

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE NEUROFARMACOLÓGICA DE
Ilex paraguariensis EM CAMUNDONGOS**

EVELYN CRISTINA DA SILVA SANTOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thereza Christina Monteiro de Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto

Florianópolis
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

S237i Santos, Evelyn Cristina da Silva

Investigação da atividade neurofarmacológica de *Ilex paraguariensis* em camundongos [dissertação] / Evelyn Cristina da Silva Santos ; orientadora, Thereza Christina Monteiro de Lima. - Florianópolis, SC, 2011.

107 p.: il., grafs., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

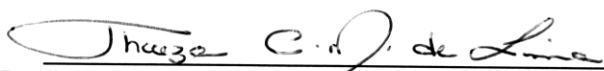
1. Farmacologia. 2. Erva-mate. 3. Ansiedade. 4. Memória. I. Lima, Thereza Christina Monteiro de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

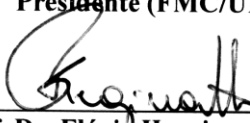
Título
Investigação da atividade neurofarmacológica de *Ilex*
***paraguariensis* em camundongos**

EVELYN CRISTINA DA SILVA SANTOS

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final
pelos membros da Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:



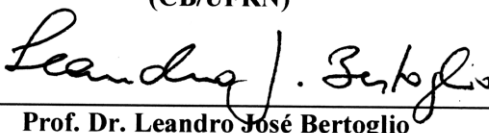
Prof.^a. Dr.^a. Thereza Christina Monteiro de Lima
Presidente (FMC/UFSC)



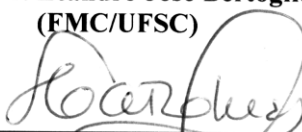
Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto
Co-orientador (CIF/UFSC)



Prof.^a. Dr.^a. Elaine Cristina Gavioli
(CB/UFRN)



Prof. Dr. Leandro José Bertoglio
(FMC/UFSC)



Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC

Florianópolis, 09 de fevereiro de 2011.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima, pela orientação, sobretudo pela confiança depositada. Agradeço pela oportunidade, amizade, bem como pelo crescimento pessoal e profissional proporcionado.

Ao professor Dr. Flávio Henrique Reginatto, pela coorientação nesse trabalho e por contribuir com os extratos, bem como os dados químicos da *Ilex paraguariensis*. Ao Carlos Henrique Blum da Silva, pela realização dos experimentos fitoquímicos que dão suporte aos dados aqui apresentados.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram para a minha formação científica.

Aos professores Dra. Elaine Cristina Gavioli, Dr. Leandro José Bertoglio e Dr. Rui Daniel Schröder Prediger, por aceitarem o convite para compor a banca e pela colaboração no aprimoramento desse trabalho.

Aos meus pais, Jane e Alan, e minha irmã, Aline, e toda a minha família, pelo carinho, amizade e apoio constante para a minha formação.

Aos meus amigos do laboratório de Neurofarmacologia, Ana Paula, Claudini, Andressa, Rebeca, Alexandre, Gilliard, Marcelo, Ligia, Filipe, Nayana, Carize, pela ajuda e sugestões na realização desse trabalho, mas acima de tudo pela amizade e ótimos momentos de convívio.

Aos meus amigos Lucas, Filipe, Cris Stern, Thaize e Cris Mochny, pela amizade, paciência, apoio, pelos momentos bons, bem como pela contribuição nesse trabalho.

A minha amiga Patrícia Midori Oguma, pela grande amizade e paciência comigo em todos esses anos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia e demais colegas da pós-graduação.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

A todos que, de alguma maneira, colaboraram para a realização desse trabalho.

E, acima de tudo, a Deus pelas oportunidades e vitórias conquistadas.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao tamanho normal”

(Einstein)

RESUMO

O presente estudo investigou a atividade do tipo ansiolítica e mnemônica, bem como o possível efeito adaptogênico do extrato aquoso (EA) e hidroetanólico (EHE) obtidos das folhas de *Ilex paraguariensis*, conhecida popularmente como erva mate. O perfil fitoquímico desta espécie apresenta diversos constituintes químicos que podem ser responsáveis pelas suas atividades biológicas. O tratamento agudo por via oral com o EA e EHE não promoveu nenhuma alteração comportamental quando os animais foram avaliados no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e no teste do campo aberto (CA). No entanto, o tratamento oral subcrônico com o EHE produziu um aumento da atividade locomotora, evidenciado pelo aumento de entradas nos braços fechados e total de entradas no teste do LCE e, ainda, pelo aumento no número de cruzamentos no teste do CA, sem alterar os parâmetros de ansiedade no teste do LCE. Por outro lado, o tratamento crônico com o EHE de *Ilex paraguariensis* promoveu um comportamento do tipo ansiolítico quando avaliado no teste do LCE e aumento da atividade locomotora no teste do CA. No teste da esquiiva inibitória do tipo *step-down*, o tratamento agudo do EA e EHE não interfere no aprendizado e memória dos animais. Contudo, quando utilizado um modelo de amnésia induzido por escopolamina o EA foi capaz de prevenir o déficit de memória induzido por esta substância. O tratamento crônico com o EHE revelou um efeito diferencial nos tipos de memória avaliados (memória de trabalho, curta e longa duração). *Ex vivo*, o EHE de *Ilex paraguariensis* não reduziu a atividade da acetilcolinesterase. Por fim, o tratamento por sete dias com o EHE e EA de *Ilex paraguariensis* não foi capaz de impedir o aumento no nível de corticosterona nos animais submetidos ao estresse de contenção a frio, sendo observada apenas uma melhora parcial do desempenho motor dos mesmos no teste do CA. Nossos resultados sugerem que a atividade ansiolítica aqui observada envolve a participação de outros constituintes da erva mate, como por exemplo, flavonoides, saponinas e outros polifenóis, além das metilxantinas como a cafeína. O efeito nootrópico observado parece também depender desta interação, envolvendo provavelmente o antagonismo dos receptores de adenosina. Todas estas hipóteses devem ser melhor investigadas.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*; psicoestimulação; ansiedade; memória.

ABSTRACT

The present study has investigated the anxiolytic- and mnemonic-like activity as well as a putative adaptogenic effect of the aqueous (AE) and hydroethanolic (EHE) extract obtained from the leaves of *Ilex paraguariensis*, popularly known as yerba mate. The phytochemistry profile of this species presents several constituents that could be responsible for its biological activities. Acute oral treatment with AE and EHE did not promote any behavioral change when animals were evaluated in the elevated plus-maze (EPM) and open-field (OF) tests. However, the subchronic treatment produced an enhancement in the locomotor activity, shown by an increase in the entries into the open and enclosed arms, besides in the total entries in the EPM test. Moreover, treated animals showed an increased number of crossings in the OF test, without changing the anxiety parameters in the EPM test. On the other hand, the chronic treatment with the EHE of *Ilex paraguariensis* promoted an anxiolytic-like profile of action in the EPM test and an enhancement of the motor activity in the OF test. In the passive avoidance test (step-down), the acute treatment with AE or EHE of *Ilex paraguariensis* did not influence learning and memory processes. Nevertheless, the AE treatment was able to prevent the memory deficit induced by scopolamine. The chronic treatment with EHE showed a different effect in each type of memory evaluated (working, short- and long-term memories). *Ex vivo* studies showed that the EHE of *Ilex paraguariensis* was not able to reduce the acetylcholinesterase levels in the blood. Finally, a 7-day treatment with EHE or EA of *Ilex paraguariensis* did not diminish the corticosterone levels of animals submitted to the cold (4°C) restraint stress, but a partial improvement in the motor performance in the OF test was observed. Our results suggest that the anxiolytic-like activity here observed probably involves other constituents of yerba mate, such as flavonoids, saponins and other polyphenols, besides the methylxanthines such as caffeine. It is feasible that a synergistic action among these compounds results in the nootropic effect here observed, probably due to the antagonism of the adenosine receptors. These hypothesis have to be further investigated.

Keywords: *Ilex paraguariensis*; psychostimulant; anxiety; memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fonte de moléculas de drogas de 1981 – 2006.....	24
Figura 2. Maiores regiões produtoras de erva mate no Brasil - região Sul (verde escuro) e Centro-Oeste (verde claro).....	27
Figura 3. Representação dos frutos (a), flores (b) e árvore (c) de erva mate.....	28
Figura 4. Estrutura química de compostos fenólicos.....	30
Figura 5. Estrutura química da rutina	30
Figura 6. Estrutura química das metilxantinas: cafeína, teobromina e teofilina.....	31
Figura 7. Estrutura química dos ácidos oleanólico e ursólico	33
Figura 8. Protocolo do tratamento agudo nos experimentos de investigação da atividade tipo ansiolítica dos EA e EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> no teste do labirinto em cruz elevado, seguido pelo teste do campo aberto.....	44
Figura 9. Protocolo do tratamento agudo nos experimentos de investigação do efeito nootrópico dos EA e EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> no teste da esquivia inibitória do tipo <i>step-down</i>	44
Figura 10. Protocolo do tratamento subcrônico nos experimentos de investigação da atividade tipo ansiolítica dos EA e EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> no teste do labirinto em cruz elevado, seguido pelo teste do campo aberto.....	44
Figura 11. Protocolo do tratamento crônico nos experimentos de investigação da atividade tipo ansiolítica do EHE obtido de <i>Ilex paraguariensis</i> no teste do labirinto em cruz elevado, seguido pelo teste do campo aberto.....	45
Figura 12. Protocolo do tratamento crônico nos experimentos de investigação do efeito nootrópico do EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> no teste da esquivia inibitória do tipo <i>step-down</i>	45
Figura 13. Protocolo do experimento de investigação da atividade adaptogênica dos EA e EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> no teste de estresse por contenção a frio.....	45

Figura 14. Efeito do tratamento agudo com EA de <i>Ilex paraguariensis</i> (60 - 300 mg/kg, v.o.) no número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) em camundongos submetidos ao teste do campo aberto durante 5 min.....	52
Figura 15. Efeito do tratamento agudo com EA de <i>Ilex paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg; v.o.) na retenção da memória de trabalho (30 s), de curta (90 min) e longa duração (24 h) no teste de esquiwa inibitória do tipo <i>step-down</i>	53
Figura 16. Efeito do tratamento agudo com EA de <i>Ilex paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg; v.o.) na retenção da memória de trabalho (30 s), de curta (90 min) e longa duração (24 h) no teste de esquiwa inibitória do tipo <i>step-down</i> em um modelo de amnésia induzida por escopolamina.....	54
Figura 17. Efeito do tratamento agudo com EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> (60 - 300 mg/kg, v.o.) no número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) em camundongos submetidos ao teste do campo aberto durante 5 min.....	56
Figura 18. Efeito do tratamento agudo EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg; v.o.) na retenção da memória de trabalho (30 s), de curta (90 min) e longa duração (24 h) no teste de esquiwa inibitória do tipo <i>step-down</i>	57
Figura 19. Efeito do tratamento agudo EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg; v.o.) na retenção da memória de trabalho (30 s), de curta (90 min) e longa duração (24 h) no teste de esquiwa inibitória do tipo <i>step-down</i> em um modelo de amnésia induzida por escopolamina.....	58
Figura 20. Efeito do tratamento subcrônico com EHE e EA de <i>Ilex paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg; v.o.) no tempo (A) e entradas (B) nos braços abertos, entradas nos braços fechados (C) e total de entradas (D) em camundongos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado durante 5 min.....	60
Figura 21. Efeito do tratamento subcrônico com EHE e EA de <i>Ilex paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg; v.o.) nos estiramentos corporais (A), imersões de cabeça (B), comportamento de levantar (C) e de autolimpeza (D) em camundongos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado durante 5 min.....	61
Figura 22. Efeito do tratamento subcrônico com EHE e EA de <i>Ilex paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg, v.o.) no número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) em camundongos avaliados ao teste do campo aberto durante 5 min.....	62
Figura 23. Efeito do tratamento crônico com EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg; v.o.) no tempo (A) e entradas (B) nos braços abertos,	

entradas nos braços fechados (C) e total de entradas (D) em camundongos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado durante 5 min.....	63
Figura 24. Efeito do tratamento crônico com EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg; v.o.) nos estiramentos corporais (A), imersões de cabeça (B), comportamento de levantar (C) e de autolimpeza (D) em camundongos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado durante 5 min.....	64
Figura 25. Efeito do tratamento crônico com EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg; v.o.) no teste do campo aberto durante 5 min (A) distância percorrida (m), (B) velocidade média, (C) número total de cruzamentos e (D) entradas na zona central.....	65
Figura 26. Efeito do tratamento crônico com EHE de <i>Ilex Paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg; v.o.) no teste do campo aberto durante 5 min (A) tempo na zona central, (B) tempo na zona periférica, (C) distância percorrida na zona central e (D) distância percorrida na zona periférica.....	66
Figura 27. Efeito do tratamento crônico com EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg, v.o.) no número de levantamentos (A) e autolimpeza (B) em camundongos avaliados no teste do campo aberto durante 5 min.....	67
Figura 28. Imagens representativas da ocupação de cada grupo de animais no teste do CA após o tratamento crônico com o EHE de <i>Ilex paraguariensis</i>	68
Figura 29. Imagens representativas da ocupação de cada grupo de animais no teste do LCE após o tratamento crônico com o EHE de <i>Ilex paraguariensis</i>	69
Figura 30. Efeito do tratamento crônico do EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg; v.o.) na retenção da memória de trabalho (30 s), de curta (90 min) e longa duração (24 h) no teste de esQUIVA inibitória do tipo <i>step-down</i>	70
Figura 31. Efeito do tratamento crônico do EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg) na atividade da AChE no hipocampo e córtex dos animais submetidos ao teste da esQUIVA inibitória do tipo <i>step-down</i>	71
Figura 32. Efeito do tratamento de sete dias com o EHE e EA de <i>Ilex paraguariensis</i> (100 - 600 mg/kg; v.o.) em camundongos avaliados no teste do campo aberto durante 5 min.....	72
Figura 33. Imagens representativas da ocupação de cada grupo de animais no teste do CA após o estresse de contenção a frio em animais tratados com o EHE e EA de <i>Ilex paraguariensis</i> durante sete dias.....	73

Figura 34. Níveis de corticosterona plasmática em animais submetidos ao estresse de contenção a frio após tratamento de sete dias com o EHE e EA de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg; v.o.).....74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade de cafeína em bebidas que contêm mate.....	27
Tabela 2. Teores de cafeína e teobromina de folhas de espécies de <i>Ilex</i>	29
Tabela 3. Algumas atividades descritas dos compostos isolados encontrados na <i>Ilex paraguariensis</i>	34
Tabela 4. Diferenças entre adaptógenos e outros estimulantes.....	35
Tabela 5. Efeito do tratamento agudo do EA de <i>Ilex paraguariensis</i> nos parâmetros comportamentais registrados no teste do labirinto em cruz elevado.....	52
Tabela 6. Efeito do tratamento agudo do EHE de <i>Ilex paraguariensis</i> nos parâmetros comportamentais registrados no teste do labirinto em cruz elevado.....	56
Tabela 7. Principais resultados obtidos na investigação neurofarmacológica dos extratos obtidos das folhas de <i>Ilex paraguariensis</i>	75

LISTA DE ABREVIACOES

%EA	Porcentagem de entrada nos braços abertos
%TA	Porcentagem de tempo nos braços abertos
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AMPc	3',5'-monofosfato de adenosina cíclica
AU	Autolimpeza
BDZ	Benzodiazepínico
CA	Campo aberto
CGA	cido clorogênico
CL	Comportamento de levantar
DA	Doença de Alzheimer
DTNB	Ditiobisnitrobenzoato
DZP	Diazepam
EA	Extrato aquoso
EC	Estiramentos corporais
EF	Entradas nos braços fechados
EHE	Extrato hidroetanólico
E.P.M.	Erro padrão da média
escop.	Escopolamina
GABA	cido- γ -aminobutírico
GMPc	3',5'-monofosfato de guanossina cíclica
IC	Imersões de cabeça
i.p.	Intraperitoneal
LCE	Labirinto em cruz elevado
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
v.o.	Via oral
ptz	Pentilenotetrazol
r.p.m	Rotação por minuto
TE	Total de entradas
TNB	cido 5-tio-2-nitro-benzóico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>	26
1.1.1 <i>Principais compostos ativos</i>	29
1.1.1.1 Compostos fenólicos	29
1.1.1.2 Metilxantinas	31
1.1.1.3 Saponinas	32
1.1.1.4 Minerais.....	33
1.2 PLANTAS ADAPTÓGENAS.....	35
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	39
3.2 ANIMAIS	39
3.3 MATERIAL VEGETAL.....	39
3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	40
3.4.1 <i>Preparo e fracionamento do extrato bruto</i>	40
3.4.2 <i>Análise quantitativa das metilxantinas cafeína e teobromina</i> ...	40
3.4.3 <i>Perfil de ácidos fenólicos e flavonoides</i>	41
3.4.4 <i>Validação dos procedimentos analíticos</i>	41
3.5 DROGAS E TRATAMENTO	42
3.5.1 <i>Drogas</i>	42
3.5.2. <i>Tratamento</i>	42
3.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	43
3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS	46
3.7.1 <i>Teste do labirinto em cruz elevado seguido do teste do campo aberto</i>	46
3.7.2 <i>Teste da Esquiva Inibitória do tipo step-down</i>	47
3.7.3 <i>Estresse de contenção no frio</i>	48
3.8 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	48
3.9 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ACETILCOLINESTERASE.....	49
3.10 ENSAIO PARA DOSAGEM DE PROTEÍNA	49
3.11 DOSAGEM DA CORTICOSTERONA PLASMÁTICA	49

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4 RESULTADOS	51
4.1 EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO DO EXTRATO AQUOSO (EA) DE <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>	51
4.1.1 <i>Teste do labirinto em cruz elevado seguido do campo aberto...</i>	51
4.1.2 <i>Teste da esquiwa inibitória do tipo step-down.....</i>	53
4.1.3 <i>Teste da esquiwa inibitória do tipo step-down - amnésia induzida por escopolamina.....</i>	54
4.2 EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO (EHE) DE <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>	55
4.2.1 <i>Teste do labirinto em cruz elevado seguido do campo aberto...</i>	55
4.2.2 <i>Teste de esquiwa inibitória do tipo step-down.....</i>	57
4.2.3 <i>Teste da esquiwa inibitória do tipo step-down - amnésia induzida por escopolamina.....</i>	58
4.3 EFEITO DO TRATAMENTO SUBCRÔNICO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO (EHE) E AQUOSO (EA) DE <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>	59
4.3.1 <i>Teste do labirinto em cruz elevado seguido do teste do campo aberto</i>	59
4.4 EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO (EHE) DE <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>	62
4.4.1 <i>Teste do labirinto em cruz elevado seguido do teste do campo aberto</i>	62
4.4.3 <i>Teste de esquiwa inibitória do tipo step-down.....</i>	70
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA AChE	70
4.6 EFEITO DA ATIVIDADE ADAPTOGÊNICA DO EHE E EA DE <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>	71
4.6.1 <i>Teste do campo aberto após o estresse de contenção a frio.....</i>	71
4.6.2 <i>Avaliação do nível de corticosterona plasmática.....</i>	74
5 DISCUSSÃO.....	75
7 REFERÊNCIAS	89
ANEXO	105

1 INTRODUÇÃO

A civilização tem acumulado ao longo do tempo conhecimento sobre o uso de produtos naturais devido à sua diversidade de atividade biológica e o potencial uso que os mesmos possuem na prática médica (JI; LI; ZHANG, 2009). As plantas psicoativas exercem profundos efeitos sobre a consciência humana, emoção e cognição, e têm sido utilizadas com finalidades recreativas, espirituais e terapêuticas. Atualmente, ainda se faz uso de muitas plantas e derivados utilizados desde os primórdios como *Coffea arabica* (café), *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Cannabis sativa* (maconha), *Papaver somniferum* (ópio), entre outras espécies (O'CONNOR; ROTH, 2005).

A investigação do uso popular ou de comunidades indígenas de inúmeras plantas possibilitou a descoberta de muitas drogas com ação psicoativa, como a ioimbina, efedrina, tubocurarina e galantamina (HOUGHTON; SETH, 2003; ZHANG, 2004). Neste contexto de investigação de plantas medicinais destaca-se o campo da etnofarmacologia que combina a estratégia do conhecimento do uso popular/tradicional com estudos químicos e farmacológicos como instrumento promissor na descoberta de novas drogas (ELISABETSKY; SOUZA, 2007). A importância histórica e potencial de investigação etnofarmacológica tem enfatizado que tais estudos podem levar à (1) descoberta de protótipos de medicamentos, (2) o reconhecimento de novas ações terapêuticas dos compostos já comumente utilizados para outros fins, (3) a descoberta de novas fontes de material bruto de drogas semissintéticas e, (4) a utilização *in natura* de plantas, ou de suas formulações farmacêuticas simples, como um meio de alcançar o desenvolvimento de medicamentos de baixo custo (ELISABETSKY, 1986).

Os produtos naturais desempenham um papel significativo na descoberta de compostos biologicamente ativos e desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de diversas doenças (NEWMAN; GRAGG, 2007). Em 2000, a estimativa de drogas desenvolvidas a partir de produtos naturais era de cerca de 20% (BUTLER, 2004), tendo um aumento significativo nos anos seguintes. Newman (2008) sugeriu que cerca de 60% das drogas disponíveis foram direta ou indiretamente derivadas de produtos naturais, uma vez que os mesmos consistem em uma fonte importante para o desenvolvimento, através da síntese orgânica, de novos agentes com potencial terapêutico como ilustrado na figura 1. Além disso, tem sido demonstrado que numerosas substâncias purificadas, derivadas de produtos naturais, podem interagir com receptores de mamíferos atestando a bioatividade destes produtos (BEUTLER, 2009).

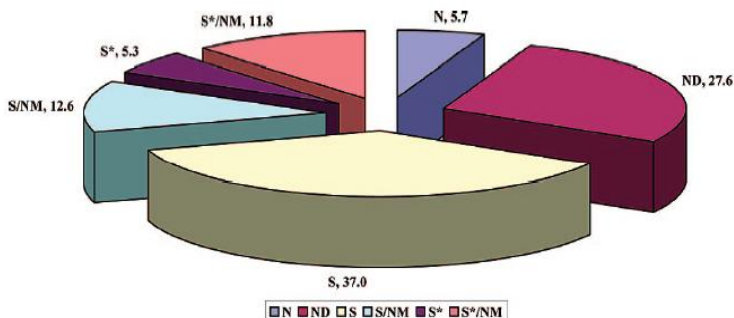


Figura 1: Fonte de moléculas de drogas de 1981 – 2006: (N) produtos naturais, (ND) derivado de produtos naturais e geralmente modificação semissintética, (S) droga totalmente sintética, (S*) droga sintética no qual o farmacóforo partiu de produto natural e (NM) mimitiza produto natural. (Retirado de Newman, 2008).

As plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas em diversas partes do mundo no tratamento de várias doenças, dentro de um contexto cultural na medicina popular, como única opção pelas populações mais carentes e como alternativa terapêutica nos países ricos e desenvolvidos (ASTIN, 1998; DUARTE, 2007). No Brasil, várias espécies nativas têm sido empregadas pela população, cujo conhecimento acerca do uso medicinal foi desenvolvido inicialmente por comunidades indígenas e caboclas do país. Entre as principais plantas nativas de uso popular podem ser citadas as espécies de *Bacharis* (carqueja), *Bauhinia* (pata-de-vaca), *Cecropia* (embaúba), *Maytenus* (espinheira-santa), *Mikania* (guaco) e *Passiflora* (maracujazeiro) (REIS; MARIOT; STEHENBOCK, 2007).

O Brasil, com o seu grande patrimônio genético associado à rica diversidade étnico-cultural envolvendo grupos indígenas, europeus e africanos, representa uma grande potência para o desenvolvimento de novos medicamentos a base de plantas medicinais (RODRIGUES; CARLINI, 2005; GIORGETTI; NEGRI; RODRIGUES, 2007) que é, no entanto, pouco explorada. Estima-se que apenas de 8% da flora brasileira foi estudada quanto ao seu potencial terapêutico (GUERRA; NODARI, 2007), merecendo ter neste sentido, mais incentivos para a investigação não somente dos produtos naturais com potenciais propriedades farmacológicas, mas também como uma fonte de compostos possivelmente modificados para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos (HOSTETTMANN; MARSTON, 2002). Neste sentido, a etnofarmacologia consiste em uma ferramenta importante para a descoberta de novas

alterativas terapêuticas e fonte de moléculas biologicamente ativas para o tratamento de doenças. Isso se faz possível graças à interação de caráter multidisciplinar de diferentes grupos de pesquisa que tem proporcionado grandes avanços no que diz respeito a plantas com utilidade terapêutica (ELISABETSKY; SOUZA, 2007).

O potencial terapêutico de diversas plantas, ou de produtos delas derivados, tem sido avaliado em uma variedade de modelos animais, e seus mecanismos de ação tem sido investigado por meio de abordagens neuroquímicas, contribuindo desta maneira, com informações úteis para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas (ZHANG, 2004). O uso de plantas medicinais representa uma abordagem terapêutica alternativa e extremamente útil para o tratamento de transtornos psiquiátricos (GURIB-FAKIM, 2006). Gurib-Fakim (2006) relata em seu trabalho que os transtornos de depressão e ansiedade acometem uma em cada 6 pessoas e que 40% dos indivíduos que apresentam outros tipos de transtornos psiquiátricos acabam desenvolvendo sintomas de ansiedade e depressão associados ainda a distúrbios do sono. Neste sentido, os medicamentos fitoterápicos são bastante empregados para aliviar os sintomas de distúrbios psiquiátricos. A maior parte dos medicamentos fitoterápicos indicados na terapêutica destes distúrbios são extratos brutos ou semipurificados, como os de *Hypericum perforatum* (erva-de-São-João), *Ginkgo biloba* (gingko), *Panax ginseng* (ginseng), *Melissa officinalis* (melissa), *Valeriana officinalis* (valeriana), *Crataegus oxyacantha* (pilriteiro ou cratego), *Piper methysticum* (kava-kava) e diferentes espécies de *Passiflora* (maracujá), os quais reacenderam o interesse da indústria farmacêutica por produtos de origem vegetal (MONTANARI; BOLZANI, 2001; SENA, 2009).

Várias classes de moléculas mostram-se agentes promissores para terapêutica dos transtornos do sistema nervoso central (SNC), psiquiátricos ou não (GOMES et al., 2009). Recentemente, muita atenção tem sido dada a potenciais agentes que atuam no SNC e que possam contribuir para novos tratamentos de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, de alguns tipos de epilepsia e analgésicos mais potentes (GURIB-FAKIM, 2006).

No entanto, muitas plantas utilizadas tradicionalmente e que apresentam atividade no SNC não tem identificado o composto ou a classe dos compostos responsáveis pelo efeito apresentado, podendo o mesmo ser atribuído a uma combinação dos diferentes compostos encontrados (sinergismo) na planta (ELISABETSKY; WANNMACHER, 1993; GURIB-FAKIM, 2006).

Entre as plantas utilizadas tradicionalmente no Brasil, principalmente, na região sul do país, destaca-se a erva mate (*Ilex paraguariensis*). No entanto, uma busca pela literatura mostra que a maioria dos trabalhos publicados e relacionados à *Ilex paraguariensis* focam

estudos com atividade antioxidante (FILIP et al., 2000; SCHINELLA et al., 2000), inibição de LDL (FILIP et al., 2000; GUGLIUCCI; MENINI, 2002), e avaliação do perfil fitoquímico (ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, 2000). Poucos são os estudos que visam investigar a ação central da *Ilex paraguariensis*. Até o presente momento, apenas três trabalhos relatam a investigação neurofarmacológica desta espécie. O primeiro trabalho desenvolvido por Milioli e colaboradores (2007) relata o efeito do extrato hidroalcoólico, nas doses de 250 ou 500 mg/kg via intraperitoneal (i.p.) de *Ilex paraguariensis*, foi capaz de prevenir a hipolocomoção induzida por MPTP e ainda efetivo em reverter a catalepsia induzida por reserpina, sugerindo um efeito antiparkinsoniano em modelos animais. O segundo trabalho sugere a redução da discinesia orofacial e efeito neuroprotetor do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* após tratamento crônico (25 g diluído em 500 mL de água destilada - *ad libitum*) em ratos submetidos ao modelo do labirinto aquático após a indução de déficit de memória induzida por haloperidol (COLPO et al., 2007). Por último, Prediger e colaboradores (2008), mostraram o efeito diferencial na memória de curta e longa duração em ratos após o tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico de *Ilex paraguariensis* no teste de reconhecimento social, labirinto aquático e esQUIVA inibitória.

1.1 *Ilex paraguariensis*

O gênero *Ilex* compreende cerca de 600 espécies nativas principalmente da Ásia e América do Sul (LOIZEAU et al., 2005). A *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate, é uma espécie arbórea nativa da América do Sul, sendo encontrada principalmente no Brasil (Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo), na Argentina, Paraguai (Alto Paraná, Amambay, Caaguazu, Canendiyu, Central, Guaira, Itapuã, Misiones, San Pedro), e Uruguai (USDA, ARS, National Genetic Resources Program, 2007). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2009, o Brasil, segundo maior produtor mundial de erva mate, produziu 218.102 toneladas de erva mate, sendo o cultivo concentrado nas regiões Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e Centro-oeste (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) do país.

A infusão ou decocção de suas folhas e talos moídos é utilizada para preparação de bebidas alimentícias e estimulantes (RATES, 1999), principalmente na forma de chimarrão, tererê e de chá mate. O consumo por milhões de pessoas é estimado em mais de 1 litro por dia da infusão de erva mate, constituindo a principal alternativa para a substituição do café ou chá

(BASTOS et al., 2007). Alguns trabalhos relacionam a quantidade de cafeína encontrada, por exemplo, em uma *cuia* de chimarrão como mostra a tabela 1.



Figura 2. Maiores regiões produtoras de erva mate no Brasil - região Sul (verde escuro) e Centro-Oeste (verde claro).

Tabela 1. Quantidade de cafeína em bebidas que contêm mate.

Bebida	Cafeína (µg/mL)		
	Clifford; Ramirez, 1990	Mazzafera, 1997	Bastos et al., 2005
Chimarrão	90-180	290-790	202-330
Tereré	na	na	112-204
Chá mate	na	na	44-110

na: não analisado

(adaptado de BASTOS et al., 2007)

A *Ilex paraguariensis* é uma árvore dioica perene, cuja altura varia de 8 a 15 m, as folhas são simples e alternadas com 5 a 10 cm de comprimento, possui coloração verde-escura e margem irregular serrilhada ou denteada. A floração ocorre na primavera, produzindo flores pequenas, unissexuais com 4 pétalas brancas, algumas podem variar e chegar até 7 pétalas e os frutos consistem em bagas de cor vermelha contendo 4 a 5 sementes (CARVALHO, 2003; BRACESCO et al., 2010) (figura 3).



Figura 3. Representação dos frutos (a), flores (b) e árvore (c) de erva mate (TWF, 2010; VIVATERRA, 2010).

O perfil fitoquímico de *Ilex paraguariensis* apresenta diversos constituintes químicos ativos que podem ser responsáveis pelas inúmeras atividades biológicas desta espécie. Os compostos encontrados em quantidades mais elevadas são polifenóis (ácido clorogênico e seus derivados) e alcaloides purínicos (metilxantinas, como cafeína, teobromina e teofilina) seguidos pelos flavonoides (quercetina, kaempferol, e rutina), saponinas triterpênicas, taninos, minerais e vitaminas (A, complexo B, C e E) (FILIP et al., 2001; BASTOS et al., 2007; HECK; DE MEJILA, 2007). Alguns estudos indicam ainda que a acumulação simultânea de cafeína e teobromina parece ser uma característica particular da *Ilex paraguariensis* (REGINATTO et al., 1999). Deve-se ressaltar que a composição química da erva mate, assim como de outras plantas, pode sofrer alterações qualitativas e quantitativas em função de diversos fatores, como o tipo de cultivo, clima, solo, idade da planta, sazonalidade, processamento industrial e metodologia de análise (MAZZAFERA, 1994; REGINATO et al., 1999; HECK; SCHMALKO; DE MEJIA, 2008; GIULIAN et al., 2009).

Ilex dumosa, *I. pseudobruceus*, *I. breviscupis*, *I. theezans*, *I. microdonta* e *I. argentina* constituem as principais espécies de *Ilex* utilizadas como adulterantes na erva mate, sendo a *I. dumosa* a prevalente (HECK; DE MEJILA, 2007; FILIP et al., 2001). Nestas espécies, traços ou nenhuma quantidade de metilxantinas são detectados, diferindo ainda na concentração de saponinas, que pode resultar no sabor amargo do mate (FILIP et al., 2001). A tabela 2 mostra o rendimento dos extratos e teores de cafeína e teobromina, determinados por HPLC de folhas de diferentes espécies de *Ilex*.

Tabela 2. Teores de cafeína e teobromina em folhas de espécies de *Ilex*.

Espécie de <i>Ilex</i>	Quantidade de metilxantinas	Cafeína (m/m)	Teobromina (m/m)
<i>Ilex brevicuspis</i>	59,7 mg (0,40%)	nd	nd
<i>Ilex dumosa</i>	56,9 mg (0,39%)	nd	nd
<i>Ilex microdonta</i>	85,5 mg (0,57%)	nd	nd
<i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>paraguariensis</i>	257,8 mg (1,72%)	0,646% CV 0,38%	0,12% CV 0,27%
<i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>vesitta</i>	48,0 mg (0,32%)	0,003% CV 0,77%	-

(adaptado de REGINATTO et al., 1999).

1.1.1 Principais compostos ativos

1.1.1.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos presentes no extrato de erva mate compreendem cerca de 40% dos constituintes químicos da planta, sendo a quantidade destes constituintes afetada, dentre outros fatores, pelo método de extração utilizado. A figura 4 mostra os principais compostos fenólicos e derivados encontrados na *Ilex paraguariensis*. O ácido clorogênico (CGA) pertence a uma família de ésteres formados entre o ácido quínico e um ou mais resíduos de determinados ácidos trans-cinâmicos, sendo os mais comuns o p-cumárico, o ferúlico, sinápico e o caféico (BASTOS et al., 2007; CLIFFORD, 2000). O ácido 5-cafeoilquínico, formado pela esterificação do ácido quínico e ácido caféico, é um dos ácidos clorogênicos presentes na erva mate. Ainda estão presentes outros derivados cafeoil, como os ácidos 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico (FILIP et al., 2000). O ácido caféico, CGA, derivados do ácido cafeoil e flavonoides estão presentes em todas as espécies de *Ilex*, porém uma diferença quantitativa dos constituintes, ou seja, uma maior quantidade é encontrada na *Ilex paraguariensis* (FILIP et al., 2001).

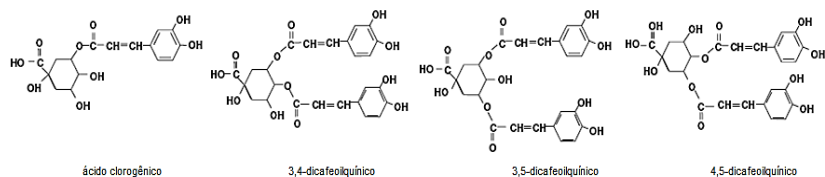


Figura 4. Estrutura química de compostos fenólicos (HECK; DE MEJIA, 2007).

Além do CGA e seus derivados, pertencem a esta classe os flavonóis, e estes diferem dos demais flavonoides pela mudança de radicais na posição 3 e 4, isto é, pela presença de um grupo hidroxílico e carbonílico, respectivamente (DUTRA, 2009). Na erva mate está presente o flavonol glicosídico rutina (3- *O*-rutinosídeo-quercetina) (figura 5), quercetina e kaempferol (FILIP et al., 2001; BASTOS et al., 2007).

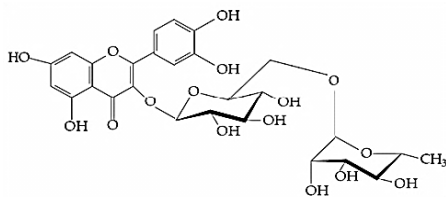


Figura 5. Estrutura química da rutina (Adaptado de PEDRIALI, 2005).

Estudos demonstram um efeito antioxidante do extrato de *Ilex paraguariensis* St.-Hil sobre a oxidação de LDL (lipoproteína de baixa densidade), *in vitro* e *in vivo* (FILIP et al., 2000; GUGLUICCI; MENINI, 2002). Filip e colaboradores (2000) relatam uma melhor atividade antioxidante na espécie *Ilex paraguariensis* quando comparada a outras espécies do gênero, e esta atividade está associada ao maior teor de derivados cafeoil encontrados nesta espécie, dentre outros compostos fenólicos. A presença de rutina, quercetina e kaempferol podem também ser responsáveis, ao menos em parte, pela atividade antioxidante observada na erva mate (FILIP et al., 2000; LÓPEZ-REVUELTA et al., 2006). Além do efeito antioxidante, compostos fenólicos parecem exercer atividade do tipo ansiolítica em camundongos (VIGNES et al., 2006; BOUAYED et al., 2007). Recentemente, Kwon e colaboradores (2010) demonstraram efeito

neuroprotetor do CGA em camundongos com prejuízo de memória induzida por escopolamina.

1.1.1.2 Metilxantinas

As metilxantinas são constituintes derivados do nucleotídeo purina e conhecidos como alcaloides purínicos. A presença destes constituintes ocorre principalmente em bebidas alimentícias ou estimulantes como café, chá, guaraná e chocolate (HECK; DE MEJIA, 2007). Na erva mate destaca-se a presença da cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e teobromina (3,7-dimetilxantina) e em menor quantidade da teofilina (1,3-dimetilxantina), sendo a presença de teofilina controversa nesta espécie (SCHUBERT et al., 2006). Estas substâncias diferem estruturalmente somente no número e posição do grupo metil (figura 6).

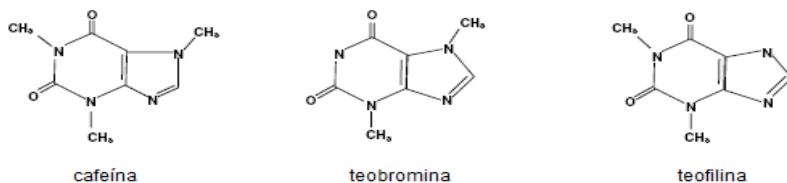


Figura 6. Estrutura química das metilxantinas: cafeína, teobromina e teofilina (HECK; DE MEJIA, 2007).

A respeito da atividade farmacológica dos constituintes dessa classe, as xantinas exercem efeito nos sistemas nervoso central, cardiovascular, renal e digestivo (RATES, 1999). A ingestão de cafeína está associada ao efeito psicoestimulante e motor (NEHLIG; DAVAL; DEBRY, 1992; GASIOR et al., 2000; FERRÉ, 2008) e ainda, ao desempenho cognitivo. Estudos demonstram que a cafeína reduz o prejuízo de memória induzido por escopolamina (RIEDEL et al., 1995) e melhora o aprendizado em um modelo animal de déficit de atenção (PREDIGER et al., 2005). Prediger e colaboradores (2008) mostraram que o extrato hidroalcoólico de *Ilex paraguariensis* melhorou o aprendizado, provavelmente decorrente da alta concentração de metilxantinas; o extrato hidroalcoólico ainda apresentou efeito antiparkinsoniano em alguns modelos animais (MILIOLI et al., 2007). Estudos têm demonstrado ainda que a ingestão crônica de cafeína está associada a um menor risco de desenvolver doenças

neurodegenerativas como doença de Alzheimer e Parkinson (AGUIAR et al., 2006; DALL'IGNA et al., 2007; PREDIGER, 2010).

As metilxantinas possuem diversos efeitos farmacológicos por atuarem como antagonistas não-seletivos de receptores de adenosina, sendo a cafeína um antagonista competitivo não específico dos receptores A_1 e A_2 (DALY, 2000). A teofilina, também antagonista não específico, apresenta atividade equivalente nos receptores A_1 , A_2 e A_3 , enquanto a teobromina parece ser menos efetiva em A_2 do que em A_1 (SHI; DALY, 1999). Outro mecanismo de ação das metilxantinas consiste na inibição das fosfodiesterases, enzimas responsáveis pela inativação hidrolítica do AMPc e GMPc, tendo como consequência o aumento dos mesmos à nível intracelular (DALY, 2000), que pode estar envolvido no efeito estimulante da erva mate. Ainda, estas substâncias podem interferir com a mobilização do cálcio intracelular (NEHLIG; DAVAL; DEBRY, 1992). O bloqueio de receptores de adenosina pode ainda levar a efeitos secundários decorrentes de outros neurotransmissores incluindo noradrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina, glutamato e GABA, que afetam inúmeras funções biológicas (FREDHOLM, 1999).

1.1.1.3 Saponinas

Saponinas são um grupo de glicosídeos que apresentam distribuição diferenciada entre espécies vegetais, sendo classificadas em dois grupos: saponinas esteroidais, encontradas quase exclusivamente em monocotiledôneas, e saponinas triterpênicas, presentes principalmente em dicotiledôneas, incluindo o gênero *Ilex* (ou a família Aquifoliaceae) (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007). Estudos demonstram um amplo espectro de atividade biológica e farmacológica destas substâncias devido à capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolipídios de membrana. Em relação à ação sobre membranas, as saponinas apresentam atividade hemolítica, antifúngica, antibacteriana e antiparasitária (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 1999). Hostettmann e Marston (1995) relatam ainda outras atividades biológicas como antiviral, citotóxica, antitumoral, analgésica e antiinflamatória para estes constituintes. As folhas de *Ilex paraguariensis* contém uma quantidade significativa de saponinas triterpênicas como ácido oleanólico e seu isômero ácido ursólico (figura 7). Essas substâncias apresentam dentre outras atividades biológicas efeito hipoglicêmico, e anti-hipertensivo por interferirem com o metabolismo do colesterol, e um potente efeito diurético e natriurético (SPARG; LIGHT; STANDEN, 2004; BASTOS et al., 2007).

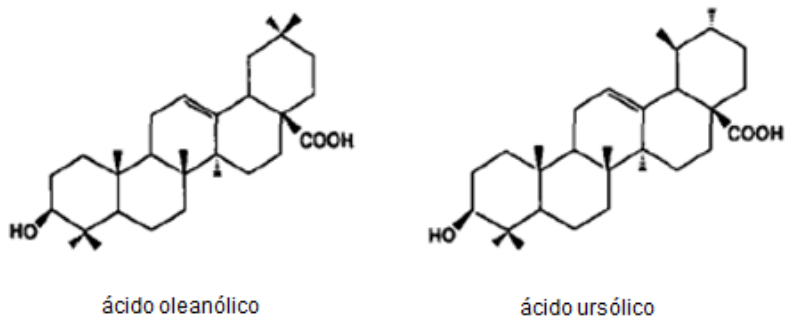


Figura 7. Estrutura química dos ácidos oleanólico e ursólico (BASTOS et al., 2007).

1.1.1.4 Minerais

Além dos diversos compostos encontrados na erva mate citados anteriormente, esta planta apresenta alta concentração de compostos inorgânicos, incluindo alumínio, crômio, cobre, ferro, manganês, níquel, potássio e zinco, cujo teor é dependente de diversos fatores relacionados ao solo e práticas de cultivo (BASTOS et al., 2007; HECK; DE MEJIA, 2007).

Assim, os vários constituintes da *Ilex paraguariensis* podem estar envolvidos em uma gama de efeitos como apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Algumas atividades descritas dos compostos isolados encontrados na *Ilex paraguariensis*. (adaptado HECK; DE MEJLA, 2007)

Composto	Atividade biológica
Cafeína	antitumoral, antiobesidade, antioxidante, antifúngico, diurético, estimulante, inibidor da topoisomerase I 0,1M, inibidor da topoisomerase II 99nM, vasodilatador
Ácido clorogênico	Antioxidante IC ₅₀ =54,2µM, analgésico, antiaterosclerótico, antibacteriano, antidiabético, antitumoral, colerético
Clorofila	Antibacteriana, antitumoral
Colina	Antidiabético, colinérgico, lipotrópico
Ácido nicotínico	Colerético, hipocolesterolémico 1 a 6 g/dia
Ácido pantotênico	Antialérgico 100 a 500 mg/dia, antiarrítmico 500 a 2000 mg/kg, anti-fadiga
Rutina	Antioxidante IC ₅₀ = 30ppm IC ₅₀ = 120µM, antitumoral, antiúlcera
Taninos	Antioxidante 1/3 quercetina IC ₅₀ = 1,44 µg/mL, antitumoral, inibidor da lipoxigenase, inibidor da MAO
Teobromina	Inibidor da fosfodiesterases, diurético 300 a 600 mg/dia, estimulante, miorelaxante 100µM
Ácido ursólico	Analgésico, antioxidante IC ₅₀ = 10µM, antiperoxidase IC ₅₀ = 200 µg/mL, inibidor da protease IC ₅₀ = 18µg/mL, inibidor da topoisomerase II, antiarrítmico, antitumoral, anti-Alzheimer

1.2 Plantas adaptógenas

A exposição prolongada a eventos estressantes leva a alterações homeostáticas nos indivíduos, culminando com o desenvolvimento de diversos quadros patológicos, incluindo hipertensão arterial, úlcera gástrica, diabetes, imunossupressão, disfunção reprodutiva, e alterações comportamentais, como ansiedade e também déficit de memória (GLAVIN et al., 1994, RUSSO, 2001). Lazarev descreveu o termo adaptógeno como uma “substância capaz de desenvolver um estado de resistência” (LAZAREV, 1958 apud PANOSSIAN; WIKMAN, 2010) e, neste sentido, as plantas adaptógenas são utilizadas tradicionalmente pelo seu efeito benéfico adaptogênico, conferindo ao organismo maior capacidade de se adaptar a fatores estressantes (tabela 4).

Tabela 4. Diferenças entre adaptógenos e outros estimulantes.

