

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

CLAUDINI HONÓRIO DE PIERI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MNEMÔNICA DAS FRAÇÕES
BUTANÓLICA E RICA EM SAPONINAS DE *Ilex paraguariensis***

**FLORIANÓPOLIS
2015**

Claudini Honório de Pieri

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MNEMÔNICA DAS FRAÇÕES
BUTANÓLICA E RICA EM SAPONINAS DE *Ilex paraguariensis***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Ciências Biológicas do Centro de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

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

Coorientadora: M.Sc. Evelyn Cristina
da Silva Santos.

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

de Pieri, Claudini Honório

Avaliação da atividade mnemônica das frações butanólica e
ríca em saponinas de *Ilex paraguariensis* / Claudini Honório
de Pieri ; orientadora, Thereza Christina Monteiro de Lima
; coorientadora, Evelyn Cristina da Silva Santos. -
Florianópolis, SC, 2015.

63 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Memória. 3. Erva-mate. I. de
Lima, Thereza Christina Monteiro. II. Santos, Evelyn
Cristina da Silva. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Claudini Honório de Pieri

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MNEMÔNICA DAS FRAÇÕES
BUTANÓLICA E RICA EM SAPONINAS DE *Ilex paraguariensis***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para a obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 5 de fevereiro de 2015.

Prof^a. Dr^a Maria Risoleta Freire Marques
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora:



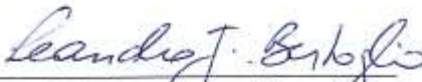
Prof^a. Dr^a. Thereza Christina Monteiro de Lima
Presidente

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger
Membro Titular

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Leandro José Bertoglio
Membro Titular

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Geison Souza Izídio
Membro Suplente

Universidade Federal de Santa Catarina

Dedicado à Maria Nirce de Pieri, João
Teixeira de Pieri, Rita Ana Rosa (*in
memorian*) e Elmir Tiago Honório (*in
memorian*).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João Teixeira de Pieri e Maria Nirce de Pieri, por terem me educado à base de respeito, conversa e muito amor. Pela incansável paciência que têm comigo, por sempre depositarem confiança nas minhas capacidades e nunca medirem esforços para que eu pudesse alcançar os meus objetivos.

À professora Thereza C. M. de Lima, por ter me acolhido com carinho em seu laboratório quando eu ainda era caloura, oferecer condições para que eu permanecesse nele, pelos conselhos, por acalmar-me nos momentos de nervosismo e ser um exemplo para mim. Obrigada por tudo, prof!

Aos professores Rui Prediger, Leandro Bertoglio e Geison Izídio pela participação não só banca avaliadora deste trabalho, mas também pela convivência e aprendizado ao longo dos anos da minha iniciação científica.

Ao professor Flávio Henrique Reginatto e ao Carlos Henrique Blum-Silva, pelo preparo das frações e fornecimento dos demais dados químicos da espécie estudada.

Aos amigos que a Biologia me trouxe: Bárbara Martins, Débora Pereira, Franciele Dutra, Gabriel Matos, Gabriela Almeida, Guilherme Medeiros, Mariana Becker, Tomás Pessatti – obrigada pelos momentos de diversão e pelo desespero pré-provas e trabalhos. À Leandra Formentão, por ter sido uma anja presente até o final da graduação e sempre ter me ajudado quando precisei. Em especial, à Roberta Ribeiro, por fazer a melhor grade de horários sempre, por dividir comida comigo, pelos momentos de cilada e prova surpresa e por ser minha irmã desde o primeiro dia de aula (*Ohana quer dizer família...*).

Aos amigos do Laboratório de Neurofarmacologia: Alexandre Hoeller, Ana Paula Costa, Andressa Gazola, Evelyn Santos, Felipe Vanz, Gilliard Lach, Júlia Vaz, Maíra Bicca, Marcelo Duzzioni, Nayana Moreira, Pablinny Galdino, Renata Marchette e Vagner Linartevichi, por terem feito do laboratório uma extensão da minha casa. Obrigada por todos os momentos que passamos juntos fazendo experimento, aprendendo, comendo e nos divertindo dentro e fora do LabThê. Aos amigos do Departamento de Farmacologia: Alessandra Martini, Filipe Carvalho, Karina Sobota, Karla Guarido, Lucas Gazarini, Marília Bessa (e Guri!) e Stefânia Forner, por todos os bons momentos que dividimos.

Às maravilhosas e insubstituíveis amigas Franciele Ribeiro, Karolina Hardt, Maria Alice Trentini, Rebecca Haas e Thaís Bardini, porque não há distância, tempo e nem espaço que diminua o amor que

sinto por vocês. Ao Edwaldo Monteiro, pelo apoio, paciência e companheirismo nos últimos anos.

À Ana Paula Costa, por tantas coisas que fica até difícil escrever. Pelo amor, pela confiança, por ser quem eu quero ser quando crescer e por construir junto comigo uma amizade que se faz presente mesmo à distância.

À Renata Marchette, por estar sempre disposta a ajudar, ser uma amiga sensível, cheia de doçuras, companheira de indignações e por me mostrar que devo ser eu mesma, apesar de ser tão diferente dela própria. *Te carrego dentro do coração!*

Ao Gilliard Lach, por ser meu companheiro de laboratório, meu amigo para conversas sem noção e de cunho emocional e psicológico. Sem você, eu não teria me sentido tão em casa no lab desde o primeiro dia.

E por último, mas longe de ser a menos importante: à Evelyn Santos, a coorientadora mais presente e atenciosa do mundo. Obrigada por tudo que você fez por mim nesses anos, pelas festas de aniversário compartilhadas, por ser paciente e me orientar sempre pelo melhor caminho. Faltam-me palavras para agradecer por todo o apoio, ideias e parceria, amora!

Ao CNPq e à UFSC pelo financiamento através do PIBIC.

RESUMO

A *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate, é uma espécie arbórea nativa da América do Sul. Ainda que existam trabalhos relatando os efeitos antioxidante, anti-inflamatório, antimutagênico e de inibição de LDL desta espécie, até o presente momento, apenas seis estudos relatam seu efeito no sistema nervoso central. Estudos prévios do laboratório mostraram que o tratamento agudo com o extrato aquoso desta planta é capaz de impedir o prejuízo de memória induzido pela administração de escopolamina. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade mnemônica das frações butanólica e rica em saponinas obtidas a partir das folhas de *I. paraguariensis*. Camundongos *Swiss* machos (40 a 50 g), foram submetidos ao tratamento agudo por via oral (0,1 mL/10 g) com as doses de 10, 30 ou 60 mg/kg de uma fração rica em saponinas ou butanólica, sendo utilizada solução salina como controle e escopolamina (1 mg/kg), uma droga amnésica, como controle positivo. Trinta minutos após o tratamento, grupos independentes de animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de objeto e ao teste esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. A fração rica em saponinas *per se* não promove nenhuma alteração na memória dos animais avaliados no teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down* e de reconhecimento de objeto. O mesmo ocorre quando avaliamos a atividade da fração butanólica *per se*, exceto a dose de 60 mg/kg, que apresentou uma redução da latência para a descida da plataforma, sugerindo um possível prejuízo mnemônico causado por esta fração no teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. Todas as doses da fração butanólica foram capazes de prevenir o déficit cognitivo induzido pela escopolamina no teste de reconhecimento de objeto, enquanto a dose de 60 mg/kg da fração rica em saponinas foi capaz de prevenir a perda de memória induzida pela escopolamina no teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. Os dados referentes à prevenção do déficit cognitivo provocado pelas frações apontam que os diferentes compostos presentes em cada uma delas podem estar atuando em regiões cerebrais distintas, e que o sinergismo destas substâncias presentes na *I. paraguariensis* parece atuar para a promoção de uma atividade neuroprotetora. Desta forma, este trabalho ressalta a importância desta espécie vegetal pelo seu potencial terapêutico para o tratamento de doenças relacionadas com o processo cognitivo, como a doença de Alzheimer.

Palavras-chave: erva-mate; memória; reconhecimento de objetos; esQUIVA inibitória.

ABSTRACT

Ilex paraguariensis A. St.-Hil. (Aquifoliaceae), popularly known as yerba-maté, is a native tree species from South America. Although there are studies reporting antioxidant, anti-inflammatory and antimutagenic effects, as well as the inhibition of LDL by this species, there are only six studies reporting its effect upon the central nervous system, so far. Previous studies also showed that the acute treatment using the aqueous extract of this plant is able to prevent the memory impairment induced by scopolamine administration. Thus, the objective of this study was to investigate the mnemonic activity of the butanolic fraction and saponin enriched fraction, obtained from the leaves of *I. paraguariensis*. Swiss male mice (40 g to 50 g) were orally treated (0.1 ml/10g) with 10, 30 or 60 mg/kg doses of saponin enriched fraction and butanolic fraction. Saline solution was used as control and scopolamine (1 mg/kg), an amnesic drug, was used as a positive control. Thirty minutes after treatments, independent groups of animals were evaluated in the object recognition test and the *step-down* inhibitory avoidance test. The saponin enriched fraction *per se* did not promote any changes in the memory of animals when evaluated in the *step-down* inhibitory avoidance test as well as in the object recognition test. The same was observed when evaluating the activity of butanolic fraction *per se*, except for the 60 mg/kg dose which reduced the latency during the descent of the platform, suggesting a possible mnemonic damage caused by this fraction in the *step-down* inhibitory avoidance test. All doses of the butanolic fraction were able to prevent scopolamine-induced cognitive deficits in the object recognition test, whereas the dose of 60 mg/kg from the saponin enriched fraction prevented the memory impairment induced by scopolamine in the *step-down* inhibitory avoidance test. Data related to the prevention of cognitive impairment caused by these fractions indicate that the different compounds in each of them may be acting in different brain regions, and the synergism of these substances in *I. paraguariensis* seems to act to improve neuroprotective activities. Thus, this study highlights the importance of this plant species as a potential therapeutic tool for the treatment of diseases related to cognitive processes, such as the Alzheimer's disease.

