BEATRIZ DORR CANICEIRO

**Efeitos da *Paullinia cupana* e de seus principais
compostos ativos na modulação da resposta imune**

São Paulo

2012

BEATRIZ DORR CANICEIRO

**Efeitos da *Paullinia cupana* e de seus principais compostos
ativos na modulação da resposta imune**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia Experimental
e Comparada da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2639
FMVZ

Caniceiro, Beatriz Dorr

Efeitos da *Paullinia cupana* e de seus principais compostos ativos na modulação da resposta imune / Beatriz Dorr Caniceiro. -- 2012.
120 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak.

1. Guaraná. 2. Cafeína. 3. Catequina. 4. Imunidade adaptativa. 5. Plantas medicinais. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos possíveis efeitos da administração de *paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, sobre o sistema imune de camundongos", protocolado sob o nº1756/2009, utilizando 160 (cento e sessenta) camundongos, sob a responsabilidade da Profa Dra Silvana Lima Górnaiak, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09/09/09.

We certify that the Research "Evaluation of possible effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis* (guarana) administration on the immune system of mice", protocol number 1756/2009, utilizing 160 (one hundred sixty) mice, under the Profa Dra Silvana Lima Górnaiak, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/09/09.

São Paulo, 10 de setembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CANICEIRO, Beatriz Dorr

Título: Efeitos da *Paullinia cupana* e de seus principais compostos ativos na modulação da resposta imune

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

*À minha mãe Hilda pelo amor, carinho, apoio e confiança sempre constantes.
Muito obrigada por acreditar em mim, por se preocupar, estressar, chorar e sorrir
comigo, me estimular quando estava desanimando e me ensinar a ter garra para
lutar pelos meus sonhos. Mãe a senhora é uma guerreira!
Tenho muito orgulho de ser sua filha. Te amo!*

*Ao meu pai Antônio que apesar de não estar entre nós há 16 anos, nunca deixou
de viver em meu coração e nas minhas lembranças. Com ele aprendi o verdadeiro
significado das palavras perseverança, humildade e amor. Tudo que consegui até
hoje, todos os sonhos e conquistas, sempre foram dedicados a ele e a minha
“mamis”. Sinto muito a sua falta e sempre vou te amar!*

Ao meu noivo Tiago por me apoiar, consolar e estimular sempre. Por ter paciência e me “aguentar” nos momentos de estresse, por ser esta pessoa tão gentil, carinhosa e compreensiva que és. Lindo, te amo!

À minha irmã Suzana por me apoiar não só agora, mas em todos os momentos da minha vida. Por aturar minha bagunça no quarto e ouvir a leitura desta dissertação algumas “muitas” vezes. Apesar de nossas diferenças, sei que posso contar com você em qualquer hora e lugar. Te amo!

À minha irmã Rosane, meu sobrinho Vinicius e ao “bebê” Bolinha por todos os momentos juntos. Como vocês dizem: “nossa família é pequena, mas é a melhor do mundo!” Amo vocês!

À minha orientadora, Silvana Lima Górnias, por sempre acreditar em mim e no meu futuro na pesquisa. Obrigada por me estimular quando estava desanimada, me aconselhar quando estava “perdida” e se preocupar comigo e minha família. Muito obrigada por me ajudar sempre! Nunca esquecerei o que você fez por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Patologia (VPT), Laboratório de Farmacologia e Toxicologia e Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), local onde este trabalho foi desenvolvido.

A todos os professores do Departamento de Patologia (FMVZ-USP), pelo incentivo e auxílio.

Aos professores Heidge Fukumasu e Edson Roberto da Silva pelo apoio no início do mestrado.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, Laboratório de Ficologia e, mais especificamente, à pesquisadora Luciana Retz de Carvalho, por me apresentar ao “mundo da química”, pelos ensinamentos, apoio e amizade desde a iniciação científica.

A Prof^ª. Célia Aparecida Paulino por acreditar no meu potencial e me ajudar quando precisei. Foi com o apoio dela que dei meu primeiro passo em direção à vida científica.

Aos funcionários do CEPTOX pelo auxílio na realização da bioquímica e pela ótima convivência.

Aos funcionários do biotério: Claudia, Idalina, Rosiris, Nelson, Mauro, Luciana e Aline pela dedicação, fornecimento dos camundongos mesmo diante de todos os contratemplos, por me fazerem rir diante das adversidades, me apoiar e confortar quando eu desanimava e chorava. Enfim, o meu mais profundo obrigada. Vocês são muito mais do que “os funcionários do biotério”, são meus amigos!

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia: Nicolle, Vagner e Herculano pelo auxílio nos experimentos, boa convivência e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia: Cláudio e Luciano pela ajuda na confecção das lâminas.

As secretárias da pós-graduação e a secretária de pós-graduação do VPT: Cristina.

Aos demais funcionários do Departamento de Patologia pela ótima convivência.

Aos funcionários da biblioteca, principalmente a D. Elza, pela correção da tese e auxílio sempre presentes.

À Andréia Oliveira Latorre, pela amizade e apoio sempre presentes. Foi com você que aprendi a “pensar cientificamente” e hoje, se sou uma pesquisadora melhor, devo um pouco disso à você. Muito obrigada pelo apoio e confiança depositados em mim.

À todos meus colegas da pós-graduação pela ótima convivência: Aline, Andreia Latorre, Izabel, Thaísa, Sayuri, Andreia Leffer, Luciana Lippi, Luciana Cunha, Fernando Pípole, Fernando Souza, , Juliana Vieira, Fabiana Elias, Camila Lima, Daniel Sanches, Márcia Nagamine, Tereza, Lucas Chaible, Thiago Kirsten, Thiago Marinho, Vanessa, Thalita, Adriana Siqueira, Aline Mello, André, Gabriela, Juliana e Silmara.

Ao “quarteto fantástico” da graduação por sempre me apoiarem: Verônica, Carlão, Gabi, e Michelle.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento desta pesquisa (Processo nº. 2009/12117-4).

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda.”

Confúcio

RESUMO

CANICEIRO, B. D. **Efeitos da *Paullinia cupana* e de seus principais compostos ativos na modulação da resposta imune.** [Effects of *Paullinia cupana* and its main active principles on the immune response modulation]. 2012. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A busca por substâncias imunomoduladoras oriundas de plantas medicinais é crescente devido à grande variedade de doenças relacionadas às respostas imunológicas desordenadas, como as autoimunidades e o câncer. Neste sentido, sabe-se que a *Paullinia cupana*, popularmente conhecida como guaraná, é uma planta medicinal que apresenta entre outros efeitos, propriedades quimiopreventiva e antitumoral em camundongos. Entretanto, até o presente estudo, não havia relatos na literatura a respeito dos efeitos desta planta sobre o sistema imune, conhecido por desempenhar papel fundamental não só no controle de infecções, mas também no combate ao câncer. Assim, o presente estudo avaliou os efeitos do pó das sementes de guaraná e de seus principais compostos ativos, cafeína e catequina, sobre o sistema imune de camundongos C57BL/6 através de protocolos preconizados pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) com modificações. Os resultados obtidos mostraram que o guaraná, devido à ação majoritária da catequina, mas com a participação da cafeína também, diminui as respostas imunes, celular e humoral, verificada através da diminuição da expansão de linfócitos T frente a um antígeno específico, redução da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia e título de anticorpos, diminuição dos pesos relativos do baço e timo e celularidade deste último, além de aumento de células imaturas no timo. Desta forma, os resultados aqui expostos demonstram, pela primeira vez, que a ingestão de guaraná reduz a imunidade adaptativa através da diminuição das respostas celular e humoral. Assim, futuros estudos deverão ser realizados, no sentido de se verificar a possibilidade do uso desta planta ou de seus princípios ativos no controle de doenças inflamatórias e autoimunes, caracterizadas por uma resposta exacerbada do sistema imune.

Palavras-chave: Guaraná. Cafeína. Catequina. Imunidade adaptativa. Plantas medicinais.

ABSTRACT

CANICEIRO, B. D. **Effects of *Paullinia cupana* and its main active principles on the immune response modulation.** [Efeitos da *Paullinia cupana* e seus principais compostos ativos na modulação da resposta imune]. 2012. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Seeking for immunomodulatory compounds derived from medicinal plants is increasing due to the huge variety of diseases related to disordered immune responses, such as autoimmunity and cancer. Therefore, it is known that the *Paullinia cupana*, popularly known as guarana, is a medicinal plant that has among other effects, chemopreventive and antitumor properties in mice. However, until the present moment, there were no reports in the literature about the effects of this plant on the immune system, which is known to play key role not only in the infectious control, but also in combat cancer. Thus, this study evaluated the effects of guarana seed powder and its major active principles, caffeine and catechin, on the immune system of C57BL/6 mice through protocols recommended by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) with modifications. The results showed that guarana, due to the majority action of catechin, but also with the participation of caffeine, decreases the cellular and humoral immune responses, as indicated by the decreased expansion of antigen-specific T lymphocyte, reduced response delayed-type hypersensitivity and titer of antibodies, reduction in relative weights of thymus and spleen cellularity, besides increase of immature cells in the thymus. Thus, the results showed here demonstrate, for the first time, that the intake of guarana decreases the adaptive immunity by reducing cellular and humoral responses. Thus, futures studies should be conducted in order to better evaluate the use of this plant and/or its main active principle in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases, which are characterized by exarcebated immune response.

Key words: Guarana. Caffeine. Catechin. Adaptative immunity. Herbal plants.

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	-	Células aderentes
AMPc	-	Monofosfato de adenosina cíclico
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	-	Célula apresentadora de antígeno
AT	-	Anatoxina tetânica
ATM	-	Ataxia telangiectasia mutada
ATR	-	Ataxia telangiectasia relacionada
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMB	-	Concentração Média Determinada
DC	-	Célula dendrítica
DP	-	Desvio Padrão
DPR	-	Desvio Padrão Relativo
DTH	-	Hipersensibilidade do tipo tardia
EGCG	-	Epigallocatequina-3-galato
EMBRAPA	-	Empresa Brasileira de Agropecuária
FCA	-	Adjuvante completo de Freund
FTTC	-	Isotiocianato de fluoresceína
FMVZ	-	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FSC	-	<i>Forward scatter</i>
LHS	-	Lípase hormônio-sensível
MHC	-	Complexo de histocompatibilidade principal

NA	-	Células não-aderentes
NF-kB	-	Fator Nuclear kappa B
NK	-	<i>Natural killer</i>
OECD	-	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
PE	-	Ficoeritrina
PE-Cy7	-	Ficoeritrina – cyanine dye 7
PI	-	Iodeto de propídeo
R ²	-	Coeficiente de correlação
SAPI	-	<i>Staphylococcus aureus</i> conjugado com PI
SFB	-	Soro fetal bovino
SNC	-	Sistema Nervoso Central
SSC	-	<i>Side scatter</i>
SRBC	-	Eritrócitos de carneiro
TAE	-	Tumor Ascítico de Ehrlich
TCR	-	Receptor de célula T
Th	-	T <i>helper</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	SOBRE A <i>Paullinia cupana</i>	20
1.1.1	Propriedades terapêuticas do guaraná.....	21
1.1.2	Possíveis efeitos tóxicos do guaraná.....	23
1.1.3	Sobre a cafeína.....	24
1.1.4	Sobre a catequina	28
1.2	NOÇÕES BÁSICAS SOBRE O SISTEMA IMUNE.....	30
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	ANIMAIS	36
3.2	REAGENTES	36
3.2.1	Soluções	38
3.3	ESTUDO QUÍMICO	39
3.3.1	Estudo comparativo entre os teores de cafeína e catequina presentes nos extratos, aquoso e etanólico, do pó de guaraná.....	39
3.3.2	Validação da metodologia de quantificação de cafeína e catequina presentes no pó de guaraná por CLAE.....	40
3.3.3	Quantificação da cafeína presente no pó de guaraná por CLAE.....	41
3.3.4	Quantificação da catequina presente no pó de guaraná por CLAE	42
3.4	ESTUDO “ <i>IN VIVO</i> ”	44
3.4.1	Tratamento com guaraná (<i>Paullinia cupana</i>).....	44
3.4.2	Tratamento com cafeína	44
3.4.3	Tratamento com catequina	45
3.4.4	Tratamento com cafeína e catequina.....	45
3.4.5	Avaliação do consumo de água e ração e mensuração do peso corpóreo	45

3.4.6	Indução do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) em camundongos C57BL/6	46
3.4.7	Coleta do TAE.....	46
3.4.8	Avaliação do peso relativo do baço, timo e adrenais, celularidade do baço, timo e medula óssea, além de observação da presença ou de alterações clínicas.....	46
3.4.9	Avaliação da bioquímica sérica e hemograma	47
3.4.10	Avaliação histopatológica de órgãos linfóides, adrenais, fígado, rim, estômago e intestino delgado	47
3.4.11	Preparação dos eritrócitos de carneiro (SRBC)	48
3.4.12	Avaliação da resposta humoral por meio da técnica de hemaglutinação	48
3.4.13	Avaliação da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH).. ..	48
3.4.14	Indução da resposta imune celular	49
3.5	ESTUDO <i>EX VIVO</i>	49
3.5.1	Citometria de fluxo.....	49
3.5.2	Ciclo celular	50
3.5.3	Fenotipagem dos linfócitos esplênicos, tímicos e do sangue periférico.....	50
3.5.4	Avaliação da proliferação de linfócitos T antígeno-específica.....	51
3.5.5	Avaliação da atividade dos macrófagos peritoneais medida por meio da fagocitose.....	52
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	54
4.1	EXPERIMENTO 1: QUANTIFICAÇÃO DA CAFEÍNA PRESENTE NO PÓ DE GUARANÁ POR CLAE	55
4.1.1	Resultados da validação do método por CLAE.....	55
4.1.2	Resultados da quantificação da cafeína presente no pó de guaraná por CLAE	57
4.2	EXPERIMENTO 2: QUANTIFICAÇÃO DA CATEQUINA PRESENTE NO PÓ DE GUARANÁ POR CLAE.	59
4.2.1	Resultados da validação do método por CLAE.....	59

4.2.2	Resultados da quantificação da catequina presente no pó de guaraná por CLAE.....	61
4.3	EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DO GUARANÁ EM CAMUNDONGOS C57BL/6 E ANÁLISE DE PARÂMETROS IMUNES.....	63
4.3.1	Resultados	63
4.4	EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DO PESO RELATIVO DO BAÇO, TIMO E ADRENAIS, CELULARIDADE DO BAÇO, TIMO E MEDULA ÓSSEA E PRESENÇA OU NÃO DE ALTERAÇÕES CLÍNICAS.....	69
4.4.1	Resultados	69
4.5	EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA, BIOQUÍMICA SÉRICA E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE ÓRGÃOS LINFOIDES, ADRENAIS, FÍGADO, RIM, ESTÔMAGO E INTESTINO DELGADO.....	74
4.5.1	Resultados	74
4.6	EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA (DTH)	79
4.6.1	Resultados	79
4.7	EXPERIMENTO 7: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL POR MEIO DA TITULAÇÃO DE ANTICORPOS.....	82
4.7.1	Resultados	82
4.8	EXPERIMENTO 8: QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS, TÍMICOS E NO SANGUE PERIFÉRICO POR FENOTIPAGEM.....	84
4.8.1	Resultados	84
4.9	EXPERIMENTO 9: AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T ANTÍGENO-ESPECÍFICA	89
4.9.1	Resultados	89
4.10	EXPERIMENTO 10: ATIVIDADE DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS MEDIDA POR MEIO DA FAGOCITOSE.....	91
4.10.1	Resultados	91

5	DISCUSSÃO.....	93
6	CONCLUSÃO	102
	REFERÊNCIAS.....	105

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para o tratamento das mais variadas doenças é observado desde a antiguidade, conforme demonstrado em pergaminhos sumérios sobre a utilização da *Papaver somniferum* para diminuição da dor ou como descrito em obras chinesas, tais como o livro *Pen T'Sao Ching*. (GURIB-FAKIM, 2006).

Atualmente, a utilização de plantas medicinais na forma de suplementos ou fitoterápicos é praticada por mais de 80% da população mundial e movimenta em torno de US\$ 34 bilhões/ano (MAINARDI; KAPOOR; BIELORY, 2009). No Brasil estima-se que este mercado gire em torno de 160 milhões de dólares por ano, apresentando taxa de crescimento aproximadamente quatro vezes maior do que o observado nas vendas de medicamentos sintéticos (CARVALHO et al., 2008).

O uso crescente das plantas medicinais vem acontecendo por vários motivos, dentre os quais destacam-se, a preferência por tratamentos ditos “naturais” devido à crença de que estas plantas são isentas de efeitos adversos, além do elevado custo para produção dos medicamentos sintéticos quando comparado àqueles derivados das plantas (SIANI, 2003; OLIVEIRA, 2005).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão federal responsável pela regulamentação de medicamentos no Brasil, a *Paullinia cupana* é a terceira planta medicinal com maior número de registros dentre as 87 cadastradas neste órgão (CARVALHO et al., 2008) e já rendeu mais de R\$ 1 milhão para o país entre os anos 2000 e 2001. Este valor se refere tanto ao mercado interno, no comércio de bebidas à base desta planta, quanto à exportação do pó das sementes de guaraná para uso diverso (BRASIL, 2003). Por este motivo, estudos que busquem avaliar o papel desta planta no tratamento das mais variadas doenças são de grande interesse científico, econômico e para saúde pública.

1.1 SOBRE A *Paullinia cupana*

O gênero *Paullinia* compreende 180 espécies distribuídas pelo continente americano, sendo que duas destas localizam-se na região da floresta Amazônica e diferem-se quanto à forma, tamanho e cor do fruto, além de localização geográfica, sendo elas: *P. cupana* Mart var. '*typica*', a qual se distribui na Venezuela e Colômbia e *P. cupana* Mart var. '*sorbilis*', encontrada somente no Brasil (FREITAS et al., 2007). No Brasil, a *P. cupana*, popularmente conhecida como guaraná, é encontrada especificamente na região de Maués na bacia Amazônica (HENMAN, 1986).

