
Experimental features	The extract and the fractions of <i>Ilex paraguariensis</i> leaves were analyzed qualitatively and quantitatively by UPLC-PDA and UPLC-MS.
Data source location	Department of Pharmaceutical Science, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianopolis, Brazil.
Data accessibility	Data is with this article

Value of the data

- Chromatographic and mass spectrometric data can be used for comparison with other studies performed on *I. paraguariensis* extracts.
- The extract contents and the metabolites identification data will provide a valuable reference for studies comprising the chemical and pharmacological effects of *I. paraguariensis*.
- Allows the characterization of new targets and new potential functions for this medicinal plant.
- Interaction network generated.

1. Data

The following dataset includes one figure and two tables that support the identification as well as validation assays to quantify the major compounds of *Ilex paraguariensis* samples extracts. Fig. 1 shows the UPLC-PDA chromatographic profile of *I. paraguariensis* crude extract. The chromatographic and spectroscopic (UPLC-PDA and UPLC-MS) detection parameters data for each identified compound are presented in Table 1. Further, Table 2 data shows the validated parameters of the methodology developed. The different contents data of compounds of *I. paraguariensis* crude extract and its related fractions are showed in Table 1 in Ref. [1].

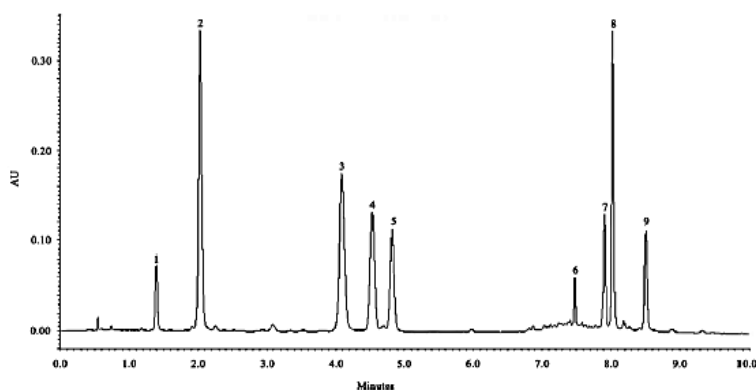


Fig. 1. UPLC-PDA chromatogram at 280 nm. Peak identification: 1, theobromine; 2, 3-O-caffeoylquinic acid; 3, 5-O-caffeoylquinic acid; 4, caffeine; 5, 4-O-caffeoylquinic acid; 6, rutin; 7, 3,4-dicaffeoylquinic acid; 8, 3,5-dicaffeoylquinic acid; 9, 4,5-dicaffeoylquinic acid.

Table 1

Chromatographic and spectroscopic profile of phenolic compounds and methylxanthines of the extract and fractions from *Ilex paraguariensis* leaves.

Peak	Identification	RT (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Error (mDa)	^a Reference
1	Theobromine	1.4	272	n.d.	–	Standard
2	3-O-caffeoylquinic acid	2.05	325–296	353.0903	–3.1	(An et al. [2]; Dartora et al. [3])
3	5-O-caffeoylquinic acid	4.1	325–296	353.0903	–1.3	Standard (Granica et al. [4]; Dartora et al. [3])
4	Caffeine	4.55	273	n.d.	–	Standard
5	4-O-caffeoylquinic acid	4.85	325–296	353.0903	0.3	Standard (Granica et al. [4]; Dartora et al. [3])
6	Rutin	7.5	353–255	609.1376	–5.4	Standard (An et al. [2]; Dartora et al. [3])
7	3,4-dicaffeoylquinic acid	7.91	325–296	515.1198	–2.0	(Li et al. [5]; Dartora et al. [3])
8	3,5-dicaffeoylquinic acid	8.05	325–296	515.1152	–6.9	(Li et al. [5]; Dartora et al. [3])
9	4,5-dicaffeoylquinic acid	8.52	325–296	515.1105	–10.2	(Li et al. [5]; Dartora et al. [3])

n.d. – not detected.

^a Identification based on mass spectra, chromatographic profiles and previous reports.

2. Experimental design, materials and methods

2.1. Plant material

Plant material data described here has been carried out in accordance with Ref. [1]. After harvesting, *I. paraguariensis* A. St. Hil. leaves (RSPF 11074) were processed and stored until the extraction and the preparation of its related fractions.

2.2. Extract preparation

The hydroethanolic *I. paraguariensis* crude extract were prepared by turboextraction in an Ultra-Turrax[®] apparatus. After filtration, the solvent was removed under reduced pressure, and the obtained crude extract (CE) was partitioned between *n*-BuOH and water affording fractions BF and ARF, respectively. For details of the samples preparation see Ref. [1].

Table 2
Validated parameters for the UPLC-PDA quantification.

Compound	Precision ^a				Accuracy ^b (Recovery)		LOQ ^c ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD ^c ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	Repeatability		Intermediate precision		Mean (%)	R.S.D. (%)		
	Mean ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	R.S.D. (%)	Mean ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	R.S.D. (%)				
Caffeine	0.05	3.17	10.00	1.01	100.9	1.07	0.05	0.015
	10.00	0.26						
	50.00	0.34						
Chlorogenic acid	0.05	4.77	50.00	1.02	99.5	1.17	0.05	0.01
	50.00	3.49						
	100.00	0.18						
Rutin	0.25	4.07	50.00	1.68	97.6	1.53	0.25	0.01
	10.00	3.37						
	50.00	0.82						

^a Limit: R.S.D. < 5%.