Keywords: yerba-mate; memory; object recognition; inhibitory avoidance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fontes de moléculas para drogas de 1981 a 2010.....	20
Figura 2. Representação e foto de <i>Ilex paraguariensis</i>	22
Figura 3. Protocolo experimental para a avaliação da atividade <i>per se</i> das frações butanólica e rica em saponinas de <i>Ilex paraguariensis</i>	30
Figura 4. Protocolo experimental para a avaliação da atividade preventiva de déficit cognitivo das frações butanólica e rica em saponinas de <i>Ilex paraguariensis</i>	30
Figura 5. Teste de esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	31
Figura 6. Teste do reconhecimento de objeto.....	32
Figura 7. Efeito do tratamento agudo da fração butanólica de <i>Ilex paraguariensis</i> na memória de camundongos submetidos ao teste de esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	36
Figura 8. Efeito do tratamento agudo da fração rica em saponinas de <i>Ilex paraguariensis</i> na memória de camundongos submetidos ao teste de esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	38
Figura 9. Efeito do tratamento agudo da fração butanólica de <i>Ilex paraguariensis</i> na memória de camundongos submetidos ao teste de reconhecimento de objeto.....	40
Figura 10. Efeito do tratamento agudo da fração rica em saponinas de <i>Ilex paraguariensis</i> na memória de camundongos submetidos ao teste de reconhecimento de objeto.....	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Síntese dos resultados obtidos na avaliação da atividade mnemônica das frações butanólica e saponinas de <i>Ilex paraguariensis</i>	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh – acetilcolina

AChE – acetilcolinesterase

AMPC – 3',5'-monofosfato de adenosina cíclica

BChE – butirilcolinesterase

BuOH – butanólica

CTL – controle

DA – doença de Alzheimer

DP – doença de Parkinson

E.P.M. – erro padrão da média

ESCOP – escopolamina

GMPc – 3',5'-monofosfato de guanosina cíclica

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

SAP – saponinas

SNC – Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos específicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Animais	29
3.2 Material Vegetal.....	29
3.3 Drogas e Tratamento	29
3.4 Testes Comportamentais	30
3.4.1 Teste de Esquiva Inibitória do Tipo <i>Step-down</i>	30
3.4.2 Teste de Reconhecimento de Objeto	31
3.5 Análises Estatísticas	32
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Teste de Esquiva Inibitória do Tipo <i>Step-down</i>	35
4.2 Teste de Reconhecimento de Objeto	39
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÕES	51
7 REFERÊNCIAS	53
ANEXO I - Principais atividades biológicas de diferentes tipos de saponinas.....	63

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas pelos seres humanos data de, pelo menos, 60.000 anos atrás, no período Paleolítico Médio, por conta da descoberta de pólen de flores junto aos fósseis de neandertais (SOLECKI, 1975). Registros escritos, porém, datam de 5.000 anos atrás, provenientes dos Sumérios, ainda que se acredite que o uso de plantas medicinais seja bem mais antigo (RASKIN *et al.*, 2002). Isto mostra o quanto as civilizações desenvolveram, ao longo de muito tempo, uma estreita relação com espécies vegetais de interesse alimentício, decorativo e medicinal. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 65-80% da população de países em desenvolvimento fazem uso de plantas medicinais, tendo nelas sua principal forma de tratamento, uma vez que possuem dificuldades de acesso à medicina moderna (CALIXTO, 2005; FABRICANT, 2001). Em 1978, através da Declaração de Alma-Ata, a OMS endossou a importância das plantas e a ligação delas com o ser humano ao destacar a necessidade de valorização dos fitoterápicos. Além disto, reconheceu e recomendou o uso e disseminação de plantas medicinais entre as populações com o objetivo de reduzir os custos dos programas de saúde (VEIGA-JR, PINTO & MACIEL, 2005), já que tais fitoterápicos podem ser cultivados em hortas coletivas ou particulares.

Apesar da competição com outras drogas sintéticas, os produtos naturais (derivados não só de plantas, mas também de fungos e bactérias) ainda constituem novos e promissores candidatos ao desenvolvimento de drogas (BUTLER, 2004). Neste quesito, a América Latina, especificamente o Brasil, poderia ser um grande fornecedor de candidatos a novos produtos, já que possui extensa biodiversidade de plantas. Apesar de possuir, sozinho, 20-25% do total de plantas e microrganismos existentes no mundo, apenas 0,4% da flora brasileira está documentada medicinalmente (CALIXTO, 2005; GURIB-FAKIM, 2006). No entanto, este não é um problema apenas da América Latina, já que, em todo o mundo, apenas 6% das plantas existentes foram estudadas para atividade biológica e 15% para a fitoquímica (VERPOORTE, 2000).

Neste panorama, é muito útil o uso da etnobotânica moderna para o descobrimento de novas substâncias químicas que possam ser utilizadas no desenvolvimento de drogas. A etnobotânica foi definida por Shultes, em 1967, como “as relações entre o homem e a vegetação do ambiente” (GURIB-FAKIM, 2006). Estima-se que 122 drogas provenientes de 94 espécies de plantas tenham sido descobertas através de estudos etnobotânicos, como a morfina, um alcaloide

hipnoanalgésico derivado da *Papaver somniferum*, e a vincristina, um composto antitumoral proveniente de *Vinca* spp. (GU *et al.*, 2014). Em seu trabalho de revisão, Newman & Cragg (2012) mostram que somente 36% das drogas aprovadas entre 1981 e 2010 tem suas moléculas ativas produzidas sinteticamente, como mostra a figura 1. As demais moléculas foram retiradas diretamente de plantas ou outras fontes naturais ou, ainda, são inspiradas em produtos naturais.

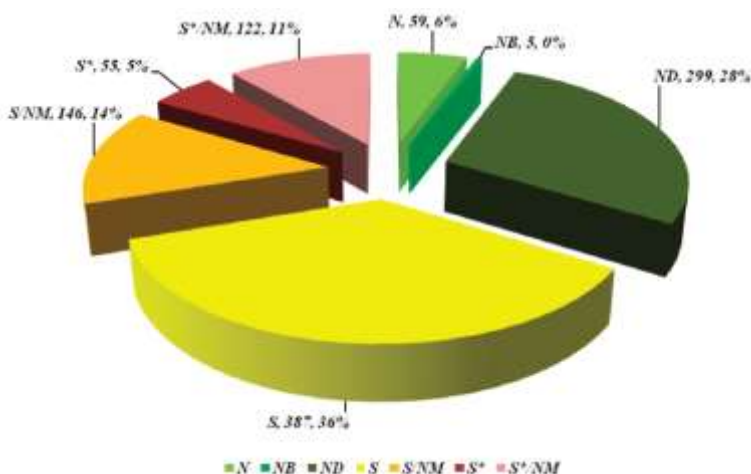


Figura 1. Fontes de moléculas para drogas de 1981 a 2010: (N) produtos naturais, (ND) derivado de produtos naturais, (NB) produto natural botânico, (S) droga totalmente sintética, (S*) droga sintética no qual o farmacóforo partiu de um produto natural, (NM) mimetiza produto natural. Adaptado de Newman & Cragg (2012).

Além de serem utilizadas no tratamento de doenças como câncer, diabetes, problemas respiratórios e cardiovasculares, as plantas também possuem importantes atividades no sistema nervoso central (SNC) (GURIB-FAKIM, 2006; SULTANA *et al.*, 2014). Algumas das plantas que atuam no SNC são a *Piper methysticum* (kava), apresentando atividade ansiolítica, a *Valeriana officinalis* (valeriana), empregada para o tratamento de distúrbios do sono, o *Hypericum perforatum* (erva de São João), possuindo efeitos antidepressivos e as diferentes espécies de *Passiflora*, popularmente conhecidas como maracujá, que possuem efeitos antidepressivos, ansiolíticos e sedativos (GURIB-FAKIM, 2006; SENA *et al.*, 2009).

Entre os transtornos neurológicos mais estudados estão as doenças neurodegenerativas, visando o fato de que a expectativa de vida da população está aumentando mundialmente com o avanço da tecnologia e da medicina. A doença de Alzheimer é a forma mais prevalente de neurodegeneração. Porém, apesar de já serem conhecidos os principais aspectos fisiopatológicos que contribuem para a progressão da doença, como a perda neuronal, as placas senis e os oligômeros de β -amiloide, não existe ainda nenhuma droga capaz de parar, ou mesmo minimizar, o processo neurodegenerativo. Uma abordagem alternativa é a de identificar pequenas moléculas com atividades biológicas relevantes para a doença de Alzheimer (KIM & OH, 2012; SCHUBERT & MAHER, 2012; CURRAIS *et al.*, 2014). Como exemplo de extratos de plantas que são utilizados no tratamento para a doença de Alzheimer, tem-se a *Ginkgo biloba* (ginkgo), a *Panax ginseng* (ginseng), a *Salvia officinalis* (salva), a *Melissa officinalis* (erva-cidreira), e a *Bacopa moniera* (brahmi), que ainda passam por estudos clínicos para comprovar sua eficácia (KIM & OH, 2012). Nos últimos anos, a espécie *Ilex paraguariensis* (erva-mate) também vem mostrando resultados positivos no que diz respeito à sua atividade mnemônica (SANTOS, 2011).

O gênero *Ilex* é o único da família Aquifoliaceae, que é composto de aproximadamente 600 espécies e tem como principal localização de ocorrência a América tropical e o sudeste da Ásia, apesar de já terem sido encontrados fósseis do pólen deste gênero por todas as partes do mundo (LOIZEAU *et al.*, 2005). A *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire é uma espécie popular na região que abrange o Paraguai, Uruguai, nordeste da Argentina e sul do Brasil. Seu uso na forma de chá foi adotado há séculos pelos índios guaranis e passado aos missionários jesuítas, sendo estes os primeiros a cultivar a espécie em larga escala por volta do ano de 1670 (HERNÁNDEZ-BERMEJO & LEON, 1994). O consumo da bebida produzida através da infusão das folhas da planta é conhecido como chimarrão, tereré ou mate, e é uma tradição cultivada ao longo do tempo, principalmente nas regiões Centro-oeste e Sul do Brasil e países fronteiriços (BRACESCO *et al.*, 2011). As populares rodas de chimarrão mantêm esta tradição e levam à comercialização não só da erva-mate, como também de produtos como cuias e kits típicos de utilitários para seu consumo.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, no ano de 2011 foram produzidas 229.681 toneladas de erva-mate nativa, rendendo 118 milhões de reais à economia e revelando um aumento de aproximadamente 1% em relação ao ano anterior, fazendo da erva-mate

a extração vegetal alimentícia mais produzida no país. Sozinha, a região Sul deteve, naquele ano, 99.8% da produção total de erva-mate do país, sendo que o Paraná foi o maior produtor (169.549 toneladas), seguido por Santa Catarina (36.117 toneladas) e Rio Grande do Sul (23.579 toneladas) (IBGE, 2011).

A *I. paraguariensis* é uma árvore perene e dioica que pode alcançar até 15 m de altura. Medindo 8 cm de comprimento, suas folhas são verde-oliva, perenes, alternas, coriáceas, de limbo obovado e margem levemente crenada. Sua floração ocorre durante a primavera, dando origem à inflorescências em fascículos, com 1 a 15 flores pequenas e unissexuais de 4 pétalas brancas, podendo ter 5, 6 ou 7 pétalas em locais tropicais ou subtropicais. Seus frutos são do tipo baga, de cor vermelha e contém 4 ou 5 sementes (figura 2).



Figura 2. Representação (A) e foto (B) das folhas, flores e frutos de *Ilex paraguariensis*. Fonte: Wikipedia e Culham Research Group (acesso em dezembro de 2014).

Podem ser encontrados diversos constituintes químicos na *I. paraguariensis*, como alcaloides purínicos (metilxantinas), flavonoides, taninos, ácido clorogênico e derivados, e um grande número de saponinas triterpênicas derivadas do ácido ursólico (metasaponinas), sendo que a quantidade destes componentes depende de fatores como o solo de plantio, clima e época do ano (BRACESCO *et al.*, 2011; HECK & DE MEJIA, 2007). Mesmo que as metilxantinas sejam correlacionadas com muitas atividades farmacológicas da erva-mate,

outras propriedades e atividades vem sendo estudadas e mostram-se independentes da presença destes compostos (BRACESCO *et al.*, 2011).