Em relação às suas características botânicas, sabe-se que a *P. cupana* pertence à família Sapindaceae e é uma planta perene e trepadeira que pode atingir 10 metros de altura. Suas flores crescem em forma de cachos e rendem muitos frutos que são formados por cápsulas vermelho-alaranjadas (quando maduro) contendo até três sementes de coloração castanho-escuro imersas em um arilo farináceo branco (HENMAN, 1982) (Figura 1).

Figura 1 – Fotografia da *P. cupana* ilustrando seus frutos e sementes

Segundo o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011), as sementes correspondem à porção da planta comumente utilizada, porém as folhas, flores e frutos também podem ser empregadas.

Em relação aos seus constituintes químicos, cada parte da planta contém diferenças, sendo verificada, no extrato das sementes de guaraná, a presença de metilxantinas, como a cafeína, a teobromina e a teofilina, flavonoides como a catequina e a epicatequina, além de proantrocianidóis e saponinas (HENMAN, 1982). Dentre estes compostos, destacam-se a cafeína e a catequina como os mais importantes princípios ativos da planta, sendo que cada um deles atinge a concentração de até 6% nas sementes do guaraná (CARLINI, 2003; GRUENWALD; BRENDLER; JAENICKE, 2007; YAMAGUCHI-SASAKI et al., 2007).

1.1.1 Propriedades terapêuticas do guaraná

Há vários relatos na literatura comprovando diferentes ações terapêuticas da *P. cupana*. Assim, sabe-se que o guaraná pode apresentar efeito bacteriostático em algumas espécies de bactérias como a *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno Gram-negativo causador de infecção (BASILE et al., 2005) e o *Streptococcus mutans*, microorganismo Gram-positivo envolvido na formação da placa dentária (YAMAGUCHI-SASAKI et al.; 2007).

Além disso, o guaraná também desempenha uma importante função no tratamento de doenças cardiovasculares, uma vez que promove, em seres humanos, redução da pressão arterial, dos níveis da fração LDL do colesterol, além de diminuição da prevalência de infarto do miocárdio (KREWER et al., 2011). Corroborando estes efeitos, demonstrou-se que a *P. cupana* também promove a inibição da agregação plaquetária, devido a menor síntese de tromboxano A₂ em modelos *in vitro*, (BYDLOWSKI; YUNKER; SUBBIAH, 1988; BYDLOWSKI; DAMICO; CHAMONE, 1991), sendo a catequina, epicatequina e a cafeína, aqueles princípios ativos responsáveis por este efeito (SUBBIAH; YUNKER, 2008).

Em relação às propriedades afrodisíacas, sabe-se que o guaraná é popularmente empregado no tratamento da impotência sexual, principalmente quando associado a

outras plantas medicinais como a *Trichilia catigua*, *Zingiber officinalis* e *Ptychopetalum olacoides* no fitoterápico Catuama® (DREWES; GEORGE; KHAN, 2003; SMITH; ATROCH, 2010). Neste sentido, verificou-se que tanto a Catuama® quanto, e principalmente, o guaraná, promovem o relaxamento do corpo cavernoso (ANTUNES et al., 2001), culminando na ereção peniana, sendo atribuída tal propriedade aos constituintes presentes nesta planta.

No que se refere aos efeitos gastroprotetores da *P. cupana*, Campos et al. (2003) demonstraram que ratos pré-tratados com guaraná e cafeína apresentaram redução da gravidade das lesões gástricas induzidas pelo etanol e indometacina; porém apenas os animais tratados com a planta apresentaram efeito anti-ulcerogênico. Isto se deve provavelmente à presença de outros compostos no guaraná, como os flavonoides, conhecidos pela capacidade antioxidante e citoprotetora (GONZÁLES et al., 2000).

Vários estudos também têm demonstrado o efeito do guaraná no metabolismo de lipídeos induzindo, desta forma, a redução de peso e gordura corpórea em seres humanos (BOOZER et al., 2001; BÉRUBÉ-PARENT et al., 2005) e animais, sendo a cafeína, a substância responsável por essa ação (LIMA et al., 2005). Do mesmo modo, estudos epidemiológicos demonstraram que a ingestão de guaraná por seres humanos diminui o risco de obesidade (KREWER et al., 2011) e é capaz de aumentar o metabolismo basal (RUXTON et al., 2007).

De todas as funções terapêuticas atribuídas ao guaraná, com certeza a mais conhecida é a de estimulante do sistema nervoso central - SNC - (SCHOLEY; HASKELL, 2008). De fato, estudos conduzidos em animais de laboratório, mostraram que esta planta apresenta efeitos panicolítico (RONCON et al., 2011) e antidepressivo (CAMPOS et al, 2005; OTOBONE et al., 2007). Além disso, observou-se que o guaraná foi capaz de aumentar o desempenho físico, bloquear o efeito amnésico induzido pela escopolamina, bem como manter a memória previamente adquirida. Estes efeitos são atribuídos à presença de outros compostos no guaraná, além da cafeína, uma vez que esta metilxantina quando empregada isoladamente não apresentou os mesmos resultados (ESPINOLA et al., 1997). Corroborando estes relatos, demonstrou-se em humanos que a ingestão de guaraná está diretamente relacionada com a melhora do humor, aumento do desempenho cognitivo e redução da fadiga mental (KENNEDY et al., 2004; HASKELL et al., 2007; KENNEDY et al., 2008; SCHOLEY;HASKELL, 2008). Por outro lado,

existem trabalhos na literatura descrevendo a ausência de efeitos estimulantes no SNC, tanto após a administração aguda quanto crônica de guaraná, provavelmente devido variação no extrato empregado (GALDUROZ; CARLINI, 1994, 1996).

Outro efeito benéfico relacionado ao guaraná, mais especificamente aos seus flavonoides, é a sua atividade antioxidante. Neste sentido, Leite et al. (2011) recentemente demonstraram que a ingestão da planta é capaz de reduzir o estresse oxidativo em ratos intoxicados com metais pesados. Do mesmo modo, Fukumasu et al. (2006a) verificaram que o consumo de guaraná protege o DNA de hepatócitos contra injúria induzida por composto pró-oxidante, sendo observado, ainda, que os flavonoides desta planta são capazes de inibir a peroxidação lipídica *in vitro* (MATTEI et al., 1998; BASILE et al., 2005).

Por fim, sabe-se que nos últimos anos, vários estudos têm sido publicados a respeito dos efeitos das plantas medicinais sobre o desenvolvimento e controle do câncer (PARK et al, 2011; GU et al., 2012; THAKUR; GUPTA; GUPTA, 2012). Dentre estas plantas, destaca-se o guaraná, a qual Fukumasu (2008) demonstrou apresentar efeitos quimiopreventivo e antitumoral em vários modelos experimentais realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Estes estudos revelaram que o efeito antitumoral do guaraná ocorre devido à inibição da proliferação celular e aumento de células tumorais apoptóticas (FUKUMASU et al., 2006b; FUKUMASU et al., 2008), ocasionada pela diminuição da expressão de ciclina D1e consequente parada das células tumorais na fase G0/G1 do ciclo celular (FUKUMASU; LATORRE; DAGLI, 2011).

1.1.2 Possíveis efeitos tóxicos do guaraná

Há poucos relatos na literatura sobre os possíveis efeitos tóxicos do guaraná. Assim, de maneira geral, a toxicidade da planta está relacionada aos efeitos centrais, promovendo agitação e insônia (ERNST, 1998) sendo que estas alterações normalmente se devem ao consumo de doses elevadas do guaraná (MARIA et al., 1998; ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2010). No entanto, deve-se considerar que alguns estudos com administração da planta em doses elevadas (1 e 2 g/kg), por diferentes vias de exposição,

em ratos e camundongos, não causaram efeito tóxico (MATTEI et al., 1998). Estas mesmas observações foram relatadas quando da administração de 1g/dia, por 150 dias em seres humanos (GALDUROZ; CARLINI, 1996). Da mesma maneira, não foram detectados efeitos tóxicos em indivíduos que ingeriram fitoterápico que continha a *P.cupana* em sua composição (OLIVEIRA et al., 2005). No entanto, mais estudos devem ser realizados, empregando-se especificamente alguns protocolos de análise de risco preconizados pelas principais agências normatizadoras internacionais, como a OECD, para melhor concluir sobre seus possíveis efeitos tóxicos.

1.1.3 Sobre a cafeína

A cafeína, também conhecida como 1,3,7-trimetilxantina, é um alcaloide purínico, podendo ser encontrada em mais de 60 espécies de plantas, como por exemplo, no guaraná (YAMAGUCHI-SASAKI et al., 2007), em cafés, chás, chocolates, cacau, bebidas derivadas da cola, além de diversos medicamentos (HARLAND, 2000). Uma xícara contendo 180 mL de café, por exemplo, pode apresentar um teor de cafeína que varia entre 20 mg e 150 mg, dependendo da espécie de planta utilizada, localização geográfica da mesma e condições climáticas (CAMARGO; TOLEDO, 1998) (Figura 2).

Figura 2 – Fórmula estrutural da cafeína. Extraída de Horrigan, Kelly e Connor (2006)

Sabe-se ainda que a cafeína é a xantina mais consumida no planeta, atingindo cerca de 80% da população mundial (OGAWA; UEKI, 2007). Com base nisso, estima-se que mais de 120 mil toneladas de cafeína sejam consumidas por ano em todo mundo (CAMARGO; TOLEDO, 1998), sendo o Brasil um dos três países que mais consome esta xantina, apresentando média de consumo per capita ao redor de 300 mg de cafeína/dia (FREDHOLM et al., 1999).

Em relação às características farmacocinéticas, a cafeína é completamente absorvida pelo trato gastrointestinal, principalmente no intestino delgado (ARNAUD, 2011), apresentando biodisponibilidade de aproximadamente 100% (LIGUORI; HUGHES; ANDGRASS, 1997), independente da via de exposição e em diferentes espécies como o ser humano, rato e camundongo (WALTON; DORNE; RENWICK, 2001). Este composto não possui efeito significativo de primeira passagem e apresenta baixa ligação a proteínas plasmáticas (10 a 35%) (DALY, 2007).

Em humanos, a maior parte da cafeína absorvida é biotransformada, principalmente pela CYP1A2 (SAWYNOK; YAKSH, 1993), gerando três metabólitos ativos: paraxantina (84 %), teobromina (12 %) e teofilina (4 %), os quais são responsáveis, respectivamente, pelo aumento da lipólise, vasodilatação e broncodilatação (SAFRANOW; MACHOY, 2005). Já, em roedores, o metabólito predominante é a teobromina constituindo 51% do total de compostos ativos (ETENG et al., 1997).

Uma vez no sangue, a cafeína e seus metabólitos ativos atravessam as membranas celulares e distribuem-se por todo o corpo, sendo estes encontrados em quantidades variáveis no líquido, cordão umbilical, leite, sêmen, saliva, cérebro, além de outros órgãos (ARNAUD, 2011).

A maior parte da cafeína presente no sangue é reabsorvida nos túbulos renais (ARNAUD, 2011), sendo que somente 1 a 2% da dose total desta xantina ingerida pelos seres humanos é excretada sem alteração na urina. Já, os metabólitos ativos são biotransformados em compostos mais polares e então excretados da mesma maneira (WALTON; DORNE; RENWICK, 2001).

Em relação ao mecanismo de ação, sabe-se que a cafeína atua em vários alvos moleculares, sendo o antagonismo dos receptores de adenosina e a inibição da fosfodiesterase, responsáveis pela maioria dos efeitos biológicos atribuídos a este composto (NAWROT et al., 2003). Desta forma, há relatos na literatura demonstrando

que a ingestão de cafeína promove melhora da função pulmonar e estimulação do centro respiratório em pacientes asmáticos (DALY, 2007).

Também, foi demonstrado o efeito estimulante da cafeína através da melhora do humor (LORIST; TOPS, 2003) e da função cognitiva (MERCADANTE; SERRETTA; CASUCCIO, 2001), aumento da resistência física e diminuição da fadiga (DOHERTY; SMITH, 2004), bem como efeitos antidepressivo e ansiolítico (FREDHOLM et al., 1999) após o uso desta metilxantina. Outros estudos descreveram ainda a ação analgésica (ZHANG, 2001) e vasoconstritora da cafeína, importante no alívio da cefaleia (SAWYNOK, 2010).

Além disso, vários pesquisadores relataram os efeitos preventivos e terapêuticos da cafeína em doenças crônicas, tais como a prevenção de hepatopatias como a cirrose e a fibrose (CRONSTEIN, 2010), o efeito antitumoral e antimetástático (YANG et al., 2004; OHTA et al., 2006; FUJISE et al., 2012) devido, em parte, à parada das células tumorais na fase G2/M do ciclo celular (ZHOU et al., 2000), além do uso no tratamento da obesidade (JEUKENDRUP; RANDELL, 2011) e doenças neurológicas como o Parkinson (XU; BASTIA; SCHWARSCHILD, 2005) e Alzheimer (ARENDASH; CAO, 2010).

No que se refere aos efeitos imunomodulatórios da cafeína, pode-se verificar tanto supressão quanto estimulação da resposta imune, dependendo da dose empregada (HORRIGAN; KELLY; CONNOR, 2006). Neste sentido, autores relataram que a cafeína pode diminuir a produção de citocinas importantes na resposta imune como IFN- γ e IL-2 nas concentrações de 3,75 mM e 10 mM após estimulação de esplenócitos murinos com concanavalina A (RITTER et al., 2005), além de reduzir a proliferação *in vitro* após tratamento por 48 horas com esta xantina nas concentrações entre 50 e 300 μ g/mL (ROSENTHAL; TAUB; MOORS, 1992). Por outro lado, trabalhos indicam o que a cafeína pode também apresentar efeito imunoestimulante, uma vez que a administração desta substância em concentrações inferiores a 40 mg/kg promove aumento no peso relativo do baço e linfonodos dos camundongos tratados (RAMANAVICIENE; ACATE; RAMANAVICIUS, 2004), além de aumento na proliferação dos linfócitos quando empregadas concentrações entre 10 e 1000 μ g/mL (DAVICINO; ALONSO; ANESINI, 2011).

Em relação à toxicidade desta xantina, ainda existem controvérsias quanto aos efeitos no sistema cardiovascular. Enquanto alguns estudos demonstram que a ingestão de cafeína além de não promover alterações histológicas no coração (RAY et al., 2005) apresenta ação diurética e natriurética, auxiliando no controle e redução da pressão arterial (RIBEIRO; SEBASTIÃO, 2010). Outros verificam que o seu consumo está relacionado ao aumento da pressão sanguínea e arritmia cardíaca (RIKSEN; RONGEN; SMITS, 2009).

Também podem ser observados efeitos gastrointestinais como náuseas e vômitos, além de fasciculações musculares, incontinência urinária, aumento da pressão intraocular e distúrbios neurológicos caracterizados por alucinações, delírio, irritabilidade, tontura e, em casos mais graves, psicose, em pacientes que ingeriram mais de 1 g de cafeína por dia (FREDHOLM et al., 1999; JULIANO; GRIFFITHS, 2004).

O uso de cafeína tem também sido associado à diminuição da densidade óssea devido ao aumento de cálcio excretado na urina (FREDHOLM et al., 1999) que pode estar relacionado (HERNANDEZ-AVILA et al., 1991) ou não (TAVANI; NEGRI; LA VECCHIA, 1995) com a ocorrência de osteoporose.

No que se refere à gestação, há relatos associando o consumo de altas doses de cafeína (> 5 mg/kg/dia) a alterações esqueléticas no feto, retardo no crescimento intrauterino e baixo peso ao nascer, bem como aborto e malformações congênitas nos casos mais graves (SAWYNOK; YAKSH, 1993). Por outro lado, vários autores não encontraram correlação entre o consumo de cafeína e a ocorrência de efeitos adversos reprodutivos e perinatais (PECK; LEVITON; COWAN, 2010).

Outro fato que deve ser considerado, quando se analisa os efeitos tóxicos da cafeína, se refere às velocidades de biotransformação e eliminação desta xantina; assim, sabe-se que estes parâmetros farmacocinéticos apresentam-se reduzidos em bebês, idosos, gestantes e pacientes com insuficiência hepática ou renal (ARNAUD, 2011), o que acarreta em potencialização dos efeitos da cafeína no organismo. Este efeito pode ser agravado, ainda, com a associação concomitante de álcool e tabaco, e correlaciona-se com o maior risco de infarto do miocárdio (SAWYNOK; YAKSH, 1993).

Ainda, verificou-se que o uso contínuo de cafeína pode promover tolerância, sendo necessárias doses cada vez maiores para observação dos mesmos efeitos (JULIANO; GRIFFITHS, 2004), além da síndrome de abstinência, quando seu uso é

interrompido temporária ou definitivamente causando ansiedade, nervosismo, irritação, agitação e alteração do sono (TAVARES; SAKATA, 2012).

1.1.4 Sobre a catequina

A catequina é um tipo de flavonoide que pode existir na natureza como dois estereoisômeros: *trans*-catequina e *cis*-epicatequina que diferem apenas na fórmula estrutural, sendo a (+)-catequina e (-)-epicatequina as formas comumente encontradas nos alimentos (RINALDO et al., 2010) (Figura 3). Desta maneira, são fontes de flavonoides os legumes, verduras, frutas como a uva, maçã, açaí, cacau, além de uma variedade de plantas medicinais tais como o chá verde, chá preto e o guaraná, sendo que neste último, a (+)-catequina é o flavonoide predominante (GRUENWALD; BRENDLER; JAENICKE, 2007; HACKMAN et al., 2008; PACHECO-PALENCIA; MERTENS-TALCOTT; TALCOTT, 2008).