Características	Estimulantes	Adaptógenos
Processo de recuperação após exaustiva carga física	Baixa	Alta
Depleção de energia	Sim	Não
Desempenho no stress	-	Aumenta
Sobrevivência do stress	-	Aumenta
Qualidade da excitação	Pobre	Bom
Potencial de dependência	Sim	Não
Efeitos colaterais	Sim	Raros
DNA/RNA e síntese proteica	Diminui	Aumenta

(adaptado PANOSSIAN; WIKMAN, 2010)

O aumento da capacidade do organismo para responder a estímulos estressantes pode ser decorrente da resposta aos mediadores do estresse, como corticoides, catecolaminas e óxido nítrico (PANOSSIAN; WIKMAN; WAGNER, 1999; REGE et al., 1999), promovido pelo uso de plantas com atividade adaptogênica, podendo ainda agir de maneira não específica como antioxidante, imunomodulador, hipoglicemiante, hipocolesterolêmico, entre outras funções. A *Panax ginseng* (ginseng), uma planta chinesa, é o exemplo mais conhecido de adaptógeno e utilizado clinicamente com esta

finalidade (RAI et al., 2003). No Brasil, algumas plantas com propriedade estimulantes são utilizadas como tônicas ou fortificantes, sendo empregadas similarmente como adaptógenas pelas suas propriedades estimulantes (ELISABETSKY; SIQUEIRA, 1998). A *Paullinia cupana* Kunth (guaraná), *Mauritia flexuosa* L. (buriti), *Theobroma cacao* L (cacau) e a *Ilex paraguariensis* (mate) são exemplos de plantas utilizadas com esta finalidade, sendo que algumas, por apresentarem alta concentração de metilxantinas, exercem efeito psicoestimulante (MENDES; CARLINI, 2007). No entanto, o efeito adaptogênico é observado após tratamento prolongado, ao contrário de substâncias estimulantes em que a resposta é observada de forma aguda (MENDES; CARLINI, 2007).

Com base no que foi apresentado até o momento, esse trabalho foi delineado para investigar a ação central de *Ilex paraguariensis*, tendo visto os poucos estudos voltados para a avaliação comportamental, principalmente no que diz respeito ao uso crônico desta espécie vegetal sobre a ansiedade e memória.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por finalidade investigar a atividade neurofarmacológica de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.

2.1 Objetivos específicos

- Investigar a atividade neurofarmacológica após o tratamento agudo com o extrato aquoso e hidroetanólico obtidos a partir das folhas de *Ilex paraguariensis*, no teste do labirinto em cruz elevado seguido do campo aberto e teste de esquiva inibitória do tipo *step-down*, a fim de verificar o possível efeito sobre os parâmetros de ansiedade e no aprendizado e memória nos animais;
- Investigar a atividade neurofarmacológica após o tratamento subcrônico com o extrato aquoso e hidroetanólico obtidos a partir das folhas de *Ilex paraguariensis*, no teste do labirinto em cruz elevado e do campo aberto.
- Investigar a atividade neurofarmacológica após o tratamento crônico com o extrato aquoso e hidroetanólico obtidos a partir das folhas de *Ilex paraguariensis*, no teste do labirinto em cruz elevado, do campo aberto e da esquiva inibitória do tipo *step-down*.
- Investigar o possível efeito adaptogênico após 7 dias de tratamento com o extrato hidroetanólico e aquoso obtidos a partir das folhas de *Ilex paraguariensis*, no teste de estresse de contenção a frio e posterior análise bioquímica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Todos os experimentos foram realizados conforme as normas internacionais de bem-estar animal e recomendadas pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), sendo os protocolos experimentais previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número 23080,013794/2009-71/CEUA/UFSC.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos adultos, com peso entre 35 e 50 gramas e cerca de 3 a 4 meses de idade. Os animais foram alojados em grupos de 10 – 20 por caixa com água e ração *ad libitum*, exceto durante as sessões de experimento, e mantidos em um ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 h, com luzes se acendendo às 07:00 h. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, sendo transferidos e habituados sob as condições do laboratório pelo menos 1 semana antes da realização dos experimentos.

3.3 Material vegetal

Folhas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. foram coletadas no município de Erechim, Rio Grande do Sul, em outubro de 2006. O material vegetal (MV) foi identificado pela Professora Branca Maria Aimi Severo e o material testemunho está depositado no Herbário da Universidade de Passo Fundo (RSPF 11074). Após a coleta, o material vegetal foi seco à temperatura ambiente, durante 15 dias, triturado em moinho de facas e armazenado a -20°C até a preparação dos extratos.

3.4 Obtenção dos extratos e caracterização química

Os extratos, bem como a caracterização química dos mesmos, foram fornecidos pelo mestrando Carlos Henrique Blum da Silva e pelo Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto (Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFSC).

3.4.1 Preparo e fracionamento do extrato bruto

O MV foi extraído sob refluxo (90° C) por 30 min, utilizando como líquido extrator (LE) água destilada e etanol 40° GL, ambos numa relação MV:LE de 1:10 (m/v), obtendo-se dois diferentes tipos de extratos, o extrato aquoso e o extrato hidroetanólico. Após filtração, o etanol foi eliminado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, sendo o resíduo congelado e submetido à liofilização gerando o extrato hidroetanólico bruto. O extrato aquoso foi congelado e submetido à liofilização.

3.4.2 Análise quantitativa das metilxantinas cafeína e teobromina

A análise cromatográfica quantitativa das metilxantinas foi realizada em coluna C8 *Brownlee Analytical* da Perkin-Elmer (150 x 4,6 mm d. i., 5 µm) em um sistema de eluição isocrática com os solventes metanol e hidróxido de amônio 0,2% (pH 8,0) na proporção de 80:20. A fase móvel foi preparada e desgaseificada por sonicação antes da utilização, diariamente. O fluxo utilizado foi de 0,9 mL/min e o volume de injeção foi 20 µL. Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de 280 nm, enquanto os espectros de UV foram obtidos na faixa de 200 – 450 nm. Soluções padrão de cafeína e teobromina foram preparadas na faixa de concentração de 1,25, 10, 20, 40, 80 e 100 µg/mL e 3, 4, 8, 10, 12 e 15 µg/mL respectivamente para construção da curva analítica. Os extratos foram analisados na concentração de 2 mg/mL. Cada análise foi realizada em triplicata

As curvas analíticas de cafeína e teobromina apresentaram uma boa relação linear entre área do pico e concentração para ambas as soluções padrão ($r^2 > 0,99$). O limite de quantificação (LQ) foi definido através da análise do desvio padrão relativo (DPR) $< 5\%$ e o limite de detecção (LD) através da relação sinal:ruído (3:1). A teobromina e a cafeína apresentaram tempos de retenção (TR), respectivamente, de 3,5 e 9,5 min (ANEXO IV) e

seus teores nos extratos analisados são mostrados no ANEXO V. De acordo com as análises cromatográficas verificou-se similaridade entre o perfil e teor dos dois extratos analisados.

3.4.3 Perfil de ácidos fenólicos e flavonoides

Os perfis de ácidos fenólicos e flavonoides do extrato aquoso e hidroetanólico foram realizados através de metodologia previamente descrita (COSTA et al., 2011).

A análise cromatográfica foi realizada empregando a coluna C18 *Brownlee Analytical* da Perkin-Elmer (150 x 4,6 mm d. i., 5 µm), um sistema de eluição em gradiente com os solventes acetonitrila e ácido acético 1% (pH 3,0), a qual foi preparada diariamente e desgaseificada por sonicação antes da utilização. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min e o volume de injeção de 10 µL. Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de 320 nm, enquanto os espectros de UV foram obtidos na faixa de 200 – 450 nm. Foram injetadas soluções de ácido caféico, ácido clorogênico e rutina como substâncias de referência. A identificação foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de UV obtidos pelo DAD. Os extratos foram analisados na concentração de 1,0 mg/mL.

De acordo com as análises cromatográficas realizadas com detecção em 320 nm, foi possível observar perfis de ácidos fenólicos e flavonoides semelhantes entre os dois extratos. Através da injeção de soluções das substâncias de referência, observou-se a presença dos ácidos clorogênico e caféico nos extratos, cujos tempos de retenção foram de 16,4 e 17,9 min, respectivamente, sendo que o segundo está presente em baixas quantidades nos extratos avaliados. Também foi possível observar a presença de rutina, cujo tempo de retenção foi de 29,8 min. Foi possível verificar também por meio da análise dos espectros de UV dos picos dos cromatogramas, um perfil rico em ácidos fenólicos e também alguns flavonoides, como pode ser verificado no ANEXO III.

3.4.4 Validação dos procedimentos analíticos

Os parâmetros validados foram especificidade, linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD) de acordo com Cass e Degani, (2001) e as especificações do ICH (2005).

3.5 Drogas e Tratamento

3.5.1 Drogas

As doses utilizadas para a realização deste trabalho foram baseadas na literatura ou em padronizações prévias do laboratório.

- Solução salina – NaCl 0,9% - (Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO, USA), usado como diluente;
- Diazepam (Dienpax®, Sanofi-Winthrop Lab., São Paulo, SP), usado como droga sedativa/ansiolítica padrão, agonista GABAérgico (WEI et al., 2007);
- Pentilenotetrazol (Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO, USA), antagonista do sítio da picrotoxina do receptor GABA_A, utilizado como droga ansiogênica padrão (RODGERS et al., 1995);
- Hidrobrometo de escopolamina (Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO, USA), antagonista de receptores muscarínico, utilizada como droga amnésica padrão (LIMA et al., 2009).

3.5.2. Tratamento

Os animais receberam, através de uma cânula intragástrica (via oral, v.o.), o EA ou EHE de *Ilex paraguariensis* em um volume constante de 0.1mL/10g de peso corporal. Os tratamentos para avaliar o efeito dos extratos obtidos da *Ilex paraguariensis*, extrato aquoso (EA) e hidroetanólico (EHE), foram os seguintes:

- Tratamento agudo: os animais foram tratados 1 h antes do teste comportamental, uma única vez;
- Tratamento subcrônico: os animais foram tratados em um período de 24 h com 3 doses (24 h, 5 h e 1 h antes do teste);
- Tratamento crônico: por um período de 21 dias os animais foram tratados uma vez ao dia (entre 10:00 e 11:00 h), sendo submetidos aos testes comportamentais no 21º dia.

3.6 Protocolo Experimental

No protocolo 1 camundongos machos receberam o EA ou EHE de *Ilex paraguariensis* (60 – 300 mg/kg) 1 h antes da avaliação comportamental (tratamento agudo). Os animais do grupo controle foram tratados pela mesma via com o veículo (solução salina – NaCl 0.9%), ou diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o., 30 min) ou escopolamina (1 mg/kg, i.p., 30 min) que foram utilizados como droga ansiolítica padrão e amnésica, respectivamente. Este protocolo foi dividido em 2 etapas, no qual os animais foram separados em grupos independentes. Após os tratamentos os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE) seguido pelo teste do campo aberto (CA) (etapa 1- figura 8) e ao teste da esquiiva inibitória do tipo *step-down* (etapa 2 -figura 9).

No protocolo 2, camundongos machos receberam o EA ou EHE de *Ilex paraguariensis* (100 – 600 mg/kg), 3 doses em 1 dia (tratamento subcrônico). Os animais do grupo controle foram tratados pela mesma via com o veículo (solução salina – NaCl 0.9%) e o grupo controle positivo com pentilenotetrazol (PTZ - 20 mg/kg, i.p., 20 min). Após os tratamentos os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado seguido pelo teste do campo aberto (figura 10).

No protocolo 3, camundongos machos receberam o EHE de *Ilex paraguariensis* (100 – 600 mg/kg) por 21 dias consecutivos (tratamento crônico). Os animais do grupo controle foram tratados pela mesma via com o veículo (solução salina – NaCl 0.9%), e o diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o., 30 min) foi utilizado como droga ansiolítica padrão e pentilenotetrazol (PTZ – 20 mg/kg; i.p. 20 min) como droga ansiogênica padrão. Este protocolo foi dividido em 2 etapas, no qual os animais foram separados em grupos independentes. No 21º dia os animais foram tratados com o extrato 1 h antes do teste, e submetidos ao teste do LCE seguido pelo teste do CA (etapa 1- figura 11) e ao teste da esquiiva inibitória do tipo *step-down* (etapa 2 –figura 12).

No protocolo 4, os animais receberam o EA ou EHE (100 – 600 mg/kg) por sete dias consecutivos para investigar a possível atividade adaptogênica dos extratos de *Ilex paraguariensis*. Os animais do grupo controle foram tratados pela mesma via com o veículo (solução salina – NaCl 0.9%). No 7º dia os animais foram tratados 1 h antes de serem submetidos ao teste de contenção a frio (figura 13).

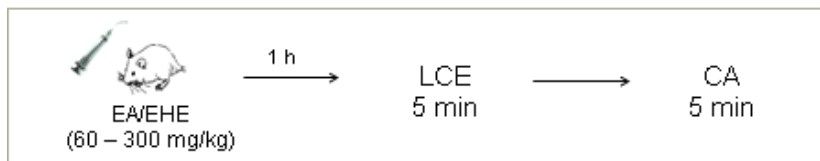


Figura 8. Protocolo do tratamento agudo nos experimentos de investigação da atividade tipo ansiolítica do EA e EHE de *Ilex paraguariensis* no teste do labirinto em cruz elevado e do campo aberto.

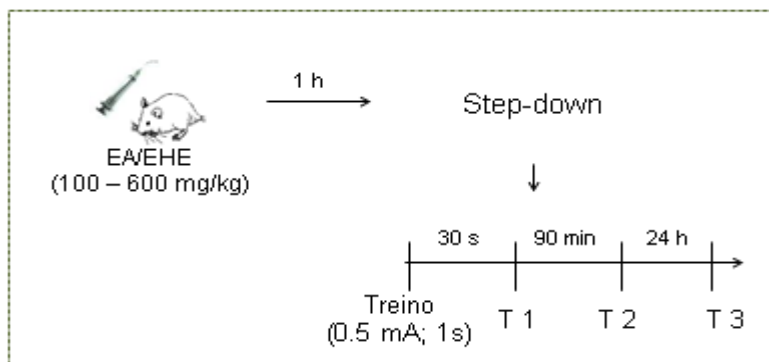


Figura 9. Protocolo do tratamento agudo nos experimentos de investigação do efeito nootrópico dos EA e EHE de *Ilex paraguariensis* no teste da esquiwa inibitória do tipo *step-down*.

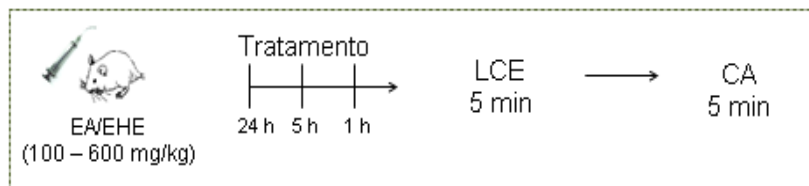


Figura 10. Protocolo do tratamento subcrônico nos experimentos de investigação da atividade tipo ansiolítica do EA e EHE de *Ilex paraguariensis* no teste do labirinto em cruz elevado e do campo aberto.

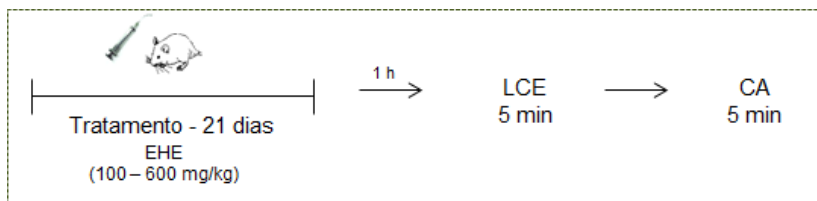


Figura 11. Protocolo do tratamento crônico nos experimentos de investigação da atividade tipo ansiolítica do EHE de *Ilex paraguariensis* no teste do labirinto em cruz elevado e do campo aberto.

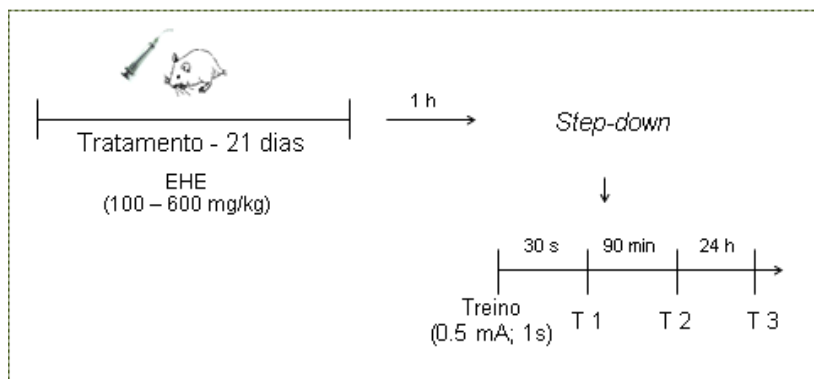


Figura 12. Protocolo do tratamento crônico nos experimentos de investigação dos efeitos do EHE de *Ilex paraguariensis* no teste da esquiva inibitória do tipo *step-down*.

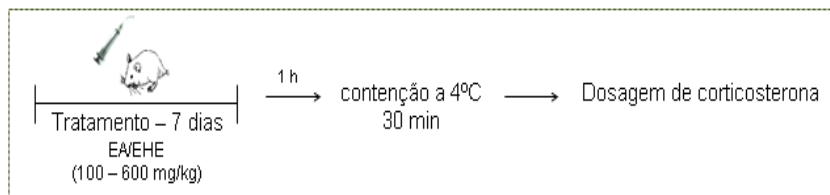


Figura 13. Protocolo do experimento de investigação da atividade adaptogênica dos EA e EHE de *Ilex paraguariensis* no teste de estresse por contenção a frio.

3.7 Testes comportamentais

3.7.1 *Teste do labirinto em cruz elevado seguido do teste do campo aberto*

O labirinto em cruz elevado tem sido amplamente utilizado para investigação da atividade ansiolítica bem como ansiogênica de plantas medicinais (ZHANG, 2004), entre outros compostos. O teste foi inicialmente desenvolvido por Handley e Mithany (1984), baseado no labirinto em Y criado por Montgomery em 1955, sendo posteriormente validado farmacologicamente por Pellow e colaboradores (1985) para ratos e, mais tarde, para camundongos por Lister (1987). O teste do LCE prevê sua aplicação nos estados de ansiedade induzidos por estímulo incondicionado, visto que a tarefa é aversiva por si só (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005), baseando-se pela aversão inata dos roedores por lugares abertos e pela altura (PELLOW; FILE, 1986). O teste apresenta sensibilidade tanto para drogas ansiolíticas como para ansiogênicas, de maneira que drogas que aumentam a atividade nos braços abertos são comumente retratadas como compostos ansiolíticos em outros modelos animais, enquanto o oposto é válido para drogas ansiogênicas (RODGERS; COLE, 1994; RODGERS; DALVI, 1997).

O LCE consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm) opostos entre si em forma de cruz e elevados a 45 cm do nível do chão. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). Todo o aparato foi confeccionado em acrílico sendo as paredes dos braços fechados (15 cm) em acrílico transparente e o chão em acrílico cinza. O teste foi realizado em uma sala com luz vermelha de forma que a intensidade de luminosidade no assoalho do aparato foi de 3 lux.

Após receberem o tratamento, os animais foram colocados individualmente na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços fechados e seu comportamento avaliado durante 5 min (PELOW et al., 1985). Os parâmetros comportamentais clássicos avaliados neste teste foram o tempo e o número de entradas nos braços abertos e fechados, sendo utilizada para a análise estatística a porcentagem de tempo (%TA), bem como a de entradas (%EA), nos braços abertos, calculada a partir do tempo gasto no braço aberto em relação ao somatório do tempo gasto nos braços abertos e fechados, sendo o quociente obtido multiplicado por 100 [% = tempo no aberto / (tempo no braço aberto + tempo no braço fechado) * 100]. A entrada do animal em um dos braços foi considerada quando o mesmo se posiciona com as quatro patas. Ainda, foram registradas medidas etológicas tais como: entradas nos braços fechados (EF), total de entradas (TE) nos

braços abertos somado às entradas nos braços fechados, avaliação de risco, observada através dos estiramentos corporais protegidos (EC) e imersões de cabeça desprotegidas (IC), comportamentos de levantar (CL) e de autolimpeza (AU). A avaliação secundária de parâmetros como avaliação de risco, observadas neste trabalho como estiramentos corporais e imersões de cabeça, consiste em ferramenta importante que auxilia na interpretação dos resultados. As respostas comportamentais de avaliação de risco como estiramentos corporais bem como, imersões de cabeça protegidos retratam indicadores de ansiedade (ESPEJO; 1997), sendo o aumento indicativo de comportamento ansiogênico e o inverso sendo válido para ansiolítico. O diazepam foi utilizado como droga ansiolítica padrão (2,5 mg/kg) e pentilenotetrazol como droga ansiogênica padrão (20 mg/kg).

Imediatamente após o teste do labirinto em cruz elevado, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto para avaliar os efeitos do tratamento sobre a atividade motora. O teste do campo aberto permite avaliar a possível atividade estimulante ou sedativa de um determinado composto (SIEGEL, 1946; ARCHER, 1973). O aparato consiste em uma caixa (30 X 30 cm) confeccionada em acrílico transparente com o chão preto dividido em nove quadrantes e paredes de acrílico transparente de 15 cm de altura. Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto e a atividade exploratória registrada através do número de cruzamentos transpassados com as quatro patas e o comportamento de levantar durante 5 min.

Nos testes comportamentais cujos animais foram tratados cronicamente o aparato do campo aberto foi modificado para que fosse possível avaliar além do efeito locomotor também parâmetros de ansiedade. O aparato do campo aberto neste caso consistiu de uma caixa (50 x 50 cm) confeccionada em acrílico transparente com o chão encapado com papel cinza que permitisse contraste com o animal sendo o experimento, posteriormente, analisado no programa ANY-MAZE® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

3.7.2 Teste da Esquiva Inibitória do tipo *step-down*

O teste da esquiva inibitória do tipo *step-down* foi utilizado para avaliar os efeitos dos extratos de *Ilex paraguariensis* nos processos de aprendizado e memória dos animais. O aprendizado no teste da esquiva inibitória é avaliado nas exposições subsequentes e está relacionado com a inibição do comportamento natural do animal de explorar o aparato além da plataforma em consequência do choque que o animal recebe nas patas ao descer da plataforma na primeira exposição ou sessão de treino,

constituindo uma memória aversiva. Com isso, em uma exposição após a sessão de treino, o animal evita o comportamento de descer da plataforma para explorar a caixa, sendo este comportamento relacionado ao aprendizado.

O aparato consiste em uma caixa de metal retangular (50 x 25 x 25 cm) sendo o piso formado por barras metálicas (1 mm) paralelas com 1 cm de distância entre si, conectado a um estimulador de choque. A plataforma foi posicionada no centro da caixa (8 x 6 x 3 cm) livre de choque (adaptado de ROESLER et al., 1999). Os animais foram submetidos à sessão treino após o tratamento sendo individualmente colocados na plataforma e a latência para a descida da plataforma com as quatro patas foi registrada (máximo de 120 s). Na sessão treino, imediatamente após a descida da plataforma, o animal recebeu um choque nas patas (0.5 mA) durante 1 s. Posteriormente, na sessão teste, foi avaliada a memória de trabalho (30 s) e a retenção da memória de curta duração e longa duração, 90 min e 24 h, respectivamente após a sessão treino. As sessões teste foram realizadas na ausência de choque, sendo registrada a latência para a descida da plataforma (máximo de 180 s). A escopolamina (1 mg/kg; i.p.) foi utilizada como droga amnésica padrão.