Um dos componentes mais encontrados na erva-mate são os polifenóis, que aparecem em altas concentrações nesta planta e mostram uma forte correlação com a capacidade antioxidante da mesma. O extrato de erva-mate é rico, especificamente, em ácido clorogênico, que representa 42% do total de componentes ativos encontrados nesta planta, o que significa mais do que o encontrado no chá-verde e tornando-a comparável ao vinho em termos de quantidade deste polifenol (GUGLIUCCI *et al.*, 2009; BRACESCO *et al.*, 2011). Além disto, Filip e colaboradores (2001) demonstraram que a espécie *I. paraguariensis* é a mais rica em derivados do cafeoil (por exemplo, ácido clorogênico e ácido cafeico) e flavonoides (rutina, quercetina e kaempferol) quando comparada com demais espécies deste gênero.

Além de compostos fenólicos, a *I. paraguariensis* também possui xantinas, que são de alcaloides purínicos encontrados em chás, cafés e chocolates. A xantina mais encontrada na erva-mate é a cafeína (1 – 2% do peso seco), seguido pela teobromina (0.3 – 0.9% do peso seco) (ITO; CROZIER & ASHIHARA, 1997). A quantidade de cafeína presente em 150 mL de erva-mate (78 mg) assemelha-se à encontrada numa mesma medida de café (85 mg) (MAZZAFERA, 1997), de forma que sua ingestão se torna ainda mais significativa quando ambas as tradições do mate e do café são mantidas durante grande parte da vida do indivíduo. A cafeína é uma substância com efeitos estimulantes no SNC e possui um efeito positivo na memória de longo prazo (DE MEJIA & RAMIREZ-MARES, 2014). No entanto, a forma de preparo das folhas de *I. paraguariensis* muito influencia na disponibilidade de cafeína: quando as folhas passam pelo processo de secagem, perdem aproximadamente 30% da sua concentração de cafeína e até 80% de clorofila (SCHMALKO & ALZAMORA, 2001). Apesar disto, a concentração pode ser aumentada posteriormente, por conta da infusão com água quente no preparo do mate ou chimarrão, pois neste processo as células são rompidas por conta da temperatura e liberam estes componentes no chá (HECK & DE MEJIA, 2007).

As saponinas triterpênicas, por sua vez, são glicosídeos altamente solúveis em água, específicos de dicotiledôneas, que conferem o gosto amargo à erva-mate. À elas são atribuídas propriedades antiinflamatórias e hipocolesterolêmicas, por conta da inibição da difusão passiva de ácido cólico e a formação de micelas que não podem ser absorvidas, sendo portanto excretadas (FERREIRA *et al.*, 1997; HECK & DE MEJIA, 2007). As saponinas presentes em maior

quantidade nas folhas de *I. paraguariensis* são o ácido oleanólico e o ácido ursólico, que mostraram um efeito neuroprotetor em um modelo de hipoxia cerebral, e de proteção contra o estresse oxidativo, respectivamente (CALTANA *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2014).

Existem diversos estudos sobre as atividades da *I. paraguariensis*, entre elas a atividade antioxidante, a qual parece ser melhor nesta espécie em relação à outras do gênero por conta da alta concentração de derivados cafeicos e polifenóis (GUGLIUCCI, 1996; FILIP *et al.*, 2000; ANESINI *et al.*, 2012); apresentando ainda efeitos na diminuição do peso em pacientes obesos por conta do aumento da saciedade (ANDERSEN & FOGH, 2001) e efeito protetor contra o câncer (RAMIREZ-MARES; CHANDRA & DE MEJIA, 2004).

Embora muito estudada para atividades antioxidantes e inibição de LDL, até o presente momento são encontrados apenas seis trabalhos que relacionam esta espécie com atividades no SNC. O primeiro deles relatou que o extrato de *I. paraguariensis* nas doses de 250 e 500 mg/kg (intraperitoneal) foi capaz de prevenir a hipolocomoção causada por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina, neurotoxina que provoca morte neuronal) e reverter a catalepsia induzida por reserpina em camundongos, sugerindo uma atividade antiparkinsoniana (MILIOLI *et al.*, 2007). O segundo estudo mostrou que após indução do prejuízo de memória por haloperidol, os ratos tratados cronicamente (via oral) com *I. paraguariensis* obtiveram melhor resultado no modelo do labirinto aquático, sugerindo um efeito neuroprotetor e redução da discinesia orofacial (COLPO *et al.*, 2007). Prediger e colaboradores (2008) mostraram que o tratamento agudo com o extrato desta espécie, por via intraperitoneal, nas doses de 62.5, 125 e 250 mg/kg, foi capaz de melhorar a memória de curto e longo prazo de ratos submetidos aos testes de reconhecimento social, labirinto aquático de Morris e esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. O quarto trabalho mostrou que a infusão de erva-mate na dose de 50 mg/kg, em tratamento por 15 dias e via oral, foi capaz de reduzir as frequências de convulsões e as convulsões tônico-clônica, bem como reduzir o dano oxidativo em lipídeos e os níveis de óxido nítrico em ratos, sugerindo um efeito neuroprotetor (BRANCO *et al.*, 2013). Reis e colaboradores (2014) mostraram, ainda, que ratos tratados durante 4 semanas com o extrato aquoso de *I. paraguariensis* (*ad libitum*) apresentaram um menor tempo de imobilidade no teste do nado forçado, sugerindo um efeito do tipo-antidepressivo.

De maneira importante, o último estudo mostrou que camundongos submetidos ao tratamento com extrato hidroetanólico de *I. paraguariensis* apresentaram um perfil tipo-ansiolítico após tratamento

de 21 dias. Ademais, o tratamento agudo com o extrato aquoso desta planta foi capaz de impedir o prejuízo de memória induzido pela administração de escopolamina, um antagonista de receptores muscarínicos, no teste de esquiva inibitória do tipo *step-down* (SANTOS *et al.*, 2015).

Com base no que foi exposto até aqui, os produtos naturais claramente consistem em importantes fontes de novas moléculas para o tratamento farmacológico de diversas doenças. As doenças relacionadas a déficits de memória, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, tem se tornado prevalente na população, decorrente, dentre outros fatores, de uma maior expectativa de vida da mesma. Como abordado anteriormente, não existe na atualidade nenhuma droga eficaz na reversão da doença de Alzheimer, fazendo com que as drogas disponíveis sejam paliativas. Sendo assim, são necessários estudos para a identificação de novas moléculas com atividades biológicas relevantes para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

2. OBJETIVOS

Investigar a atividade mnemônica das frações obtidas de *Ilex paraguariensis* em camundongos *Swiss* adultos.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade *per se* e o potencial preventivo de perda de memória induzida pela escopolamina da fração butanólica de *I. paraguariensis* nos testes de esquiva inibitória do tipo *step-down* e de reconhecimento de objetos
- Avaliar a atividade *per se* e o potencial preventivo de perda de memória induzida pela escopolamina da fração rica em saponinas de *I. paraguariensis* nos testes de esquiva inibitória do tipo *step-down* e de reconhecimento de objetos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados camundongos *Swiss* machos, com idade entre 3 e 4 meses (40 – 50 g), provenientes do Biotério Central da UFSC. Os animais foram alojados em grupos de 15 por caixa e mantidos em condições controladas de temperatura, ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro 12/12h (luzes acendendo às 7h), acesso à água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram executados de acordo com os padrões internacionais de bem-estar animal recomendados pela Lei 11.794/2008 e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC sob o número PP00798.

3.2 Material Vegetal

As folhas de *I. paraguariensis* foram coletadas no município de Erechim, Rio Grande do Sul, em outubro de 2006. O material testemunho está depositado no Herbário da Universidade de Passo Fundo (RSPF 11074).

As frações obtidas das folhas de *I. paraguariensis* foram preparadas pelo doutorando Carlos Henrique Blum-Silva, do Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Ciências Farmacêuticas desta Universidade, sob a orientação do Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto e Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel.

3.3 Drogas e Tratamento

Os animais controle foram tratados com o veículo de solubilização das frações (solução salina - NaCl 0,9%) e o controle positivo foi feito com a administração de hidrobrometo de escopolamina (Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO, EUA), um antagonista de receptores muscarínicos, na dose de 1 mg/kg, por via intraperitoneal. As frações foram administradas nas doses de 10, 30 e 60 mg/kg, por via oral, com auxílio de cânula intragástrica, no volume de 0.1 mL/10g de peso corporal, para a avaliação da atividade das frações *per se*. Os testes foram conduzidos individualmente, 30 min após o tratamento dos animais. Este tempo foi obtido em curvas de tempo-resposta previamente realizadas por nosso grupo de pesquisa.

Para os diferentes testes comportamentais, os animais foram divididos em cinco grupos experimentais: grupo controle, controle

positivo e as 3 doses da fração obtida de *I. paraguariensis*. Na etapa de avaliação da possível atividade preventiva das frações, os animais receberam hidrobrometo de escopolamina 30 min após terem recebido uma das doses das frações, sendo submetidos ao teste 30 min após o tratamento com o hidrobrometo de escopolamina. O protocolo experimental da avaliação da atividade das frações *per se* está representado na figura 3, e o da avaliação da atividade preventiva está representado na figura 4.

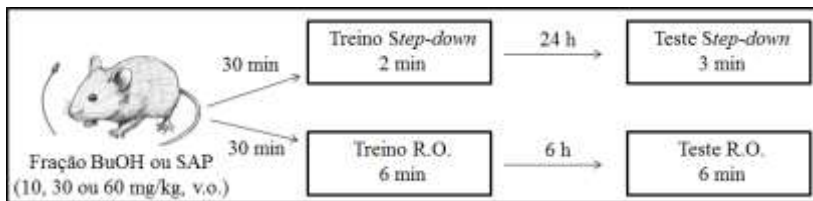


Figura 3. Protocolo experimental para a avaliação da atividade *per se* das frações butanólica e rica em saponinas de *Ilex paraguariensis*, através dos testes de esquiva inibitória do tipo *step-down* e do reconhecimento de objetos.

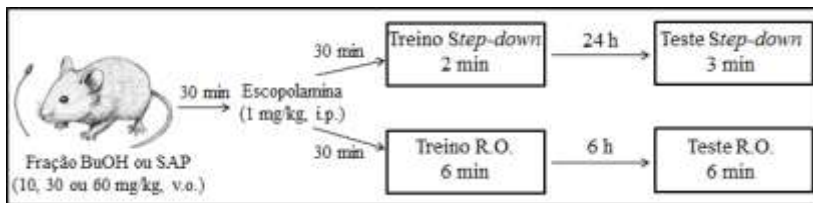


Figura 4. Protocolo experimental para a avaliação da atividade preventiva das frações butanólica e rica em saponinas de *Ilex paraguariensis*, através dos testes de esquiva inibitória do tipo *step-down* e do reconhecimento de objetos.

3.4 Testes Comportamentais

3.4.1 Teste da Esquiva Inibitória do tipo *Step-down*

O teste da esquiva inibitória do tipo *step-down* tem como objetivo avaliar a memória do tipo emocional dos animais. Neste teste, o aprendizado do animal está relacionado com a inibição de seu comportamento natural de explorar o aparato para além da plataforma central em que é posicionado, na primeira exposição (sessão de treino).

Ao descer da plataforma, o animal recebeu um choque nas patas, formando uma memória aversiva. Na exposição subsequente (sessão de teste), foi avaliado se o animal levaria mais tempo para descer da plataforma ou, ainda, não desceria, por conta do choque que havia recebido anteriormente.