Figura 3 – Fórmula estrutural dos isômeros de catequina. Extraída de Rinaldo et al. (2010)

Sabe-se, ainda, que a (+)-catequina e a (-)-epicatequina apresentam semelhanças quanto à farmacocinética, diferindo-se apenas pela maior rapidez de absorção e biotransformação do isômero cis quando comparado ao trans (OTTAVIANI et al., 2011). Assim, uma vez consumidas, estas catequinas são absorvidas ao longo do trato gastrointestinal, a começar pelo intestino delgado, podendo alcançar concentração plasmática máxima, em seres humanos, 1 h e meia após a ingestão (BELL et al., 2000). Na mucosa intestinal estes compostos são conjugados ao ácido glicurônico, atingindo o fígado e posteriormente o rim concluindo o processo de biotransformação (PISKULA; TERAQ, 1998). Os metabólitos se distribuem para a maioria dos órgãos, sendo encontrados em maior quantidade no esôfago, pulmão, bexiga urinária, rins, intestino grosso (KIM et al., 2000), testículos e timo (URPI-SARDA et al., 2010), onde desempenharão as mais variadas funções.

Os flavonoides que, porventura, não foram absorvidos e os metabólitos que foram excretados pela bile no jejuno-íleo podem ser (re)absorvidos após ação da microbiota no intestino grosso (HIGDON; FREI, 2003).

Por fim, é possível observar que o processo de eliminação das catequinas no organismo ocorre nas primeiras oito horas após o consumo, sendo verificado mais de 90% dos metabólitos na urina (OTTAVIANI et al., 2011), além da ocorrência, em menor quantidade, de excreção biliar através das fezes (PISKULA; TERAQ, 1998).

Em relação ao mecanismo de ação, sabe-se que estes flavonoides atuam como agentes antioxidantes através da eliminação de radicais livres, inibição de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF-kB), relacionado à produção de espécies reativas de oxigênio, bem como indução de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase e a catalase (HIGDON; FREI, 2003).

Há vários relatos na literatura que comprovam os efeitos biológicos dos flavonoides, quando consumidos isolados ou associados a outros componentes como no caso dos chás e suplementos (HACKMAN et al., 2008). No entanto, é importante ressaltar que a maioria destes estudos foi realizada com o chá verde e seus mais relevantes princípios ativos, a epigallocatequina-3-galato (EGCG) e a epigallocatequina (MCKAY; BLUMBERG, 2002), haja vista, a carência de trabalhos envolvendo somente a catequina e seus isômeros. Os estudos relativos a estas catequinas mostraram ação antitumoral, a qual se atribui à parada no ciclo celular, inibição da angiogênese e indução de apoptose em

células tumorais (SINGH; SHANKAR; SRIVASTAVA, 2011); modulação da imunidade celular e humoral (KLEIN et al., 2000); efeito preventivo nas doenças de Alzheimer e Parkinson (MAK, 2012) e efeito cardioprotetor, uma vez que previne o aumento da pressão arterial e a ocorrência de aterosclerose (HIGDON; FREI, 2003). Além disso, também têm sido verificados efeitos benéficos destes compostos no tratamento de doenças autoimunes como na artrite reumatoide (AHMED, 2010).

1.2 NOÇÕES BÁSICAS SOBRE O SISTEMA IMUNE

O sistema imune é formado por células, órgãos e tecidos que agem em conjunto com a finalidade de proteger o organismo de qualquer substância estranha, microorganismo invasor ou célula mutante, podendo esta proteção ser dividida de duas maneiras: a imunidade inata ou inespecífica e a imunidade adquirida ou adaptativa (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2007).

A imunidade inata age como a primeira linha de defesa do organismo contra os patógenos e é composta por mecanismos de defesa inespecíficos contra o invasor e que já existiam antes do estabelecimento deste. É constituída, principalmente, por barreiras físicas e químicas, como a pele e as enzimas hidrolíticas, além de diferentes tipos celulares como os neutrófilos, macrófagos, célula *natural killer* (NK) e célula dendrítica (DC) (COICO; SUNSHINE; BENJAMINI, 2009).

Os neutrófilos e macrófagos são importantes na resposta inflamatória, sendo responsáveis pela remoção do patógeno por meio de dos processos de fagocitose e *burst* oxidativo. Além disso, os macrófagos também podem ser considerados células apresentadoras de antígeno (APC) juntamente com as DCs, responsáveis pela modulação da resposta imune (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2007).

As células NK, por sua vez, são muito importantes na morte de células infectadas por vírus ou tumorais. Este tipo de célula não precisa de um contato prévio para apresentar atividade citotóxica, isto por que o reconhecimento ocorre pela ausência ou diminuição da expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I, que normalmente é expresso na superfície de todas as células nucleadas (LANIER, 2005).

Além disso, estudos vêm demonstrando que as células NK podem também desempenhar importante função na modulação da resposta imune adaptativa, promovendo a maturação das DCs e polarização do linfócito T *helper* (Th) para Th1 (MARTIN-FONTECHA et al., 2004; BERNARDINI; GISMONDI; SANTONI, 2012).

Quanto à imunidade adaptativa, esta se caracteriza pela especificidade, discriminação entre o próprio e não próprio e pelo desenvolvimento de células de memória, responsáveis por uma resposta imune mais rápida e efetiva. Pode ser classificada em imunidade humoral ou celular.

Na resposta imune humoral ocorre a produção de anticorpos pelos linfócitos B. Estes anticorpos ou imunoglobulinas são proteínas específicas a um determinado antígeno, em geral bactérias extracelulares, que são liberados após interação entre o antígeno e o receptor de célula B (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2007).

Em relação à imunidade celular, dois tipos de linfócitos atuam: os linfócitos T citotóxicos (CD3+CD8+) e os linfócitos Th (CD3+CD4+). Os linfócitos T citotóxicos agem destruindo células infectadas por vírus ou bactérias intracelulares e células tumorais, apresentando, portanto, função semelhante às células NK. Entretanto, o mecanismo pelo qual estas células reconhecem o antígeno difere-se das células da resposta inata. Aqui, o reconhecimento ocorre após a interação entre o receptor de célula T (TCR) com o antígeno expresso no complexo MHC-I da célula infectada ou mutante, levando a liberação de enzimas que culminam na lise e consequente apoptose da célula alvo (COICO; SUNSHINE; BENJAMINI, 2009).

Já os linfócitos Th, quando estimulados pelas DCs, são capazes de produzir citocinas capazes de modular a atividade de outras células do sistema imune, potencializando ou suprimindo a resposta (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2007). Para tal é necessário, inicialmente, a ativação destes linfócitos após interação do TCR com o MHC-II presente nas células APCs. Dependendo do tipo de antígeno e citocinas envolvidas, ocorre a polarização dos linfócitos Th *naive* em vários subtipos de linfócitos Th efetores, dentre eles, Th1, Th2, Th 17 e Treg (MOSMANN et al., 2009).

Assim, os linfócitos Th1 desempenham resposta imune do tipo celular devido à ativação de macrófagos e participação na resposta inflamatória. Por outro lado, os linfócitos do tipo Th2 são caracterizados pela produção de citocinas responsáveis pela ativação de linfócitos B, constituindo então a resposta imune humoral. Os linfócitos

Th17, por sua vez, estão vinculados à resposta inflamatória observada nas autoimunidades, enquanto as células Treg são responsáveis pela supressão de outros linfócitos efetores, promovendo assim, um balanço na resposta imune (SCHMIDT-WEBER, 2010).

Neste contexto, sabe-se que o sistema imune desempenha importante papel não só no combate ao câncer, mas também no controle de autoimunidades. Assim, para proteger o organismo contra o desenvolvimento de cânceres, o sistema imune conta com uma série de mecanismos efetores que constituem a etapa de eliminação do processo de imunoedição do câncer (BHATIA; KUMAR, 2011; QUEZADA et al., 2011). Já, para evitar as doenças autoimunes, caracterizadas por respostas exacerbadas ao próprio organismo, existem mecanismos de controle e regulação deste sistema (TIAN; HUMBLET-BARON; LISTON, 2012).

Desta forma, presume-se que qualquer substância capaz de modular o sistema imune pode tanto aumentar a imunovigilância ao câncer quanto proteger o organismo contra as autoimunidades. Por outro lado, até o presente estudo não havia relatos na literatura sobre os efeitos do guaraná, conhecido por suas propriedades quimiopreventiva e antitumoral, no sistema imune. Portanto, foi objetivo do presente trabalho elucidar o papel da *Paullinia cupana* e de seus principais compostos, cafeína e catequina, na modulação da resposta imune.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração de guaraná (*Paullinia cupana*) e seus principais princípios ativos metilxantínico e polifenólico sobre o sistema imune de camundongos adultos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✧ Validação da metodologia de quantificação de cafeína e catequina presentes no pó de guaraná por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)
- ✧ Quantificação da cafeína e catequina presentes no pó de guaraná por CLAE
- ✧ Avaliação do efeito antitumoral do guaraná em camundongos C57BL/6 e análise de parâmetros imunes
- ✧ Avaliação do peso relativo do baço, timo e adrenais, celularidade do baço, timo e medula óssea, além de observação da presença ou não de alterações clínicas
- ✧ Avaliação do hemograma, bioquímica sérica e análise histopatológica de órgãos linfoides, adrenais, fígado, rim, estômago e intestino delgado
- ✧ Avaliação da resposta humoral por meio da titulação de anticorpos
- ✧ Avaliação da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)
- ✧ Quantificação de linfócitos esplênicos, tímicos e no sangue periférico por fenotipagem
- ✧ Avaliação da proliferação de linfócitos T antígeno-específica
- ✧ Avaliação da atividade dos macrófagos peritoneais medida por meio da fagocitose

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos, machos, da linhagem C57BL/6, com aproximadamente 85 dias de idade no início do experimento. Os animais foram provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP) e permaneceram durante todo o experimento em caixas plásticas medindo 19,5 x 29,5 x 13 cm, forradas com maravalha esterilizada, as quais foram mantidas em sala com aeração, exaustão, temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (45% - 65%) controladas por meio de aparelhos de ar condicionado central em um ciclo claro/escuro de 12 h; água e ração foram fornecidos *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da FMVZ-USP e estão protocolados sob o nº1756/2009.

3.2 REAGENTES

- ✧ Acetonitrila (Sigma), ácido acético glacial (Merck), metanol (EMD™), ácido trifluoracético (J. T. Baker), celite 545 (Sigma) e álcool etílico (QM) – utilizados para validação e quantificação dos princípios ativos.
- ✧ Adjuvante Completo de Freund (FCA) (Sigma) – utilizado associado a um antígeno para induzir resposta imune celular.
- ✧ Anasedan (xilazina) (Vetbrands™) – sedativo veterinário usado em associação com cetamina para anestesia dos camundongos.
- ✧ Anatoxina tetânica (AT) (limite de floculação 3450 LF/mL) lote nº: IB – AnT/PAG 04/09 fornecida pelo Instituto Butantã – usada para induzir a resposta imune celular

- ✧ Azul de Tripán (Gibco™, Invitrogen cell culture) – utilizado para determinar a viabilidade celular.
- ✧ Cafeína e $\pm$ Catequina (Sigma) – utilizados para tratamento dos camundongos.
- ✧ Citrato de sódio (BD Biosciences) - anticoagulante usado nos testes de coagulação.
- ✧ Dopalen (cetamina) (Vetbrands™) – anestésico veterinário usado em associação com xilazina para anestesia dos camundongos.
- ✧ EDTA (Merck) – anticoagulante usado para coleta de sangue para o hemograma.
- ✧ Hepamax S (heparina) (Blausiegel) - anticoagulante usado na coleta de sangue para avaliação da fagocitose.
- ✧ Iodeto de propídeo (PI) (Sigma) – utilizado para avaliação do ciclo celular e quando conjugado ao *Staphylococcus aureus* é empregado para avaliação da atividade de neutrófilos pela medida da fagocitose.
- ✧ Penicilina/estreptomicina (Gibco™, Invitrogen cell culture) – antibióticos empregados no preparo de meio de cultura.
- ✧ RNase A e Tris (Gibco™, Invitrogen cell culture) – utilizados para avaliação do ciclo celular.
- ✧ RPMI-1640 (Gibco™, Invitrogen cell culture) – meio de cultura utilizado neste estudo.
- ✧ Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco™, Invitrogen cell culture) – utilizado para preparo de meio completo.
- ✧ Triton 100 (Sigma) - utilizado na permeabilização das células para avaliação do ciclo celular.
- ✧ Todos os kits utilizados para avaliação da bioquímica sérica foram da Bioclin.

Os dados dos anticorpos utilizados, como sua especificidade e fabricante são descritos no quadro 1 a seguir.

Quadro 1 - Anticorpos

Especificidade	Clone	Origem	Marcação	Fabricante
Anti-CD3	17A2	IgG2b, k, rato	PE	BD Biosciences
Anti-CD4	RM4-5	IgG2a, k, rato	PE-Cy7	BD Biosciences
Anti-CD8	53-6.7	IgG2a, k, rato	FITC	BD Biosciences
Anti-CD19	ID3	IgG2a, k, rato	FITC	BD Biosciences
Anti-CD16/CD32	2.4G2	IgG2b, k, rato	não marcado	BD Biosciences

3.2.1 Soluções

✧ **PBS (salina tamponada com fosfato) – solução estoque 10x concentrada.**

Utilizada para cultura celular

Na ₂ PO ₄ .7H ₂ O	(Sigma)	26,79g
Na ₂ PO ₄ .H ₂ O	(Sigma)	4,14g
NaCl	(Sigma)	82,0g
H ₂ O ultra pura		1000mL

✧ **Solução de Lise (cloreto de amônio)**

Solução de cloreto de amônio 0,16M:

Cloreto de amônio	8,56g
H ₂ O ultra pura	1000mL

Solução Tris 0,17M (pH 7,5):

Tris	20,5g/L
H ₂ O ultra pura	1000mL

Para uso misturar 9 partes da solução de cloreto de amônio e 1 parte de solução Tris.

3.3 ESTUDO QUÍMICO¹

3.3.1 Estudo comparativo entre os teores de cafeína e catequina presentes nos extratos, aquoso e etanólico, do pó de guaraná

A escolha do solvente adequado para a realização deste estudo químico teve como base o cálculo da eficiência extrativa dos solventes água e etanol.

O extrato aquoso foi preparado pela diluição de 1 g de pó de guaraná em 8 mL de água ultrapura, seguida da adição de Celite (terra de diatomáceas), para a adsorção de pigmentos. Esta mistura foi aquecida a 60°C por 15 min, após os quais foram adicionados 2 mL de água; a seguir, a mistura foi submetida à filtração para a retirada dos sólidos. Esse processo foi repetido por quatro vezes, sendo os filtrados (cor alaranjada) reunidos, congelados e submetidos à liofilização, dando origem ao extrato seco que foi empregado em análise por CLAE.

O extrato etanólico, por sua vez, foi preparado, com assistência de ultrassom (10 min, 50 W), pela diluição de 1 g de pó de guaraná em 8 mL de etanol, seguida da adição de Celite. Este material foi acrescido de 2 mL de etanol e filtrado para a retirada de sólidos. Esse processo foi repetido por quatro vezes, sendo ao final, reunidos os filtrados (cor amarelada), concentrados em rotoevaporador até a eliminação do solvente orgânico e liofilizados para a obtenção do extrato etanólico seco, que foi empregado em análise por CLAE.

¹ O estudo químico foi realizado no setor de Ficologia do Instituto de Botânica com a colaboração da Dr^a. Luciana Retz de Carvalho.

3.3.2 Validação da metodologia de quantificação de cafeína e catequina presentes no pó de guaraná por CLAE

A validação analítica do método de quantificação, por CLAE, da cafeína e da catequina presentes no pó de guaraná foi realizada de acordo com a RE nº. 899/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003), com algumas modificações. Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão (repetitividade) e exatidão (recuperação).

Para avaliar a linearidade do método, foi construída, para cada um dos padrões e a partir de seis concentrações distintas, uma curva analítica que forneceu os valores de uma equação de reta $y = ax + b$ e o respectivo coeficiente de correlação linear.

A repetitividade mostra a precisão do método empregado e foi determinada pela análise de duas amostras individuais dos padrões de cafeína e de catequina, em concentrações diferentes das utilizadas na construção das curvas analíticas. Os resultados foram expressos pelo desvio padrão relativo das amostras (DPR), calculados segundo a fórmula:

$$\text{DPR (\%)} = \text{DP/CMB} \times 100$$

Onde: DPR – desvio padrão relativo entre as amostras expresso em porcentagem;

DP – desvio padrão;

CMB – concentração média determinada

Por fim, a exatidão das medidas foi avaliada em ensaio de recuperação, que se baseia na adição de uma quantidade conhecida do padrão da substância em análise, antes do início da extração, com o objetivo de mensurar as perdas ocorridas durante o procedimento. Assim, a recuperação do processo foi estimada pela análise, em duplicata, dos extratos do pó de guaraná acrescidos dos padrões de cafeína e catequina, em concentrações conhecidas e foi expressa em porcentagem, segundo a fórmula:

$$\text{Recuperação} = \text{área do padrão após extração} / \text{área do padrão não extraído} \times 100$$

Sendo que as áreas citadas na fórmula acima correspondem às áreas dos picos dos padrões nos cromatogramas desenvolvidos por CLAE.

3.3.3 Quantificação da cafeína presente no pó de guaraná por CLAE

A quantificação da cafeína foi realizada segundo a técnica de Turkmen et al. (2007) com modificações.

Para a realização da etapa cromatográfica foi empregado sistema CLAE - Dionex, composto por bomba quaternária P 680, injetor automático UltiMate 3000, coluna C₁₈ de 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, mantida a 20°C, e detector de arranjo de diodo UVD 340V, com detecção em comprimento de onda de 270 nm.