3.7.3 Estresse de contenção no frio

Para avaliar o possível efeito adaptógeno do EA e EHE obtidos de *Ilex paraguariensis* os animais foram submetidos a uma sessão de estresse agudo por contenção a frio. O aparato consiste em um tubo de PVC com diâmetro de 3 cm no qual os animais foram colocados individualmente, ficando com seus movimentos restritos. Depois de imobilizados nos contêntores, os animais foram colocados na geladeira a uma temperatura de 4°C por 30 min (adaptado de KANNUR; HUKKERI; AKKI, 2006). Posteriormente, os animais foram retirados da contenção e colocados individualmente no teste do campo aberto (descrito anteriormente). Após este último teste os animais foram anestesiados em uma câmara contendo éter etílico e decapitados para retirada do sangue para posterior dosagem do nível de corticosterona.

3.8 Obtenção do material biológico

Após a finalização dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados em câmaras saturadas com éter etílico. Os animais foram

guilhotinados para a coleta de sangue posteriormente, utilizado para a dosagem dos níveis de corticosterona do protocolo 4. O sangue obtido dos animais foi previamente armazenado em tubo *Eppendorf* contendo 40 μ L de heparina (aproximadamente 10U de heparina por ml de sangue) e mantido resfriado em um isopor com gelo. Para obtenção do plasma as amostras foram centrifugadas a 2000 r.p.m. por 15 min, separado o sobrenadante e congelados até a realização das dosagens de corticosterona.

Em uma segunda etapa dos experimentos, os animais, após serem anestesiados, foram decapitados e os cérebros rapidamente removidos numa placa de Petri colocada em gelo e recoberta com papel filtro umedecido. As estruturas cerebrais, especificamente o córtex e hipocampo, foram armazenadas, pesadas e mantidas congeladas até a homogeneização para determinação da atividade da AChE.

3.9 Ensaio para determinação da atividade de acetilcolinesterase

A determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi estimada pelo método previamente descrito por Ellman e colaboradores (1961), que utiliza o iodeto de acetilcolina como substrato. A taxa de hidrólise deste composto é medida através da liberação de compostos tióis que quando reagem com o ditiobisnitrobenzoato (DTNB) produz um composto colorido denominado ácido 5-tio-2-nitro-benzóico (TNB), lido em um espectrofotômetro (TECAN[®] – Infinit M200) no comprimento de onda de 412 nm.

3.10 Ensaio para dosagem de proteína

A quantidade de proteína foi dosada pelo método descrito por Lowry (1951), usando albumina bovina como padrão.

3.11 Dosagem da corticosterona plasmática

A determinação quantitativa da corticosterona no plasma foi realizada por imunensaio enzimático (ELISA) adquirido da IBL Hamburg[®], Alemanha. O ensaio baseia-se no princípio de ligação competitiva e foi realizado de acordo com a descrição do kit.

3.12 Análise estatística

As análises estatísticas, bem como a confecção dos gráficos, foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 5.0[®]. Os dados paramétricos foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e a análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA). Para comparações entre os grupos foi empregado o teste *post hoc* de Dunnett. Os dados das drogas utilizadas como controles positivos foram analisados separadamente sendo comparado ao grupo controle (salina) utilizando o teste “t” de Student não pareado.

Os dados não-paramétricos foram expressos como medianas (intervalos interquartis) e analisados através do teste Kruskal-Wallis, seguido do teste *post hoc* de Dunn. Os dados das drogas utilizadas como controles positivos foram analisados separadamente comparados ao grupo controle (salina) utilizando o teste de Mann-Whitney. O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para a análise estatística entre a sessão treino e as sessões teste de cada grupo. A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi de $P < 0,05$ em todas as análises.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento agudo do extrato aquoso (EA) de *Ilex paraguariensis*

4.1.1 Teste do labirinto em cruz elevado seguido do campo aberto

Como mostra a tabela 5, o EA não promoveu, nas doses testadas (60 – 300 mg/kg), qualquer alteração significativa no tempo e nas entradas nos braços abertos [F(3,25)= 0,99; p=0,42 e F(3,25)=0,29; p=0,83, respectivamente], bem como no número de entradas nos braços fechados [F(3,25)= 1,33; p=0,28] e total de entradas [F(3,25)=0,92; p=0,45]. O tratamento com diazepam 2,5 mg/kg, droga ansiolítica padrão, promoveu o aumento de tempo despendido nos braços abertos [t(13)=3,86; p=0,002], bem como o aumento das entradas nos braços fechados e o total de entradas, quando comparado ao grupo controle [t(13)=2,25; p=0,04 e t(13)=2,87; p=0,01, respectivamente] não sendo observada nenhuma alteração significativa nas entradas nos braços abertos [t(13)=1,94; p=0,07] como mostra a tabela 5.

Ainda, a análise estatística não revelou nenhuma alteração comportamental significativa dos animais tratados com o EA quando comparados com o grupo controle no número de estiramentos corporais [F(3,25)=0,03; p=0,99], imersões de cabeça [F(3,25)= 0,64; p=0,59], comportamentos de levantar e autolimpeza [F(3,25)= 0,37; p=0,77 e F(3,25)= 0,08; p=0,97, respectivamente]. Em relação aos parâmetros etológicos, o diazepam foi capaz de reduzir significativamente os estiramentos corporais [t(13)=3,10; p=0,008] e as imersões de cabeça [t(13)=3,62; p=0,003] como mostra a tabela 5.

Em relação ao teste do campo aberto, representado na figura 14, a ANOVA de uma via não mostrou nenhuma alteração significativa no número de cruzamentos [F(3,25)= 1,74; p=0,18] e comportamento de levantar [F(3,25)= 1,34; p=0,28], embora o teste de “regressão linear” revele uma tendência em aumentar o número de cruzamentos dos animais tratados em relação ao controle (teste de tendência p=0,03). O tratamento com diazepam 2,5 mg/kg alterou significativamente apenas o número de cruzamentos [t(12)=2,26; p=0,04] enquanto o comportamento de levantar foi similar ao grupo controle [t(12)=0,27; p=0,79].

Tabela 5. Efeito do tratamento agudo do EA de *Ilex paraguariensis* nos parâmetros comportamentais registrados no teste do labirinto em cruz elevado.

	controle	DZP	60 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg
%TA	9,6±4,8	54,9±10,1**	18,3±7,7	22,5±7,6	9,9±5,2
%EA	18,5±5,7	41,6±9,9**	13,5±5,3	17,9±5,6	12,5±5,8
TE	11,1±2,2	25,7±4,3*	15,0±2,9	17,3±3,1	17,4±3,5
EF	8,7±1,5	16,7±3,0*	12,1±1,7	13,4±1,9	15,1±3,3
CL	18,4±1,2	17,5±3,5	23,4±1,6	20,6±3,6	20,5±4,7
EC	6,7±2,0	0,6±0,5**	6,6±2,1	5,9±1,8	6,4±2,1
IC	10,9±4,1	34,2±4,9**	13,6±3,1	18,1±5,2	13,7±2,0
AU	2,3±0,5	1,6±0,8	1,9±0,5	2,5±0,7	2,2±1,5

DZP (2,5 mg/kg, v.o.) foi usado como droga ansiolítica padrão. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M.; n= 7-8 animais. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP).

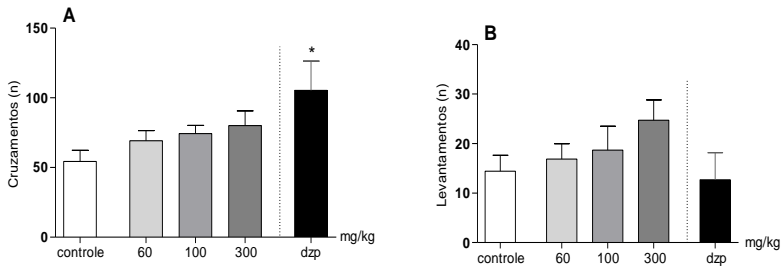


Figura 14. Efeito do tratamento agudo com EA (60 - 300 mg/kg, v.o.) no número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) em camundongos submetidos ao teste do campo aberto durante 5 min. O diazepam (DZP, 2,5 mg/kg, v.o.) foi utilizado como droga padrão. O número de animais utilizados em cada grupo foi de 7 - 8 animais. Cada coluna representa a média ± E.P.M. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP).

4.1.2 Teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down*

A figura 15 mostra o efeito do tratamento com EA de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg, v.o.) na memória de trabalho, de curta e de longa duração no teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revela ausência de qualquer efeito em relação ao tratamento, nas doses testadas, na sessão treino [H(4)= 2,88; p= 0,41]. O teste de Wilcoxon revela um aumento significativo (p<0,05) da latência para descida da plataforma na memória de trabalho (30 s), de curta e de longa duração (90 min e 24 h) dos grupos que receberam o EA assim como o grupo controle. O mesmo não ocorre com o grupo tratado com escopolamina, uma vez que nenhum efeito significativo é observado em relação à sessão treino (p>0,05).

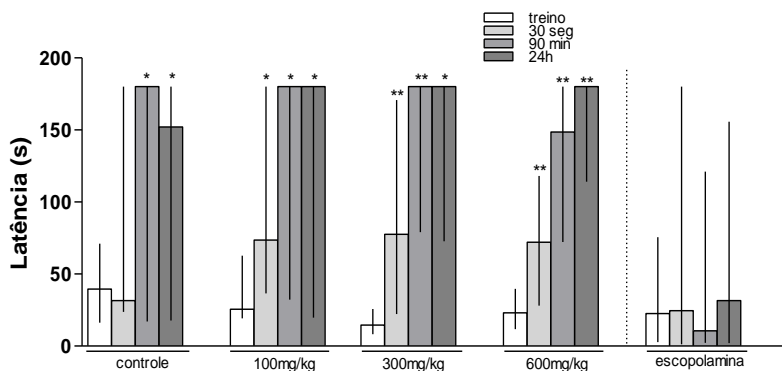


Figura 15. Efeito do tratamento agudo com EA de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg; v.o.) na retenção da memória de trabalho (30 s), de curta (90 min) e de longa duração (24 h) no teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. A escopolamina (1,0 mg/kg; i.p.) foi utilizada como droga amnésica padrão. Os dados são representados por mediana (intervalo interquartil) da latência para descida da plataforma. N=8 animais/grupo. *P<0,05 e **P<0,01, quando comparado à sessão treino do respectivo grupo (teste não paramétrico pareado de Wilcoxon).

4.1.3 Teste da esQUIVA inibit6ria do tipo *step-down* - amn6sia induzida por escopolamina

A figura 16 mostra os resultados do teste de esQUIVA inibit6ria (*step-down*) para avalia7o do efeito do EA nas mem6rias de trabalho (30 s), curta (90 min) e longa-dura7o (24 h). O teste não param6trico de Kruskal-Wallis revela aus7ncia de efeito em rela7o ao tratamento nas doses testadas na sessão treino [H(4)=5,8; p=0,12]. O teste de Wilcoxon revela um aumento significativo (p<0,05) da lat7ncia para descida da plataforma na mem6ria de trabalho, de curta e de longa dura7o na dose de 100 mg/kg de EA semelhante ao grupo controle (p<0,05). De maneira semelhante, a dose de 300 mg/kg apresenta efeito significativo (p<0,05) na mem6ria de curta e de longa dura7o. O grupo tratado com escopolamina não apresenta nenhum efeito significante (p>0,05) em rela7o  sessão treino, sendo a lat7ncia para a descida da plataforma reduzida significativamente (p<0,05) quando comparado ao grupo controle no respectivo intervalo.

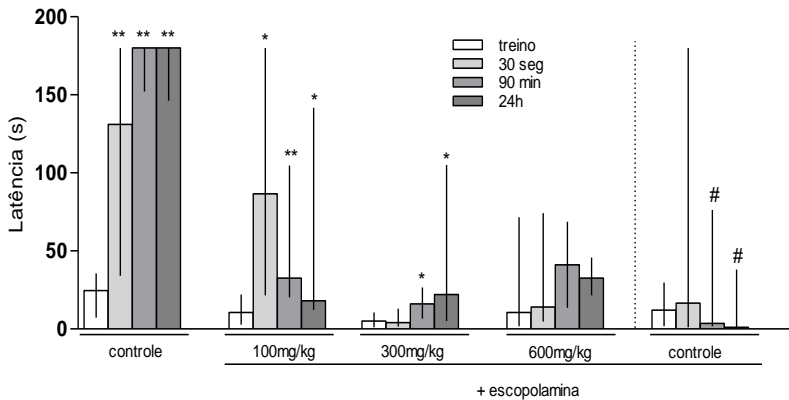


Figura 16. Efeito do tratamento agudo com EA de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg; v.o.) na reten7o da mem6ria de trabalho (30 s), de curta (90 min) e longa dura7o (24 h) no teste de esQUIVA inibit6ria do tipo *step-down* em um modelo de amn6sia induzida por escopolamina. A escopolamina (1,0 mg/kg; i.p.) foi utilizada como droga amn6sica padrão. Os dados são representados por mediana (intervalo interquartil) da lat7ncia para descida da plataforma. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$, quando comparado  sessão treino do respectivo grupo (teste não param6trico pareado de Wilcoxon); # $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle nos respectivos intervalos.

4.2 Efeito do tratamento agudo do extrato hidroetanólico (EHE) de *Ilex paraguariensis*

4.2.1 Teste do labirinto em cruz elevado seguido do campo aberto

A análise estatística não mostrou nenhuma alteração comportamental significativa no tempo [$F(3,28)=0,79$; $p=0,50$], bem como nas entradas nos braços abertos [$F(3,28)=1,43$; $p=0,25$], após o tratamento agudo dos animais com o EHE submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado, como mostra a tabela 6. Apenas o grupo tratado com diazepam na dose de 2,5 m/kg (droga-padrão) apresentou aumento significativo no tempo despendido nos braços abertos [$t(14)=2,30$; $p=0,03$] e nas entradas nos braços abertos [$t(14)=2,38$; $p=0,03$]. Além disso, o EHE não promoveu qualquer diferença significativa nas doses testadas quando comparado ao grupo controle no número de entradas nos braços fechados [$F(3,28)= 1,51$; $p=0,23$] e total de entradas [$F(3,28)= 0,97$; $p=0,41$], enquanto o grupo tratado com diazepam apresentou alteração significativa no total de entradas [$t(14)=2,45$; $p=0,02$], sendo as entradas nos braços fechados semelhante a do grupo controle [$t(14)=0,94$; $p=0,35$]. Com relação aos parâmetros etológicos, também não houve nenhuma alteração significativa quanto à avaliação de risco [$F(3,28)=0,08$; $p=0,08$], imersões de cabeça [$F(3,28)= 4,09$; $p=0,01$], comportamento de levantar e de autolimpeza [$F(3,28)= 0,68$; $p=0,56$ e $F(3,28)= 0,66$; $p=0,58$, respectivamente]. No entanto, a análise de tendência revela uma redução significativa dos estiramentos corporais em relação ao tratamento com o EHE nas doses testadas (teste de tendência $p= 0,03$), assim como das imersões de cabeça (teste de tendência $p= 0,01$). O tratamento com diazepam promoveu uma redução dos estiramentos corporais [$t(14)=2,23$; $p=0,04$] e imersões de cabeça [$t(14)=2,23$; $p=0,042$] sendo os demais parâmetros similares aos do grupo controle [comportamento de levantar: $t(14)=0,09$; $p=0,92$] e de autolimpeza [$t(14)=0,00$; $p=1,00$] como mostra a tabela 6.

O tratamento com o EHE nas doses testadas, no teste do CA, não produziu nenhuma alteração estatisticamente significante quando comparado ao grupo controle [número de cruzamentos: $F(3,28)=1,25$; $p=0,30$; número de levantamentos: $F(3,28)=0,71$; $p=0,55$], como pode ser observado na figura 17. O tratamento com diazepam na dose de 2,5 mg/kg também não promoveu qualquer alteração nos parâmetros de locomoção [número de cruzamentos: $t(14)=0,65$; $p=0,52$; número de levantamentos: $t(14)=0,04$; $p=0,96$].

Tabela 6. Efeito do tratamento agudo do EHE de *Ilex paraguariensis* nos parâmetros comportamentais registrados no teste do labirinto em cruz elevado.

	controle	DZP	60 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg
%TA	10,8±3,4	34,0±9,5*	8,2±2,9	10,6±3,4	16,3±5,2
%EA	15,0±4,0	34,8±7,3*	10,3±2,8	14,9±4,2	22,6±5,5
TE	12,6±2,1	20,5±2,4*	14,8±2,2	13,6±1,9	18,7±2,4
EF	10,5±1,6	12,6±1,4	13,0±1,6	11,5±1,6	14,3±1,8
CL	15,3±2,0	15,7±3,3	16,4±1,9	17,2±1,9	20,0±3,3
EC	4,2±1,0	1,2±0,8*	5,5±2,0	2,0±0,8	1,0±1,0
IC	11,2±2,8	25,7±5,8*	7,0±1,0	12,3±2,6	18,0±1,9
AU	0,8±0,5	0,8±0,3	0,2±0,1	0,5±0,2	0,7±0,3

DZP (2,5 mg/kg, v.o.) foi usado como droga ansiolítica padrão. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M.; n=8 animais. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP).

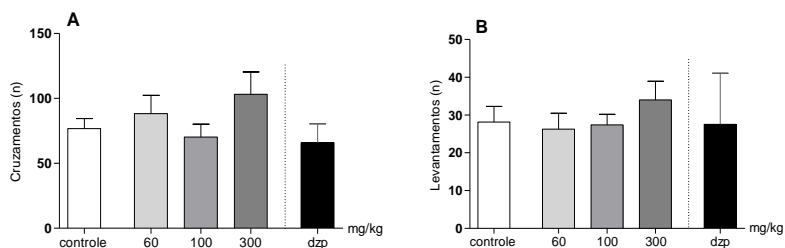


Figura 17. Efeito do tratamento agudo com EHE de *Ilex paraguariensis* (60 - 300 mg/kg, v.o.) no número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) em camundongos submetidos ao teste do campo aberto durante 5 min. O diazepam (DZP, 2,5 mg/kg, v.o.) foi utilizado como droga padrão. O número de animais utilizados em cada grupo foi de 8 animais. Cada coluna representa a média ± E.P.M. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP).

4.2.2 Teste de esquiva inibitória do tipo *step-down*

O efeito do tratamento agudo com EHE de *Ilex paraguariensis* na memória de trabalho, de curta e longa duração (30 s, 90 min e 24 h, respectivamente) está representado na figura 18. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revela ausência de efeito em relação ao tratamento, nas doses testadas, na sessão de treino [H(4)=0,97; p=0,80]. No entanto, o teste de Wilcoxon revela que o extrato na dose de 100 mg/kg promove um aumento significativo da latência para a descida da plataforma na memória de trabalho, de curta e longa duração quando comparado a sessão treino (p<0,05), enquanto as doses de 300 e 600 mg/kg apresentam aumento significativo apenas na memória de curta e longa duração (p<0,05). O mesmo não ocorre com o grupo tratado com escopolamina, uma vez que nenhum efeito significativo foi observado em relação à sessão treino (p>0,05).

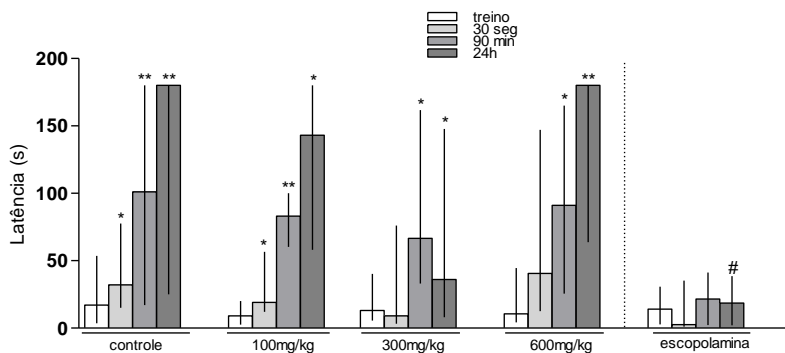


Figura 18. Efeito do tratamento agudo EHE de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg; v.o.) na retenção da memória de trabalho (30 s), de curta (90 min) e longa duração (24 h) no teste de esquiva inibitória do tipo *step-down*. A escopolamina (1,0 mg/kg; i.p.) foi utilizada como droga amnésica padrão. Os dados são representados por mediana (intervalo interquartil) da latência para descida da plataforma. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$, quando comparado à sessão treino do respectivo grupo (teste não paramétrico pareado de Wilcoxon); # $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle nos respectivos intervalos.

4.2.3 Teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down* - amnésia induzida por escopolamina

O protocolo realizado neste teste foi semelhante ao descrito no item 4.1.3. A figura 19 mostra o efeito do tratamento com o EHE nas doses 100, 300 e 600 mg/kg. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revela ausência de efeito em relação ao tratamento nas doses testadas na sessão treino [H(4)= 2,21; p=0,52]. O teste de Wilcoxon não mostra nenhum efeito estatisticamente significativo do EHE nas doses testadas quando comparado à sessão teste de cada grupo (p>0,05).

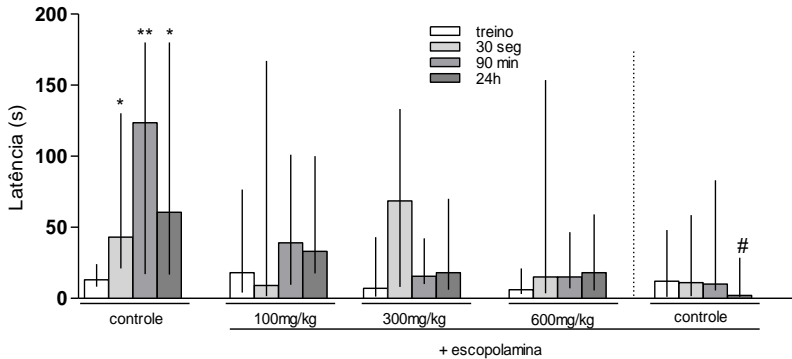


Figura 19. Efeito do tratamento agudo EHE de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg; v.o.) na retenção da memória de trabalho (30 s), de curta (90 min) e longa duração (24 h) no teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down* em um modelo de amnésia induzida por escopolamina. A escopolamina (1,0 mg/kg; i.p.) foi utilizada como droga amnésica padrão. Os dados são representados por mediana (intervalo interquartil) da latência para descida da plataforma. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$, quando comparado à sessão treino do respectivo grupo (teste não paramétrico pareado de Wilcoxon); # $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle nos respectivos intervalos.