O aparato consistiu de uma caixa de metal retangular (50 x 25 x 25 cm), sendo o piso formado por barras metálicas (3 mm) paralelas com 1 cm de distância entre si, conectadas a um estimulador de choque. No centro da caixa de metal, foi posicionada uma plataforma (8 x 6 x 3 cm), livre de choque (adaptado de ROESLER *et al.*, 1999), conforme a figura 5. Os animais foram submetidos à sessão treino após o tratamento, sendo individualmente colocados na plataforma. Foi utilizado como parâmetro de seleção dos animais para a sessão teste a latência para a descida da plataforma na sessão treino (máximo de 120 s), onde ao descer da plataforma com as quatro patas o animal recebeu um choque nas patas (0.5 mA) com duração de 1 s. Posteriormente, na sessão teste, foi avaliada a memória de longa duração, 24 h após a sessão treino. A sessão teste foi realizada na ausência de choque, sendo registrado o tempo de latência para a descida da plataforma, com o tempo máximo de 180 s. Com isso, em apenas uma exposição após a sessão de treino, o animal já é capaz de evitar a descida da plataforma para explorar a caixa. Relaciona-se um maior tempo para descer da plataforma com o aprendizado de que o ambiente é aversivo.



Figura 5. Animal posicionado na plataforma central livre de choques, na caixa com o piso de barras metálicas. Foto: Arquivo pessoal.

3.4.2 Teste de Reconhecimento de Objeto

O teste de reconhecimento de objetos é usado para avaliar o processo de aprendizado e memória espacial (WALLACE *et al.*, 2006). Após o tratamento, sem que houvesse uma sessão de habituação antes da

sessão de treino (ASSINI, DUZZIONI & TAKAHASHI *et al.*, 2009), os animais foram colocados individualmente em um campo aberto (50 x 50 cm), com dois objetos idênticos, juntamente com uma pista visual no aparato, tendo sua atividade registrada em vídeo durante 6 min. Foi registrado o tempo em segundos que o animal passa explorando cada objeto. A sessão de teste foi realizada 6 h depois, onde um dos objetos foi trocado, sendo avaliado o tempo gasto na investigação dos objetos numa sessão de 6 min (figura 6). Os objetos utilizados na sessão treino foram blocos de montar na cor vermelha, sendo que na sessão teste um deles foi trocado por um tubo falcon encapado e pintado de amarelo.

Neste teste, foi utilizado como parâmetro o índice de exploração do objeto novo, calculado por $(T_{\text{novo}} \times 100) / (T_{\text{novo}} + T_{\text{velho}})$, onde T_{novo} é o tempo que o animal passa explorando o objeto que foi trocado na sessão teste e T_{velho} é o tempo que o animal passa explorando o objeto antes deste ser trocado, na sessão treino (MURAI *et al.*, 2007).



Figura 6. À esquerda, animal em sessão treino e à direita, em sessão de teste. Foto: Arquivo pessoal.

3.5 Análises Estatísticas

As análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram feitas no programa GraphPad Prism versão 5.0[®]. 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 relativos ao controle positivo (escopolamina) foram analisados separadamente e comparados ao grupo controle, através do teste de Mann-Whitney. A análise estatística entre a sessão treino e a sessão teste de cada grupo foi realizada com o teste não paramétrico de Wilcoxon.

Os dados paramétricos estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) para a análise estatística. Para comparações entre os grupos foi empregado o teste *post hoc* de Dunnett. Os dados relativos ao controle positivo (escopolamina) foram analisados separadamente e comparados ao grupo controle, através do teste *t* de Student não pareado. A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi de $p < 0,05$ em todas as análises.

4. RESULTADOS

4.1 Teste de esquivia inibitória do tipo *step-down*

Na figura 7-A, estão apresentados os resultados referentes à atividade *per se* da fração butanólica de *Ilex paraguariensis*. Segundo o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, o tempo de latência para descida da plataforma na sessão treino não foi afetado por nenhum dos tratamentos administrados [$H(5)=1,646$; $p=0,8004$]. O teste de Wilcoxon mostrou que houve um aumento significativo ($p<0,05$) no tempo de latência na sessão teste e em relação à sessão treino de cada tratamento para os grupos tratados com 10 e 30 mg/kg da fração butanólica, bem como o grupo controle ($p=0,0438$; $p=0,0078$ e $p=0,002$; respectivamente). Porém, nenhuma alteração foi observada no tempo de latência da sessão treino quando comparado a sessão teste para os animais tratados com 60 mg/kg da fração, semelhante ao grupo tratado com escopolamina ($p>0,05$). Isso sugere que esta dose causa um prejuízo na memória quando administrada *per se*.

Os resultados obtidos na realização da prevenção da perda de memória com a fração butanólica estão mostrados na figura 7-B. Novamente, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revelou que não houve diferença no tempo de latência da sessão treino entre os grupos [$H(5)=4.430$; $p= 0,3509$]. Apenas o grupo controle apresentou um aumento significativo no tempo de latência para descida da plataforma na sessão teste, segundo o teste não paramétrico de Wilcoxon ($p=0,0039$). Os demais grupos, que receberam escopolamina na segunda etapa do tratamento, apresentaram $p>0,05$. Sendo assim, todos os grupos tratados com escopolamina não mostraram diferença significativa entre o tempo de latência da sessão treino e teste, revelando que a fração butanólica não foi capaz de prevenir o déficit cognitivo promovido pela escopolamina.

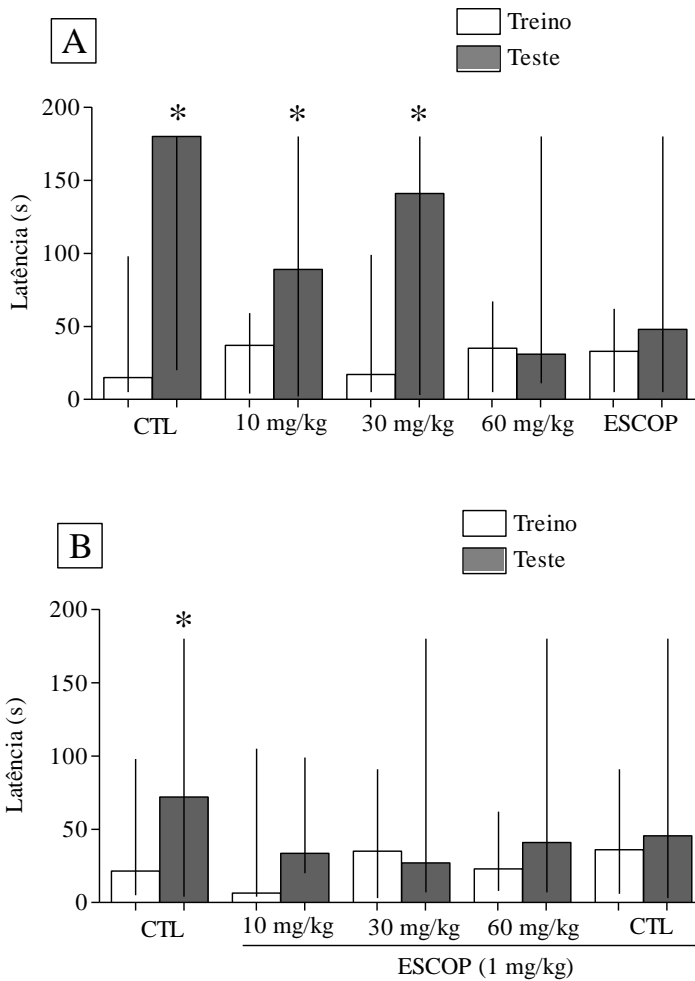


Figura 7. Efeito do tratamento agudo da fração BuOH de *Ilex paraguariensis* na memória de camundongos submetidos ao teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. (A) Avaliação *per se*, (B) prevenção da perda de memória induzida pela administração de escopolamina. A escopolamina (1 mg/kg; i.p.) foi utilizada como droga amnésica padrão. Os dados estão representados na forma de mediana (intervalo interquartil) da latência para descida da plataforma. CTL=controle (salina); ESCOP=escopolamina. n=8-13 animais/grupo. * $p < 0,05$ quando comparadas as sessões treino e teste de cada grupo (teste não paramétrico pareado de Wilcoxon).

O efeito *per se* do tratamento agudo com a fração rica em saponinas de *I. paraguariensis* está apresentado na figura 8-A. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revelou que existe diferença entre os grupos no tempo de latência para descida da plataforma na sessão treino [$H(5)=18,72$; $p=0,0009$], em relação ao grupo tratado com a dose de 10 mg/kg e a escopolamina. De acordo com o teste não paramétrico de Wilcoxon, o grupo controle e os tratados com as frações nas doses de 10, 30 e 60 mg/kg apresentam um aumento significativo ($p<0,05$) no tempo de latência na sessão teste, quando comparados à sessão treino de cada grupo ($p=0,0004$; $p=0,0002$; $p=0,0001$; $p=0,0157$; respectivamente), mostrando que nenhuma das doses *per se* prejudica a memória dos animais.

Na figura 8-B, estão apresentados os resultados referentes à prevenção da perda de memória com a fração saponinas. Segundo o teste de Kruskal-Wallis, os grupos não apresentaram diferença no tempo de latência para descida da plataforma na sessão treino [$H(5)=2,344$; $p=0,6728$]. Segundo o teste de Wilcoxon, os grupos controle e 60 mg/kg da fração apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) no tempo de latência na sessão teste ($p=0,0051$ e $p=0,0068$; respectivamente), revelando que esta dose é capaz de prevenir o prejuízo que é causado pela escopolamina. Os grupos tratados com 10 mg/kg, 30 mg/kg e escopolamina não mostraram diferença significativa entre o tempo de latência na sessão treino e teste ($p>0,05$).