A fase móvel, composta pelos solventes (A) solução aquosa de ácido acético a 0,1% (v/v) e (B) acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido acético (v/v), foi filtrada em membrana de 0,45 µm e deaerada por 10 min em ultrassom. O gradiente de eluição aplicado foi de 8 a 60% de B em 15 min, retornando às condições iniciais 20 min após a injeção da amostra no equipamento, sendo o fluxo utilizado de 1 mL/min.

As amostras do padrão de cafeína e dos extratos do pó de guaraná foram diluídas em metanol: água (80:20, v/v), filtradas em filtros Millipore 0,45 µm e o volume injetado de amostra foi de 50 µL (Figura 4). O pico da cafeína, no extrato de guaraná, foi identificado por comparação de seu tempo de retenção e de seu espectro ultravioleta com os dados equivalentes obtidos para o pico do padrão de cafeína. As análises foram feitas em duplicada e a quantificação do alcaloide, correlacionando-se o valor das áreas dos picos respectivos às concentrações correspondentes, na curva analítica.

Figura 4 – Cromatograma da solução padrão de cafeína (500 mg/L). Condições cromatográficas: fase móvel composta pelos solventes (A) solução aquosa de ácido acético a 0,1% e (B) acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido acético; fluxo de 1 mL/min, coluna C₁₈ 250 mm x 4,6 mm, 5 µm e detector UV em 270 nm

3.3.4 Quantificação da catequina presente no pó de guaraná por CLAE

A quantificação da catequina foi realizada segundo protocolo preconizado pela Sigma-Aldrich/Supelco (2005) com modificações.

O sistema cromatográfico empregado foi CLAE - Dionex, composto por bomba quaternária P 680, injetor automático UltiMate 3000, coluna Ascentis RP-amida de 150 mm x 4,6 mm, 5 µm, mantida a 20°C e detector de arranjo de diodo UVD 340V com detecção em comprimento de onda de 280 nm.

A fase móvel, composta pelos solventes (A) solução aquosa de ácido trifluoracético a 0,085% (v/v) e (B) acetonitrila, foi filtrada em membrana de 0,45 µm e deaerada por 10 min em ultrassom. O gradiente de eluição aplicado foi de 15 a 30% de B em 25 min, retornando às condições iniciais 30 min após a injeção da amostra no equipamento, sendo o fluxo utilizado de 1 mL/min.

As amostras do padrão de catequina e dos extratos do pó de guaraná foram diluídas no solvente (A) - solução aquosa de ácido trifluoracético a 0,085%, em volume -

filtradas em filtros Millipore 0,45 μm e o volume injetado de amostra foi de 50 μL (Figura 5).

Devido à dificuldade de solubilização do extrato etanólico na fase móvel A, foi necessário adicionar etanol, na proporção de 20% do volume final. O pico da catequina, no extrato do guaraná, foi identificado por comparação de seu tempo de retenção e de seu espectro ultravioleta com os dados equivalentes obtidos para o pico do padrão deste flavonoide.

As análises foram feitas em duplicada e a quantificação da catequina, correlacionando-se o valor das áreas dos picos respectivos às concentrações correspondentes, na curva analítica.

Figura 5 – Cromatograma da solução padrão de catequina (500 mg/L). Condições cromatográficas: fase móvel composta por (A) solução aquosa de ácido trifluoracético a 0,085%, em volume e (B) acetonitrila; coluna Ascentis RP-amida 150 mm x 4,6 mm, 5 μm , detecção em 280 nm e fluxo de 1 mL/min

3.4 ESTUDO *IN VIVO*

3.4.1 Tratamento com guaraná (*Paullinia cupana*)

O pó das sementes de guaraná (denominado a partir de agora somente guaraná) foi cedido pela Empresa Brasileira de Agropecuária (EMBRAPA), Amazônia Ocidental, e foi mantido em condições secas à temperatura de aproximadamente $\pm 4^{\circ}\text{C}$ até a administração aos camundongos. A dose de guaraná empregada foi estabelecida após avaliação do efeito antitumoral em camundongos C57BL/6, conforme descrito a seguir no experimento 3, item 4.3. Após o estabelecimento da dose de guaraná com efeito antitumoral, esta foi utilizada nos experimentos seguintes. Os tratamentos foram feitos durante 15 dias, por via oral, através de gavagem, uma vez ao dia, sempre no mesmo horário. Durante todo o tratamento, os camundongos foram pesados a cada três dias para o ajuste da dose.

3.4.2 Tratamento com cafeína

A dose de cafeína utilizada neste estudo, equivalente à concentração de guaraná com efeito antitumoral, foi determinada após avaliação da composição do pó de guaraná por CLAE, conforme descrito no item 4.1. Os tratamentos foram feitos durante 15 dias em todos os experimentos e a administração da cafeína foi realizada por via oral, através de gavagem, uma vez ao dia, sempre no mesmo horário. Durante todo o tratamento os camundongos foram pesados a cada três dias para o ajuste da dose.

3.4.3 Tratamento com catequina

A dose de catequina utilizada neste estudo, equivalente à concentração de guaraná com efeito antitumoral, foi determinada após avaliação da composição do pó de guaraná por CLAE, conforme descrito no item 4.2. Os tratamentos foram feitos durante 15 dias em todos os experimentos e a administração da catequina foi realizada por via oral, através de gavagem, uma vez ao dia, sempre no mesmo horário. Durante todo o tratamento, os camundongos foram pesados a cada três dias para o ajuste da dose.

3.4.4 Tratamento com cafeína e catequina

As doses de cafeína e catequina utilizadas foram as mesmas que aquelas empregadas e descritas nos itens 3.4.2 e 3.4.3, respectivamente. Os tratamentos foram realizados, simultaneamente, durante 15 dias e a administração desta associação de princípios ativos foi realizada por via oral, através de gavagem, uma vez ao dia, sempre no mesmo horário. Durante todo o tratamento os camundongos foram pesados a cada três dias para o ajuste da dose.

3.4.5 Avaliação do consumo de água e ração e mensuração do peso corpóreo

Os camundongos foram avaliados quanto à variação do peso corpóreo a cada três dias, já os consumos de água e ração foram mensurados semanalmente.

3.4.6 Indução do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) em camundongos C57BL/6

As células do TAE são singênicas de camundongos BALB/c e por isso somente após, pelo menos, 12 passagens na linhagem C57BL/6 foram utilizadas para realização deste estudo. Assim, para indução do tumor, as células TAE foram coletadas da cavidade peritoneal de um camundongo C57BL/6 portador e após a lise das hemácias, foram contadas e ajustadas para 1×10^7 células em 200 μ L de PBS 1x estéril e inoculadas nos camundongos por via intraperitoneal.

3.4.7 Coleta do TAE

Os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina, por via intramuscular, e o peritônio foi exposto para coleta do líquido tumoral presente na cavidade abdominal destes animais. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em tubos falcon para as análises posteriores, tais como: mensuração do volume tumoral, contagem total de células tumorais, avaliação das populações viáveis e inviáveis através de contagem em câmara de Neubauer das células coradas ou não com Azul de Trypan (células mortas se coram de azul) e avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo.

3.4.8 Avaliação do peso relativo do baço, timo e adrenais, celularidade do baço, timo e medula óssea, além de observação da presença ou não de alterações clínicas

Os camundongos foram submetidos à eutanásia por decapitação, sendo realizada a coleta das adrenais, baço e timo para o cálculo do peso relativo. Em seguida preparou-se uma suspensão celular de timócitos e esplenócitos para contagem e cálculo da celularidade. Também foi coletada a medula óssea de todos os camundongos através da

lavagem do fêmur direito com 5 mL de PBS 1X gelado, após o corte das epífises, para avaliação de celularidade.

3.4.9 Avaliação da bioquímica sérica e hemograma

Os camundongos submetidos à eutanásia por anestesia profunda, sendo realizada a coleta de sangue por punção cardíaca em dois tubos:

- Seco - análise das enzimas hepáticas (alanina-aminotransferase, aspartato-aminotransferase e fosfatase alcalina), uréia, creatinina, proteínas totais, albumina, imunoglobulinas, glicose, colesterol, triglicérides, HDL e cálcio.
- Contendo EDTA 10% - hemograma.

Após permanecerem em temperatura ambiente por pelo menos 45 minutos para formação de coágulo, as amostras de sangue coletadas sem anticoagulante foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos para separação do soro, o qual foi então preservado à -20°C até sua análise.

3.4.10 Avaliação histopatológica de órgãos linfoides, adrenais, fígado, rim, estômago e intestino delgado

Após o término do tratamento procedeu-se a coleta de um fragmento do baço, timo, placas de Peyer, cadeia de linfonodos mesentéricos, esterno, adrenais, fígado, rim, estômago e intestino delgado que, após fixação em formol 10%, foram processados e corados com hematoxilina e eosina para análise histopatológica.

3.4.11 Preparação dos eritrócitos de carneiro (SRBC)

Os eritrócitos de carneiro foram coletados de um animal adulto e sadio (carneiro Rubinho) proveniente do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP. As coletas foram realizadas de forma asséptica em tubos Vacutainer® e mantidas em geladeira por pelo menos 24 horas antes do uso. Após este período, estas células foram centrifugadas a 2000 rpm por 8 minutos para retirada do plasma e lavadas três vezes com PBS 1X, centrifugadas, contadas e ajustadas para a concentração de interesse em PBS 1X.

3.4.12 Avaliação da resposta humoral por meio da técnica de hemaglutinação

Os camundongos foram imunizados com 5×10^8 SRBC em 200 μ L de PBS 1X, por via intraperitoneal, e após sete dias procedeu-se a entânsia para coleta do soro que foi utilizado para análise da hemaglutinação. Para tal, realizou-se uma diluição seriada de 1:2 com o soro de um camundongo não imunizado com SRBC em placas de 96 wells de fundo em U previamente acrescidas de salina, que foi utilizado como controle negativo. Em seguida, diluiu-se o soro dos camundongos imunizados nos poços seguintes e então, foi acrescentado 25 μ L de SRBC [9×10^8 hemácias/mL] em cada poço. Por fim, as placas foram incubadas em estufa (37°C, 5% CO₂ e atmosfera umidificada) por 1h, sendo o título de anticorpos determinado como aquele em que a hemaglutinação foi semelhante ao do controle negativo e também às diluições subsequentes.

3.4.13 Avaliação da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)

Os camundongos foram sensibilizados com 60 μ L contendo 1×10^8 SRBC suspensos na proporção de 1:1 de PBS 1X e Adjuvante completo de Freund (FCA), por via subcutânea, na base da cauda. Sete dias após a sensibilização foi mensurado o

diâmetro da pata esquerda de todos os camundongos, sendo considerado como tempo zero e, em seguida, foram desafiados na mesma pata com 20 μL contendo 1×10^8 SRBC em PBS 1X. Após 24, 48 e 72 horas foi medido o aumento de volume, através de nova mensuração da pata esquerda destes camundongos. O cálculo do aumento absoluto foi feito subtraindo-se o diâmetro da pata medido nos intervalos acima citados do valor do diâmetro medido a 0h, e o resultado foi expresso em mm. O linfonodo poplíteo drenante desta pata também foi coletado para o cálculo do peso relativo após 72hrs do desafio.

3.4.14 Indução da resposta imune celular

Para indução da resposta imune celular foi utilizada anatoxina tetânica (AT) como antígeno. Resumidamente, os camundongos foram imunizados com 100 μL de AT [50 LF/mL] diluída 1:1 em PBS 1X e FCA, por via subcutânea. Sete dias após esta imunização, os camundongos foram sacrificados para coleta do baço, sendo os esplenócitos desafiados *in vitro* com o mesmo antígeno.

3.5 ESTUDO *EX VIVO*

3.5.1 Citometria de Fluxo

Foi utilizado um citômetro de fluxo (Becton Dickison Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Machintosh Apple, CA, USA), sendo que os eventos foram adquiridos por meio de um programa denominado Cell Quest Pro® (Becton Dickison Immunocytometry System, San Jose, CA, USA).

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades de FSC – *Forward Scatter* e SSC – *Side Scatter* que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. As fluorescências foram adquiridas em escala logarítmica. A

fluorescência do isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi detectada pelo filtro FL-1 (530 nm), já da ficoeritrina (PE) e iodeto de propídeo foram detectadas pelo filtro FL-2 (585 nm) e da ficoeritrina – cyanine dye 7 (PE-Cy7) foi detectada pelo filtro FL-3 (> 650 nm).

Todos os dados foram analisados através do programa FlowJo 7.2.2® (Tree Star Inc, Ashland, USA), sendo as populações de interesse em cada experimento selecionadas por meio de *gates*, excluindo assim outros tipos celulares das amostras.

Além disso, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo branco como controle de fluorescência basal da célula a ser analisada.

3.5.2 Ciclo celular

A análise do ciclo celular das células do TAE foi realizada conforme publicado por Santos et al. (2011). Assim, após a coleta do líquido ascítico tumoral, as células foram contadas e ajustadas para 1×10^6 e fixadas em etanol 70% por uma semana a -20°C . Então as células foram lavadas três vezes com PBS 1x (1200 rpm, 10 min) e incubadas com 200 μL de solução contendo 80 $\mu\text{g/mL}$ de Iodeto de Propídeo (5 mg/mL), 200 $\mu\text{g/mL}$ de RNase A (20 mg/mL) e 20 μL de Triton 100 (0,1% v/v) em PBS 1x. Após 30 minutos de incubação no escuro a 37°C , procedeu-se a leitura em citômetro de fluxo.

3.5.3 Fenotipagem dos linfócitos esplênicos, tímicos e do sangue periférico

A fenotipagem foi realizada através da avaliação de moléculas de superfície celular específicas a cada tipo de linfócito.

Desta maneira, o baço e o timo foram coletados e macerados em meio RPMI sendo a suspensão de células esplênicas submetida à hemólise. Todas as suspensões foram ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/tubo em um volume de 50 μL .

Para análise fenotípica do sangue, procedeu-se a lise de 200 μL de sangue com solução salina hipotônica para então se iniciar a marcação com os anticorpos.

Para marcação das moléculas de superfície foram empregados os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD3 e anti-CD4 para linfócitos T *helper*; anti-CD3 e anti-CD8 para detectar linfócitos T citotóxicos; e anti-CD19 para detectar os linfócitos B. Antes das marcações descritas acima foi adicionado o anticorpo CD16/CD32 em cada tubo para evitar marcação inespecífica por 5 minutos a 4°C. Em seguida, as amostras foram incubadas a 4°C durante 30 minutos, no escuro, com os diferentes anticorpos, centrifugadas e ressuspensas em 200 µL de PBS 1X para avaliação através de citometria de fluxo (FACScan Becton Dycson®).

3.5.4 Avaliação da proliferação de linfócitos T antígeno-específica

Para avaliação da proliferação de linfócitos T antígeno-específica foi utilizado o protocolo proposto por Latorre et al. (2009). Primeiramente foi induzida a resposta imune celular através da imunização dos camundongos com 100 µL de anatoxina tetânica (AT) [50 LF/mL] diluída 1:1 em PBS 1X e FCA, por via subcutânea. Sete dias após a imunização, estes camundongos foram eutanasiados para coleta do baço e preparação de uma suspensão celular. As hemácias presentes nesta suspensão foram lisadas com solução de lise e os esplenócitos foram mantidos por duas horas em estufa (37°C, 5% CO₂ e atmosfera umidificada) para separação das células não-aderentes (NA) e aderentes (AD). Em seguida, as células foram coletadas, contadas e co-cultivadas na proporção de 30:1 (NA:AD), ou seja, $1,93 \times 10^5$ NA ($4,29 \times 10^6$ células/mL, plaqueia 45 µL) e $6,5 \times 10^3$ AD ($1,44 \times 10^4$ células/mL, plaqueia 45 µL) na presença ou não de AT (20LF/poço). Por fim, as placas foram mantidas em estufa por 72 horas, sendo realizada a aquisição de 20000 células por citometria de fluxo (FACS Calibur). O resultado foi expresso através do índice de proliferação que é determinado pela divisão da % de linfócitos estimulados pela % de linfócitos basais.

3.5.5 Avaliação da atividade dos macrófagos peritoneais medida por meio da fagocitose

Foi utilizado o método proposto por Hasui et al. (1989) com modificações. Para elicitar macrófagos para cavidade peritoneal foi aplicado 1 mL de tioglicolato 10% quatro dias antes do término do tratamento. Após este período os camundongos foram submetidos à eutanásia, por decapitação, sendo imediatamente coletados os macrófagos peritoneais através da lavagem desta cavidade com 5 mL de PBS 1X a 4°C. A seguir, esta suspensão de células foi ajustada a uma concentração de 1×10^6 células em 100 μ L e incubada com 100 μ L de *Staphylococcus aureus* conjugado com PI (SAPI) e 900 μ L de PBS 1X por 30 minutos a 37°C. Após este período, adicionou-se EDTA 3mM para interromper o processo de fagocitose e em seguida realizou-se a leitura em citômetro de fluxo.

Os valores obtidos foram avaliados através da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelos macrófagos. Este valor foi dado pelo aparelho a partir do *gate* selecionado para a população celular de interesse e pela análise do histograma de fluorescência da população.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Para verificar a homocedasticidade dos dados utilizou-se o teste de Bartlett. Para dados paramétricos, foram utilizados o teste t não pareado para comparação de um grupo experimental com o grupo controle e as análises de variância ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett ou ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni para comparação dos quatro grupos experimentais com o grupo controle. Para dados não paramétricos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Foram consideradas significativas as análises que apresentaram nível de significância $p < 0,05$. Os dados estão expressos como média $\pm$

desvio padrão e os dados de porcentagem estão expressos como mediana (mínimo – máximo).