4.3 Efeito do tratamento subcrônico do extrato hidroetanólico (EHE) e aquoso (EA) de *Ilex paraguariensis*

4.3.1 Teste do labirinto em cruz elevado seguido do teste do campo aberto

A ANOVA de uma via revelou ausência de efeito dos EHE e EA de *Ilex paraguariensis* quando administrados subcronicamente nos parâmetros tempo [EHE: $F(3,28)=0,06$; $p=0,98$; EA: $F(3,28)=0,16$; $p=0,915$] bem como entradas [EHE: $F(3,28)=0,55$; $p=0,64$; EA: $F(3,28)=0,99$; $p=0,40$] nos braços abertos. De maneira semelhante o controle positivo utilizado, o pentilenotetrazol, também não apresentou nenhuma alteração no tempo [$t(14)=1,59$; $p=0,13$] e entradas [$t(14)=0,53$; $p=0,60$] nos braços abertos. No entanto, o EHE apresentou aumento significativo de entradas nos braços fechados na dose de 300 mg/kg, quando comparado ao grupo controle [$F(3,28)=3,59$; $p=0,028$], porém nenhuma alteração no número de entradas nos braços fechados foi verificada com o EA nas doses testadas [$F(3,28)=1,42$; $p=0,25$]. O EHE promoveu, de maneira semelhante ao parâmetro citado anteriormente, o aumento no total de entradas na dose de 300 mg/kg [$F(3,28)=3,12$; $p=0,04$], enquanto o EA não revelou qualquer efeito nas doses testadas quando comparado ao grupo controle [$F(3,38)=1,07$; $p=0,37$]. O pentilenotetrazol 20 mg/kg, utilizado como padrão ansiogênico, apresentou uma redução significativa no número de entradas nos braços fechados [$t(14)=3,31$; $p=0,004$] e no total de entradas [$t(14)=3,82$; $p=0,001$]. Estes resultados estão apresentados na figura 20 abaixo.

Ainda, nas doses testadas, não foi observada nenhuma alteração significativa nos parâmetros etológicos (figura 21) como imersões de cabeça [EHE: $F(3,28)=1,23$; $p=0,31$; EA: $F(3,28)=1,13$; $p=0,35$], estiramentos corporais [EHE: $F(3,28)=0,96$; $p=0,42$; EA: $F(3,28)=0,99$; $p=0,40$], comportamento de levantar [EHE: $F(3,28)=0,85$; $p=0,47$; EA: $F(3,28)=1,10$; $p=0,36$] e de autolimpeza [EHE: $F(3,28)=1,01$; $p=0,40$; EA: $F(3,28)=0,11$; $p=0,95$]. O pentilenotetrazol (20 mg/kg), utilizado como controle, mostrou ser capaz de reduzir significativamente o comportamento de levantar [$t(14)=4,03$; $p=0,001$] e de imersões de cabeça [$t(14)=2,76$; $p=0,01$], permanecendo inalterados os estiramentos corporais [$t(14)=1,73$; $p=0,10$] e o comportamento de autolimpeza [$t(14)=0,39$; $p=0,70$].

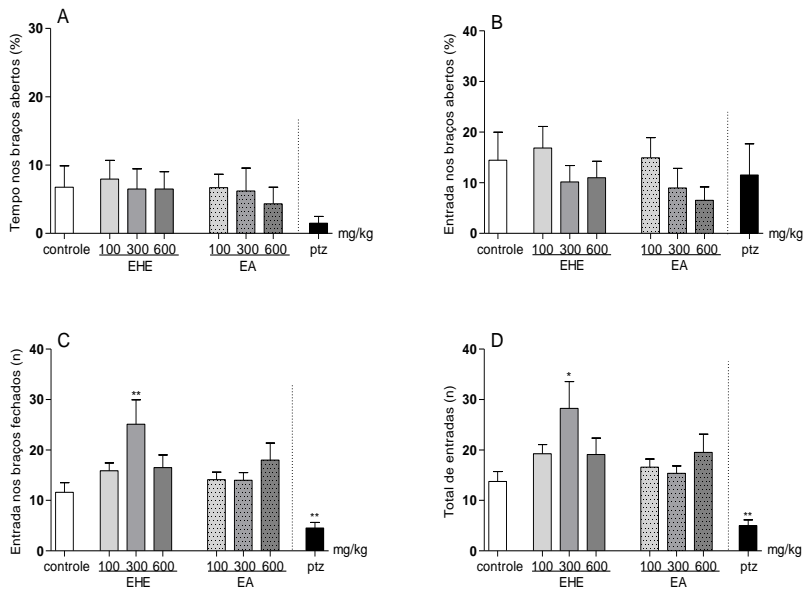


Figura 20. Efeito do tratamento subcrônico com EHE e EA de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg, v.o.) no tempo (A) e entradas (B) nos braços abertos, entradas nos braços fechados (C) e total de entradas (D) em camundongos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado durante 5 min. O pentilenotetrazol (PTZ, 20 mg/kg, i.p.) foi utilizado como droga ansiogênica padrão, administrado uma única vez. O número de animais utilizados em cada grupo foi de 8-9 animais. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do PTZ).

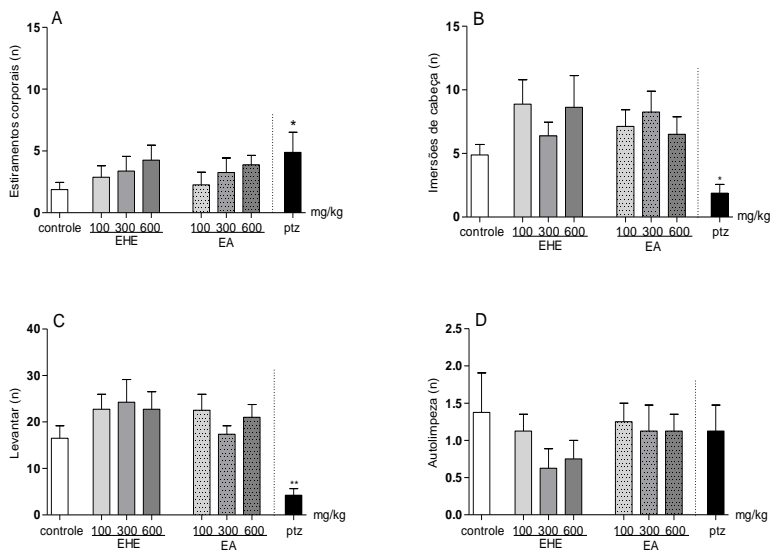


Figura 21. Efeito do tratamento subcrônico com EHE e EA de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg, v.o.) nos estiramentos corporais (A), imersões de cabeça (B), comportamento de levantar (C) e de autolimpeza (D) em camundongos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado durante 5 min. O pentileno tetrazol (PTZ, 20 mg/kg, i.p.) foi utilizado como droga ansiogênica padrão, administrado uma única vez. O número de animais utilizados em cada grupo foi de 8-9 animais. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do PTZ).

Em relação aos parâmetros observados no teste do campo aberto, o EHE apresentou um aumento significativo do número de cruzamentos [$F(3,26)=4,74$; $p=0,009$]. O teste de tendência revela ainda, um aumento no número de levantamentos [$F(3,26)=1,92$; $p=0,15$; teste de tendência: $p=0,03$]. Por outro lado, o EA apresenta ausência de efeito tanto no número de cruzamentos [$F(3,25)=1,24$; $p=0,31$], como no comportamento de levantar [$F(3,25)=0,58$; $p=0,63$]. O pentileno tetrazol, utilizado como controle ansiogênico neste experimento, produz uma diminuição significativa no número de cruzamentos [$t(11)=4,24$; $p=0,001$] e comportamento de levantar [$t(11)=4,82$; $p=0,0005$]. Estes resultados estão apresentados na figura 22 abaixo.

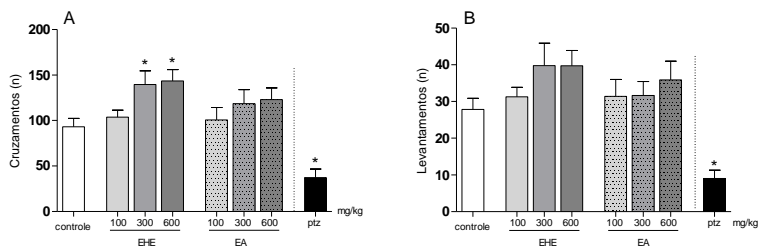


Figura 22. Efeito do tratamento subcrônico com EHE e EA de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg, v.o.) no número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) em camundongos avaliados ao teste do campo aberto durante 5 min. O pentilenotetrazol (PTZ, 20 mg/kg, i.p.) foi utilizado como droga padrão, administrado uma única vez. O número de animais utilizados em cada grupo foi de 7- 8 animais. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do PTZ).

4.4 Efeito do tratamento crônico do extrato hidroetanólico (EHE) de *Ilex paraguariensis*

4.4.1 Teste do labirinto em cruz elevado seguido do teste do campo aberto

Os animais tratados com o EHE de *Ilex paraguariensis* nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg por um período de 21 dias foram avaliados no 21º dia no teste do LCE, como mostra a figura 23. As doses de 100 e 300 mg/kg promoveram um aumento significativo no tempo [$F(3,30)=5,46$; $p=0,004$], bem como nas entradas [$F(3,30)=8,53$; $p=0,0003$] nos braços abertos, assim como a droga ansiolítica padrão diazepam na dose de 2,5 mg/kg [$t(13)=2,22$; $p=0,04$]. Além disso, a ANOVA de uma via não revelou efeito significativo no total de entradas quando comparado ao controle [$F(3,32)=2,61$, $p=0,06$]. No parâmetro número de entradas nos braços fechados não foi observada nenhuma alteração significativa, porém o teste de regressão linear revelou uma tendência, nas doses testadas, a um aumento de entradas nos braços fechados [$F(3,32)=2,23$, $p=0,10$; teste de tendência, $p=0,02$] como mostra a figura 23. O pentilenotetrazol, utilizado como padrão ansiogênico, apresentou um comportamento similar ao

controle no tempo e entradas dos braços abertos [t(14)=0,09; p=0,92; t(17)=0,43; p=0,66] e uma redução significativa nas entradas nos braços fechado [t(17)=3,05; p=0,007] e no total de entradas [t(17)=3,09; p=0,006] (figura 23).

Em relação aos parâmetros etológicos mostrados na figura 24, foi observada uma redução significativa dos estiramentos corporais dos grupos tratados com o EHE quando comparados ao grupo controle, sendo o mesmo efeito observado no grupo diazepam [F(3,32)=8,52; p=0,0003; t(14)=2,43; p=0,02]. A análise estatística revelou ausência de efeito significativo no parâmetro de imersões de cabeça [F(3,32)=1,84; p=0,15], comportamento de levantar e autolimpeza [F(3,32)=1,98; p=0,13 e F(3,32)=0,83; p=0,48, respectivamente]. O tratamento com a droga ansiolítica padrão diazepam promoveu um aumento significativo de imersões de cabeça [t(14)=3,37; p=0,004] não alterando o comportamento de levantar e de autolimpeza [t(14)=0,60; p=0,55; t(14)=0,74; p=0,47].

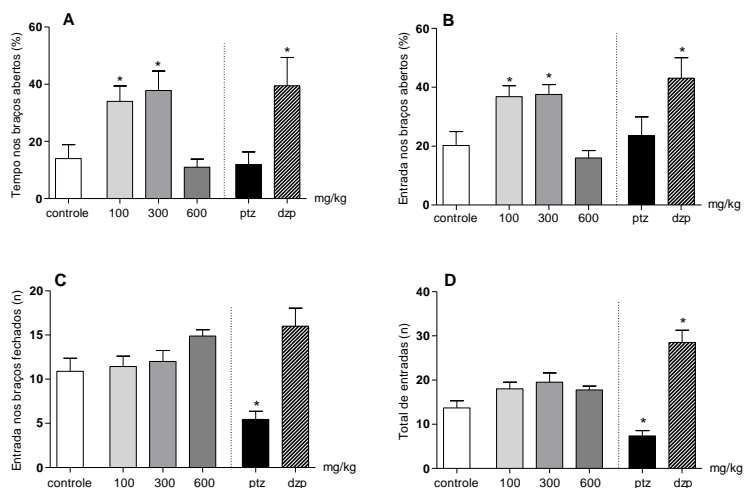


Figura 23. Efeito do tratamento crônico com EHE de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg, v.o.) no tempo (A) e entradas (B) nos braços abertos, entradas nos braços fechado (C) e total de entradas (D) em camundongos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado durante 5 min. O diazepam (DZP, 2,5 mg/kg, v.o.) foi utilizado como droga ansiolítica padrão e pentilenotetrazol (PTZ, 20mg/kg, i.p.) como droga ansiogênica padrão, administrados uma única vez. O número de animais utilizados em cada grupo foi de 8-10 animais. Cada coluna representa a média ± E.P.M. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP ou PTZ).

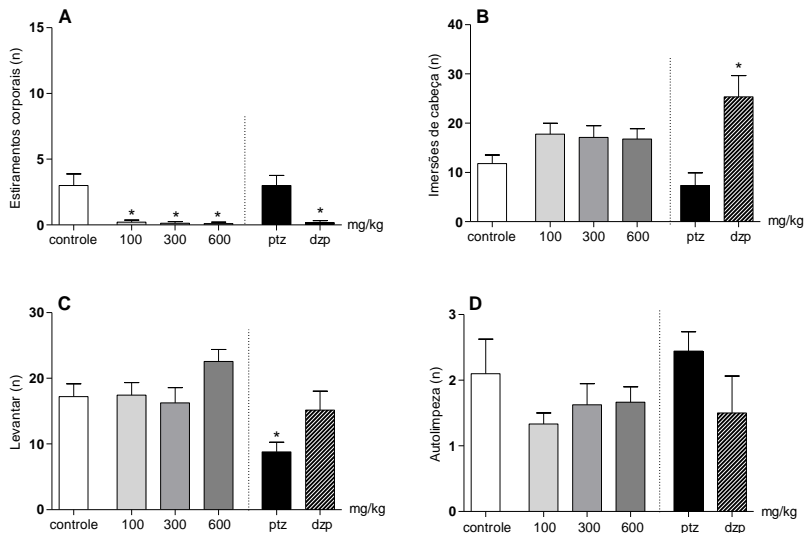


Figura 24. Efeito do tratamento crônico com EHE de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg, v.o.) nos estiramentos corporais (A), imersões de cabeça (B), comportamento de levantar (C) e de autolimpeza (D) em camundongos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado durante 5 min. O diazepam (DZP, 2,5 mg/kg, v.o.) foi utilizado como droga ansiolítica padrão e pentilenotetrazol (PTZ, 20mg/kg, i.p.) como droga ansiogênica padrão, administrado uma única vez. O número de animais utilizados em cada grupo foi de 8-10 animais. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP ou PTZ).

Imediatamente após o teste do LCE, os animais foram submetidos ao teste do CA para avaliar a atividade locomotora e ainda, parâmetros relacionados à ansiedade, após o tratamento crônico com o EHE de *Ilex paraguariensis*. O programa ANY-MAZE® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) foi utilizado para avaliar os parâmetros neste teste como mostram as figuras 25 e 26. A análise estatística revelou um aumento significativo da distância total percorrida nas doses testadas [$F(3,34)=9,34$; $p=0,0001$], assim como da velocidade média [$F(3,34)=9,11$; $p=0,0001$] (figura 25). Ainda, ocorre um aumento significativo das três doses testadas no número de entradas na zona central [$F(3,34)=4,05$; $p=0,01$] (figura 25).

No parâmetro de número total de cruzamentos é observado um aumento significativo nas doses de 100 e 300 mg/kg [F(3,34)=6,83; $p=0,001$]. Os parâmetros tempo na zona central e na periférica não foram alterados pelo tratamento com o extrato [F(3,34)=0,60; $p=0,61$; F(3,34)=0,87; $p=0,46$, respectivamente], no entanto, a ANOVA de uma via revela o aumento da distância percorrida na zona periférica nas doses de 300 e 600 mg/kg [F(3,34)=5,83; $p=0,002$] e da distância percorrida na zona central na dose de 300 mg/kg [F(3,34)=5,83; $p=0,002$], como mostrado na figura 26.

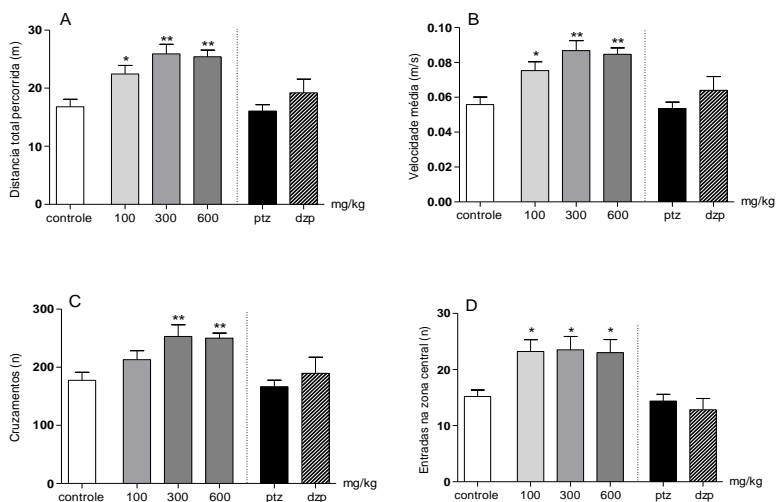


Figura 25. Efeito do tratamento crônico com EHE de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg; v.o.) no teste do campo aberto durante 5 min: (A) distância percorrida (m), (B) velocidade média, (C) número total de cruzamentos e (D) entradas na zona central. O diazepam (DZP, 2,5 mg/kg; v.o.) foi utilizado como droga ansiolítica padrão e pentilenotetrazol (PTZ, 20mg/kg, i.p.) como droga ansiogênica padrão, administrados uma única vez. O número de animais utilizados em cada grupo foi de 7-10 animais. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP ou PTZ).

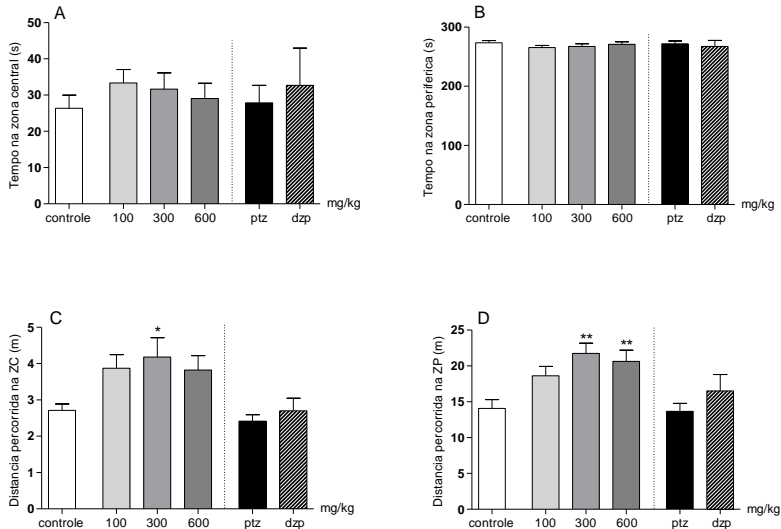


Figura 26. Efeito do tratamento crônico com EHE de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg; v.o.) no teste do campo aberto durante 5 min: (A) Tempo na zona central, (B) tempo na zona periférica, (C) distância percorrida na zona central e (D) distância percorrida na zona periférica. O diazepam (DZP, 2,5 mg/kg; v.o.) foi utilizado como droga ansiolítica padrão e pentilenotetrazol (PTZ, 20mg/kg, i.p.) como droga ansiogênica padrão, administrados uma única vez. O número de animais utilizados em cada grupo foi de 7-10 animais. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP ou PTZ).

Nenhuma alteração significativa foi encontrada no comportamento de levantar e de autolimpeza dos animais tratados com o EHE de *Ilex paraguariensis* [F(3,34)=0,52; p=0,66; F(3,34)= 0,35; p=0,78, respectivamente]. As imagens da ocupação dos aparatos estão mostradas nas figuras 28 (campo aberto) e 29 (labirinto em cruz elevado).

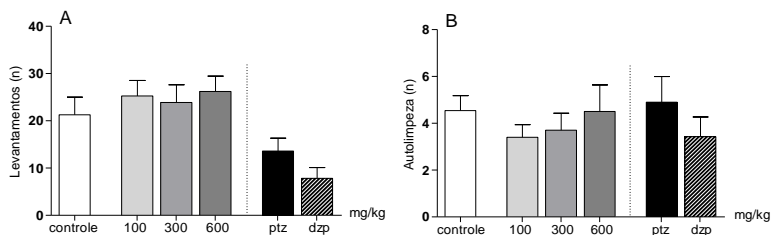


Figura 27. Efeito do tratamento crônico com EHE de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg, v.o.) no número de levantamentos (A) e autolimpeza (B) em camundongos submetidos ao teste do campo aberto durante 5 min. O diazepam (DZP, 2,5 mg/kg, v.o.) foi utilizado como droga padrão e o pentilenotetrazol (PTZ, 20 mg/kg; i.p.) como droga ansiogênica padrão, administrados uma única vez. O número de animais utilizados em cada grupo foi de 7-10 animais. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP ou PTZ).

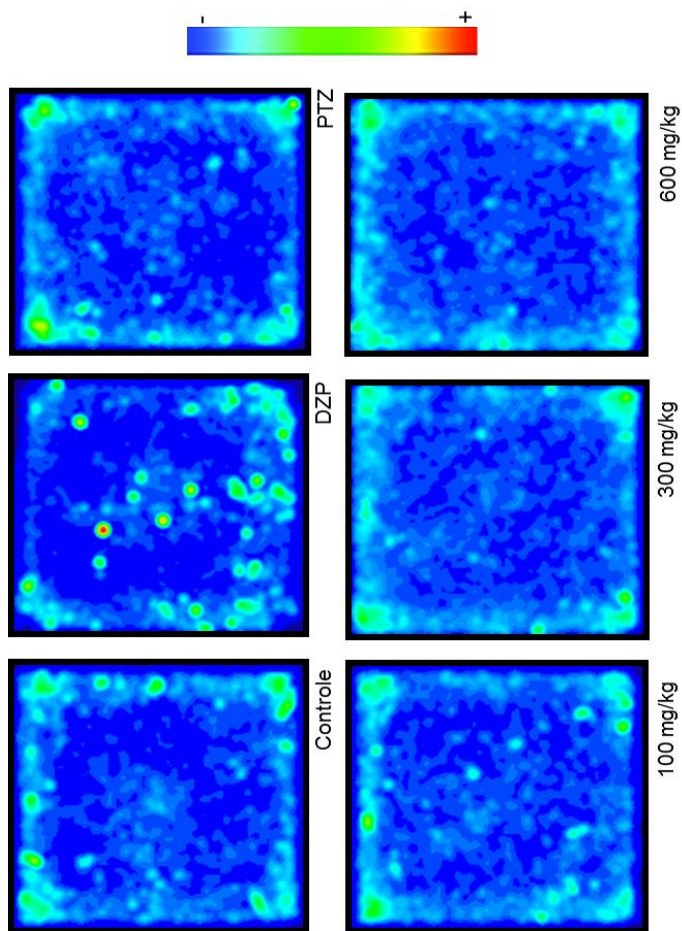


Figura 28. Imagens da ocupação de cada grupo de animais por tratamento no aparato do CA após o tratamento crônico com o EHE de *Ilex paraguariensis*. A escala de cores indica o local de maior ou

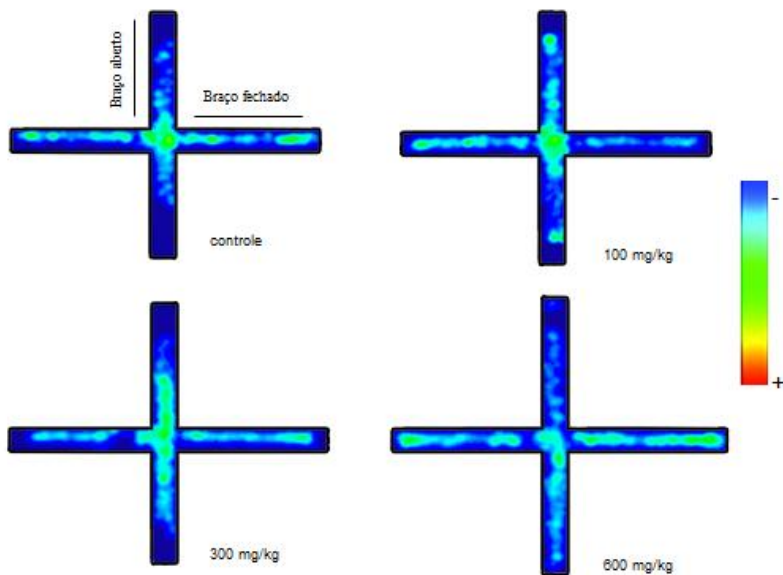


Figura 29. Imagens da ocupação de cada grupo de animais por tratamento no aparato do labirinto em cruz elevado após o tratamento crônico com o EHE de *Ilex paraguariensis*. A escala de cores indica o local de maior ou menor permanência do animal em uma determinada área do aparato. As imagens representam apenas um animal do grupo com o comportamento mais frequente.