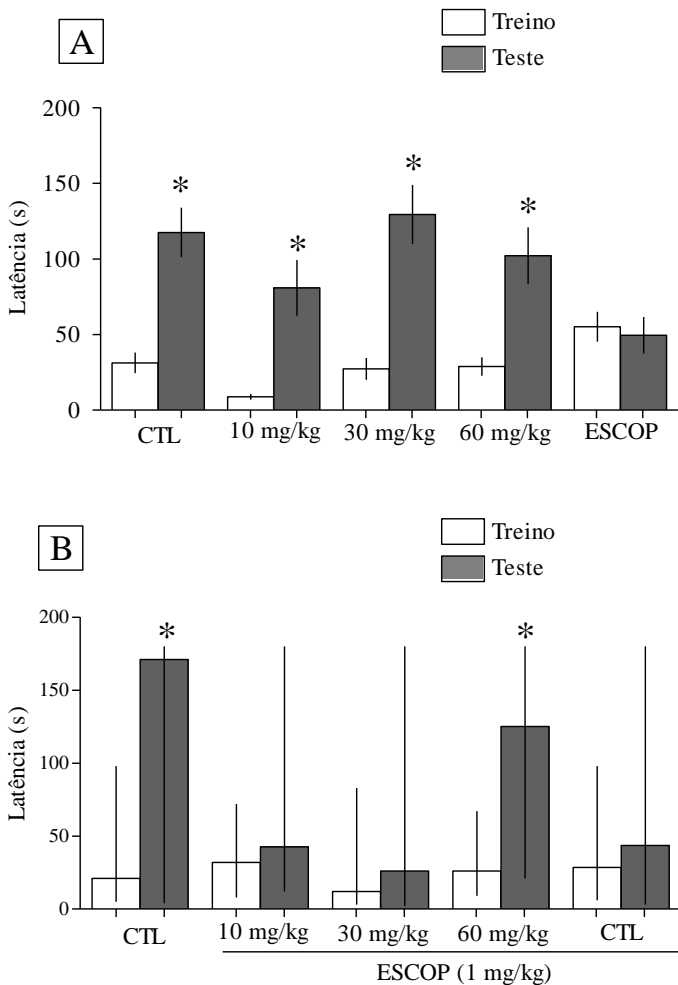


Figura 8. Efeito do tratamento agudo da fração rica em saponinas de *Ilex paraguariensis* na memória de camundongos submetidos ao teste de esquiva inibitória do tipo *step-down*. (A) Avaliação *per se*, (B) prevenção da perda de memória induzida pela administração de escopolamina. A escopolamina (1 mg/kg; i.p.) foi utilizada como droga amnésica padrão. Os dados estão representados na forma de mediana (intervalo interquartil) da latência para descida da plataforma. CTL=controle (salina); ESCOP=escopolamina. n=10-11 animais/grupo. * $p < 0,05$ quando comparadas as sessões treino e teste de cada grupo (teste não paramétrico pareado de Wilcoxon).

4.2 Teste de reconhecimento de objeto

Na figura 9-A, estão apresentados os efeitos *per se* da fração butanólica no teste de reconhecimento de objeto. Apenas o grupo tratado com escopolamina apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) no tempo de exploração do objeto novo, durante a sessão teste, quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0317$), através do teste *t* de Student. Os grupos tratados com a fração butanólica não apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p > 0,05$) quando utilizada a ANOVA de 1 via, mostrando que o tratamento *per se* com a fração butanólica não interfere na memória dos animais.

Os resultados referentes à prevenção da perda de memória através do tratamento com a fração butanólica estão representados na figura 9-B. O teste *t* de Student revelou que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) no tempo de exploração do objeto novo entre o grupo controle e o tratado com escopolamina ($p = 0,0112$). A ANOVA de 1 via revelou que as três doses da fração foram capazes de prevenir o dano mnemônico causado pela escopolamina, já que houve uma diferença significativa entre o índice de reconhecimento dos grupos tratados com as diferentes doses da fração butanólica e o grupo escopolamina [$F(3,15) = 7,959$; $p = 0,0021$].

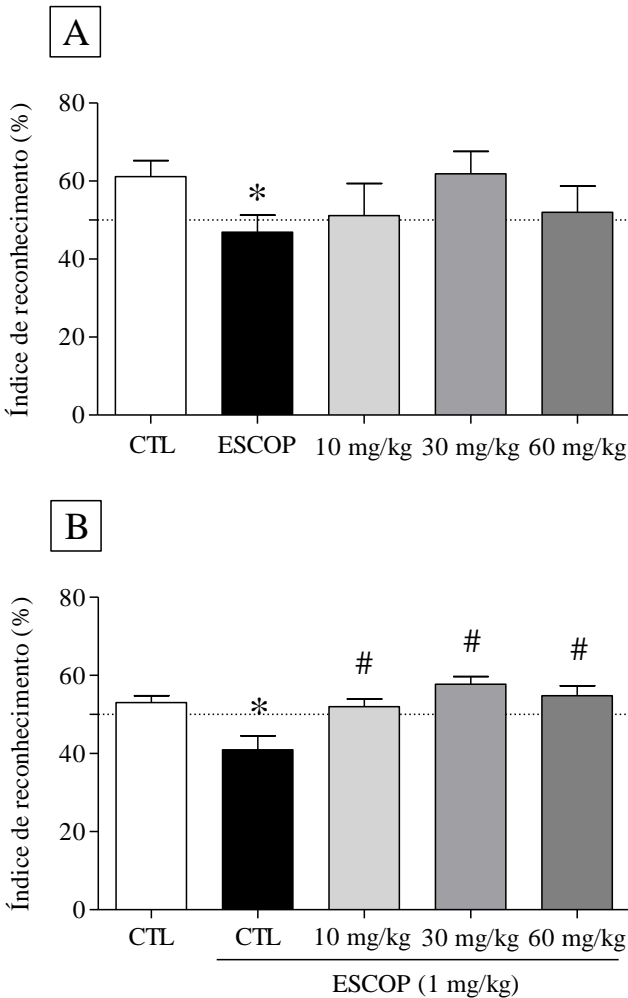


Figura 9. Efeito do tratamento agudo da fração butanólica de *Ilex paraguariensis* na memória de camundongos submetidos ao teste de reconhecimento de objeto. (A) Avaliação *per se*, (B) prevenção da perda de memória induzida pela administração de escopolamina. A escopolamina (1 mg/kg; i.p.) foi utilizada como droga amnésica padrão. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. CTL=controle (salina); ESCOP=escopolamina. n=5-6. * p <0,05 quando comparado ao grupo controle (teste *t* de Student); # p <0,05 quando comparado ao grupo escopolamina (ANOVA de 1 via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

Na figura 10-A, estão apresentados os efeitos *per se* da fração rica em saponinas no teste de reconhecimento de objeto. O teste *t* de Student revelou uma redução significativa ($p < 0,05$) no tempo de exploração do objeto novo, durante a sessão teste, entre o grupo tratado com escopolamina e o grupo controle ($p = 0,0064$). A ANOVA de 1 via não mostrou diferença no índice de reconhecimento entre os grupos tratados com as doses da fração e o grupo controle, ou seja, o tratamento *per se* não promoveu nenhum prejuízo cognitivo nos animais submetidos a este teste.

Os efeitos provocados pela prevenção da perda de memória com a utilização da fração saponinas estão expostos na figura 10-B. Através do teste *t* de Student, é possível observar uma redução significativa ($p < 0,05$) no tempo de investigação do objeto novo entre o grupo controle e escopolamina na sessão teste ($p = 0,0227$).

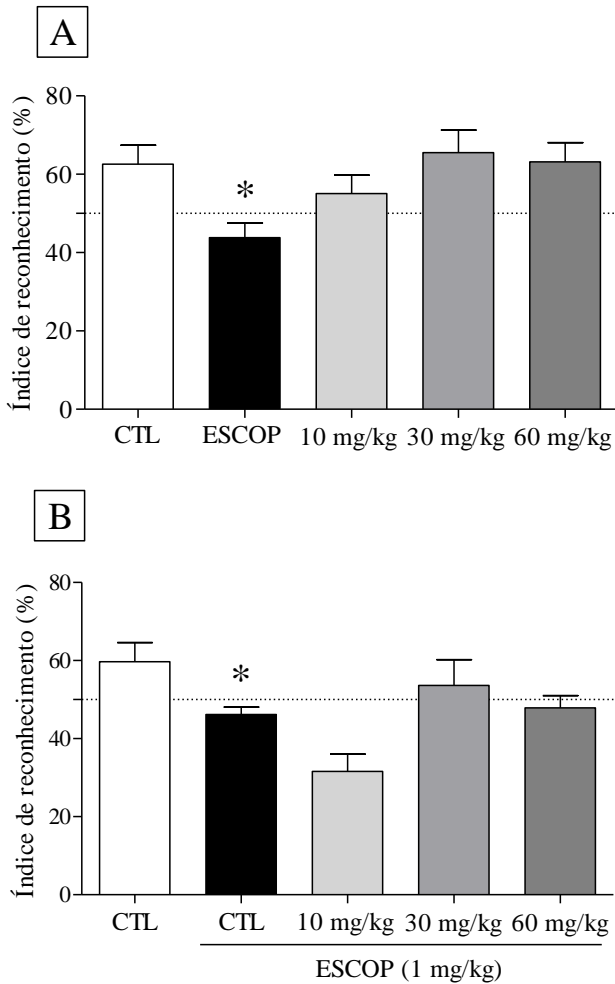


Figura 10. Efeito do tratamento agudo da fração saponinas de *Ilex paraguariensis* na memória de camundongos submetidos ao teste de reconhecimento de objeto. (A) Avaliação *per se*, (B) prevenção da perda de memória induzida pela administração de escopolamina. A escopolamina (1 mg/kg; i.p.) foi utilizada como droga amnésica padrão. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. CTL=controle (salina); ESCOP=escopolamina. n=8-10 animais/grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (teste *t* de Student); # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo escopolamina (ANOVA de 1 via seguida pelo *post hoc* de Dunnett).

Como síntese dos resultados apresentados, o Quadro 1 traz um resumo do que foi observado para cada fração, em cada teste:

Quadro 1. Síntese dos resultados obtidos na avaliação da atividade mnemônica das frações butanólica e saponinas de *Ilex paraguariensis*.

	Tratamento	Teste S.D.	Teste R.O.
Fração BuOH	<i>per se</i>	prejudica (60 mg/kg)	NA
	prevenção	NA	previne
Fração SAP	<i>per se</i>	NA	NA
	prevenção	previne (60 mg/kg)	NA

S.D.: *step-down*; R.O.: reconhecimento de objeto; NA: não altera.

5. DISCUSSÃO

Com este trabalho, foi possível avaliar o efeito do tratamento agudo com as frações butanólica e rica em saponinas no comportamento de camundongos *Swiss* adultos, quando submetidos ao teste de esquiwa inibitória do tipo *step-down* e ao teste de reconhecimento de objetos.

A partir dos testes utilizados, foi possível verificar se as frações causam algum efeito *per se* na memória de camundongos submetidos aos testes. Após esta etapa, avaliamos se as frações tinham o poder de prevenir a perda de memória induzida pela escopolamina, através da administração desta depois do tratamento com as diferentes doses das frações. Este desenho experimental foi escolhido por conta de trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa, onde Santos e colaboradores (2011) verificaram que o tratamento com o extrato aquoso das folhas de *I. paraguariensis*, nas doses de 100 e 300 mg/kg, foi capaz de prevenir o déficit cognitivo induzido pela escopolamina em camundongos submetidos ao teste de esquiwa inibitória. Além disto, estudos vem mostrando a influência desta planta no SNC, o que poderia ser mais um atrativo para o consumo da erva-mate (MILIOLI *et al.*, 2007; COLPO *et al.*, 2007; PREDIGER *et al.*, 2008; BRANCO *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2014).

Os dois testes utilizados tiveram como objetivo avaliar a memória de longa duração, que é consolidada a partir de cascatas sinalizadoras na região do encéfalo denominada hipocampo. Apesar de se assemelharem quanto à duração da memória, os testes diferenciam-se pelo tipo de memória avaliado: a esquiwa inibitória estaria relacionada a uma memória emocional de medo, e o reconhecimento de objetos a uma memória espacial (ou de reconhecimento). Quanto à neurobiologia deste tipo de memória, estudos mostram a importância do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na consolidação de memórias tanto de medo (PARFITT *et al.*, 2012; GIOVANNINI; LANA; PEPEU, 2015) quanto espaciais (DEIANA; PLATT; RIEDEL, 2011).