***DELINEAMENTO
EXPERIMENTAL E
RESULTADOS***

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1: QUANTIFICAÇÃO DA CAFEÍNA PRESENTE NO PÓ DE GUARANÁ POR CLAE

Para validar a metodologia a ser empregada na quantificação do teor de cafeína presente no pó das sementes de guaraná, analisaram-se os parâmetros de linearidade, repetitividade e recuperação, conforme descrito no item 3.3.2. A quantificação da cafeína foi feita a partir de dois extratos, aquoso e etanólico, preparados de acordo com o item 3.3.1 e a análise quantitativa do alcalóide existente no guaraná foi realizada como descrito no item 3.3.3.

4.1.1 Resultados da validação do método por CLAE

A análise de regressão linear da curva analítica obtida pela correlação dos valores das áreas de cada pico com as suas respectivas concentrações, comprovou a linearidade do método, no intervalo de 0 mg/L a 500 mg/L. O gráfico 1 mostra a curva analítica, a equação da reta e o coeficiente de correlação (R^2).

Gráfico 1 – Curva analítica, equação da reta e o coeficiente de correlação linear da cafeína obtida por CLAE utilizando concentrações de 0 mg/L a 500 mg/L

Em relação ao parâmetro repetitividade, obtido através da análise cromatográfica do padrão de cafeína, em concentrações diferentes das usadas na curva analítica, pôde-se concluir que o método utilizado mostrou-se preciso, apresentando DPR inferior ao estabelecido pela legislação vigente que é de 5%, como mostrado na tabela 1.

Tabela 1 – Valores de repetitividade estimados a partir da curva analítica obtida para quantificação do teor de cafeína presente no pó de guaraná

Concentração	100	31,25
teórica		
(mg/L)	100	31,25
Concentração	105,3008	30,7312
obtida na		
curva (mg/L)	107,218	30,73535
Média	103,1297	30,99618
DP	3,697653	0,293225
DPR (%)	3,58544	0,946003

Concentração teórica – valor da concentração da solução preparada; Concentração obtida na curva – valor da concentração, obtido quando se relaciona graficamente a área do pico da cafeína com a concentração, na curva analítica, construída com dados do cromatograma desenvolvido com o padrão da cafeína; DP – desvio padrão; DPR – desvio padrão relativo expresso em porcentagem

Por fim, a análise do parâmetro recuperação mostrou que durante o processo de extração com etanol não houve perda mensurável de cafeína, diferentemente do observado na extração com água, que apresentou perda de aproximadamente 22% deste alcalóide, conforme tabela 2.

Tabela 2 – Valores da recuperação de cafeína, nos processos de extração com água e com etanol

	Extrato aquoso	Extrato etanólico
Taxa de recuperação (%)	78,794	128,234

4.1.2 Resultados da quantificação da cafeína presente no pó de guaraná por CLAE

A quantificação da cafeína presente no guaraná mostrou que o extrato aquoso continha maior quantidade de cafeína, quando comparado ao extrato etanólico (Figura 6), conclusão inferida dos dados experimentais do processo de recuperação, conforme ilustrado na tabela 3.

Figura 6 – Cromatograma do extrato aquoso do pó de guaraná. O pico n°. 9 refere-se à cafeína

Tabela 3 – Valores da quantificação do teor de cafeína presente no pó de guaraná, pré e pós processo de recuperação

	Extrato aquoso	Extrato etanólico
Quantificação inicial (%)	5,297	3,044
Quantificação final (%)	6,72	3,044

Quantificação inicial – antes do processo de recuperação; quantificação final – após o processo de recuperação. A porcentagem de cafeína no extrato etanólico não foi alterada, pois a taxa de recuperação deste extrato foi de 100%

Portanto, a quantificação obtida com o extrato aquoso, por apresentar melhor extração de cafeína, foi àquela escolhida para o cálculo da dose que foi administrada aos camundongos nos experimentos subsequentes, sendo esta de 134,4 mg/kg de peso corpóreo.

4.2 EXPERIMENTO 2: QUANTIFICAÇÃO DA CATEQUINA PRESENTE NO PÓ DE GUARANÁ POR CLAE

A metodologia a ser empregada na quantificação do teor de catequina presente no pó de guaraná foi validada pela análise dos parâmetros de linearidade, repetitividade e recuperação, conforme descrito no item 3.3.2, para então ser utilizada na quantificação da catequina existente no guaraná. Para tanto, dois extratos, um aquoso e outro etanólico, obtidos como descrito no item 3.3.1, foram empregados em análise cromatográfica quantitativa, procedimento detalhado no item 3.3.4.

4.2.1 Resultados da validação do método por CLAE

A análise de regressão linear da curva analítica obtida pela correlação dos valores das áreas de cada pico com as suas respectivas concentrações, comprovou a linearidade do método, no intervalo de 0 mg/L a 250 mg/L. O gráfico 2 mostra a curva analítica, a equação da reta e o coeficiente de correlação (R^2).

Gráfico 2 – Curva analítica, equação da reta e coeficiente de correlação linear da catequina obtidos por HPLC utilizando concentrações de 0 mg/L a 250 mg/L

Em relação ao parâmetro repetitividade, obtido através da análise cromatográfica do padrão de catequina, em concentrações diferentes das empregadas na curva analítica, pôde-se concluir que o método utilizado mostrou-se preciso, pois apresentou DPR inferior ao estabelecido pela legislação vigente que é de 5%, como mostrado na tabela 4.

Tabela 4 – Valores de repetitividade estimados a partir da curva analítica obtida para quantificação do teor de catequina presente no pó de guaraná

Concentração	50	83,34
teórica		
(mg/L)	50	83,34
Concentração	47,148	82,23939
obtida na		
curva (mg/L)	48,58	87,11426
Média	48,932	84,00841
DP	1,364772	2,134579
DPR (%)	2,78912	2,540911

Concentração teórica – valor da concentração da solução preparada; Concentração obtida na curva – valor da concentração obtido na curva analítica, correlacionando-se graficamente a área do pico de catequina com a concentração; DP – desvio padrão; DPR – desvio padrão relativo expresso em porcentagem

Por fim, a análise do parâmetro recuperação indicou perda de catequina em ambos os processos de extração (com água e com etanol), sendo a maior perda, de aproximadamente 80%, verificada na extração com água, conforme tabela 5.

Tabela 5 – Valores da recuperação de catequina nos processos de extração com água e com etanol

	Extrato aquoso	Extrato etanólico
Taxa de		
recuperação	18,36	25,48
(%)		

4.2.2 Resultados da quantificação da catequina presente no pó de guaraná por CLAE

A quantificação da catequina presente no guaraná mostrou que o extrato aquoso também continha maior quantidade deste flavonoide, quando comparado ao extrato etanólico (Figura 7), conclusão inferida após observação dos dados obtidos no processo de recuperação, conforme ilustrado na tabela 6.

Figura 7 – Cromatograma obtido do extrato aquoso do pó de guaraná. O pico n°. 11 refere-se à catequina

Tabela 6 – Valores da quantificação do teor de catequina presente no pó de guaraná, pré e pós processo de recuperação

	Extrato aquoso	Extrato etanólico
Quantificação		
inicial (%)	0,855	0,841
Quantificação		
final (%)	4,66	3,30

Quantificação inicial – antes do processo de recuperação; quantificação final – após o processo de recuperação

Assim, apesar da perda da catequina apresentar-se elevada durante o processo de extração, em ambos os casos, a extração com água foi mais efetiva, motivo pelo qual o extrato aquoso foi selecionado para o cálculo da dose a ser administrada aos camundongos nos experimentos subsequentes, sendo esta de 93,2 mg/kg de peso corpóreo do animal.

4.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DO GUARANÁ EM CAMUNDONGOS C57BL/6 E ANÁLISE DE PARÂMETROS IMUNES

Foram utilizados 21 camundongos, separados em 4 grupos: 1 controle (n=5) e 3 experimentais: 0,1G (n=5), 1G (n=4), 2G (n=7), os quais foram submetidos ao tratamento com as doses de 100, 1000 e 2000 mg/kg do pó de guaraná, respectivamente, por gavagem, de acordo com o item 3.4.1. Os camundongos do grupo controle receberam apenas água pelo mesmo período e via de administração. No 7º dia de tratamento, os animais foram inoculados com 1×10^7 células do TAE, conforme descrito no item 3.4.6 e tratados até o 21º. dia, quando foram submetidos à eutanásia para coleta do líquido ascítico tumoral e baço, de acordo com os itens 3.4.7 e 3.4.8, respectivamente. O ciclo celular das células tumorais foi avaliado e o baço foi macerado para a realização da fenotipagem, conforme itens 3.5.2 e 3.5.3, respectivamente. O peso e os consumos de água e ração foram mensurados de acordo com o descrito no item 3.4.5.

4.3.1 Resultados

A análise do consumo de água dos camundongos tratados com as diferentes doses do pó de sementes de guaraná mostrou, através do teste estatístico ANOVA de duas vias, que tanto o tratamento ($p=0,0047$) como o tempo ($p<0,0001$) influenciaram neste parâmetro, sendo observada a diminuição do consumo de água pelos camundongos dos grupos 0,1G e 1G. Já no que se refere ao consumo de ração, verificou-se alteração apenas ao longo do tempo de tratamento ($p=0,0261$ ANOVA de duas vias) (Gráfico 3). Em relação à variação de peso dos camundongos, verificou-se a existência de uma interação significativa entre as diferentes doses de guaraná e o tempo de tratamento ($p=0,0477$ ANOVA de duas vias), sendo observada, ainda, uma influência do tempo de tratamento na variação deste parâmetro ($p=0,0001$ ANOVA de duas vias); além disso foi observado,

durante o 15º dia, uma redução do peso dos camundongos do grupo 2G, quando comparado ao grupo Co ($p < 0,01$ pós-teste Bonferroni) (Gráfico 4).

Gráfico 3 – Consumos totais de água e ração dos camundongos tratados com guaraná nas doses de 100 (0,1G), 1000 (1G) e 2000 (2G) mg/kg de peso vivo, por via oral, durante 21 dias. Co (n=5); 0,1G (n=5); 1G (n=4); 2G (n=7)

Gráfico 4 – Variação de peso dos camundongos tratados com guaraná nas doses de 100 (0,1G), 1000 (1G) e 2000 (2G) mg/kg de peso vivo, por via oral, durante 21 dias. Co x 2G ** $p < 0,01$ pós-teste Bonferroni. Co (n=5); 0,1G (n=5); 1G (n=4); 2G (n=7)

Quanto à avaliação das células do TAE de camundongos tratados com as diferentes doses de guaraná, observou redução do volume ascítico ($p=0,0364$ teste t não pareado) - Tabela 7 – e diminuição de células viáveis ($p=0,0014$ teste t não pareado), além de aumento das células inviáveis no grupo tratado com a maior dose de guaraná quando comparado aos camundongos do grupo controle ($p < 0,05$ pós-teste de Dunnett – Gráficos 5 e Figura 8). Porém, estas alterações não refletiram na celularidade total do tumor, que se manteve semelhante entre todos os grupos (Tabela 7). Além disso, verificou-se uma redução na fase G2/M do ciclo celular destas células daqueles animais tratados com a dose de 100 mg/kg do pó das sementes da planta quando comparado ao grupo Co ($p < 0,05$ teste de Kruskal-Wallis – Gráfico 6). Com base nestes resultados, escolheu-se a dose de 2000 mg/kg de guaraná como aquela para ser empregada nos experimentos subsequentes. Por fim, este experimento permitiu ainda verificar que os camundongos tratados com as diferentes doses de guaraná não apresentaram alterações em relação ao peso relativo, a celularidade e a distribuição dos linfócitos no baço (Tabela 8).

Tabela 7 – Avaliação das células do TAE de camundongos tratados com guaraná nas doses de 100 (0,1G), 1000 (1G) e 2000 (2G) mg/kg de peso vivo, por via oral, durante 21 dias

Parâmetros	Grupos			
	Co	0,1G	1G	2G
Volume (mL)	18,84 ± 2,40	18,40 ± 3,22	15,55 ± 4,10	13,56 ± 4,41*
Celularidade (10⁷ cél.)	111,70 ± 41,81	164,40 ± 44,66	100,70 ± 38,37	147,50 ± 42,81

Dados representados por média ± desvio padrão. Co x 2G *p=0,0364 teste t não-pareado. Co (n=5); 0,1G (n=5); 1G (n=4); 2G (n=7)

Gráfico 5 – Viabilidade das células do TAE de camundongos tratados com guaraná nas doses de 100 (0,1G), 1000 (1G) e 2000 (2G) mg/kg de peso vivo, por via oral, durante 21 dias. **A)** Número de células inviáveis, Co x 2G *p<0,05 pós-teste Dunnett; **B)** Número de células viáveis, Co x 2G **p=0,0014 teste t não pareado. **C)** Viabilidade celular total. Co (n=5); 0,1G (n=5); 1G (n=4); 2G (n=7)

Figura 8 – Fotografia ilustrando camundongos portadores de TAE e tratados com água (Co) e 2000 mg/kg de guaraná, por via oral, durante 21 dias

Gráfico 6 – Avaliação das fases do ciclo celular do TAE de camundongos tratados com guaraná nas doses de 100 (0,1G), 1000 (1G) e 2000 (2G) mg/kg de peso vivo, por via oral, durante 21 dias. Co x 0,1G * $p < 0,05$ test de Kruskal-Wallis. Co (n=5); 0,1G (n=5); 1G (n=4); 2G (n=7)

Tabela 8 – Peso relativo, celularidade e distribuição dos linfócitos no baço de camundongos portadores de TAE e tratados com guaraná nas doses de 100 (0,1G), 1000 (1G) e 2000 (2G) mg/kg de peso vivo, por via oral, durante 21 dias

Parâmetros	Grupos			
	Co	0,1G	1G	2G
Peso relativo (g)	0,19 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,19 ± 0,03
Celularidade (10⁷ cél.)	1180 ± 424	1200 ± 489	1295 ± 604	1553 ± 517
Linfócitos T <i>helper</i> (%)	20,54 (16,98 - 22,88)	20,78 (19,34 - 23,86)	21,62 (12,58 - 22,78)	20,42 (18,10 - 23,04)
Linfócitos T citotóxico (%)	19,58 (15,23 - 26,28)	22,21 (17,96 - 25,76)	19,85 (17,52 - 23,62)	19,86 (17,41 - 24,42)
Proporção T <i>helper</i>/T citotóxico	1,08 (0,78 - 1,17)	0,93 (0,86 - 1,29)	1,00 (0,72 - 1,17)	1,03 (0,74 - 1,17)
Linfócitos B (%)	21,23 (13,59 - 21,88)	18,54 (17,68 - 21,63)	19,71 (13,74 - 22,76)	20,38 (15,83 - 24,47)

Dados paramétricos estão representados por média ± desvio padrão e dados não paramétricos estão representados por mediana (mínimo - máximo). Linfócitos T *helper* (CD3+CD4+) e linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+). Co (n=5/grupo); 0,1G (n=5/grupo); 1G (n=4/grupo); 2G (n=7/grupo)

4.4 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DO PESO RELATIVO DO BAÇO, TIMO E ADRENAIS, CELULARIDADE DO BAÇO, TIMO E MEDULA ÓSSEA E PRESENÇA OU NÃO DE ALTERAÇÕES CLÍNICAS

Foram utilizados 25 camundongos separados em 5 grupos iguais: 1 controle e 4 experimentais: G, CF, CT e FT. Os camundongos do grupo G foram tratados com a dose de 2000 mg/kg do pó de guaraná, por gavagem, durante 15 dias, conforme descrito no item 3.4.1; enquanto que os animais pertencentes aos grupos CF, CT e FT receberam 134,4 mg/kg de cafeína (grupo CF), 93,2 mg/kg de catequina (grupo CT) ou a associação de cafeína com catequina (grupo FT), conforme procedimentos descritos nos itens 3.4.2, 3.4.3 e 3.4.4, respectivamente. Os camundongos do grupo controle receberam apenas água pelo mesmo período e via de administração. O peso e os consumos de água e ração foram mensurados de acordo com o referido no item 3.4.5. Após o término do tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta das adrenais, baço, timo e fêmur, conforme descrito no item 3.4.8.

4.4.1 Resultados

A análise do consumo de água dos camundongos tratados com o guaraná e seus princípios ativos, cafeína e catequina, mostrou, por meio do teste estatístico ANOVA de duas vias, que apenas o tempo de tratamento ($p < 0,0001$) influenciou na redução deste parâmetro (Gráfico 7). Em relação ao consumo de ração, observou-se que tanto o tratamento ($p < 0,0001$ ANOVA de duas vias), como o tempo de tratamento ($p = 0,0022$ ANOVA de duas vias) influenciaram no aumento deste parâmetro. Além disso, verificou-se tanto no 9º dia ($p < 0,05$ pós-teste Bonferroni) quanto no 12º dia ($p < 0,001$ pós-teste Bonferroni), aumento no consumo de ração dos camundongos do grupo FT, quando comparado ao grupo controle (Gráfico 7). Já a análise da variação de peso dos

camundongos mostrou alteração deste parâmetro apenas ao longo do tempo de tratamento ($p < 0,0001$ ANOVA de duas vias) (Gráfico 8).

Gráfico 7 – Consumos totais de água e ração durante todo o tratamento dos camundongos com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT- (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. **A)** Consumo de água. **B)** Consumo de ração, **a** Co x FT e **b** Co x FT ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ pós-teste Bonferroni, respectivamente). $n=5$ camundongos/grupo

Gráfico 8 – Variação de peso dos camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT- (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. n=5 camundongos/grupo

Além disso, avaliaram-se os pesos relativos do baço, timo e adrenais, observando-se redução deste parâmetro no baço de camundongos dos grupos CF e FT, quando comparado ao controle ($p < 0,001$ e $p < 0,01$ pós-teste de Dunnett, respectivamente - Gráfico 9) e do timo nos animais pertencentes aos grupos G, CF e FT em relação àqueles provenientes do grupo Co ($p < 0,001$ pós-teste de Dunnett - Gráfico 9) o qual foi acompanhado pela redução da celularidade deste órgão nos animais pertencentes aos mesmos grupos ($p < 0,001$ pós-teste Dunnett - Gráfico 10). Por outro lado, a celularidade esplênica mostrou-se aumentada nos camundongos tratados apenas com catequina ($p < 0,01$ pós-teste Dunnett - Gráfico 10). Por fim, não foi observada alteração na celularidade da medula óssea entre os animais submetidos aos diversos tratamentos e aqueles provenientes do grupo controle (Gráfico 10). Também, não foi detectada qualquer alteração clínica digna de nota.