4.4.3 Teste de esQUIVA inibit6ria do tipo step-down

O efeito do tratamento cr6nico do EHE de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg) na mem6ria de trabalho, de curta e longa dura76o (30 s, 90 min e 24 h, respectivamente) de camundongos avaliados na esQUIVA inibit6ria 6 mostrado na figura 30. O teste de Kruskal-Wallis revela aus6ncia de efeito em rela76o 6s doses testadas, quando comparado ao grupo controle na sess6o treino [H(4)=1,18; p=0,75]. As doses de 100 e 600 mg/kg produzem um aumento significativo da lat6ncia para a descida da plataforma (p>0,05), n6o sendo observado nenhum efeito significativo na dose de 300 mg/kg nos testes subsequentes (p<0,05).

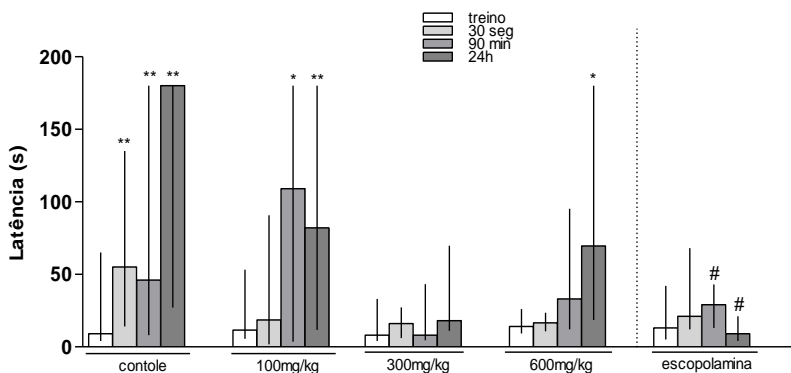


Figura 30. Efeito do tratamento cr6nico do EHE de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg; v.o.) na reten76o da mem6ria de trabalho (30 s), de curta (90 min) e longa dura76o (24 h) no teste de esQUIVA inibit6ria do tipo *step-down*. A escopolamina (1,0 mg/kg; i.p.) foi utilizada como droga amn6sica padr6o, administrada uma 6nica vez. Os dados s6o representados por mediana (intervalo interquartil) da lat6ncia para descida da plataforma. *P<0,05 e **P<0,01, quando comparado 6 sess6o treino do respectivo grupo (teste n6o param6trico pareado de Wilcoxon); #P<0,05 quando comparado ao grupo controle nos respectivos intervalos.

4.5 Determina76o da atividade da AChE

A an6lise de vari6ncia ANOVA de uma via revela um aumento significativo da atividade da AChE no hipocampo apenas na dose de 300

mg/kg, após o tratamento crônico com o EHE de *Ilex paraguariensis* [$F(3,24)=5,64$; $p=0,004$], sendo que a atividade desta enzima nas demais doses, no hipocampo, não foi alterada. Por outro lado, nenhuma alteração significativa da atividade da AChE foi observada no córtex [$F(3,24)=1,55$; $p=0,22$], como mostrado na figura 31.

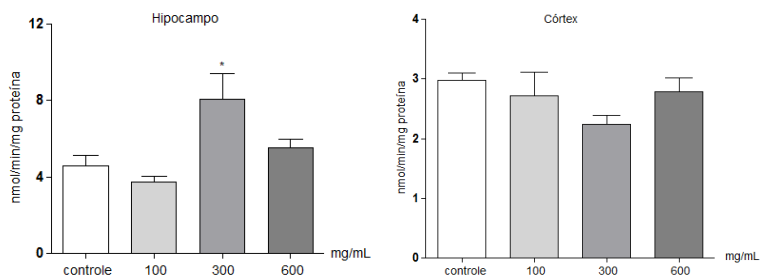


Figura 31. Efeito do tratamento crônico do EHE de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg) na determinação da atividade da AChE no hipocampo e córtex dos animais submetidos ao teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. $n=7$. * $P<0,05$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett).

4.6 Efeito da atividade adaptogênica do EHE e EA de *Ilex paraguariensis*

4.6.1 Teste do campo aberto após o estresse de contenção a frio

O efeito do tratamento com o EHE e EA de *Ilex paraguariensis* no número de cruzamentos dos animais após o estresse de contenção a frio é representado na figura 32. A análise estatística revelou uma redução significativa no número de cruzamentos do grupo controle estressado (CE) quando comparado ao grupo controle (não estressado) [$t(13)=4,22$; $p=0,001$]. Embora possa ser observado um aumento do número de cruzamentos dos grupos tratados, o mesmo não é significativo estatisticamente quando comparado ao grupo CE [EHE: $F(3,26)=1,16$; $p=0,34$; EA: $F(3,26)=1,69$; $p=0,19$]. A figura 33 mostra as imagens da localização preferencial de cada grupo de animais tratado quando avaliado

no campo aberto, conforme análise pelo programa ANY-MAZE® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

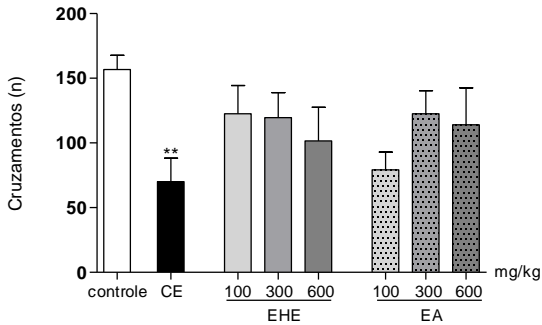


Figura 32. Efeito do tratamento de sete dias com o EHE e EA de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg; v.o.) no teste do campo aberto durante 5 min após o estresse de contenção a frio. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. n= 7-8. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para comparar o controle vs. CE).

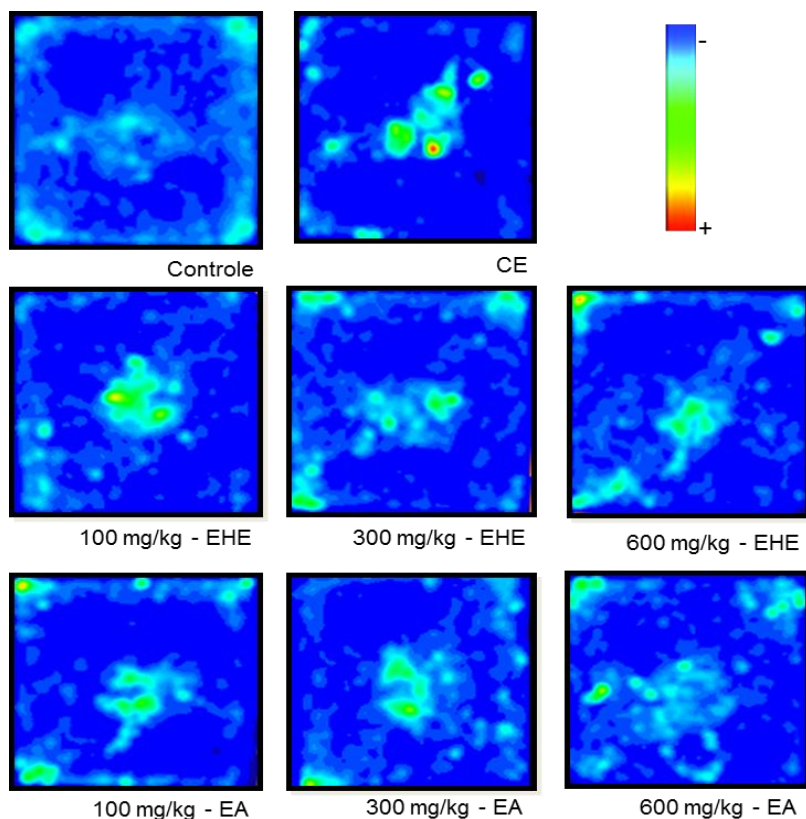


Figura 33. Imagens da ocupação de cada grupo de animais em cada tratamento (EHE e EA de *Ilex paraguariensis* durante sete dias) no aparato do campo aberto após o estresse de contenção a frio. A escala de cores indica o local de maior ou menor permanência do animal em uma determinada área do aparato. As imagens representam a média dos animais de cada grupo; n=7-8.

4.6.2 Avaliação do nível de corticosterona plasmática

A análise estatística ANOVA de uma via revelou ausência de efeito no nível de corticosterona plasmática dos animais tratados com EHE e EA de *Ilex paraguariensis* quando comparado ao grupo CE [EHE: $F(3,15)=1,02$; $p=0,41$; EA: $F(3,15)=2,15$; $p=0,135$]. No entanto, o EA apresenta uma tendência ao aumento do nível de corticosterona (teste de tendência $p=0,02$), como apresentado na figura 34.

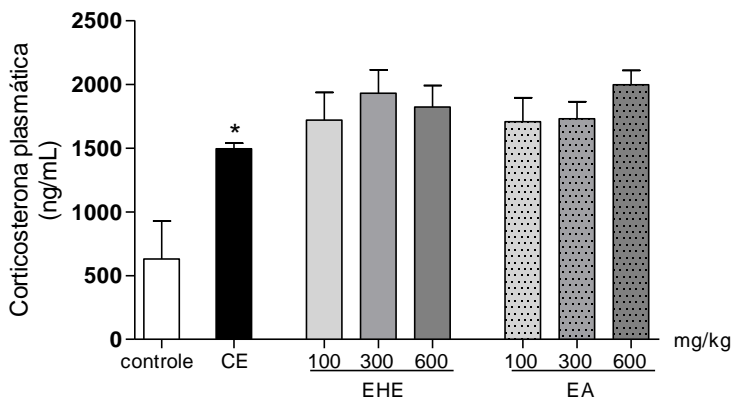


Figura 34. Nível de corticosterona plasmática em animais submetidos ao estresse de contenção a frio (4°C) após tratamento por 7 dias com o EHE e EA de *Ilex paraguariensis* (100 - 600 mg/kg; v.o.). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. $n= 4-5$. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para comparar o controle vs. CE).

5 DISCUSSÃO

A tabela abaixo resume os principais resultados encontrados neste estudo que serão discutidos a seguir:

Tabela 7. Principais resultados obtidos na investigação neurofarmacológica dos extratos obtidos das folhas de *Ilex paraguariensis*.

Tratamento	Extrato aquoso			Extrato hidroetanólico		
	agudo	subcrônico	crônico	agudo	subcrônico	crônico
Locomoção	na	na	-	na	aumenta	aumenta
Ansiedade	na	na	-	na	na	ansiolítico
Memória	na	-	-	na	-	déficit cognitivo na dose de 300 mg/kg
AChE	-	-	-	-	-	aumenta na dose de 300 mg/kg
Adaptogênico	-	na	-	-	na	-
Nível de corticosterona	-	aumenta	-	-	aumenta	-

na: não altera

Muita atenção é dada ao uso popular da erva mate (*Ilex paraguariensis*) devido ao seu efeito estimulante atribuído à presença de metilxantinas como a cafeína. Neste sentido, investigamos o possível efeito estimulante do EA e EHE obtidos das folhas de *Ilex paraguariensis* e ainda o possível efeito dos extratos sobre os parâmetros relacionados à ansiedade, uma vez que, nesta planta destaca-se o alto teor de metilxantinas como a cafeína e teobromina, bem como de flavonoides, polifenóis, entre outros constituintes.

Os dados obtidos após o tratamento agudo com o EA não mostram qualquer alteração comportamental relacionada aos parâmetros de ansiedade observados nas doses testadas, indicando assim, ausência de atividade tipo-ansiolítica/ansio gênica do tratamento agudo do EA de *Ilex paraguariensis*. Para evitar um resultado falso-positivo da substância em teste, é recomendável avaliar a atividade locomotora dos animais, uma vez que, drogas psicoestimulantes podem levar ao aumento na preferência pelos braços abertos (WEISS et al., 1998). Assim, na sequência do teste do LCE, os animais foram avaliados no teste do CA, a fim de verificar a possível alteração locomotora causada pelo tratamento. Os dados obtidos durante o teste do CA não revelaram qualquer alteração significativa nos parâmetros de locomoção observados após o tratamento agudo com o EA de *Ilex paraguariensis*, sendo verificado, no entanto, uma tendência a um aumento no número de cruzamentos. De maneira semelhante, o tratamento agudo

com o EHE não foi capaz de promover alterações nos parâmetros de ansiedade e locomoção dos animais, embora tenha sido observada uma tendência para redução dos estiramentos corporais e das imersões de cabeça; sendo que a redução destes parâmetros sugere uma possível atividade ansiolítica. Possivelmente, a ausência de efeito observado pode ser atribuída a grande variedade de constituintes que compõe esta espécie ou ainda, o fato destes resultados serem obtidos após o tratamento agudo. É interessante ressaltar que a faixa de dose pode estar abaixo da necessária para observação dos efeitos popularmente conhecidos como, por exemplo, o efeito estimulante.

O consumo de erva mate pela população, principalmente sob a forma de chimarrão e tererê se dá, geralmente, de forma crônica, no uso diário. Em alguns casos, em especial quando se trata de plantas medicinais, o período de uso pode ser fundamental para o aparecimento dos efeitos (ZHANG, 2004). Desta forma, investigamos o efeito do tratamento subcrônico dos extratos na possível atividade do tipo-ansiolítica. Tendo como base os resultados anteriores do tratamento agudo no labirinto em cruz elevado, a faixa de dose testada nesta etapa envolvendo tratamento subcrônico foi ampliada, visto que nenhuma alteração foi observada anteriormente. Para avaliar os efeitos na ansiedade do tratamento subcrônico foram testadas, então, as doses de 100, 300 e 600 mg/kg. Novamente, o EA não produziu qualquer efeito nos parâmetros de ansiedade observados no teste do LCE, como também não promoveu efeitos locomotores avaliados no teste do CA. O EHE de *Ilex paraguariensis*, por outro lado, apresentou um aumento significativo no número de entradas nos braços fechados, bem como do total de entradas na dose de 300 mg/kg. O número de entradas nos braços fechados possui alta correlação com a atividade locomotora no teste do LCE, assim como as entradas nos braços fechados, o total de entradas retrata a atividade locomotora neste teste (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; DALVI, 1997). Corroborando com estes resultados foi verificado um aumento significativo do número de cruzamentos no teste do CA, nas doses de 300 e 600 mg/kg do EHE. Em resumo, os resultados obtidos após a avaliação do tratamento subcrônico indicam a atividade estimulante do EHE de *Ilex paraguariensis*, sendo esta atividade esperada decorrente da presença de metilxantinas como cafeína e teobromina relatadas na literatura como substâncias estimulantes, sendo que essas atuam através do antagonismo dos receptores de adenosina (EL YACOUBI et al., 2000).

Baseado nos resultados obtidos com o tratamento subcrônico com o EA e EHE, no qual apenas o EHE apresentou alteração comportamental nos modelos estudados, escolhemos o EHE para investigar a atividade tipo-ansiolítica em animais tratados cronicamente com erva mate no teste do LCE e, posteriormente, no teste do CA. Assim, após o tratamento crônico

com o EHE de *Ilex paraguariensis*, os animais apresentaram um aumento do tempo, bem como, de entradas nos braços abertos e este tratamento foi ainda capaz de reduzir os estiramentos corporais. Este conjunto de alterações comportamentais indica um aumento da atividade dos braços abertos e redução do comportamento de avaliação de risco, efeito similar ao do diazepam, benzodiazepínico utilizado como controle ansiolítico padrão, sugerindo uma propriedade tipo ansiolítica para esta espécie vegetal.

O efeito ansiolítico observado foi contrário ao que era esperado, já que a literatura destaca o alto teor de metilxantinas nesta espécie e estas substâncias são descritas na literatura como ansiogênicas (EL YACOUBI et al., 2000; RAO et al., 1999). No entanto, considerando que extratos de plantas são constituídos por uma grande variedade de substâncias, vale destacar a atividade ansiolítica de compostos como, por exemplo, flavonoides, ácidos fenólicos e saponinas, compostos estes, também encontrados na erva mate (PALADINI et al., 1999; HERRERA-RUIZ et al., 2008; WEI et al., 2007). Estudos têm demonstrado que *Panax ginseng* produz efeito ansiolítico sendo que a fração de saponinas demonstra um papel importante para tal efeito no teste do LCE (CHA et al., 2005; CARR; BEKKU; YOSHIMURA, 2006) e em outros modelos animais (WEI et al., 2007); embora este efeito não seja ainda totalmente elucidado, os autores sugerem o envolvimento do sistema GABAérgico na atividade ansiolítica das saponinas (YUAN et al., 1998). Outras substâncias, obtidas de plantas medicinais, são descritas na literatura como ansiolíticas como, por exemplo, o polifenol (-)-epigallocatequina galato (EGCG) (VIGNES et al., 2006). Recentemente, Park e colaboradores (2010) demonstraram que o EGCG é capaz de antagonizar o efeito ansiogênico induzido por cafeína, reduzindo o número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos no teste do LCE. Ações sinérgicas e antagonicas de vários compostos, e diferentes ações promovidas por uma mesma substância com ação em diferentes sítios, levam a uma resposta farmacológica complexa, e isto é comumente observado em plantas que apresentam efeito no SNC (MCCLATCHEY et al., 2009).

Nossos resultados mostram ainda um aumento significativo da distância percorrida, bem como, da velocidade média e número de cruzamentos totais dos animais tratados cronicamente com EHE de *Ilex paraguariensis* no teste do CA modificado para avaliar, além da atividade motora, parâmetros relacionados à ansiedade. Estes resultados vão de acordo com dados da literatura que evidenciam atividade estimulante de substâncias como metilxantinas (EL YACOUBI et al., 2000). Por outro lado, não foi observada nenhuma alteração quanto aos parâmetros de ansiedade para o teste do CA, ou seja, o EHE não alterou o tempo de permanência do animal na zona central do aparato, tampouco, o tempo na zona periférica, semelhante ao que ocorreu com o controle positivo

diazepam. Porém, o tratamento crônico com o EHE foi capaz de promover um aumento no número de entradas na zona central, sendo este efeito, no entanto, provavelmente decorrente da ação estimulante do extrato. Isto permite explicar também o aumento na distância percorrida na zona central uma vez que ocorre de modo simultâneo com o aumento da distância percorrida na zona periférica, indicando um aumento da atividade exploratória geral. No entanto, deve ser considerado que os modelos diferem na avaliação do tipo de ansiedade (BOURIN et al., 2007) e ainda, a experiência prévia pode reduzir ou abolir o comportamento do animal. Rodgers e Shepherd (1993) mostraram que a experiência prévia no teste do LCE reduz a resposta ansiolítica do diazepam no teste da caixa claro-escuro, o que explica, pelo menos em parte, nossos resultados obtidos com o diazepam no teste do CA.

O EHE de *Ilex paraguariensis* após o tratamento crônico foi capaz de promover além de um efeito ansiolítico, um efeito estimulante motor, sendo este último efeito encontrado também após o tratamento subcrônico com o mesmo extrato.

A atividade estimulante observada ocorre provavelmente pela ação das metilxantinas, como cafeína e teobromina, encontradas na *Ilex paraguariensis*. Estes resultados concordam com dados da literatura que evidenciam o aumento da atividade locomotora em animais tratados com cafeína (EL YACOUBI et al., 2000; GASIOR et al., 2000). Ainda, existem estudos que evidenciam a atividade estimulante em modelos animais de compostos como o ácido clorogênico e seus metabólitos (OHNISHI et al., 2006), que também compõe quimicamente a *Ilex paraguariensis*.

O mecanismo de ação envolvido das metilxantinas, como a cafeína, consiste no bloqueio de ambos os receptores purinérgicos A_1 e A_{2A} , envolvendo mecanismos pré e pós-sinápticos (SNYDER et al., 1981; KARCZ-KUBICHA et al., 2003; XIE; RAMKUMAR; TOTH, 2007). Em baixas doses, a adenosina atua na pré-sinapse em receptores de adenosina A_1 modulando a liberação de neurotransmissores como a dopamina e glutamato nos terminais estriatais (FERRÉ et al., 1992; OKADA; MIZUNO; KANEKO, 1996; SOLINAS et al., 2002). A distribuição dos receptores A_{2A} no SNC, por outro lado, é bastante restrita e limitada a regiões altamente inervadas por neurônios dopaminérgicos como, por exemplo, no estriado (FREDHOLM et al., 1999), e estão localizados nesta estrutura principalmente na região pós-sináptica (SCHIFFMANN et al., 1991; SCHIFFMANN; VAN DER HAEGHEN, 1993). Desta forma, a cafeína, por atuar de forma contrária aos efeitos da adenosina, pode aumentar a neurotransmissão dopaminérgica (FERRÉ et al., 2008). Assim, a estimulação locomotora estaria associada ao antagonismo de receptores de adenosina que, por sua vez, aumenta a função dopaminérgica (FERRÉ et al., 1992; XIE; RAMKUMAR; TOTH, 2007). O bloqueio de receptores de

adenosina pode levar a efeitos secundários decorrentes de outros neurotransmissores incluindo noradrenalina, serotonina, acetilcolina, GABA, além de dopamina e glutamato já citados, culminando com alterações das inúmeras funções biológicas (FREDHOLM et al., 1999).

Paralelamente, em função dos resultados comportamentais obtidos, foi realizada a investigação fitoquímica para determinação da quantidade de cafeína e teobromina no EHE de *Ilex paraguariensis*. A análise fitoquímica foi realizada pelo aluno de mestrado Carlos Henrique Blum do Laboratório de Ciências Farmacêuticas do Departamento de Química Farmacêutica, CCS, Universidade Federal de Santa Catarina, sob supervisão do Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto. A análise mostrou que o EHE de *Ilex paraguariensis*, na dose de 100 mg/kg, contem cerca de 4,20 mg de cafeína e 0,44 mg de teobromina (ANEXO V). Em resumo, em consonância aos dados fitoquímicos obtidos, a dose máxima de cafeína administrada nos animais foi em torno de 25 mg/kg correspondente a dose de 600 mg/kg de extrato utilizada neste estudo.