A esquiwa inibitória do tipo *step-down* é um teste amplamente utilizado em estudos com o objetivo de avaliar a memória de animais submetidos a determinados tratamentos, e baseia-se na tendência natural do animal de explorar um ambiente novo. O animal passa por um momento de conflito entre descer ou não da plataforma e, através da exploração do ambiente, decide descer ou não. A partir do choque que leva ao descer da plataforma, tem início a formação de uma memória aversiva relacionada ao contexto a que foi submetido (grades, plataforma, cheiro do local, luminosidade, etc) e seu tempo de latência

para descida aumenta na exposição subsequente ao aparato (GIOVANNINI; LANA; PEPEU, 2015). A memória de curto e longo prazos podem ser facilmente avaliadas apenas com a variação do intervalo de tempo entre a sessão treino e teste, variando de 1,5 h a 1 dia. Ambas parecem ser dependentes de uma integração entre a atividade da região CA1 do hipocampo e córtex parietal posterior e entorrinal, sendo modulados pela amígdala e pelos neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal e, ainda e indiretamente, por hormônios do estresse, como a corticosterona (CAMMAROTA *et al.*, 2007; IZQUIERDO & MEDINA, 1997). Ademais, diversos estudos relacionam a memória contextual de medo a circuitarias envolvendo a amígdala (NIEMINEN *et al.*, 1992; DIAS *et al.*, 2014; DO-MONTE; QUIÑONES-LARACUENTE; QUIRCK, 2015; KOCHLI *et al.*, 2015), ressaltando a importância desta estrutura na memória aversiva de longo prazo, bem como a interação e regulação através do córtex pré-frontal (FURINI; MYSKIW & IZQUIERDO, 2014).

Estudos prévios mostraram, no entanto, que houve alterações no nível de corticosterona plasmática de camundongos submetidos ao estresse de contenção a frio e que o tratamento sub-crônico com os extratos hidroetanólico e aquoso de *I. paraguariensis*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg não foi capaz de prevenir este aumento (SANTOS, 2011), indicando que esta espécie parece não atuar no controle da corticosterona plasmática de forma a reduzi-la. Entretanto, são necessários mais estudos para a avaliação da possibilidade de interferência dos componentes da *I. paraguariensis* com a corticosterona.

Diferentemente do teste de esquiva inibitória, o teste de reconhecimento de objetos não está relacionado diretamente a uma memória de medo, mas a uma memória espacial. Este teste permite avaliar o comportamento do animal quando o mesmo é exposto a um objeto novo e a outro familiar, sendo que não há atribuição de recompensa pela escolha de um ou outro, o que faz com que o animal explore o novo objeto de acordo com a sua propensão natural à novidade (BAXTER, 2010; ANTUNES & BIALA, 2012). Em alguns estudos, é realizada uma sessão de habituação ao ambiente onde ocorrerá o teste, submetendo o animal à mesma arena, porém sem objetos, com o intuito de que o animal se habitue à ela (MURAI *et al.*, 2007; FRYE, DUFFY & WALF, 2007). Neste trabalho, porém, não realizamos a sessão de habituação, seguindo parcialmente o protocolo de Assini, Duzzioni & Takahashi (2009), diferenciando-se deste pelo fato de que neste trabalho foi realizada a realocação de objetos e não o reconhecimento. Estudos

com primatas e roedores revelaram a importante mediação das regiões para-hipocampais do lobo temporal (isto é, a perirrinal, entorrinal, e córtices temporais inferiores), mostrando a relevância dessas estruturas na formação da memória do reconhecimento (HAMMOND; TULL & STACKMAN, 2004). Ainda assim, a amígdala basolateral parece exercer um papel importante na formação deste tipo de memória, mediando sua consolidação em conjunto com o hipocampo (BASS *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2014).

Ambos os testes realizados neste trabalho são utilizados em estudos que envolvem neuropatologias como a doença de Alzheimer (DA). A DA é a forma mais comum de demência senil, caracterizada não só pela formação de placas de peptídeo β -amiloide, mas também por uma degeneração de neurônios colinérgicos. Este evento leva a uma redução significativa dos níveis de ACh no hipocampo e no córtex, o que acredita-se ser o motivo do declínio cognitivo ao longo dos anos, fazendo com que os pacientes se esqueçam desde memórias de curto prazo às de longo prazo, bem como de memórias de cunho emocional (como esquecer-se de entes queridos) e espacial (como passar por episódios de desorientação espacial) (LOMBARDO & MASKOS, 2014).

Os animais tratados com as diferentes doses das frações *per se* não apresentaram alteração em seu comportamento no teste de reconhecimento de objeto. No teste de esquiwa inibitória, porém, a dose de 60 mg/kg da fração butanólica parece prejudicar a memória dos camundongos, enquanto a fração saponinas não provocou nenhuma alteração *per se* neste teste. Além de observar que os componentes presentes na fração butanólica podem causar efetivamente um prejuízo mnemônico, é importante considerar a possibilidade de que esteja ocorrendo uma alteração motora ou sensorial, levando a uma diminuição da latência para descida da plataforma dos animais que receberam a dose de 60 mg/kg desta fração. Isto é, deve-se ter certeza de que esta dose não promova nenhuma alteração por si mesma de forma a afetar o desempenho motor (QUILLFELDT, 2009). Para a comprovação de que não houve realmente uma alteração locomotora, seria necessária a realização do teste do campo aberto ou rota-rod para dissociar o comportamento observado (redução da latência para descida da plataforma na sessão teste) de um possível aumento da locomoção.

De acordo com o resultado apresentado na etapa de prevenção, a dose de 60 mg/kg da fração rica em saponinas foi capaz de prevenir o déficit de memória induzido pela escopolamina em camundongos, no teste de esquiwa inibitória. Como já mencionado, diversos estudos

relatam a ampla ação das saponinas em atividades biológicas, inclusive no SNC. A presença destes compostos na espécie *I. paraguariensis* é bem documentada, inclusive com um estudo sobre seu efeito preventivo quanto à inflamação no cólon de ratos por atuação na inibição do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (SCHENKEL; MONTANHA & GOSMANN, 1996; COELHO *et al.*, 2010; PUANGPRAPHANT *et al.*, 2013).

O resultado positivo quanto à atividade de prevenção da perda de memória encontrado na fração rica em saponinas de *I. paraguariensis* é bem sustentado pela literatura. O trabalho de Sun e colaboradores (2014) relata que esta ação pode ocorrer por conta da regeneração da rede neural pela promoção da sobrevivência celular, pode recuperar a atividade de axônios e sinapses, e ainda prevenir o mau funcionamento dos neurônios alterando níveis de neurotransmissores, receptores e mensageiros secundários. Existem várias pesquisas mostrando que as saponinas podem ter um efeito benéfico contra a DA, apesar das evidências clínicas ainda serem limitadas (TOHDA *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2006). No anexo 1, é possível observar o grande leque de ações já descritas para saponinas presentes em diferentes espécies vegetais. Por ser utilizada cronicamente pela população, a espécie *I. paraguariensis* necessita de uma melhor atenção às suas propriedades.

No presente estudo, é possível que as saponinas estejam atuando como agonista inverso de receptores muscarínicos, já que a escopolamina é um antagonista de receptores muscarínicos e tem sua ação amnésica bloqueada pela fração rica em saponinas. Dessa forma, o efeito da escopolamina não apareceria, por conta da impossibilidade de ligação aos devidos receptores. Porém, também é útil analisar a ação desta fração sobre a enzima AChE para que o entendimento do modo de ação seja melhor elucidado, já que fármacos inibidores da AChE são utilizados como tratamento para a DA e demais demências e apresentam efeitos adversos significativos (RANG *et al.*, 2007). Trabalhos mostram que saponinas provenientes de espécies como *Panax ginseng* (ginsenosídeos) e *Dipsacus asper* (akebia D) são capazes de melhorar o aprendizado e a memória através, também, do aumento dos níveis de ACh pela diminuição da atividade da enzima AChE, representando possíveis estratégias para o tratamento da DA (ZHOU *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010). Pelo fato de ser proveniente diretamente de uma espécie vegetal, a toxicidade destes fármacos tende a ser baixa quando comparada com fármacos já utilizados (SUN *et al.*, 2014).

A fração butanólica, por sua vez, preveniu o déficit de memória no teste de reconhecimento de objetos, nas doses de 10, 30 e 60 mg/kg,

sendo esse efeito decorrente, provavelmente, da presença de diferentes constituintes químicos. Os componentes encontrados em maiores quantidades no extrato de *I. paraguariensis* são os ácidos clorogênicos, chegando a 42% das substâncias encontradas (BRACESCO *et al.*, 2011). Com o envelhecimento, ocorre uma maior vulnerabilidade ao stress oxidativo, podendo levar à disfunção e morte celular. O cérebro, especificamente, possui uma limitada capacidade antioxidante, o que pode levar a doenças neurodegenerativas como a DA e a DP. Por conseguir atravessar a barreira hematoencefálica, os ácidos clorogênicos vem se mostrando uma grande fonte de interesse em estudos no SNC. Já foi mostrado que os ácidos clorogênicos são capazes de prevenir a formação de placas senis (HAN *et al.*, 2010), inibir a AChE e a BChE (OBOH *et al.*, 2013), dentre outras evidências que mostram a atividade antioxidante de diferentes ácidos clorogênicos em células neuronais (SHEN *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012).

Ao mesmo tempo, as metilxantinas parecem ser boas candidatas a responsáveis pela atividade neuroprotetora de *I. paraguariensis*. A cafeína, especialmente, atua como antagonista competitivo não específico dos receptores A₁ e A₂ de adenosina. No SNC, a adenosina exerce, geralmente, uma ação depressora pré e pós-sináptica, levando à redução da atividade motora, diminuição da respiração, induzindo o sono e reduzindo a ansiedade (RANG *et al.*, 2007). Os efeitos da cafeína poderiam ser explicados, portanto, pelo bloqueio dos receptores inibitórios da adenosina, bem como pela ação de inibição das fosfodiesterases, o que leva a um aumento do AMPc e GMPc a níveis intracelulares (DALY, 2000). Porém, para a observação deste efeito, seriam necessárias doses mais elevadas de cafeína. Demais trabalhos descrevem a ação neuroprotetora da cafeína na DP (PREDIGER, 2010; YADAV *et al.*, 2012) e na DA (CARMAN *et al.*, 2014; CUNHA & AGOSTINHO, 2010).

Posto isto, é possível inferir que os ácidos clorogênicos e metilxantinas, que podem estar presentes na fração butanólica, tenham promovido o efeito benéfico na prevenção da perda de memória dos animais tratados com as diferentes doses da fração butanólica e submetidos ao teste de reconhecimento de objeto. Este efeito pode ter acontecido por conta do bloqueio dos receptores de adenosina e/ou também pela diminuição da atividade da AChE.

Os resultados aqui apresentados corroboram os encontrados por outros grupos de pesquisa, que também relatam uma atividade neuroprotetora proveniente da *I. paraguariensis* (MILIOLI *et al.*, 2007; COLPO *et al.*, 2007; PREDIGER *et al.*; 2008; BRANCO *et al.*, 2013). Porém, nestes

trabalhos não foram avaliadas as frações separadamente, com o intuito de encontrar alguma substância responsável por este efeito, mas sim os extratos.