Gráfico 9 – Peso relativo do baço, timo e adrenais de camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT - (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. **A)** Peso relativo do baço, $**p<0,01$ e $***p<0,001$ pós-teste Dunnett. **B)** Peso relativo do timo, $***p<0,001$ pós-teste Dunnett. **C)** Peso relativo das adrenais. $n=5$ camundongos/grupo

Gráfico 10 – Celularidade do baço e timo de camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT - (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. **A)** Celularidade do baço, $**p<0,01$ pós-teste Dunnett. **B)** Celularidade do timo, $***p<0,001$ pós-teste Dunnett. **C)** Celularidade da medula óssea. $n=5$ camundongos/grupo

4.5 EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA, BIOQUÍMICA SÉRICA E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE ÓRGÃOS LINFOIDES, ADRENAIS, FÍGADO, RIM, ESTÔMAGO E INTESTINO DELGADO

Foram utilizados 25 camundongos separados em 5 grupos iguais: 1 controle e 4 experimentais: G, CF, CT e FT. Os camundongos do grupo G foram tratados com a dose de 2000 mg/kg do pó de guaraná, por gavagem, durante 15 dias, conforme descrito no item 3.4.1, enquanto que os animais pertencentes aos grupos CF, CT e FT receberam 134,4 mg/kg de cafeína (grupo CF), 93,2 mg/kg de catequina (grupo CT) ou a associação de cafeína com catequina (grupo FT), conforme descrito nos itens 3.4.2, 3.4.3 e 3.4.4, respectivamente. Os camundongos do grupo controle receberam apenas água pelo mesmo período e via de administração. O peso e os consumos de água e ração foram mensurados de acordo com o referido no item 3.4.5. Após o último dia de tratamento, os camundongos foram submetidos à eutanásia para coleta de fragmentos do baço, timo, placas de Peyer, cadeia de linfonodos mesentéricos, adrenais, fígado, rim, estômago e intestino, além de sangue, de acordo com os itens 3.4.9 e 3.4.10, respectivamente.

4.5.1 Resultados

Quanto ao consumo de água dos camundongos tratados com o guaraná e seus princípios ativos, cafeína e catequina, observou-se apenas que o tempo de tratamento ($p < 0,0001$) influenciou na redução deste parâmetro (Gráfico 11). Em relação ao consumo de ração, a análise estatística mostrou que tanto o tratamento ($p = 0,0002$ ANOVA de duas vias) como a duração deste ($p = 0,0013$ ANOVA de duas vias) influenciaram o aumento deste consumo, principalmente nos grupos CF, CT e FT. Entretanto, verificou-se no 3º dia ($p < 0,05$ pós-teste Bonferroni) redução no consumo de ração dos camundongos do grupo G quando comparado ao grupo Co (Gráfico 11). Já a variação de peso dos

camundongos mostrou-se alterada apenas ao longo do tempo de tratamento ($p < 0,0001$ ANOVA de duas vias) (Gráfico 12).

Gráfico 11 – Consumos de água e ração durante todo o tratamento dos camundongos com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT- (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. **A)** Consumo de água. **B)** Consumo de ração, * $p < 0,05$ pós-teste Bonferroni. $n = 5$ camundongos/grupo

Gráfico 12 – Variação de peso dos camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT- (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. n=5 camundongos/grupo

Além disso, foi verificado que os tratamentos com guaraná e seus princípios ativos, cafeína e catequina, promoveram redução dos níveis de uréia nos animais pertencentes aos grupos G, CF e FT (Tabela 9). Ainda, foram analisados o hemograma e a histologia dos órgãos coletados, não sendo observadas diferenças entre os camundongos provenientes dos grupos experimentais e o controle (Tabela 10).

Tabela 9 – Perfil bioquímico de camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT- (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias

Parâmetros	Grupos				
	Co	G	CF	CT	FT
AST (U/L)	129,20 ± 24,36	105,00 ± 24,10	140,60 ± 58,61	145,20 ± 106,80	154,40 ± 65,41
ALT (U/L)	36,80 ± 10,92	41,20 ± 21,00	45,60 ± 13,52	32,80 ± 4,60	42,00 ± 3,74
Uréia (mg/dL)	72,80 ± 3,83	62,40 ± 4,83*	61,80 ± 5,36*	73,20 ± 7,19	59,60 ± 6,43*
Creatinina (mg/dL)	0,30 ± 0,11	0,30 ± 0,09	0,34 ± 0,03	0,38 ± 0,05	0,24 ± 0,06
Triglicérides (mg/dL)	139,60 ± 35,96	157,60 ± 63,58	158,80 ± 51,63	183,20 ± 55,62	158,80 ± 73,94
Glicose (mg/dL)	205,60 ± 45,20	213,20 ± 23,09	252,40 ± 68,31	243,60 ± 36,64	232,00 ± 70,68
Colesterol (mg/dL)	75,60 ± 6,54	101,00 ± 16,88	84,00 ± 10,00	84,00 ± 22,93	82,80 ± 4,15
HDL (mg/dL)	69,22 ± 28,54	105,55 ± 52,26	91,56 ± 33,22	76,31 ± 29,87	82,15 ± 26,39
Cálcio (mg/dL)	8,87 ± 0,60	9,28 ± 0,38	9,28 ± 0,43	9,43 ± 0,44	9,21 ± 0,22
Proteína total (g/dL)	4,73 ± 0,34	5,02 ± 0,52	5,02 ± 0,37	4,50 ± 0,29	4,85 ± 0,31
Albumina (g/dL)	2,22 ± 0,18	2,32 ± 0,27	2,32 ± 0,11	2,20 ± 0,14	2,44 ± 0,33
Imunoglobulinas (g/dL)	2,51 ± 0,25	2,70 ± 0,29	2,70 ± 0,28	2,30 ± 0,20	2,41 ± 0,20

Os dados estão representados por média ± desvio padrão. *p<0,05 pós-teste de Dunnett. n=5 camundongos/grupo

Tabela 10 – Hemograma de camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína – CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT- (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias

Parâmetros	Grupos				
	Co	G	CF	CT	FT
Leucócitos (10 ³ cél.)	3,06 ± 0,86	2,94 ± 1,45	3,22 ± 0,55	4,00 ± 0,75	3,2 ± 0,60
Hemácias (10 ⁶ cél.)	8,19 ± 1,83	8,57 ± 0,59	8,65 ± 0,91	8,40 ± 0,46	8,35 ± 0,42
Hemoglobina (g/dL)	13,52 ± 2,78	14,16 ± 1,04	14,34 ± 0,99	14,12 ± 1,02	13,74 ± 0,74
Hematócrito (%)	47,10 (28,50–53,20)	45,50 (42,40-50,70)	43,40 (41,90-51,50)	45,20 (42,50-48,60)	44,90 (42,20-47,70)
VCM (fm ³)	54,20 ± 1,09	53,00 ± 0,00	53,40 ± 1,14	54,20 ± 1,30	53,40 ± 0,55
HCM (pg)	16,60 ± 0,70	16,45 ± 0,37	16,64 ± 1,12	16,82 ± 0,88	16,46 ± 0,99
CHCM (g/dL)	30,72 ± 1,08	31,24 ± 0,66	31,26 ± 1,93	31,08 ± 2,07	30,94 ± 1,51
Plaquetas (10 ³ cél.)	558,20 ± 282,62	765,20 ± 219,40	632,20 ± 302,90	774,20 ± 171,10	758,60 ± 155,10

Os dados paramétricos estão representados por média ± desvio padrão e os não paramétricos estão expressos por mediana (mínimo - máximo). Índices hematimétricos: VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) e CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média). n = 5 camundongos/grupo

4.6 EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA (DTH)

Foram utilizados 25 camundongos, separados em 5 grupos iguais: 1 controle e 4 experimentais: G, CF, CT e FT. Os camundongos do grupo G foram tratados com a dose de 2000 mg/kg do pó de guaraná, por gavagem, durante 15 dias, como descrito no item 3.4.1, enquanto que os animais pertencentes aos grupos CF, CT e FT receberam 134,4 mg/kg de cafeína (grupo CF), 93,2 mg/kg de catequina (grupo CT) ou a associação de cafeína com catequina (grupo FT), conforme descrito nos itens 3.4.2, 3.4.3 e 3.4.4, respectivamente. Os camundongos do grupo controle receberam apenas água pelo mesmo período e via de administração. O peso foi mensurado de acordo com o referido no item 3.4.5. Ao final do período experimental, procedeu-se à avaliação da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia, de acordo com os itens 3.4.11 e 3.4.13.

4.6.1 Resultados

No que se refere à variação do peso corpóreo, observou-se alteração apenas ao longo do tempo de tratamento ($p < 0,0001$ ANOVA de duas vias), sendo verificada também, no 3º dia do período experimental, redução deste parâmetro nos camundongos dos grupos G, CF e FT, quando comparado ao grupo Co ($p < 0,05$ pós-teste Bonferroni) (Gráfico 13). Além disso, a avaliação da resposta imune celular, por meio da reação de hipersensibilidade do tipo tardia, mostrou que após 48 horas do desafio com o antígeno SRBC, os camundongos tratados com catequina apresentaram diminuição do edema da pata quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$ pós-teste Bonferroni) (Gráfico 14). Por fim, a análise do peso relativo do linfonodo poplíteo (linfonodo mais próximo do local do desafio com o antígeno) não mostrou qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Gráfico 15).

Gráfico 13 – Variação de peso dos camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT- (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. **a** Co x G, **b** Co x CF, **c** Co x FT $p < 0,05$ pós-teste Bonferroni. $n=5$ camundongos/grupo

Gráfico 14 – Resposta celular de hipersensibilidade tardia avaliada pelo aumento do diâmetro da pata esquerda, após desafio com SRBC, de camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT - (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias, e sensibilizados previamente com o mesmo antígeno. * $p < 0,05$ pós-teste Bonferroni. $n=5$ camundongos/grupo

Gráfico 15 – Peso relativo do linfonodo poplíteo de camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT - (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. n=5 camundongos/grupo

4.7 EXPERIMENTO 7: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL POR MEIO DA TITULAÇÃO DE ANTICORPOS

Foram utilizados 25 camundongos separados em 5 grupos iguais: 1 controle e 4 experimentais: G, CF, CT e FT. Os camundongos do grupo G foram tratados com a dose de 2000 mg/kg do pó de guaraná, por gavagem, durante 15 dias, como descrito no item 3.4.1, enquanto que os animais pertencentes aos grupos CF, CT e FT receberam 134,4 mg/kg de cafeína (grupo CF), 93,2 mg/kg de catequina (grupo CT) ou a associação de cafeína com catequina (grupo FT), conforme descrito nos itens 3.4.2, 3.4.3 e 3.4.4, respectivamente. Os camundongos do grupo controle receberam apenas água pelo mesmo período e via de administração. O peso foi mensurado de acordo com o referido no item 3.4.5. Após o término do tratamento, procedeu-se à avaliação da resposta imune humoral, conforme os itens 3.4.11 e 3.4.12.

4.7.1 Resultados

A análise estatística da variação do peso corpóreo dos camundongos tratados com guaraná e seus princípios ativos, cafeína e catequina, mostrou que apenas o tempo de tratamento ($p < 0,0001$ ANOVA de duas vias) influenciou este parâmetro (Gráfico 16). Em relação à resposta imune humoral, esta foi avaliada através da técnica de hemaglutinação, que mede o nível de anticorpos presente no soro de camundongos previamente imunizados com um antígeno específico (neste caso os SRBC), sendo observada redução significativa deste parâmetro nos camundongos tratados com catequina e associação de cafeína e catequina ($p < 0,05$ pós-teste Dunnett) (Gráfico 17).

Gráfico 16 – Variação de peso corpóreo dos camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT- (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. n=5 camundongos/grupo

Gráfico 17 – Título de anticorpos séricos anti-SRBC de camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT - (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias, e sensibilizados com este mesmo antígeno * $p < 0,05$ pós-teste Dunnett. n=5 camundongos/grupo

4.8 EXPERIMENTO 8: QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS, TÍMICOS E NO SANGUE PERIFÉRICO POR FENOTIPAGEM

Foram utilizados 25 camundongos, separados em 5 grupos iguais: 1 controle e 4 experimentais: G, CF, CT e FT. Os camundongos do grupo G foram tratados com a dose de 2000 mg/kg do pó de guaraná, por gavagem, durante 15 dias, como descrito no item 3.4.1, enquanto que os animais pertencentes aos grupos CF, CT e FT receberam 134,4 mg/kg de cafeína (grupo CF), 93,2 mg/kg de catequina (grupo CT) ou a associação de cafeína com catequina (grupo FT), conforme descrito nos itens 3.4.2, 3.4.3 e 3.4.4, respectivamente. Os camundongos do grupo controle receberam apenas água pelo mesmo período e via de administração. O peso foi mensurado de acordo com o referido no item 3.4.5. Ao final do período experimental, procedeu-se a fenotipagem dos linfócitos, conforme item 3.5.3.

4.8.1 Resultados

Em relação à variação de peso dos camundongos tratados com guaraná, cafeína, catequina e a associação dos princípios ativos, foi observado que tanto o tratamento ($p=0,0019$ ANOVA de duas vias), como o tempo de tratamento ($p=0,0146$ ANOVA de duas vias) alteraram este parâmetro. Além disso, verificou-se no 3º e 15º dias de tratamento, redução do peso corpóreo dos camundongos tratados com guaraná ($p<0,05$ pós-teste Bonferroni). Por outro lado, nos animais do grupo CT foi observado aumento deste parâmetro no 3º dia do período experimental ($p<0,05$ pós-teste Bonferroni) - Gráfico 18. Quanto à fenotipagem dos linfócitos esplênicos, observou-se aumento da porcentagem de linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) nos camundongos tratados com cafeína+catequina ($p<0,01$ pós-teste Dunn's), acompanhado de redução na proporção de linfócitos T *helper* : T citotóxicos nos grupos G e FT ($p<0,05$ pós-teste Dunn's) (Gráfico 19). A análise da fenotipagem do timo mostrou aumento dos precursores de linfócitos

nos camundongos dos grupos G, CF e FT ($p < 0,05$ pós-teste Dunn's) (Gráfico 20). Por fim, avaliou-se a fenotipagem dos linfócitos presentes no sangue periférico não sendo observada nenhuma diferença significativa entre os diferentes grupos (Tabela 11).

Gráfico 18 – Variação de peso dos camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT- (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. **a** Co x G, **b** Co x CT $p < 0,05$ pós-teste Bonferroni. $n = 5$ camundongos/grupo

Gráfico 19 – Fenotipagem de linfócitos T (*helper*: CD3+CD4+; citotóxico: CD3+CD8+) e linfócitos B no baço de camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT- (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ pós-teste Dunn's. $n=5$ camundongos/grupo

Gráfico 20 – Fenotipagem de linfócitos presentes no timo de camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT- (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. * $p < 0,05$ pós-teste Dunn's. $n = 5$ camundongos/grupo

Tabela 11 - Fenotipagem de linfócitos T (*helper*: CD3+CD4+; citotóxico: CD3+CD8+) e linfócitos B no sangue periférico de camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT- (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. n=5 camundongos/grupo

Parâmetros	Grupos				
	Co	G	CF	CT	FT
Linfócitos T					
<i>helper</i>	11,20	8,06	5,99	10,80	8,72
(%)	(6,17 – 13,30)	(7,10 – 12,80)	(4,05 – 12,00)	(8,69 – 15,50)	(6,70 – 14,10)
Linfócitos T					
citotóxicos	10,40	8,21	10,00	9,92	11,00
(%)	(9,24 – 11,90)	(7,74 – 13,50)	(5,76 – 13,70)	(7,45 – 12,60)	(6,63 – 13,20)
Proporção	1,07	0,94	0,82	1,09	0,97
CD4/CD8	(0,67 – 1,19)	(0,91 – 1,04)	(0,60 – 0,91)	(0,97 – 1,23)	(0,74 – 1,08)
Linfócitos B	9,17	6,26	17,70	11,50	8,91
(%)	(7,3 – 17,50)	(5,48 – 9,32)	(13,60 – 29,40)	(1,68 – 17,10)	(7,01 – 14,20)

Os dados estão representados por mediana (mínimo - máximo). n = 5 camundongos/grupo

4.9 EXPERIMENTO 9: AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T ANTÍGENO-ESPECÍFICA

Foram utilizados 25 camundongos separados em 5 grupos iguais: 1 controle e 4 experimentais: G, CF, CT e FT. Os camundongos do grupo G foram tratados com a dose de 2000 mg/kg do pó de guaraná, por gavagem, durante 15 dias, como descrito no item 3.4.1, enquanto que os animais pertencentes aos grupos CF, CT e FT receberam 134,4 mg/kg de cafeína (grupo CF), 93,2 mg/kg de catequina (grupo CT) ou a associação de cafeína com catequina (grupo FT), conforme descrito nos itens 3.4.2, 3.4.3 e 3.4.4, respectivamente. Os camundongos do grupo controle receberam apenas água pelo mesmo período e via de administração. O peso foi mensurado de acordo com o referido no item 3.4.5. No final do período de tratamento, os camundongos foram imunizados com anatoxina tetânica, conforme descrito no item 3.4.14. Uma semana após a imunização, estes camundongos foram submetidos à eutanásia para coleta do baço e análise da proliferação antígeno-específica, de acordo com o item 3.5.4.