^b Recovery was determined by injection of spiked samples, in triplicate, with standard solution.

^c LOQ=limit of quantification; LOD=limit of detection.

2.3. Chromatographic separation

All the chromatographic conditions are related to Ref. [1]. Chromatographic separation was achieved with an Acquity-UPLC™ (Waters®, MA, USA) system equipped with a quaternary pump, degasser, autosampler, photodiode array detector (PDA) and a Waters BEH C18 column, 1.7 μm , 50 \times 2.1 mm at 40 °C as the stationary phase. The method used a gradient at constant flow rate (0.3 mL min⁻¹) combining solvent A (formic acid/water, pH 2.5) and solvent B (acetonitrile), programmed as follows: 0–5 min, linear change from A–B (97:3 v/v) to A–B (90:10 v/v); 5–6 min, isocratic A–B (90:10 v/v); 6–9 min, linear change to A–B (80:20 v/v) and 9–10 min, linear change to A–B (10:90 v/v). The peaks were characterized by comparing the retention time, UV spectra and by co-injection of the sample with the reference standards. Quantification was performed by external calibration curve, using their corresponding standards. Caffeine (Sigma-Aldrich®) was quantified at 280 nm, while the phenolic compounds chlorogenic acid (Fluka®) and rutin (Sigma-Aldrich®) were quantified at 320 nm. All the analyses were performed in triplicate, and the peak area measured. Quantification was achieved using regression curves in the following ranges: 0.05–50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the caffeine; 0.05–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for chlorogenic acid and 0.25–50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for rutin. The regression equations were “ $y=39320x+2074.9$ ” for caffeine, “ $y=46696x-1896$ ” for chlorogenic acid, and “ $y=15618x+178.92$ ” for rutin. The extract was analyzed at a concentration of 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the injection volume was 5 μL .

2.4. UPLC-MS analysis

In addition to UPLC-PDA analysis, the identification was carried out by liquid chromatography (UPLC, Waters® Acquity mode) coupled to a high-resolution mass spectrometer (Xevo G2-S QToF model), equipped with an electrospray ionization probe. MassLynx v.4.1 software was used for data acquisition and processing. The mass spectrometer parameters were set as detailed in Ref. [1].

2.5. UPLC-PDA validation procedure

The UPLC-PDA quantification method was validated according to the ICH guidelines (2005) [6] for specificity, linearity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision), limit of quantification (LOQ) and limit of optical detection (LOD). The good linearity ranges were achieved by the analysis of linear correlation coefficient (caffeine, $r^2=1$; chlorogenic acid, $r^2=0.9999$; rutin,

$r^2 = 0.9999$) of the regression curves. The precision was determined by repeatability (intra-day assay) and intermediate precision (inter-day assay). The intra-day assay was performed in triplicate analysis of three different concentrations of the standard solutions, and expressed as relative standard deviation (RSD). The inter-day assay was determined by the analysis of a medium concentration in the curve, three times a day, on three different days. The limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) were defined by relative standard deviation ($RSD < 5\%$) and by a signal:noise ratio of 3:1, respectively. Accuracy was determined by spiking samples with the standard solutions of caffeine, chlorogenic acid or rutin (1:1 v/v) and the average recovery values were calculated.

Acknowledgments

We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) for their financial support (FAPESC/CNPq – PRONEM 27/71/2012). F. H. R. is also grateful to CNPq for his research fellowship. The authors are also grateful to CNPq and CAPES for their research fellowships.

Appendix A. Transparency document

Transparency document associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2016.05.022>.

References

- [1] A.B.G. Luz, C.H. Blum-Silva, M.V.P.S. Nascimento, B.M.C. Facchin, B. Baratto, T.S. Fröde, F.H. Reginatto, E.M. Dalmarco, The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy, *Int. Immunopharmacol.* 36 (2016) 165–172. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.027>1567–5763.
- [2] H. An, H. Wang, Y. Lan, Y. Hashi, S. Chen, Simultaneous qualitative and quantitative analysis of phenolic acids and flavonoids for the quality control of *Apocynum venetum* L. leaves by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS and HPLC-DAD, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 85 (2013) 295–304. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.07.005>.
- [3] N. Dartora, L.M. de Souza, A.P. Santana-Filho, M. Iacomini, A.T. Valduga, P.A.J. Gorin, G.L. Sassaki, UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing, *Food Chem.* 129 (2011) 1453–1461. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.112>.
- [4] S. Granica, U. Lohwasser, K. Jöhner, C. Zidorn, Qualitative and quantitative analyses of secondary metabolites in aerial and subaerial of *Scorzonera hispanica* L. (black salsify), *Food Chem.* 173 (2015) 321–331. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.006>.
- [5] M.-N. Li, X. Dong, W. Gao, X.-G. Liu, R. Wang, P. Li, H. Yang, Global identification and quantitative analysis of chemical constituents in traditional Chinese medicinal formula Qi-Fu-Yin by ultra-high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 114 (2015) 376–389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.05.030>.
- [6] ICH, International Conference on Harmonization, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2(R1), ICH, I.C.α.H., London, 2005.