Como já mostrado em trabalhos prévios, o extrato aquoso de *I. paraguariensis* tem se mostrado promissor na prevenção da perda de memória de camundongos (SANTOS, 2011). O presente estudo mostrou que pode haver uma diferenciação quanto a atividade de cada componente do extrato aquoso, por conta das duas frações analisadas terem apresentado resultados diferentes nos testes comportamentais realizados. Apesar disso, a maioria dos mecanismos regulatórios de memória se sobrepõem e fazem com que a atuação conjunta das substâncias presentes em cada uma das frações seja de suma importância para a observação de um possível efeito neuroprotetor.

Assim, foi mostrado neste trabalho que as frações butanólica e rica em saponinas de *I. paraguariensis* apresentam um efeito de prevenção da perda de memória quando avaliadas em distintos testes comportamentais. Por ser produzida em larga escala e ser utilizada tradicionalmente pelas populações, são requeridos mais estudos com esta espécie a fim de elucidar melhor sua ação no SNC para que, futuramente, esta planta possa ser utilizada como uma nova substância terapêutica para doenças relacionadas a déficits cognitivos, como a doença de Alzheimer.

6. CONCLUSÕES

- O tratamento agudo com a fração rica em saponinas obtida das folhas de *Ilex paraguariensis* foi capaz de prevenir a perda de memória induzida pela escopolamina em camundongos submetidos ao teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down*.
- A fração butanólica foi capaz de prevenir o déficit cognitivo induzido pela escopolamina, no teste de reconhecimento de objeto.
- A dose de 60 mg/kg da fração butanólica, quando administrada *per se*, prejudicou o desempenho de animais submetidos ao teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. São necessários mais estudos para desatrelar a atividade observada de um possível prejuízo locomotor.
- Juntos, os dados referentes à atividade preventiva de perda de memória das frações apontam que os compostos presentes na fração butanólica e rica em saponinas podem estar atuando em regiões cerebrais distintas.
- O singersimo de substâncias presentes na *Ilex paraguariensis* parece atuar fortemente para sua ação de prevenção da perda de memória.

7. REFERÊNCIAS

2014 Botanical Advent Calendar – Day 3 – *Ilex*. Disponível em: <<https://blogs.reading.ac.uk/crg/2014-botanical-advent-calendar-day-3-ilex/>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v.14, p 243-250, 2001.

ANESINI, C.; TURNER, S.; COGOI, L.; FILIP, R. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT – Food Science and Technology**, v.45, p.299-304, 2012.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v.13, p.93-110, 2012.

ASSINI, F.L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI R.N. Object location memory in mice: Pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behavioral Brain Research**, v.204, p.206-211, 2009.

BASS, D.I.; NIZAM, Z.G.; PARTAIN, K.N.; WANG, A.; MANNS, J.R. Amygdala-mediated enhancement of memory for specific events depends on the hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.107, p.37-41, 2014.

BAXTER, M.G. “I’ve seen it all before”: explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical Comment on Burke et al. (2010). **Behavioral Neuroscience**, v.124, p.706–709, 2010.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v.136, p.378-384, 2011.

BRANCO, C.S.; SCOLA, G.; RODRIGUES, A.D.; CESIO, V.; LAPROVITERA, M.; HEINZEN, H.; SANTOS, M.T.; FANK, B.; FREITAS, S.C.V.; COITINHO, A.S.; SALVADOR, M. Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional

yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. **Brain Research Bulletin**, v.92, p.60-68, 2013.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v.67, p.2141-2153, 2004.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134, 2005.

CALTANA, L.; RUTOLO, D.; NIETO, M.L.; BRUSCO, A. Further evidence for the neuroprotective role of oleanolic acid in a model of focal brain hypoxia in rats, **Neurochemistry Internacional**, v.79, p.79-87, 2014.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.M.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Studies of short-term avoidance memory. In: BERMUDEZ-RATTONI, F. (Ed.), Neural plasticity and memory: from genes to brain imaging. **Frontiers in Neuroscience**, 2007.

CARMAN, A.J.; DACKS, P.A.; LANE, R.F.; SHINEMAN, D.W.; FILLIT, H.M. Current evidence for the use of coffee and caffeine to prevent age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. **The Journal of Nutrition, Health and Aging**, v.18, p.383-392, 2014.

CHEN, F.; ECKMAN, E.A.; ECKMAN, C.B. Reductions in levels of the Alzheimer's amyloid beta peptide after oral administration of ginsenosides. **FASEB Journal**, v.20, p.1269-1271, 2006.

CHENG, Y.; SHEN, L.H.; ZHANG, J.T. Anti-amnestic and anti-aging effects of ginsenoside Rg1 and Rb1 and its mechanism of action. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.26, p.143-149, 2005.

COELHO, G.C.; GNOATTO, S.B.; BASSANI, V.L.; SCHENKEL, E.P. Quantification of saponins in extractive solution of mate leaves *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Journal of Medicinal Food**, v.13, p.439-443, 2010.

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, p.171-180, 2007.

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, S95-S116, 2010.

CURRAIS, A.; CHIRUTA, C.; GOUJON-SVRZIC, M.; COSTA, G.; SANTOS, T.; BATISTA, M.T.; PAIVA, J.; MADUREIRA, M.C., MAHER, P. Screening and identification of neuroprotective compounds relevant to Alzheimer's disease from medicinal plants of S. Tomé e Príncipe. **Journal of Ethnopharmacology**, 2014.

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

DE MEJIA, E.G.; RAMIREZ-MARES, M.V. Impact of caffeine and coffee on our health. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.25, p.489-492, 2014.

DEIANA, S.; PLATT, B.; RIEDEL, G. The cholinergic system and spatial learning. **Behavioural Brain Research**, v.221, p.389-411, 2011.

DIAS, B.G.; GOODMAN, J.V.; AHLUWALIA, R.; EASTON, A.E.; ANDERO, R.; RESSLER, K.J. Amygdala-dependent fear memory consolidation via miR-34a and Notch signaling. **Neuron**, v.83, p.906-918, 2014.

DO-MONTE, F.H.; QUIÑONES-LARACUENTE, K.; QUIRK, G.J. A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory. **Nature** (Epub ahead of print), 2015.

ERVA-MATE. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2014. Disponível em: <
<http://pt.wikipedia.org/wiki/Erva-mate#mediaviewer/File:Ilexparaguariensis.jpg>>. Acesso em: 22 jan. 2015.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. **Environmental Health Perspectives**, v.109, p.69-75, 2001.

- FERREIRA, F.; VÁZQUES, A.; GÜNTHER, C.; MOYNA, P. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by the *Ilex paraguariensis* St. Hil. saponins. **Phytotherapy Research**, v.11, p.79–81, 1997.
- FILIP, R.; LOTITO, S.B.; FERRARO, G.; FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v.20, p.1437–1446, 2000.
- FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v.72, p.774–778, 2001.
- FRYE, C.A.; DUFFY, C.K.; WALF, A.A. Estrogens and progestins enhance spatial learning of intact and ovariectomized rats in the object placement task. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.88, p.208–2016, 2007.
- FURINI, C.; MYSKIW, J.; IZQUIERDO, I. The learning of fear extinction. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** (Epub ahead of print), 2014.
- GIOVANNINI, M.G.; LANA, D.; PEPEU, G. The integrated role of ACh, ERK and mTOR in the mechanisms of hippocampal inhibitory avoidance memory. **Neurobiology of Learn and Memory** (Epub ahead of print), 2015.
- GU, R.; WANG, Y.; LONG, B.; KENNELLY, E.; WU, S.; LIU, B.; LI, P.; LONG, C. Prospecting for Bioactive Constituents from Traditional Medicinal Plants through Ethnobotanical Approaches. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.37, p.903–915, 2014.
- GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.224, p.338–344, 1996.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p.1–93, 2006.
- HAMMOND, R.S.; TULL, L.E.; STACKMAN, R.W. On the delaydependent involvement of the hippocampus in object recognition

memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.82, p.26-34, 2004.

HAN, J.; MIYAMAE, Y.; SHIGEMORI, H.; ISODA, H. Neuroprotective effect of 3,5-di-O-caffeoylquinic acid on SH-SY5Y cells and senescence-accelerated-prone mice 8 through the up-regulation of phosphoglycerate kinase-1. **Neuroscience**, v.169, p.1039-1045, 2010.

HAN, R.W.; XU, H.J.; ZHANG, R.S.; WANG, P.; CHANG, M.; PENG, Y.L.; DENG, K.Y.; WANG, R. Neuropeptide S interacts with the basolateral amygdala noradrenergic system in facilitating object recognition memory consolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.107, p.32-36, 2014.

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.138-151, 2007.

HERNÁNDEZ-BERMEJO, J.E.; LEÓN, J. Neglected crops: 1492 from a different perspective. **FAO Plant Production and Protection Series**, n.26, 1994.

IBGE, Brasil. Produção da extração vegetal e da silvicultura, 2011. Disponível em:

<[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_da_Extracao_Vegetal_e_da_Silvicultura_\[anual\]/2011/pevs2011.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_da_Extracao_Vegetal_e_da_Silvicultura_[anual]/2011/pevs2011.pdf)> - Acesso em: 23 jan.2015.

ITO, E.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Theophylline metabolism in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1336, p.323-330, 1997.

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

KIM, H.G.; OH, M.S. Herbal Medicines for the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v.18, p.57-75, 2012.

KIM, J.; LEE, S.; SHIM J.; KIM, H.W.; KIM, J.; JANG, Y.J.; YANG, H.; PARK, J.; CHOI, S.H.; YOON, J.H.; LEE, K.W.; LEE, H.J.

Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H₂O₂-induced apoptosis in primary cortical neurons.

Neurochemistry International, v.60, p.466-474, 2012.

KOCHLI, D.E.; THOMPSON, E.C.; FRICKE, E.A.; POSTLE, A.F.; QUINN, J.J. The amygdala is critical for trace, delay, and contextual fear conditioning. **Learning and Memory** (Epub ahead of print), 2015.

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.501–520, 2005.

LOMBARDO, S.; MASKOS, U. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment.

Neuropharmacology, p.1-8, 2014.

MA, J.Q.; DING, J.; ZHANG, L.; LIU, C.M. Ursolic acid protects mouse liver against CCl₄-induced oxidative stress and inflammation by the MAPK/NF- κ B pathway. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.37, p.975-983, 2014.

MAZZAFERA, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake.

Food Chemistry, v.60, p.67-71, 1997.

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.771–776, 2007.

MURAI, T.; OKUDA, S.; TANAKA, T.; OHTA, H. Characteristics of object location memory in mice: behavioral and pharmacological studies. **Physiology and Behavior**, v.90, p.116-124, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, p.311-375, 2012.

NIEMINEN, S.A.; SIRVIÖ, J.; TEITTINEN, K.; PITKÄNEN, A.; AIRAKSINEN, M.M.; RIEKKINEN, P. Amygdala Kindling Increased Fear-Response, but Did Not Impair Spatial Memory in Rats. **Physiology & Behavior**, v.51, p.845-849, 1992.

OBOH, G.; AGUNLOYE, O.M.; AKINYEMI, A.J.; ADEMILUYI, A.O.; ADEFEGHA, S.A. Comparative study on the inhibitory effect of caffeic and chlorogenic acids on key enzymes linked to Alzheimer's disease and some pro-oxidant induced oxidative stress in rats' brain-in vitro. **Neurochemistry Research**, v.38, p.413-419, 2013.