A cafeína apresenta efeito comportamental que é dose-dependente, no qual doses mais baixas levam a ativação, enquanto doses altas causam supressão da resposta comportamental (KARCZ-KUBICHA et al., 2003). Ainda, a exposição crônica de altas doses de cafeína resulta na tolerância do efeito estimulante motor, enquanto um aumento da atividade motora é observado durante administração subcrônica e intermitente de doses moderadas de cafeína (SIMOLA et al., 2006). Com isso, vale destacar novamente que a dose máxima de cafeína administrada nos animais foi cerca de 25 mg/kg, correspondente à dose de 600 mg/kg do EHE, ou seja, a maior dose testada. Isso justifica o não aparecimento da tolerância do efeito estimulante motor, uma vez que, a dose de cafeína administrada pode ser considerada moderada. Sendo assim, nossos resultados encontram suporte com os dados da literatura, tendo como base a quantificação das metilxantinas no extrato utilizado para a realização deste trabalho.

Por outro lado, a cafeína quando avaliada no teste do LCE, na faixa de dose de 10 a 60 mg/kg (i.p.), não foi capaz de promover alterações nos parâmetros de ansiedade, sendo, no entanto, encontrado um efeito estimulante na dose mais alta avaliada no teste do LCE, uma vez que, observamos um aumento de entradas nos braços fechados e no total de entradas, sendo ainda, verificado um aumento no número de cruzamentos em todas as doses testadas no teste do CA (ver ANEXOS I e II). Vale ressaltar que não havia, até o presente momento, dados na literatura demonstrando atividade ansiolítica de *Ilex paraguariensis* como a encontrada neste trabalho.

Dos poucos estudos de ação central da *Ilex paraguariensis*, podemos notar o interesse no efeito desta espécie sobre a memória. Neste sentido, buscamos investigar a ação do EA e EHE sobre o aprendizado e memória

no teste da esQUIVA inibitória (*step-down*). Para tanto, investigamos o efeito do EA e EHE obtidos de *Ilex paraguariensis* na memória de trabalho, de curta e longa duração, avaliadas 30 s, 90 min e 24 h após a sessão de treino, respectivamente. Está bem estabelecido que as memórias podem ser classificadas de acordo com sua duração em memória de trabalho (memória imediata, durando segundos ou poucos minutos), memória de curta duração (que se desenvolve-se em poucos segundos ou minutos e dura por algumas horas) e a memória de longa duração (que consolida-se lentamente e é relativamente permanente) (IZQUIERDO et al., 1999). Processos distintos estão envolvidos na formação dos três tipos de memória no qual ocorre participação diferencial dos vários sistemas de neurotransmissores em distintas áreas cerebrais, sendo que mecanismos comuns parecem estar envolvidos em mais de um tipo de memória (IZQUIERDO et al., 1998; IZQUIERDO et al., 1999).

O EA, no teste da esQUIVA inibitória, promoveu um aumento significativo da latência para a descida da plataforma, semelhante ao grupo controle, mostrando que o EA não interfere nos processos de aprendizado e memória dos animais. No entanto, o tratamento realizado anterior à sessão de treino, como ocorreu no presente estudo, pode afetar tanto a aquisição como a consolidação, não sendo possível fazer esta distinção (QUILLFELDT, 2009). Além disso, o uso do teste da esQUIVA inibitória pode não revelar se a substância em teste é capaz de promover a melhora cognitiva, uma vez que a intensidade do choque pode promover o valor teto do teste não sendo possível observar um aumento da latência (QUILLFELDT, 2009). Sendo assim, foi utilizado o teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down* em um modelo de amnésia induzida por escopolamina, um antagonista muscarínico, a fim de verificar o possível efeito nootrópico do extrato.

O resultado deste experimento mostra um aumento significativo da latência para a descida da plataforma nos três tipos de memória avaliada (memória de trabalho, de curta e longa duração), após o tratamento com o EA de *Ilex paraguariensis*. Em outras palavras o EA foi capaz de prevenir o déficit cognitivo causado pela administração de escopolamina nos animais na memória de curta e longa duração.

Do mesmo modo, foi investigado o efeito do EHE no teste da esQUIVA inibitória, o qual apresentou uma resposta diferencial em relação aos tipos de memória avaliados, mostrando não interferir com a memória de trabalho, de curta e longa duração, mas não sendo capaz de prevenir o déficit de memória causado pela escopolamina.

Embora as análises cromatográficas evidencie similaridade entre o perfil e teor dos dois extratos analisados (ver ANEXOS III, IV e V), vale ressaltar que outros constituintes como, por exemplo, saponinas não foram detectadas pela técnica realizada. Com isso, as diferenças nos resultados

comportamentais observados podem residir no teor de saponinas entre os extratos. Tem sido evidenciado que uma mistura de saponinas triterpênicas obtidos de *Panax ginseng* e conhecidas como ginsenosídeos promovem a melhora do déficit cognitivo induzido por escopolamina (YANG et al., 2009).

Como justificado anteriormente, a escolha do EHE para a investigação do tratamento crônico no LCE, e sua disponibilidade em termos de quantidade para prosseguir na investigação desta espécie, levou-nos à avaliação do efeito do tratamento crônico deste extrato no teste da esQUIVA inibitória (*step-down*). Foi verificado, então, que o tratamento crônico com o EHE obtido de *Ilex paraguariensis* não interfere no processo de aprendizado e memória nas doses de 100 e 600 mg/kg, mas não na dose de 300 mg/kg. No entanto, nossos dados mostram que o EHE administrado cronicamente leva a um aumento da atividade locomotora nos animais quando avaliados no teste do CA mostrando, portanto, um efeito estimulante após o tratamento crônico. A este respeito, em alguns casos a substância (ou tratamento) pode afetar substratos neurais da memória e outros mecanismos não mnemônicos, como a atividade locomotora, dificultando a interpretação dos resultados, e para isso faz-se necessários estudos adicionais como dados neuroquímicos ou histológicos (QUILLFELDT, 2009). Assim, para evidenciar que o tratamento e as doses testadas levaram essencialmente ao efeito mnemônico, não sendo afetado, por exemplo, pelo desempenho motor, investigamos a atividade da AChE nas estruturas do córtex e do hipocampo, retirados dos animais tratados cronicamente com o EHE de *Ilex paraguariensis*, na tentativa de evitar resultados falso negativos. Este experimento teve como finalidade avaliar se a falta de efeito mnemônico do EHE na dose de 300 mg/kg deveu-se à interferência do efeito estimulante do extrato, além de investigar o possível mecanismo de ação envolvido no efeito benéfico observado sobre a memória dos animais.

No processo de aprendizado e memória, a acetilcolina (ACh) demonstra um papel importante na regulação da transmissão colinérgica envolvido neste processo. Embora outros neurotransmissores estejam envolvidos no processo cognitivo, o sistema colinérgico tem tido interesse predominante. Além disso, pesquisas têm evidenciado que o déficit cognitivo observado em doenças neurodegenerativas está associado a uma diminuição da concentração de ACh (BLOKLAND, 1996). Por exemplo, na doença de Alzheimer (DA), observa-se uma concentração reduzida de ACh no hipocampo e córtex promovida pela degeneração dos neurônios colinérgicos, sendo que o tratamento com anticolinesterásicos consiste em uma abordagem terapêutica eficaz para o tratamento da doença, uma vez que promove a melhora da função cognitiva (PERRY; WALKER; GRACE, 1990; SAXENA et al., 2008). Atualmente, produtos naturais com potencial

atividade anticolinesterásica têm sido investigados como possível abordagem terapêutica para DA, visto que as drogas atualmente utilizadas na clínica apresentam limitações.

No entanto, nossos resultados mostram que o efeito observado (não interferência) no processo de aprendizagem e memória observado após o tratamento crônico nas doses de 100 e 600 mg/kg com o EHE de *Ilex paraguariensis* não leva a alteração da atividade da AChE no hipocampo tampouco no córtex. Por outro lado, podemos associar o aumento da atividade da AChE na dose de 300 mg/kg com o prejuízo de aprendizado e memória observado no teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down*; tal comportamento é semelhante ao observado após o tratamento com drogas amnésicas, como escopolamina, no qual observa-se aumento da atividade da AChE em relação ao controle (LEHE et al., 2009). Desta maneira, é possível que ocorra uma diminuição nos níveis de ACh no hipocampo dos animais tratados cronicamente com o extrato em questão. O aprendizado observado na esQUIVA inibitória do tipo *step-down* está bastante relacionado com o funcionamento correto das funções hipocampais (IZQUIERDO; MEDINA, 1997), sendo assim, o prejuízo observado pode ser explicado pela alteração da transmissão colinérgica hipocampal. Embora a participação do sistema colinérgico demonstre um papel importante do processo cognitivo, este não parece ser o único sistema envolvido nos nossos resultados. Dados da literatura mostram que o antagonismo dos receptores de adenosina consiste em um mecanismo importante para o efeito benéfico do processo cognitivo. A este respeito, recentemente, Prediger e colaboradores (2008) mostraram o efeito benéfico do tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico de *Ilex paraguariensis* sobre a função cognitiva em ratos. Foi também observado um sinergismo após a coadministração de uma dose subefetiva de cafeína (1 mg/kg, i.p.) e *Ilex paraguariensis* na memória social. O conjunto de resultados obtidos neste estudo destaca o provável antagonismo de receptores de adenosina como responsável pelo efeito benéfico da função cognitiva. Assim, o mecanismo envolvido em relação ao efeito benéfico sobre a memória das metilxantinas poderia ser devido a um antagonismo competitivo dos receptores de adenosina (NEHLIG; DAVAL; DEBRY, 1992). Uma das ações da adenosina no SNC consiste na inibição da liberação de vários neurotransmissores, principalmente glutamato, através de receptores pré-sinápticos como mencionado anteriormente. Ainda, o antagonismo de adenosina, por metilxantinas, pode levar ao aumento da liberação de neurotransmissores incluindo noradrenalina, serotonina, acetilcolina (NEHLIG; DAVAL; DEBRY, 1992; FREDHOLM, 1999). É interessante ressaltar a interação entre cafeína e dopamina, sendo que o sistema dopaminérgico esta envolvido em diversos processos biológicos como atividade motora e ainda, associado ao aprendizado e memória (JAY, 2003).

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). Estudos tem assim sugerido o uso da cafeína como uma possível abordagem terapêutica para doenças neurodegenerativas como, por exemplo, a doença de Alzheimer (MAIA; MENDONÇA, 2002; DALL'IGNA et al., 2007).

Outros estudos apontam para o potencial benéfico de plantas ricas em flavonoides que levam a uma melhora da função cognitiva (MANDEL et al., 2004; SPENCER, 2010). 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. 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, esse talvez não seja o único mecanismo responsável por tal efeito (SPENCER, 2010). Decorrente da potencial atividade antioxidante destes compostos pode-se observar o efeito benéfico em doenças neurodegenerativas, uma vez que um dos mecanismos envolvidos na patologia dessas doenças é o estresse oxidativo (PRATICO; DELANTY, 2000; MANDEL et al., 2004). O efeito benéfico sobre a função cognitiva pode ser observado ainda em compostos como polifenóis devido a sua atividade antioxidante (LAU; SHUKITT-HALE; JOSEPH, 2005). Kwon e colaboradores (2010) evidenciam a melhora do déficit cognitivo na memória de trabalho e de curta duração induzido por escopolamina após o tratamento com ácido clorogênico, mostram ainda, que o ácido clorogênico inibe a atividade da AChE (*ex vivo*) no hipocampo e córtex frontal. Estas outras possibilidades devem ser melhor investigadas para os extratos em estudos posteriores.

Por fim, com a finalidade de investigar a possível atividade adaptogênica de *Ilex paraguariensis*, os animais foram submetidos a uma situação de estresse agudo após sete dias de tratamento com EHE e EA, e posteriormente avaliados no teste do CA para verificar possíveis alterações entre os grupos no desempenho motor. Foi também realizada a coleta de sangue para avaliar as possíveis alterações no nível de corticosterona plasmática.

Substâncias com atividade adaptogênica promovem a diminuição da reatividade ao estresse bem como a sensibilidade a estímulos estressores, prolongam a fase de resistência (efeito estimulante) e ainda previnem ou retardam a fase de exaustão (conferindo proteção contra o estresse em longo prazo) (PANOSSIAN; WIKMAN; WAGNER, 1999; PANOSSIAN;

WIKMAN, 2010). Ainda, são utilizadas cronicamente para neutralizar o estresse crônico e aumentar a resistência física, visando atenuar alguns transtornos decorrentes do envelhecimento como perda de memória e atenção, cansaço geral dentre outros (RUSSO, 2001; MENDES; CARLINI, 2007).

Embora no Brasil o termo adaptógeno não seja comumente empregado, muitas plantas de uso popular apresentam efeito semelhante a um adaptógeno, sendo, no entanto, pouco estudadas farmacologicamente. Essas plantas tônicas, estimulantes ou fortificantes como também são conhecidas, são utilizadas dentre outras finalidades para aumentar o desempenho físico e mental (WAGNER; NÖRR; WINTERHOFF, 1994). Como já mencionado na introdução deste trabalho algumas plantas utilizadas com esta finalidade incluem *Paullinia cupana* Kunth (guaraná), *Mauritia flexuosa* L. (buriti), *Theobroma cacao* L (cacau), e ainda *Ilex paraguariensis* (mate); algumas delas por apresentarem alta concentração de metilxantinas que exercem efeito psicoestimulante (MENDES; CARLINI, 2007).

Como esperado, os animais controle submetidos ao estresse, apresentaram uma redução significativa do número de cruzamentos quando comparados aos animais não estressados. O tratamento com extratos de *Ilex paraguariensis* não promoveu qualquer diferença significativa na atividade locomotora, quando comparados com o grupo controle estressado, embora seja notável um aumento no número de cruzamentos dos animais tratados com o EHE e EA em relação aos controles não estressados. Devido ao comprometimento locomotor dos animais após a contenção a 4°C, optou-se por não mensurar parâmetros relacionados à ansiedade no teste do CA, uma vez que, os resultados obtidos a partir deste protocolo não seriam confiáveis. Esse conjunto de dados nos leva a acreditar que o tratamento com o EHE e EA de *Ilex paraguariensis* restabelece, pelo menos parcialmente, o desempenho motor dos animais após o protocolo de estresse.

A determinação do nível de corticosterona plasmática revelou, como esperado, um aumento significativo no grupo controle estressado quando comparado ao grupo controle não estressado. No entanto, os grupos tratados com o EHE e EA não apresentaram qualquer alteração do nível de corticosterona plasmática quando comparado ao grupo controle estressado. Em outras palavras, o tratamento com *Ilex paraguariensis* não foi capaz de prevenir o aumento do nível de corticosterona plasmática promovido pelo estresse. Assim, nosso estudo preliminar da possível atividade adaptogênica de *Ilex paraguariensis* não revelou esta atividade. No entanto, o efeito adaptogênico é observado após tratamento prolongado, ao contrário de substâncias estimulantes em que a resposta é observada de forma aguda

(MENDES; CARLINI, 2007). Sendo assim, o protocolo utilizado para esta investigação talvez não tenha sido adequado para revelar tal atividade.

Em resumo, o trabalho partiu da investigação da possível atividade neurofarmacológica dos extratos obtidos das folhas de *Ilex paraguariensis*, extrato aquoso e hidroetanólico, considerando o grande uso pela população, principalmente como bebida alimentícia. Para tal, foi realizada a investigação dos efeitos do tratamento agudo com os extratos, não sendo, no entanto, obtidos resultados significantes em nenhum dos testes realizados. Partimos, então, para uma investigação mais ampla sendo avaliado o efeito comportamental do tratamento subcrônico e, posteriormente, o tratamento crônico desta espécie vegetal. De modo semelhante, o estudo foi ampliado para investigação do efeito do tratamento agudo dos extratos sobre a memória. Devido ao seu potencial efeito estimulante, foi realizada ainda, uma breve investigação da possível atividade adaptogênica desta espécie vegetal. Em resumo, nossos resultados mostraram uma atividade ansiolítica para o EHE de *Ilex paraguariensis* após o tratamento crônico em camundongos, e ainda um efeito estimulante motor do mesmo extrato. O EA, embora não altere significativamente parâmetros comportamentais avaliados neste trabalho, mostrou um efeito nootrópico promissor, uma vez que foi capaz de proteger a amnésia induzida por escopolamina. Devido ao tempo requerido e limitações técnicas para o preparo de compostos obtidos de *Ilex paraguariensis*, o trabalho foi focado no estudo dos extratos brutos (hidroetanólico e aquoso) desta espécie. No entanto, como perspectiva deste estudo ainda serão investigados o perfil neurofarmacológico das frações obtidas a partir do extrato bruto, bem como, de substâncias isoladas encontradas nesta espécie a fim de investigar e esclarecer os compostos responsáveis pelos resultados obtidos neste estudo. Mais estudos comportamentais e bioquímicos são necessários para investigar a possível atividade adaptogênica e os mecanismos de ação dos efeitos centrais da *Ilex paraguariensis*.

6 CONCLUSÕES

- O tratamento agudo e subcrônico com o EA e o EHE obtidos das folhas de *Ilex paraguariensis* não produziram atividade do tipo ansiogênica ou ansiolítica quando avaliados no teste do LCE. No entanto, o EHE de *Ilex paraguariensis* promoveu um efeito do tipo ansiolítico após o tratamento crônico.
- Quanto à atividade estimulante dos extratos, apenas o EHE promoveu aumento da atividade locomotora tanto no teste do LCE quanto do CA, após o tratamento subcrônico e crônico.
- O EA e EHE mostraram não afetar o processo de aprendizagem e memória dos animais após o tratamento agudo. No entanto, o tratamento agudo com o EA foi capaz de prevenir o déficit de memória induzido por escopolamina.
- O aumento da atividade da AChE foi observado na dose de 300 mg/kg dose em que o animal apresenta déficit cognitivo após o tratamento crônico com o EHE de *Ilex paraguariensis*. Por outro lado, as doses de 100 e 600 mg/kg não interferem no processo cognitivo não levando ainda a alterações da enzima em questão. Isto sugere a participação da ACh no processo cognitivo de *Ilex paraguariensis*, no entanto, não como mecanismo único.
- O protocolo utilizado para investigação da possível atividade adaptogênica neste trabalho não revelou tal atividade, embora tenha sido observada uma melhora parcial do desempenho locomotor dos animais tratados por sete dias com o EHE e EA de *Ilex paraguariensis* submetidos ao estresse de contenção no frio.
- Em resumo, os constituintes dos extratos de *Ilex paraguariensis* produziram, além da estimulação motora esperada pela presença das metilxantinas, um efeito do tipo ansiolítico e preveniram o déficit de memória induzido por escopolamina. Os mecanismos básicos destas atividades, assim como os constituintes responsáveis devem ser ainda investigados.

7 REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. M. V.; NOBRE, H. V. J. R.; MACÊDO, D. S.; OLIVEIRA, A. A.; FREITAS, R. M.; VASCONCELOS, S. M.; CUNHA, G. M. A.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.84, p.415–19, 2006.

ANGELUCCI, M. E.; VITAL, M. A.; CESARIO, C.; ZADUSKY, C. R.; ROSALEN, P. L.; DA CUNHA, C. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. **European Journal Pharmacology**, v.373, p.135-40, 1999.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v.21, n.2, p.205-35, 1973.

ÁRVORES E ARBUSTOS NATIVOS DO BRASIL. Disponível em: http://www.vivaterra.org.br/arvores_nativas.htm. Acesso em: 15 nov. 2010.

ASTIN, J. A. Why patients use alternative medicine: results of a national study. **The Journal of the American Medical Association**, v.279, p.1548-53, 1998.

ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v.55, p.853-57, 2000.

BASTOS, D. H. M.; OLIVEIRA, D. M.; MATSUMOTO, R. L. T.; CARVALHO, P. O.; RIBEIRO, M. L. Yerba maté: Pharmacological properties, Research and Biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v.1, n.1, p.37–46, 2007.

BEUTLER, J. A. Natural products as a foundation for drug discovery. **Current Protocols in Pharmacology**, (2009)
doi:10.1002/0471141755.ph0911s46.

BLOKLAND, A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? **Brain Research Reviews**, v.21, p. 285-300, 1996.

BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; DICKO, A.; YOUNOS, C.; SOULIMANI, G. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with

coupled anxiolytic and antioxidant effects. **Journal of the Neurological Sciences**, v.262, p.77–84, 2007.

BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIÈRE, B.; DHONNCHADHA, B. N.; HASCÖET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.21, p.567–74, 2007.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T., GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, (2010), doi:10.1016/j.jep.2010.06.032

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v.67, p.2141-153, 2004.

CAROBREZ A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, p.1193–205, 2005.

CARR, M. N.; BEKKU, N.; YOSHIMURA, H. Identification of anxiolytic ingredients in ginseng root using the elevated plus-maze test in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.531, p.160–65, 2006.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras: vol. 1**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, Brasília (DF): EMBRAPA-SPI, 2003.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação**, EdUFSCar: Sao Carlos, 2001.

CHA, H. Y.; PARK, J. H.; HONG, J. T.; YOO, H. S.; SONG, S.; HWANG, B. Y.; EUN, J. S.; OH, K. W. Anxiolytic-like effects of ginsenosides on the elevated plus-maze model in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.28, p.1621–25, 2005.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1033-43, 2000.

COLPO, G.; TREVISOL, F.; TEIXEIRA, A.M.;FACHINETTO, R.; PEREIRA, R. P.; ATHAYDE, M. L.; ROCHA, J. B. T.; BURGER, M. E. *Ilex paraguariensis* has antioxidant potential and attenuates haloperidol-

induced orofacial and memory dysfunction in rats. **Neurotoxicity Research**, v.12, n.3, p.171-80, 2007.

COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H.; An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of Cecropia species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, *in press*, 2011.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.49, n.1, p.171-76, 1994.

CUNHA, R. A.; AGOSTINHO, P. M. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.20 Suppl 1:S95-116, 2010.

DALL'IGNA, O. P.; FETT, P.; GOMES, M. W.; SOUZA, D. O.; CUNHA, R. A.; LARA, D. R. Caffeine and adenosine A_{2a} receptor antagonists prevent β -amyloid (25–35)-induced cognitive deficits in mice. **Experimental Neurology**, v.203, p.241–245, 2007.

DALY, J. W. Alkylxanthines as research tools. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v.81, n.1-3, p. 44-52, 2000.

DUARTE, F. S. **Participação das dihidroestiril-2-pironas e estéiril-2-pironas nas ações centrais do tipo-benzodiazepínicas da planta *Polygala sabulosa* A.W. (Polygalaceae) em roedores**. 2007. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 2007.

DUTRA, F. L. G. **Compostos fenólicos e metilxantinas em erva-mate armazenadas em sistema de estacionamento natural e acelerado**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós - Graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná, PR. 2009.

EL YACOUBI, M.; LEDENT, C.; PARMENTIER, M.; COSTENTIN, J.; VAUGEOIS, J. M. The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A_{2A} adenosine receptor antagonists. **Psychopharmacology**, v.148, p.153–63, 2000.