4.9.1 Resultados

Em relação à análise da variação do peso corpóreo dos camundongos tratados com o guaraná e seus principais princípios ativos, cafeína e catequina, verificou-se, por meio do teste estatístico ANOVA de duas vias, que apenas o tempo de tratamento ($p < 0,0001$) influenciou na redução deste parâmetro. Além disso, observou-se no 6º dia de tratamento ($p < 0,05$ pós-teste Bonferroni) redução no ganho de peso dos camundongos do grupo FT quando comparado ao grupo Co (Gráfico 21). Avaliou-se, ainda, a expansão de linfócitos T antígeno-específica nos camundongos tratados com guaraná, cafeína, catequina e a associação dos princípios ativos, verificando-se redução deste parâmetro nos grupos G, CT e FT, conforme ilustrado na gráfico 22.

Gráfico 21 – Variação de peso dos camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT- (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. * $p < 0,05$ pós-teste Bonferroni. $n=5$ camundongos/grupo

Gráfico 22 – Expansão de linfócitos T antígeno-específica de camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT - (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. * $p < 0,05$ pós-teste Dunnett. $n=5$ camundongos/grupo

4.10 EXPERIMENTO 10: ATIVIDADE DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS MEDIDA POR MEIO DA FAGOCITOSE

Foram utilizados 25 camundongos separados em 5 grupos iguais: 1 controle e 4 experimentais: G, CF, CT e FT. Os camundongos do grupo G foram tratados com a dose de 2000 mg/kg do pó de guaraná, por gavagem, durante 15 dias, como apresentado no item 3.4.1; enquanto que os animais pertencentes aos grupos CF, CT e FT receberam 134,4 mg/kg de cafeína (grupo CF), 93,2 mg/kg de catequina (grupo CT) ou a associação de cafeína com catequina (grupo FT), conforme descrito nos itens 3.4.2, 3.4.3 e 3.4.4, respectivamente. Os camundongos do grupo controle receberam apenas água pelo mesmo período e via de administração. O peso foi mensurado de acordo com o referido no item 3.4.5. No final do período de tratamento, os camundongos foram submetidos à eutanásia para coleta e análise dos macrófagos peritoneais, de acordo com o item 3.5.5.

4.10.1 Resultados

A análise da variação de peso dos camundongos tratados com guaraná, cafeína, catequina e a associação de ambos princípios, mostrou alteração apenas ao longo do tempo de tratamento ($p=0,0073$), sendo verificado aumento e em seguida diminuição deste parâmetro no final do período experimental (12º e 15º dias) nos animais do grupo G em comparação com o controle ($p<0,05$ pós-teste Bonferroni) - Gráfico 23. Em relação à fagocitose dos macrófagos peritoneais destes camundongos, não foi verificada alteração estatisticamente significativa, embora tivesse sido observado leve aumento deste parâmetro nos animais do grupo G (Gráfico 24).

Gráfico 23 – Variação de peso dos camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT - (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. Co x G $p < 0,05$ pós-teste Bonferroni $n=5$ camundongos/grupo

Gráfico 24 – Intensidade de fagocitose de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com guaraná - G - (2000 mg/kg), cafeína - CF - (134,4 mg/kg), catequina - CT - (93,2 mg/kg) e cafeína + catequina - FT - (134,4 mg/kg + 93,2 mg/kg), por via oral, durante 15 dias. IMF – Intensidade Média de Fluorescência. $n=5$ camundongos/grupo

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O uso de plantas medicinais é disseminado pelo mundo (MAINARDI; KAPOOR; BIELORY, 2009) e atualmente compreende cerca de 50% do total de medicamentos disponíveis no mercado (BALUNAS e KINGHORN, 2005). Esta mesma tendência vem sendo observada no Brasil, onde se estima que quase 82% da população utiliza algum tipo de planta para o tratamento de enfermidades (ABIFITO, 2006).

Neste cenário, destaca-se a *Paullinia cupana*, popularmente conhecida como guaraná, como um dos mais promissores medicamentos procedentes da flora brasileira (MIRANDA; METZNER, 2010). Apesar de trabalhos demonstrarem que o guaraná apresenta, entre vários efeitos, propriedades quimiopreventiva e antitumoral (FUKUMASU, 2008; FUKUMASU et al., 2006b; FUKUMASU et al., 2008; FUKUMASU; LATORRE; DAGLI, 2011), uma busca na literatura revelou não haver relatos, até este momento, sobre as ações desta planta no sistema imune que, como já bem conhecido, tem papel fundamental no combate ao câncer. Além disto, deve ser considerado que o efeito da *P.cupana* neste sistema poderia contribuir também no controle de doenças autoimunes (COICO; SUNSHINE; BENJAMINI, 2009).

Desta forma, o presente estudo é o primeiro que tem como objetivo avaliar os efeitos do guaraná e de seus principais princípios ativos, cafeína e catequina, no sistema imune. Para tal, foi necessário, inicialmente, quantificar estes princípios ativos no pó de guaraná empregado neste trabalho. Assim, esta quantificação possibilitaria correlacionar os efeitos observados no tratamento com guaraná com aqueles verificados com seus princípios ativos, já que se pretendia obter as mesmas concentrações de cafeína e catequina presentes na dose de *P.cupana* com efeito antitumoral.

Além disto, sabe-se que as quantidades de princípios ativos presentes nas plantas podem variar devido a fatores ambientais, como precipitação pluviométrica, umidade, temperatura ambiente etc (HARAGUCHI; GÓRNIK, 2008). E, ainda, deve-se levar em consideração que os níveis de cafeína e catequina do guaraná variam dependendo do processo de secagem e moagem (ASHIHARA; CROZIER, 2001; SIMÕES et al., 2004). Portanto, as quantificações dos princípios ativos presentes no pó de guaraná foram primordiais para o desenvolvimento da presente pesquisa.

Para este estudo químico foram empregadas duas metodologias baseadas na detecção por HPLC com detector UV. Estes métodos possibilitam a separação e detecção de substâncias com base em dois critérios básicos: tempos de retenção e espectros ultravioletas diferentes. Substâncias diferentes, eluídas em uma mesma fase móvel, apresentam tempos de retenção e espectros UV distintos, dependendo da fase estacionária utilizada. Assim, o uso de fases móveis e estacionárias específicas e dos padrões das substâncias em questão, possibilitou determinar a quantidade destes compostos presente no pó das sementes do guaraná o que permitiu o cálculo das doses destas substâncias que, posteriormente, foram administradas aos camundongos. Desta forma, foram quantificados dois extratos: aquoso e etanólico, sendo observada maior quantidade dos dois princípios ativos no extrato aquoso (6,72% de cafeína e 4,66% de catequina) e, por isso, as doses destas substâncias empregadas nos experimentos subseqüentes foram calculadas a partir destes resultados.

Após a quantificação dos princípios ativos na planta, buscou-se determinar a dose de guaraná que teria o efeito antitumoral, já que a linhagem de camundongos empregada na presente pesquisa, C57BL/6, diferia daquela usada num estudo conduzido por Fukumasu, Latorre e Dagli (2011), no qual se empregou a linhagem *Swiss*. Assim, além dos parâmetros avaliados por aquele estudo pioneiro, nesta pesquisa foram acrescidas as avaliações de peso relativo, celularidade e a distribuição de linfócitos no baço de camundongos portadores de tumor e tratados com o guaraná.

Os dados aqui encontrados corroboram os resultados obtidos por Fukumasu, Latorre e Dagli (2011). Assim, nesta pesquisa também foi verificada a redução do volume tumoral, bem como diminuição de células tumorais viáveis e aumento das inviáveis, nos camundongos tratados com a maior dose de guaraná (2000 mg/kg), sendo, portanto, esta a dose escolhida para continuação do presente estudo. Outro fato que deve ser destacado é que a linhagem murina empregada nesta pesquisa não promoveu alterações nos resultados, o que reitera o efeito benéfico do guaraná no combate às células tumorais.

Quanto à avaliação esplênica de camundongos portadores de TAE e tratados com as diferentes doses de guaraná, não foram observadas alterações nos parâmetros analisados, quando se comparou dados provenientes entre animais do grupo controle e experimentais. Entretanto, estes resultados não excluem a possibilidade do guaraná apresentar, além dos efeitos antitumorais diretos observados por Fukumasu (2008), ação

também no processo de imunovigilância ao câncer, haja vista, que as atividades de células importantes nesta resposta como as células NK e linfócitos T citotóxicos (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011) não foram analisadas.

Uma importante avaliação seria aquela para verificar alguma toxicidade geral produzida pelo guaraná e/ou seus principais compostos. Assim, buscou-se caracterizar os efeitos destas substâncias no hemograma, na bioquímica, nos pesos relativos do baço, timo e adrenais, além de celularidade destes órgãos linfoides e da medula óssea de camundongos tratados durante 15 dias.

A análise do hemograma mostrou que camundongos tratados com guaraná e seus princípios ativos não apresentaram alteração de nenhum dos parâmetros avaliados, corroborando outros estudos que relatam a ausência de alterações hematológicas em humanos que consumiram fitoterápico à base de guaraná durante quatro semanas (OLIVEIRA et al., 2005), e em camundongos que ingeriram as catequinas presentes no chá verde por 28 dias (HSU et al., 2011).

Quanto à avaliação do perfil bioquímico, verificou-se redução apenas dos níveis de ureia em camundongos tratados com guaraná, cafeína e a associação dos princípios ativos (Tabela 9). Considerando-se que a redução deste parâmetro é um indicativo de desnutrição ou hepatopatias (LUM; LEAL-KHOURI, 1989; SELBERG; SEL, 2001), poderia-se supor que particularmente a cafeína promoveria desnutrição e/ou hepatotoxicidade; porém esta hipótese pode ser descartada, já que tal condição somente se caracteriza quando se verifica também a diminuição dos níveis de proteínas totais e albumina (JURADO; MATTIX, 1998), parâmetros estes que se encontravam dentro dos padrões de normalidade.

Um dado interessante se refere ao fato de que os níveis de ureia tanto nos camundongos do grupo controle como nos experimentais, no presente estudo, apresentavam-se acima dos limites de referência descritos para a espécie (ALMEIDA et al., 2008). Uma possível explicação para tal observação se refere ao fato de que os parâmetros bioquímicos podem ser influenciados por uma série de fatores, não somente o gênero, linhagem, idade, mas também o tipo de dieta, a forma de manuseio e, inclusive, pelo meio ambiente onde estão inseridos (GREEN, 1986). Por este motivo, recomenda-se que cada biotério apresente seus próprios valores de referência, pois somente assim será refletida a verdadeira condição da população estudada. Como o biotério onde foi

realizado o presente estudo carece de dados próprios relativos aos valores de referência desta linhagem de camundongos, condição *sine qua non* para saber-se da real condição da população estudada (ALMEIDA et al., 2008), neste momento não é possível determinar se este dado, aqui obtido, estaria relacionado a alguns destes fatores peculiares a este criatório, ou se outra condição poderia ter determinado tais alterações.

Complementam os dados bioquímicos, aqueles provenientes da análise histopatológica. Assim, a avaliação das adrenais, fígado, rim, estômago e intestino delgado de camundongos tratados com o guaraná e seus princípios ativos, cafeína e catequina, revelou não haver qualquer alteração na morfologia, em nenhum dos animais avaliados. Portanto, pode-se concluir que este resultado reitera o que foi verificado em outras pesquisas, as quais mostraram grande segurança no uso de guaraná (MATTEI et al., 1998; ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2010).

Em relação à avaliação dos órgãos linfoides, verificou-se redução do peso relativo no timo (Gráfico 9), acompanhada de diminuição da celularidade no mesmo órgão (Gráfico 10) em camundongos tratados com o pó de guaraná, cafeína, bem como a associação deste composto com a catequina. Todavia, ao se observar a análise da fenotipagem linfocítica deste órgão, verificou-se, nos animais destes mesmos grupos, aumento da porcentagem de linfócitos imaturos em diferentes fases (Gráfico 20).

Sabe-se que durante o processo de envelhecimento ocorre a substituição do estroma do timo por tecido adiposo (SPOOR; RADI; DUNSTAN, 2008). Do mesmo modo, vários estudos descrevem a ação da cafeína sobre o metabolismo lipídico através da inibição da enzima fosfodiesterase que levará ao aumento de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e consequente ativação da enzima lipase hormônio-sensível (LHS). Esta enzima, por sua vez, será responsável pela hidrólise da gordura desencadeando a lipólise (ACHESON et al., 2004). Outro mecanismo de ativação da LHS se baseia no antagonismo da cafeína nos receptores de adenosina. Desta forma, observa-se estimulação do sistema nervoso simpático, aumento na liberação de neurotransmissores como a noradrenalina e consequente ativação desta enzima (JEUKENDRUP; RANDELL, 2011).

Assim, inicialmente poderia se teorizar que a diminuição do peso relativo do timo, observada nos camundongos dos grupos tratados com cafeína (G, CF e FT) na presente pesquisa, deveria estar relacionada à ação deste alcaloide sobre o metabolismo lipídico

(WESTERTERP-PLANTENGA; LEJEUNE; KOVACS, 2005) que ao produzir a lipólise, acarretaria na diminuição do peso deste tecido. Contudo esta conjectura deve ser descartada, pois os animais utilizados neste estudo eram adultos (85 dias de idade) e não apresentavam involução tímica, o que foi confirmado por meio da análise histológica deste órgão.

Por outro lado, sabe-se que a cafeína também é responsável pela inibição da atividade de proteínas quinases como a ataxia telangiectasia mutada (ATM) e a ataxia telangiectasia relacionada (ATR), responsáveis por detectar dano no DNA durante o ciclo celular. Desta maneira, pode-se presumir que por ação desta xantina ocorra inibição do reparo do DNA e consequente apoptose (TICHÝ et al., 2011).

Assim, considerando-se que os linfócitos T são mais suscetíveis ao prejuízo acidental do DNA devido intensa proliferação observada no timo (RIVERA-MUNOZ et al., 2007), pode-se supor que a redução da celularidade e peso relativo neste órgão em camundongos tratados com cafeína (G, CF e FT), aqui encontradas, estariam relacionadas à maior indução de apoptose devido à falta de reparo de danos ao DNA causados ao acaso pela alta proliferação de células neste órgão.

No baço, também se verificou redução do peso relativo naqueles camundongos tratados com a cafeína e com a mistura dos princípios ativos do guaraná; porém, neste caso, sem a diminuição de celularidade. Dado interessante foi que contrariamente, os camundongos tratados com catequina (CT) apresentaram aumento da celularidade deste órgão (Gráficos 9 e 10, respectivamente).

Como a análise fenotípica dos linfócitos esplênicos mostrou aumento da porcentagem de linfócitos citotóxicos em camundongos tratados com a associação de princípios ativos, acompanhada de redução na proporção de linfócitos T CD4⁺: T CD8⁺ nos camundongos provenientes dos grupos G e FT e considerando-se que houve aumento da celularidade do baço, sugere-se que esta redução na proporção de linfócitos se deva ao aumento de células CD8⁺ naqueles animais tratados com o pó das sementes da planta e os princípios ativos associados. Estes resultados corroboram dados existentes na literatura os quais mostram o aumento deste tipo de linfócitos em indivíduos com câncer que ingeriram outro tipo de catequina, a ECGC (KANG; LEE; SONG, 2007).

Em relação ao estudo histopatológico dos órgãos linfoides, da mesma maneira que o verificado em outros tecidos, os camundongos tratados com o guaraná e seus princípios ativos não apresentaram qualquer alteração morfológica.

Considerando os dados obtidos até aqui, poder-se-ia esperar que devido à redução do peso relativo e celularidade do timo nos camundongos dos grupos G, CF e FT, seria observada redução da população tímica na análise histológica; entretanto tal fato não foi verificado. Uma possível explicação para o observado seria que ao mesmo tempo em que muitos timócitos estariam morrendo por apoptose, devido danos no DNA e ausência de reparo (RIVERA-MUNOZ et al., 2007; TICHÝ et al., 2011), outras tantas destas células apresentavam-se em alto estado de proliferação, já que se sabe que o ciclo celular das células expostas à cafeína é mais curto, devido à ausência de parada na fase G2/M pela inibição da ATM/ATR (PINCHEIRA et al., 2001). Assim, a falta de checagem neste ponto poderia fazer com que células com DNA danificado ou incompletamente duplicado entrassem no ciclo celular, culminando em posterior apoptose (MORGAN, 2007).

Uma vez que os linfócitos T foram aquelas células mais sensíveis ao tratamento com guaraná, fez-se necessário verificar se as atividades proliferativa e responsiva destes linfócitos também estariam prejudicadas. Para tal, procedeu-se à avaliação da expansão de linfócitos T antígeno-específica. Neste processo, a DC apresenta o antígeno para o linfócito Th *naive*, desencadeando a expressão de várias moléculas co-estimulatórias, além da secreção de citocinas como a IL-12 pelas DCs e IL-2 pelos linfócitos T, visando a polarização dos linfócitos Th *naive* em Th1 e o aumento da proliferação celular, respectivamente. Em seguida, estes linfócitos efetores produzirão citocinas como IFN- γ , responsáveis pela estimulação de células como os macrófagos com intuito de eliminar o antígeno em questão (LIN et al., 2010).

Os dados aqui obtidos evidenciaram a redução da capacidade proliferativa de linfócitos em camundongos tratados com guaraná, catequina e a associação dos princípios ativos (Gráfico 22), resultado este que apóia os estudos realizados com outros tipos de catequinas presentes no chá verde (WU et al.; 2009).