PARFITT, G.M.; CAMPOS, R.C.; BARBOSA, A.K.; KOTH, A.P.; BARROS, D.M. Participation of hippocampal cholinergic system in memory persistence for inhibitory avoidance in rats. **Neurobiology of Learn and Memory**, v.97, p.183-188, 2012.

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.465–473, 2008.

PREDIGER, R.D. 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.

PUANGPRAPHANT, S.; DIA, V.P.; DE MEJIA, E.G.; GARCIA, G.; BERHOW, M.A.; WALLIG, M.A. Yerba mate tea and mate saponins prevented azoxymethane-induced inflammation of rat colon through suppression of NF- κ B p65ser311 signaling via I κ B- α and GSK-3 β reduced phosphorylation. **Biofactors**, v.39, p.430-440, 2013.

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

RAMIREZ-MARES, M.V.; CHANDRA, S.; DE MEJIA, E.G. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research**, v.554, p.53-65, 2004.

RANG, H.P., DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. *Farmacologia*. 6ª edição, Elsevier, Rio de Janeiro, 2007.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D.M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D.A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; ONEAL, J.M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLINDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v.20, p.522-531, 2002.

REIS, E.D.; NETO, F.W.S.; CATTANI, V.B.; PEROZA, L.R.; BUSANELLO, A.; LEAL, C.Q.; BOLIGON, A.A.; LEHMEN, T.F.; LIBARDONI, M.; ATHAYDE, M.L.; FACHINETTO, R. Antidepressant-Like Effect of *Ilex paraguariensis* in Rats. **Biomed Research International**, v.2014, p.1-9, 2014.

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.349–353, 1999.

SANTOS, E.C.S. Investigação da atividade neurofarmacológica de *Ilex paraguariensis* em camundongos. Dissertação de Mestrado, *Farmacologia*, 2011.

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

SCHMALKO, M.E.; ALZAMORA, S.M. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during YerbaMate processing. **Drying Technology**, v.19, p.599–610, 2001.

SCHUBERT, D.; MAHER, P. An alternative approach to drug discovery for Alzheimer's disease dementia. **Future Medicinal Chemistry**, v.4, p.1681-1688, 2012.

SENA, L.M.; ZUCOLOTTI, S.M.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P.; DE LIMA, T.C. Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis flavicarpa* Degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids. **Experimental Biology and Medicine**, v.234, p.967-975, 2009.

SHEN, W.; QI, R.; ZHANG, J.; WANG, Z.; HU, C.; ZHAO, Y.; BIE, M.; WANG, Y.; FU, Y.; CHEN, M.; LU, D Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons. **Brain Research Bulletin**, v.88, p.487-494, 2012.

SOLECKI, R.S. Shanidar IV, a Neandertal Flower Burial in Northern Iraq. **Science**, v.190, 1975.

SULTANA, S.; ASIF, H.M.; NAZAR, H.M.; AKHTAR, N.; REHMAN, J.U.; REHMAN, R.U. Medicinal Plants Combating Against Cancer - a Green Anticancer Approach. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.15, p.4385-4394, 2014.

SUN, A.; XU, X.; LIN, J.; CUI, X.; XU, R. Neuroprotection by Saponins. **Phytotherapy Research** (Epub ahead of print), 2014.

TOHDA, C.; MATSUMOTO, N.; ZOU, K.; MESELHY, M.R.; KOMATSU, K. Abeta(25-35)-induced memory impairment, axonal atrophy, and synaptic loss are ameliorated by M1, A metabolite of protopanaxadiol-type saponins. **Neuropsychopharmacology**, v.29, p.860-868, 2004.

VEIGA-JR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, p.519-528, 2005.

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

WALLACE, M.; LUINE, V.; ARELLANOS, A.; FRANKFURT, M. Ovariectomized rats show decreased recognition memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex. **Brain Research**, v.1126, p.176-182, 2006.

WANG, Q.; SUN, L.H.; JIA, W.; LIU, X.M.; DANG, H.X.; MAI, W.L.; WANG, N.; STEINMETZ, A.; WANG, Y.Q.; XU, C.J. Comparison of ginsenosides Rg1 and Rb1 for their effects on improving scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. **Phytotherapy Research**, v.24, p.1748-1754, 2010.

YADAV, S.; GUPTA, S.P.; SRIVASTAVA, G.; SRIVASTAVA, P.K.; SINGH, M.P. Role of Secondary Mediators in Caffeine-Mediated Neuroprotection in Maneb- and Paraquat-Induced Parkinson's Disease Phenotype in the Mouse. **Neurochemistry Research**, v.37, p.875-884, 2012.

ZHOU, Y.Q.; YANG, Z.L.; XU, L., LI, P.; HU, Y.Z. Akebia saponin D, a saponin component from *Dipsacus asper* Wall, protects PC 12 cells against amyloid-beta induced cytotoxicity. **Cell Biology International**, v.33, p.1102-1110, 2009.

ANEXOS

Anexo I. Principais atividades biológicas de diferentes tipos de saponinas. Retirado de Sun e colaboradores (2014).

No.	Compound	Neuroprotection	Botanical source	Main mechanisms	Main references
(1)	Ginsenoside Rb1	Stroke, AD, HD	<i>Panax ginseng</i>	Antioxidant, TNF- α , IL-6, anti-apoptosis, Ca^{2+} influx NHE, BDNF, GDNF, tau phosphorylation, NF- κ B, PKA, GPIIb/IIIa/IC; Hs-1, neurite outgrowth enhancing	Chen et al., 2012; Li et al., 2010; Liu et al., 2012; Liang et al., 2010; Zhao et al., 2011b)
(2)	Ginsenoside Rb2	—	<i>P. ginseng</i>	TNF- α , NF- κ B	Wu et al., 2007
(3)	Ginsenoside Rb3	Depresses the basal synaptic transmission	<i>P. ginseng</i>	Antioxidant, GABA receptor, neurite outgrowth enhancing	Kim et al., 1998; Jiang et al., 2011; Zou et al., 2002
(4)	Ginsenoside Rg	HD	<i>P. ginseng</i>	Ca^{2+} signaling pathway	Wu et al., 2009
(5)	Ginsenoside Rd	Stroke	<i>P. ginseng</i>	Antioxidant, HDG, COX-2, PGE $_2$, Ca^{2+} influx, tau phosphorylation, promote the differentiation of neurospheres into astrocytes	He et al., 2006; Ye et al., 2009; Zhang et al., 2011
(6)	Ginsenoside Rg	Stroke, PD	<i>P. ginseng</i>	TNF- α , NO, decrease mitochondrial swelling	Chen et al., 2008a, 2008b; Xu et al., 2009
(7)	Ginsenoside Rg1	Stroke, AD, PD	<i>P. ginseng</i>	Antioxidant, TNF- α , NO, GDNF, BDNF, NGF, IGF-1R, NF- κ B, JNK, PKA, ER signaling pathway, neural networks reconstruction, AChE	Gao et al., 2009; Xue et al., 2006; Fang et al., 2012; Liu et al., 2011
(8)	Ginsenoside Rg2	Stroke	<i>P. ginseng</i>	Anti-apoptosis	Zhang et al., 2008a, 2008b
(9)	Ginsenoside Rg3	AD	<i>P. ginseng</i>	Antioxidant, NMDA, HDG, TNF- α , IL-1 β , MSRA, AP-1, PKA, promote A β intake	Liu and Lee, 2005; Chen et al., 2006; Bai et al., 2008
(10)	Ginsenoside Rb5	HD	<i>P. ginseng</i>	Anti-apoptosis	Wu et al., 2008
(11)	Ginsenoside Rb2	AD	<i>P. ginseng</i>	NMDA, TNF- α , JNK, AP-1, AP-1, PKA	Kim et al., 2004; Lee et al., 2006
(12)	Ginsenoside Rb3	inhibit microglial activation	<i>P. ginseng</i>	HDG, TNF- α , IL-1 β	Shen et al., 2009
(13)	Ginsenoside compound K	AD	<i>P. ginseng</i>	GABA, TNF- α , IL-1 β , HDG, NF- κ B, JNK, AP-1, ICAM-1	Bae et al., 2010; Tuntia et al., 2004
(14)	Gypenoside TN-2	Learning deficit	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	BDNF, CREB	Hong et al., 2011
(15)	Madecassoside	PD	<i>Centella asiatica</i>	BDNF, antioxidant, Bcl-2/Bax	Xu et al., 2013
(16)	Notoginsenoside R1	Protects neurons	<i>Panax notoginseng</i>	NMDA, Bcl-2/Bax, Ca^{2+} influx	Yu et al., 2009
(17)	Notoginsenoside R4	Neurite outgrowth	<i>P. notoginseng</i>	Neural networks reconstruction	Zou et al., 2002
(18)	Honginsenoside Fc	Neurite outgrowth	<i>P. notoginseng</i>	Neural networks reconstruction	Zou et al., 2002
(19)	Spiracenoside A	AD	<i>Leigou platyphylla</i>	NGF, ERK, PI3 kinase/Akt, TrkA, neural networks reconstruction	Hur et al., 2009
(20)	Teniposide AII	AD	<i>Artemisia sphaerobotria</i>	AChE	Lee et al., 2009
(21)	Xanthoxoside	AD	<i>Xanthoxenus umbellata</i>	ADChE, antioxidant	Choi et al., 2008
(22)	Oxyapocarin F	AD	<i>Polypodium tenuifolium</i>	MPF, ChAT	Yoon et al., 2005
(23)	Platygodin D	Stroke	<i>Polypodium grandifolium</i>	NF- κ B, COX-2	Choi et al., 2009
(24)	Kaipansapocarpin A	AD	<i>Achyrocline satureioides</i>	AChE, p-CREB	Chen et al., 2011
(25)	Kaipansapocarpin B	AD	<i>K. paniculata</i>	ADChE, p-CREB	Chen et al., 2011
(26)	Jaliscole A	—	<i>Ziziphora jelskii</i>	GABA receptor	Yoon et al., 2010
(27)	Astragaloside IV	Stroke, PD	<i>Astragalus membranaceus</i>	Antioxidant, TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, Ca^{2+} influx, regeneration of the neural network	Shu et al., 2008; Chen et al., 2008; Li et al., 2012
(28)	Asiatic saponin D	AD	<i>Dipsacis asper</i>	MAPK, anti-apoptosis	Yu et al., 2012
(29)	Asiaticoside	PD	<i>C. asiatica</i>	Antioxidant, balance of Bax/Bcl-2/Bax	Choi et al., 2012
(30)	2'-o-Acetyl-polygalactin D2	Stroke	<i>P. grandifolium</i>	NF- κ B, COX-2	Chen et al., 2008
(31)	Hidrocortisonolactona	AD	<i>Polypodium tenuifolium</i>	—	Chen et al., 2007
(32)	Escin	Stroke	<i>Aesculus saponaria</i>	C3, CCL2, TNF- α , CD40, GM-CSF	Zhang et al., 2010
(33)	Methylchalconein	Enhance neurite outgrowth	<i>Sinolimnium acidi</i>	—	Yu et al., 2008