EL YACOUBI, M.; LEDENT, C.; MENARD, J. F; PARMENTIER, M.; COSTENTIN, J.; VAUGEOIS. The stimulant effects of caffeine on

locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, p.1465-73, 2000.

ELISABETSKY, E. New directions in ethnopharmacology. **Journal of Ethnobiology**, v.6, n.1, p.121-128, 1986.

ELISABETSKY, E.; SIQUEIRA, I. R. Is there a psychopharmacological meaning for traditional tonics? In: PRENDERGAST, H. D. V.; ETKIN, N. L.; HARRIS, D. R.; HOUGHTON, P. J. (Eds.), **Plants for Food and Medicine**. Royal Botanical Gardens, p.373–385, 1998.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed. por SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. Editora UFSC/Editora UFRGS, Florianópolis/Porto Alegre, 2007. p.107 – 118.

ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. The Status of Ethnopharmacology in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 137-143, 1993.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. JR.; FEATHERSTONE, R. M.A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, p. 88–95, 1961.

ESPEJO, E. F. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v.86, p.105–12, 1997.

FERRÉ, S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. **Journal of Neurochemistry**, v.105, p.1067–79, 2008.

FERRÉ, S.; FUXE, K.; VON EULER, G.; JOHANSSON, B.; FREDHOLM, B. B. Adenosine-dopamine interactions in the brain. **Neuroscience**, v.51, p.501–12, 1992.

FILIP, R.; LOPEZ, P.; GIBERTI, F.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v.72, p.774-8, 2001.

- FILIP, R.; LOTITO, S.B.; FERRARO, G.; FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v.20, n.10, p.1437-46, 2000.
- FREDHOLM, B. B.; BATTIG, K.; HOLMEN, J.; NEHLIG, A.; ZVARTAU, E. E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological Reviews**, v.51, p.83-133, 1999.
- GASIOR, M.; JASZYNA, M.; PETERS, J.; GOLDBERG, S. R. Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically exposed to caffeine: Effect of caffeine dose. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, n. 3, p.1101-111, 2000.
- GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system - A study of historical sources from the 16th to 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n.2, p.338-47, 2007.
- GIULIAN, R.; SANTOS, C. E. I.; SHUBEITA, S. M.; SILVA, L. M.; YONEAMA, M. L.; DIAS, J. F. The study of the influence of industrial processing on the elemental composition of mate tealeaves (*Ilex paraguariensis*) using the PIXE technique. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p.74-80, 2009.
- GLAVIN, G. B.; PARE, W. P.; SANDBAK, T.; BAKKE, H. K.; MURISON, R. Restraint stress in biomedical research: an update. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.18, n.2, p.223-49, 1994.
- GOMES, N. G. M.; CAMPOS, M. G.; ÓRFÃO, J. M. C.; RIBEIRO, C. A. F. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. **Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.33, p.1372-89, 2009.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ªed. por SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. Editora UFSC/Editora UFRGS, Florianópolis/Porto Alegre, 2007. p. 13-25.
- GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline Satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced

inhibition of plasminogen and antithrombin III. **Life Sciences**, v.72, p.279-92, 2002.

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

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.327, n.1, p.1-5, 1984.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications and technological considerations. **Journal of Food Science**, v.72, p.138-51, 2007.

HECK, C.I.; SCHMALKO, M.; MEJIA, E. G. de. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.8394-403, 2008.

HERRERA-RUIZ, M.; ROMÁN-RAMOS, R.; ZAMILPA, A.; TORTORIELLO, J.; JIMÉNEZ-FERRER, J. E. Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus-maze test. **Journal Ethnopharmacology**, v.118, n.2, p.312-7, 2008.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Twenty years of research into medicinal plants: results and perspectives. **Phytochemistry Reviews**, v.1, p.275-285, 2002.

HOSTETTMANN, K.; MARTSON, A. **Chemistry and Pharmacology of Natural Products: Saponins**. Cambridge University Press. Cambridge, 1995.

HOUGHTON, P.J.; SETH, P. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.75, p.497-99, 2003.

IBGE-Brasil. Produção da extração vegetal e da silvicultura – 2009. Acessado online:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2009/pevs2009.pdf>

ICH – International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2(R1), London, 2005.

IZQUIERDO, I.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M. M.; QUEVEDO, J.; RODRIGUES, C.; SANTÁNNA, M.K.; MADRUGA, M.; MEDINA, J.H. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. **Behavioural Pharmacology**, v.9, n.5-6, p.421-7, 1998.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connections to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.68, p.285-316, 1997.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; VIANNA, M. R. M.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v.103, p.1-11, 1999.

JAY, T. M. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. **Progress in Neurobiology**, v.69, p.375-90, 2003.

JI, H. F.; LI, X. J.; ZHANG, H. Y. Natural products and drug discovery. **EMBO reports**, v.10, n.3, p.194-200, 2009.

KANNUR, D. M.; HUKKERI, V. I.; AKKI, K. S. Adaptogenic activity of *Caesalpinia bonduc* seed extracts in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, p.327-331, 2006.

KARCZ-KUBICHA, M.; ANTONIOU, K.; TERASMAA, A.; QUARTA, D.; SOLINAS, M.; et al. Involvement of adenosine A₁ and A_{2A} receptors in the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. **Neuropsychopharmacology**, v.28, p.1281-91, 2003.

KUMRAL, A.; YESILIRMAK, D. C.; AYKAN, S.; GENÇ, S.; TUGYAN, K.; CILARES, S.; AKHISAROĞLU, M.; AKSU, I.; SUTCUOĞLU, S.; YILMAZ, O.; DUMAN, N. OZKAN, H. Protective Effects of Methylxanthines on hypoxia-induced apoptotic neurodegeneration and long-term cognitive functions in the developing rat brain. **Neonatology**, v.98, p.128-36, 2010.

KWON, S. H.; LEHE, H. K.; KIM, J. A.; HONG, S. I.; KIM, H. C.; JO, T. H.; PARK, Y. I.; LEHE, C. K.; KIM, Y. B.; LEHE, S. L.; JANG, C. G. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.649, p.210-21, 2010.

LAU, F. C.; SHUKITT-HALE, B. JOSEPH, J. A. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. **Neurobiology of Aging**, v.26, p.128–32, 2005.

LAZAREV, N.V. General and specific in action of pharmacological agents. **Farmakologija i toksikologija**, v.21, p81–86, 1958.

LEHE, Y. K.; YUK, D. Y.; KIM, T. I.; KIM, Y. H.; KIM, K. T.; LEE, B. J.; NAM, S. Y.; HONG, J. T. Protective effect of the ethanol extract of *Magnolia officinalis* and 4-O-methylhonokiol on scopolamine-induced memory impairment and the inhibition of acetylcholinesterase activity. **Journal of Natural Medicines**, v.63, n.3, p.274-82, 2009.

LIMA, J. A.; COSTA, R. S.; EPIFÂNIO, R. A.; CASTRO, N. G.; ROCHA, M. S.; PINTO, A. C. *Geissospermum vellosii* stem bark anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.92, p.508–13, 2009.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v.92, n.2, p.180-5, 1987.

LOIZEAU, P. A.; BARRIERA, G.; MANEN, J.F.; BROENNIMANN O. Towards an understanding of the distribution of *Ilex* L. (Aquifoliaceae) on a World-wide scale. In: FRIIS, I., BALSLEV, H. (Eds.), **Plant Diversity and Complexity Patterns. Local, Regional and Global Dimensions**. Biologiske Skrifter, v.55, p. 501–20, 2005.

LÓPEZ-REVUELTA, A.; SÁNCHEZ-GALLEGO, J. I.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ-YAGÜE, J.; LLANILLO, M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v.161, p.79–91, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 265–75, 1951.

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

MANDEL, S.; WEINREB, O.; AMIT, T.; YODIM, M. B. H. Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for

neurodegenerative diseases. **Journal of Neurochemistry**, v.88, p.1555–69, 2004.

MAZZAFERA, P. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.6, p.149-51, 1994.

MCLATCHEY, W. C.; MAHADY, G. B.; BENNETT, B. C.; SHIELS, L.; SAVO, V. Ethnobotany as a pharmacological research tool and recent developments in CNS-active natural products from ethnobotanical sources. **Pharmacology & Therapeutics**, v.123, p.239–54, 2009.

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.493–500, 2007.

MILIOLI, E. M.; COLOGNI, P.; SANTOS, C.C.; MARCOS, T. D.; YUNES, V. M.; FERNANDES, M. S.; SCHOENFELDER, T.; COSTA-CAMPOS, L. Effect of acute administration of hydroalcoholic extract of *Ilex paraguariensis* St Hilaire (Aquifoliaceae) in animal models of Parkinson's disease. **Phytotherapy Research** v.21, p.771–6, 2007.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Química Nova**, v.24, n.1, p.105 -111, 2001.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.48, n.4, p.254-60, 1955.

NEHLIG, A.; DAVAL, J. L.; DEBRY, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. **Brain Research Reviews**, v.17, p.1139-170, 1992.

NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, p.2589–99, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years **Journal Natural Products**, v.70, p.461-77, 2007.

O'CONNOR, K.A.; ROTH, B.L. Screening the receptorome for plant based psychoactive compounds. **Life Sciences**, v.78, p.506-11, 2005.

OHNISHI, R.; ITO, H.; IGUCHI, A.; SHINOMIYA, K.; KAMEI, C.; HATANO, T.; YOSHIDA, T. Effects of chlorogenic acid and its metabolites on spontaneous locomotor activity in mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.70, n.10, p.2560-3, 2006.

OKADA, M.; MIZUNO, K.; KANEKO, S. Adenosine A1 and A2 receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. **Neuroscience Letters**, v. 212, p.53–6, 1996.

PALADINI, A. C.; MARDER, M.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; WASOWSKI, C.; MEDINA, J. H. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.51, n.5, p.519-26, 1999.

PANOSSIAN, A.; WIKMAN, G. Effects of adaptogens on the central nervous system and the molecular mechanisms associated with their stress - protective activity. **Pharmaceuticals**, v.3, p.188-224, 2010.

PANOSSIAN, A.; WIKMAN, G.; WAGNER, H. Plant adaptogens III: Earlier and more recent aspects and concepts on their modes of action. **Phytomedicine**, v.6, p.287-300, 1999.

PARK, K. S.; OH, J. H.; YOO, H. S.; LEHE, Y. M.; LEHE, M. K.; HONG, J. T.; OH, K. W. (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) reverses caffeine-induced anxiogenic-like effects. **Neuroscience Letters**, v.481, p.131–4, 2010.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica - Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, n.3, p.149-67, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v.24, n.3, p.525-9, 1986.

PERRY, E.; WALKER, M.; GRACE, J. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? **Trends in Neurosciences**, v.22, p.273–280, 1990.

PRATICO, D.; DELANTY, N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. **The American Journal of Medicine**, v.109, p.577–85, 2000.

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, S205–S220, 2010.

PREDIGER, R. D. S.; FERNANDES, M. S.; RIAL, D.; WOPEREIS, S.; PEREIRA, V.S.; BOSSE, T. S.; SILVA, C. B.; CARRADORE, R. S.; MACHADO, M. S.; CECHINEL-FILHO, V.; COSTA-CAMPOS, L. 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.465–73, 2008.

PREDIGER, R.D.; 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 A_{2A} receptors. **Neurobiology Aging**, v.26, p.957–64, 2005.

PU, F.; MISHIMA, K.; IRIE, K.; MOTOHASHI, K.; TANAKA, Y.; ORITO, K.; EGAWA, T.; KITAMURA, Y.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M. 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 Science**, v.104, p.329–34, 2007.

QUILLFELDT, J. A. Behavioral methods to study learning and memory in rats. In: Andersen, M. L. (Org.). **Ethical and Practical Principles of Experimental Animal Use**. 1sted., 2009.

RAI, D.; BHATIA, G.; SEN, T.; PALIT, G. Anti-stress effects of *Ginkgo biloba* and *Panax ginseng*: a comparative study. **Journal of Pharmacological Science**, v.93, p.458–64, 2003.

RAO, V. S. N.; SANTOS, F. A.; PAULA, W. G.; SILVA, R. M.; CAMPOS, A. R. Effects of acute and repeated dose administration of caffeine and pentoxifylline on diazepam-induced mouse behavior in the hole-board test. **Psychopharmacology**, v.144, p.61–6, 1999.

RATES, S. M. K. Metilxantinas. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed. por SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. Editora UFSC/Editora UFRGS, Florianópolis/Porto Alegre, 2007. p.903 – 918.

REGE, N. N.; THATTE, U. M.; DHANUKAR, S. A. Adaptogenic properties of six rasayana herbs used in ayurvedic medicine. **Phytotherapy Research**, v.13, p.275–91, 1999.

REGINATTO, F. H.; ATHAYDE, M. L.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species – Caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.10, n.6, p. 443–6, 1999.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEHENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed. por SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. Editora UFSC/Editora UFRGS, Florianópolis/Porto Alegre, 2007. p.45-74.

RIEDEL, W.; HOGERVORST, E.; LÉBOUX, R.; VERHEY, F.; PRAAG, H.; JOLLES, J. Caffeine attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. **Psychopharmacology**, v.122, n.2, p.158-68, 1995.

RODGERS, R. J., SHEPHERD, J. K. Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. **Psychopharmacology**, v.113, p.237–42, 1993.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER SJ; HENDRIE CA (Eds.), **Ethology and Psychopharmacology**. Wiley: Chichester, p.9–44, 1994.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C.; ABOUALFA, K.; STEPHENSON, L H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative ‘anxiogenic’ agents in the mouse elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.52, n.4, p. 805-13, 1995.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.21, n.6, p. 801-10, 1997.

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, p.129–35, 2005.

ROESLER, R.; WALZ, R.; QUEVEDO, J.; DE-PARIS, F.; ZANATA, S. M.; GRANER, E.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V. R.; BRENTANI, R. R. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). **Molecular Brain Research**, v.71,p.349–53, 1999.

RUSSO, E. Adaptogens. In: Russo, E. (Ed.), **Handbook of psychotropic herbs. A scientific analysis of herbal remedies for psychiatric conditions**. The Haworth Press Inc., New York, 2001. p. 181–98.

SAXENA, G.; SINGH, S. P.; AGRAWAL, R.; NATH, C. Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.581, p. 283–9, 2008.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed. por SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. Editora UFSC/Editora UFRGS, Florianópolis/Porto Alegre, 2007. p.711 – 740.

SCHIFFMANN, S. N.; LIBERT F.; VASSART; G.; VANDERHAEGHEN, J. J. Distribution of adenosine A₂ receptor mRNA in the human brain. **Neuroscience Letters**, v.130, p. 177–81, 1991.

SCHIFFMANN, S. N.; VANDERHAEGHEN, J. J. Adenosine A₂ receptors regulate the gene expression of striatopallidal and striatonigral neurons. **The Journal of Neuroscience**, v.13, n.3, p.1080–7, 1993.

SCHINELLA, G. R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P. M.; TOURNIER, H. A. antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.269, p.357–60, 2000.

SCHUBERT, A.; ZANIN, F. F.; PEREIRA, D. F.; ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. (erva mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v.29, n. 6, p.1233-36, 2006.

SENA, L. M. **Atividade neurofarmacológica do pericarpo dos frutos de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa Degener* (maracujá) em camundongos: envolvimento de flavonoides C-glicosídeos.** 2009. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 2009.

SHI, D.; DALY, J. W. Chronic effects of xanthines on levels of central receptors in mice. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.19, n.6, p.719-32, 1999.

SIEGEL, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **Journal of Psychology**, 21: 227-236, 1946.

SIMOLA, N.; TRONCI, E.; PINNA, A.; MORELLI, M. Subchronic-intermittent caffeine amplifies the motor effects of amphetamine in rats. **Amino Acids**, v.31, p.359–63, 2006.

SNYDER, S. H.; KATIMS, J. J.; ANNAU, Z.; BRUNS, R. F.; DALY, J. W. Adenosine receptors and behavioral actions of methylxanthines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.78, n.5, p.3260-4, 1981.

SOLINAS, M.; FERRÉ, S.; YOU, Z. B.; KARCZ-KUBICHA, M.; POPOLI, P.; GOLDBERG, S. R. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. **Journal of Neuroscience**, v.22, n15, p.6321-4, 2002.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.219–243, 2004.

SPENCER, J. P. E. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. **British Journal of Nutrition**, v.104, p.40-7, 2010.

TRADE WINDS FRUIT (TWF). Disponível em: http://www.tradewindsfruit.com/yerba_mate.htm. Acesso em: 15 nov. 2010.

USDA, ARS, **National Genetic Resources Program**. 2007. Germplasm Resources Information Network (GRIN) [Online Database]. Beltsville, Maryland: Natl. Germplasm Resources Laboratory. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/cgibin/npgs/html/taxon.pl?19756>.

VIGNES, M.; MAURICE, T.; LANTÉ, F.; NEDJAR, M.; THETHI, K.; GUIRAMAND, J.; RÉCASSENS, M. Anxiolytic properties of green tea polyphenol (–)-epigallocatechingallate (EGCG). **Brain Research**, v.1110, p.102-115, 2006.

VIVA TERRA. Disponível em:

http://www.vivaterra.org.br/arvores_nativas.htm#. Acesso em: 15 nov. 2010.

WAGNER, H.; NÖRR, H.; WINTERHOFF, H. Plant adaptogens. **Phytomedicine**, v.1, p.63–76, 1994.

WEI, X. Y.; YANG, J. Y.; WANG, J. H.; WU, C. F. Anxiolytic effect of saponins from *Panax quinquefolium* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.613–18, 2007.

WEISS, S. M.; WADSWORTH, G.; FLETCHER, A.; DOURISH, C. T. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.23, p.265–71, 1998.

XIE, X.; RAMKUMAR, V.; TOTH, L. A. Adenosine and dopamine receptor interactions in striatum and caffeine-induced behavioral activation. **Comparative Medicine**, v.57, p.538–45, 2007.

YANG, J. H.; HAN, S. J.; RYU, J. H.; JANG, I. S.; KIM, D. H. Ginsenoside Rh2 ameliorates scopolamine-induced learning deficit in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.32, n.10, p.1710-5, 2009.

YUAN, C.S.; ATTELE, A.S.; WU, J.A.; LIU, D. Modulation of American ginseng on brainstem GABAergic effects in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.62, p.215–22, 1998.

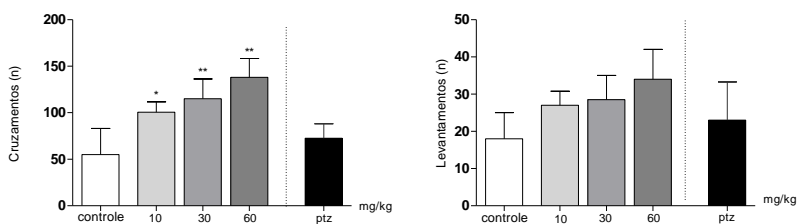
ZHANG, Z. L. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. **Life Sciences**, v.75, p.1659–99, 2004.

ANEXO

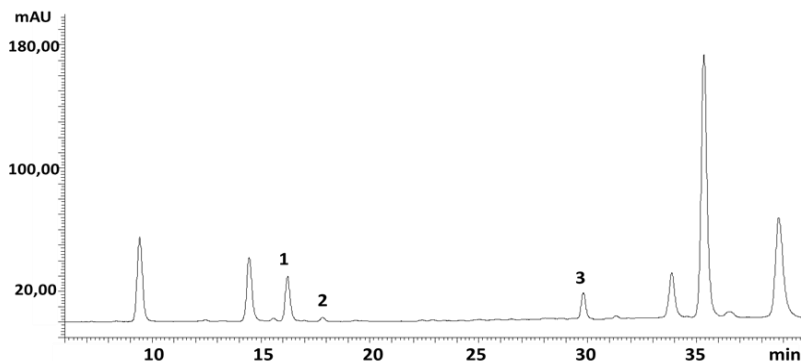
Anexo I. Efeito da cafeína no teste do labirinto em cruz elevado (10 – 60 mg/kg, i.p.; 30 min).

	controle	PTZ	10 mg/kg	30 mg/kg	60 mg/kg
%TA	6,81±4,04	5,05±1,65	6,07±3,40	9,44±2,89	6,41±2,65
%EA	9,23±4,73	13,61±3,71	6,08±2,66	10,85±3,01	8,12±3,06
TE	14,57±2,41	13,67±1,45	19,88±1,54	18,13±2,44	24,38±2,30*
EF	12,86±2,04	13,00±1,71	18,50±1,28	15,88±2,07	22,25±2,07**
CL	19,00±2,43	12,67±2,83	15,50±2,23	14,75±1,74	19,25±3,82
EC	4,14±0,98	5,00±2,70	2,00±0,84	3,12±1,07	2,37±1,36
IC	8,71±1,79	5,00±1,59	7,37±1,30	9,00±1,45	12,38±2,17
AU	1,14±0,50	0,85±0,34	1,00±0,26	1,00±0,59	1,37±0,37

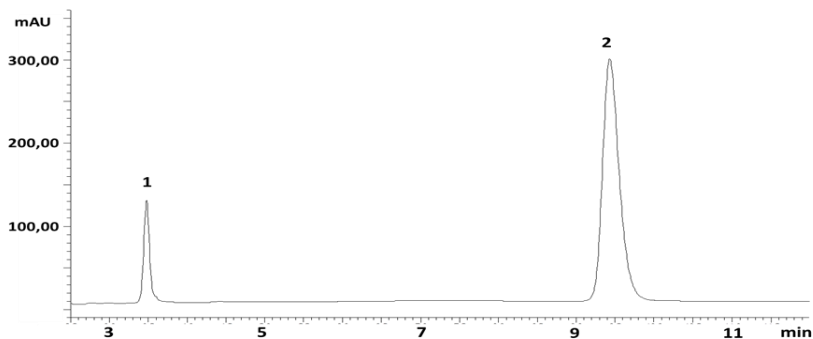
PTZ (20mg/kg, i.p.) foi usado como droga ansiogênica padrão. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M.; n=7-8 animais. * $P<0,05$ e ** $P<0,01$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do PTZ).



Anexo II. Efeito da cafeína no teste do campo aberto. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M.; n=7-8 animais. Pentilenotetrazol (PTZ, 20 mg/kg; i.p.) foi utilizado como droga ansiogênica padrão. * $P<0,05$ e ** $P<0,01$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do PTZ).



Anexo III. Cromatograma do extrato aquoso das folhas de *I. paraguariensis* (1 mg/mL) por CLAE/DAD com detecção em 320 nm. As condições cromatográficas estão descritas na Seção Materiais e Métodos. 1. Ácido Clorogênico; 2. Ácido Caféico; 3. Rutina.



Anexo IV. Cromatograma do extrato aquoso das folhas de *I. paraguariensis* (2 mg/mL) por CLAE/DAD com detecção em 280 nm. As condições cromatográficas estão descritas na Seção Materiais e Métodos. 1. Teobromina; 2. Cafeína.

Anexo V: Teores de metilxantinas nos extratos^a

Tipo de extrato/fração	Metilxantinas	
	Teobromina (TR: 3,5 min)	Caféina (TR: 9,5 min)
Extrato aquoso	4,6 ± 0,03	42,5 ± 0,11
Extrato hidroetanólico	4,4 ± 0,02	42,0 ± 0,10

^a: Expressos em mg/g de extrato ± DP ($n = 3$)