Com base nestes resultados e considerando-se o mecanismo de ativação dos linfócitos T, pode-se supor que a catequina afete a maturação da DC, impedindo assim a expressão das moléculas co-estimulatórias, prejudicando, portanto, a interação DC - T

helper e, conseqüentemente, a resposta imune celular. Neste sentido, existem vários relatos na literatura relacionando a EGCG, principal catequina presente no chá verde, com distúrbios na DC, dentre eles pode-se destacar a indução da apoptose de DC imaturas, diminuição na expressão das principais moléculas co-estimulatórias como CD86 e CD11c e aumento na secreção de IL-10 (AHN et al., 2004; YONEYAMA et al., 2008). Além disso, há estudos evidenciando que esta mesma catequina também pode agir diretamente sob os linfócitos Th, comprometendo assim a utilização de IL-2 e a produção de IFN- γ (WU et al.; 2009; PAE et al., 2010). Portanto, é provável que o mecanismo de ação da catequina presente no guaraná seja semelhante ao da catequina do chá verde. Porém, considerando-se que as catequinas presentes no guaraná e no chá verde apresentam estruturas químicas bastante diferentes, respectivamente, (+)-catequina – $C_{15}H_{14}O_6$ e EGCG – $C_{22}H_{18}O_{11}$, serão necessários novos estudos para confirmar esta suposição.

Os resultados obtidos até esta etapa permitiram verificar que a administração de guaraná e seu princípio ativo catequina, durante 15 dias, promove redução da proliferação de linfócitos T. No entanto, uma nova questão deve ser levantada: será que esta alteração pode afetar a DTH, parâmetro da resposta imune celular?

Para tentar responder tal pergunta, realizou-se a avaliação da DTH após desafio com SRBC. A resposta de DTH inicia-se após migração dos linfócitos Th1 para o local infectado com o antígeno, onde há aumento na produção e secreção de citocinas inflamatórias, principalmente de IFN- γ , responsável pelo recrutamento e ativação de macrófagos. Os macrófagos, por sua vez, destroem o antígeno provocando uma reação inflamatória local com presença de edema, que regride em até 72h após o contato com o antígeno (KOBAYASHI; KANEDA; KASAMA, 2001).

Desta forma, a análise da DTH mostrou que após 48 horas do desafio com o antígeno SRBC, os camundongos tratados com catequina apresentaram diminuição do edema da pata, quando comparado ao grupo controle (Gráfico 14). Contudo, dois fatores devem ser levados em consideração: primeiro, o pico deste tipo de resposta em roedores ocorre 24 horas após o desafio com o antígeno (TUMPEY et al.; 2002), entretanto aqui não se observou tal alteração durante a avaliação neste período de tempo e, segundo, embora tenha sido verificada diferença estatística às 48 hs do desafio, esta foi muito sutil e por isso pode não ter significado biológico. Portanto, apesar de se obter um resultado estatisticamente significativo, e este corroborar os resultados anteriores, já que é necessária

a proliferação dos linfócitos Th para ocorrência deste processo, não se pode afirmar, neste momento, que o efeito aqui observado seria, de fato, biologicamente significativo.

Portanto, buscou-se avaliar a atividade dos macrófagos, importantes no desenvolvimento da resposta de DTH, utilizando-se para tal a avaliação da fagocitose da bactéria *S. aureus*, não sendo observada diferença de atividade nestas células entre os diferentes grupos experimentais e o grupo controle.

Tomando-se em conjunto estes resultados, pode-se fortemente sugerir que a principal célula acometida pela ação do guaraná, mais especificamente da catequina, é o linfócito T *helper*, no entanto, a ambiguidade do resultado obtido na avaliação da DTH ainda não permite efetivamente afirmar tal conjectura.

Avaliou-se, ainda nesta pesquisa, a resposta humoral, por meio do título de anticorpos produzidos por camundongos tratados com o pó de guaraná e seus princípios ativos. Para tal utilizou-se um antígeno T-dependente, ou seja, um antígeno que desencadeia a produção de anticorpos somente após interação entre os linfócitos B e Th, promovendo, assim, a produção de citocinas que atuarão na proliferação celular, além de ocasionar o *switch* de classes e a síntese de imunoglobulinas (MITCHISON, 2004).

Assim, confirmando o esperado, os resultados mostraram que camundongos tratados com catequina e a associação de cafeína e catequina apresentaram redução significativa da imunidade humoral (Gráfico 17). Desta maneira, é possível sugerir que esta diminuição da resposta humoral nos animais expostos à catequina (CT e FT) seja decorrente da alteração na imunidade celular, uma vez que a proliferação de linfócitos T nestes animais também se apresentou reduzida.

Concluindo, os resultados obtidos no presente estudo mostraram redução significativa da imunidade celular e humoral nos camundongos tratados com guaraná, catequina e a associação deste com cafeína. Supõe-se que estas alterações sejam decorrentes dos efeitos do guaraná, devido à presença de catequina, no próprio linfócito T *helper* ou em células envolvidas na indução da resposta imune, como as DCs e células NK (KAPSENBERG, 2003). Assim, novos estudos já estão em andamento, buscando melhor compreender o mecanismo de ação do guaraná e seus princípios ativos no sistema imune, bem como elucidar alguns resultados, aparentemente ambíguos, obtidos na presente pesquisa.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- ♣ A validação das metodologias utilizadas para as quantificações dos princípios ativos serviu como controle de qualidade dos procedimentos.
- ♣ A quantificação dos compostos ativos presentes no pó das sementes de guaraná mostrou que o extrato aquoso aqui empregado, continha as maiores quantidades de cafeína e catequina, sendo estas de 6,72% e 4,66%, respectivamente.
- ♣ A dose de guaraná com efeito antitumoral em camundongos C57BL/6 empregada neste estudo foi de 2000 mg/kg de peso corpóreo.
- ♣ Os tratamentos com guaraná, cafeína e a associação de cafeína com catequina diminuíram o peso relativo do timo bem como a celularidade, enquanto os camundongos tratados com catequina apresentaram aumento do peso relativo do baço. Não foram observadas alterações no peso relativo das adrenais e na celularidade da medula óssea.
- ♣ Os tratamentos com guaraná, cafeína e a associação de princípios ativos diminuíram o nível de ureia destes camundongos. Entretanto, não foram observadas alterações no hemograma e na análise histológica dos órgãos linfoides, adrenais, fígado, rim, estômago e intestino delgado. Portanto, o guaraná e/ou seus princípios ativos parecem não promover toxicidade geral, mesmo quando administrado em doses altas por um período de tempo prolongado.
- ♣ Os tratamentos com catequina e associação deste composto com a cafeína apresentaram redução da resposta humoral verificada através do título de anticorpos.
- ♣ O tratamento com catequina promoveu a redução da resposta de DTH.

- ♣ Os tratamentos com guaraná, cafeína e a associação de cafeína com catequina promoveram aumento do número de linfócitos imaturos no timo; enquanto que no baço verificou-se aumento da porcentagem de linfócitos citotóxicos em camundongos tratados com a associação de princípios ativos, acompanhada de redução na proporção de linfócitos T CD4⁺: T CD8⁺ neste mesmo grupo e nos animais tratados com guaraná.
- ♣ Os tratamentos com guaraná, catequina e associação deste composto com a cafeína reduziram a imunidade celular verificada por meio da proliferação de linfócitos T antígeno-específica.
- ♣ O guaraná e seus principais compostos ativos, cafeína e catequina, não alteraram a atividade de macrófagos.

Portanto, conclui-se, que o guaraná, devido ao efeito supressor majoritário da catequina, promove redução da resposta imune adaptativa, sendo, portanto, uma alternativa útil para modular o sistema imune e, assim, auxiliar no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes, caracterizadas por uma resposta exacerbada deste sistema.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LITCHMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007. 566 p.

ABIFITO. **Uma legislação justa para os produtos de origem natural**. Disponível em: <http://www.abifito.com.br/introducao.asp>. Acesso em: 18 de junho de 2006.

ACHESON, K. J.; GREMAUD, G.; MEIRIM, I.; MONTIGON, F.; KREBS, Y.; FAY, L. B.; GAY, L. J.; SCHNEITER, P.; SCHINDLER, C.; TAPPY, L. Metabolic effects of caffeine in humans: lipid oxidation or futile cycling? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 1, p. 40–46, 2004.

AHMED, S. Green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate in arthritis: progress and promise. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 2, p. 208, 2010.

AHN, S.; KIM, G.; KIM, J.; BAIK, S.; HAN, M.; LEE, H.; MOON, D.; LEE, C.; KANG, J.; KIM, B.; OH, Y.; PARKA, Y. Epigallocatechin-3-gallate, constituent of green tea, suppresses the LPS-induced phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells through inhibition of mitogen-activated protein kinases and NF- κ B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 1, p. 148–155, 2004.

ALMEIDA, A. S.; FALEIROS, A. C. G.; TEIXEIRA, D. N. S.; COTA, U. A.; CHICA, J. E. L. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 6, p. 429–432, 2008.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; KANESHIMA, E. N.; GABRIEL, M.; AUDI, E. A.; MARQUES, L. C.; MELLO, J. C. P. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1817–1820, 2010.

ANTUNES, E.; GORDO, W. M.; DE OLIVEIRA, J. F.; TEIXEIRA, C. E.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama and its constituents. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 5, p. 416–421, 2001.

ARENDASH, G. W.; CAO, C. Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, p. S117–S126, 2010. Supplementum 1.

ARNAUD, M. J. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. In: FREDHOLM, B. B. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 33-91.

ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 407-413, 2001.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, D. Drug Discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-252, 1998.

BASILE, A.; FERRARA, L.; PEZZO, M. D.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 32-36, 2005.

BELL, J. R.; DONOVAN, J. L.; WONG, R.; WATERHOUSE, A. L.; GERMAN, J. B.; WALZEM, R. L.; KAISIM-KARAKAS, S. E. (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 1, p. 103-108, 2000.

BERNARDINI, G.; GISMONDI, A.; SANTONI, A. Chemokines and NK cells: regulators of development, trafficking and functions. **Immunology Letters**, v. 145, n.1-2, p. 39-46, 2012.

BÉRUBÉ-PARENT, S.; PELLETIER, C.; DORÉ, J.; TREMBLAY, A. Effects of encapsulated green tea and Guaraná extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. **British Journal of Nutrition**, v. 94, p. 432-436, 2005.

BHATIA, A.; KUMAR, Y. Cancer-immune equilibrium: questions unanswered. **Cancer Microenvironment**, v. 4, n. 2, p. 209-217, 2011.

BOOZER, C. N.; NASSER, J. A.; HEYMSFIELD, S. B.; WANG, V.; CHEN, G.; SOLOMON, J. L. An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. **International Journal of Obesity**, v. 25, 316-324, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 2011. 126 p.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior Agricultura. Superintendência da Zona Franca de Manaus - SUFRAMA. Superintendência Adjunta de Planejamento e Desenvolvimento Regional. **SUFRAMA Potencialidades Regionais. Estudo de Viabilidade Econômica do Guaraná**. Manaus: Instituto Superior de Administração e Economia (ISAE)/Fundação Getúlio Vargas (FGV), 2003. 14 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação “**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**”. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 01 de outubro de 2010.

BYDLOWSKI, S. P.; DAMICO, E. A.; CHAMONE, D. A. F. An aqueous extract of Guarana (*Paullinia cupana*) decreases platelet thromboxane synthesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 4, p. 421-424, 1991.

BYDLOWSKI, S. P.; YUNKER, R. L.; SUBBIAH, M. T. R. A novel property of an aqueous guarana extract (*Paullinia cupana*) – inhibition of platelet-aggregation in vitro and in vivo. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 3, p. 535-538, 1988.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 421-424, 1998.

CAMPOS, A. R.; BARROS, A. I. S.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1199-1202, 2003.

CAMPOS, A. R.; BARROS, A. I. S.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; LEAL, L. K. A. M.; RAO, V. S. N. Acute effects of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behavior in forced swimming and open field tests. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 5, p. 441-443, 2005.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 501–512, 2003.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

COICO, R.; SUNSHINE, G.; BENJAMINI, E. **Immunology: a short course**. 6. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. 391 p.

CRONSTEIN, B. N. Caffeine, a drug for all seasons. **Journal of Hepatology**, v. 53, n. 1, p. 207–208, 2010.

DALY, J. W. Caffeine analogs: biomedical impact. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v., 64, n. 16, p. 2153–2169, 2007.

DAVICINO, R.; ALONSO, R.; ANESINI, C. Comparison between normal coffee and decaffeinated coffee effects on lymphocytes and macrophages: role of the antioxidant activity of caffeine. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 877–897, 2011.

DOHERTY, M.; SMITH, P. M. Effects of caffeine ingestion on exercise testing: a meta-analysis. **Internacional Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 14, n. 6, p. 626–646, 2004.

DREWES, S. E.; GEORGE, J.; KHAN, F. Recent findings on natural products with erectile-dysfunction activity. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1019–1025, 2003.

ERNST, E. Harmless herbs? A review of the recent literature. **The American Journal of Medicine**, v. 104, n. 2, p. 170–178, 1998.

ESPINOLA, E. B.; DIAS, R. F.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Pharmacological activity of Guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 3, p. 223–229, 1997.

ETENG, M. U.; EYONG, E. U.; AKPANYUNG, E. O.; AGIANG, M. A.; AREMU, C. Y. Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.51, n. 3, p. 231–243, 1997.

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, n. 1, p. 83–133, 1999.

FREITAS, D. V.; CARVALHO, C. R.; NASCIMENTO FILHO, F. J.; ASTOLFI-FILHO, S. Karyotype with 210 chromosomes in guaraná (*Paullinia cupana* ‘Sorbilis’). **Journal of Plant Research**, v. 120, p. 399–404, 2007.

FUJISE, Y.; OKANO, J.; NAGAHARA, T.; ABE, R.; IMAMOTO, R.; MURAWAKI, Y. Preventive effect of caffeine and curcumin on hepatocarcinogenesis in diethylnitrosamine-induced rats. **International Journal of Oncology**, v. 40, n. 6, p. 1779–1788, 2012.

FUKUMASU, H. Sobre os efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, em modelos experimentais in vivo e in vitro. 2008. 300f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; HEIDOR, R.; SILVA, T. C.; ATROCH, A.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. Protective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 862–867, 2006a.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; BARBUTO, J. A.; RAO, K. V.; DAGLI, M. L. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guarana, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 41, p. 305-310, 2008.

FUKUMASU, H.; DA SILVA, T. C.; AVANZO, J. L.; ESTEVES, C.; MACKOWIAKA, I. I.; ATROCH, A.; SPINOSA, H. S.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. D. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guarana, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 233, p. 158–164, 2006b.

FUKUMASU, H.; LATORRE, A. O.; DAGLI, M. L. Z. *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*, guarana, increases survival of ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 11-16, 2011.

GALDUROZ, J. C. F.; CARLINI, E. Acute effects of the Guaraná-*Paullinia cupana* on the cognition of normal volunteers. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 112, p. 607-611, 1994.

GALDUROZ, J. C. F.; CARLINI, E. The effects of long-term administration of guaraná on the cognition of normal, elderly volunteers. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 114, p. 1073-1078, 1996.

GONZÁLES, E.; IGLESIAS, I.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Gastric cytoprotection of bolivian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 329–333, 2000.

GREEN, E. L. **Biology of the laboratory mouse**. 2. ed. Nova York: McGraw-Hill Book Co., 1986.

GRUENWALD, J.; BRENDLER, T.; JAENICKE, C. (Ed.). *Guarana*. In:_____. **PDR for Herbal Medicines**. 3. ed. Montvale: Thomson PDR, 2007. p. 425-428.

GU, G.; BARONE, I.; GELSOMINO, L.; GIORDANO, C.; BONOFIGLIO, D.; STATTI, G.; MENICHINI, F.; CATALANO, S.; ANDO, S. *Oldenlandia diffusa* extracts exert antiproliferative and apoptotic effects on human breast cancer cells through ERα/Sp1-mediated p53 activation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, p. 3363-3372, 2012.

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

HACKMAN, R. M.; POLAGRUTO, J. A.; ZHU, Q. Y.; SUN, B.; FUJII, H.; KEEN, C. L. Flavanols: digestion, absorption and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 195-208, 2008.

HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S. L. Introdução ao estudo das plantas tóxicas. In: SPINOSA, H.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. Barueri: Manole, 2008. p.367-414. cap. 14.

HARLAND, B. F. Caffeine and nutrition. **Nutrition**, v. 16, n. 7-8, p. 522-526, 2000.

HASKELL, C. F.; KENNEDY, D. O.; WESNES, K. A.; MILNE, A. L.; SCHOLEY, A. B. A Double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guaraná in humans. **Journal of Psychopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 65-70, 2007.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n.1, p. 53-58, 1989.

HENMAN, A. R. Guarana (*Paullinia Cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 311-338, 1982.

HENMAN, A. R. **Vida natural – O guaraná**: sua cultura, propriedades, formas de preparação e uso. São Paulo, Brasil: Global: Ground, 1986.

HERNANDEZ-AVILA, M.; COLDITZ, G. A.; STAMPFER, M. J.; ROSNER, B.; SPEIZER, F. E.; WILLET, W. C. Caffeine, moderate alcohol intake, and risk of fractures of the hip and forearm in middle-aged women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 157-163, 1991.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 89-143, 2003.

HORRIGAN, L. A.; KELLY, J. P.; CONNOR, T. J. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 3, p. 877–892, 2006.

HSU, Y. W.; TSAI, C. F.; CHEN, W. K.; HUANG, C. F.; YEN, C. C. A subacute toxicity evaluation of green tea (*Camellia sinensis*) extract in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2624-2630, 2011.

JEUKENDRUP, E.; RANDELL, R. Fat burners: nutrition supplements that increase fat metabolism. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 10, p. 841–851, 2011.

JULIANO, L. M.; GRIFFITHS, R. R. A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features. **Psychopharmacology**, v. 176, n. 1, p. 1-29, 2004.

JURADO, R.; MATTIX, H. The Decreased Serum Urea Nitrogen–Creatinine Ratio. **Archives of Internal Medicine**, v. 158, n. 22, p. 2509-2511, 1998.

KANG, T. H.; LEE, J. H.; SONG, C. K. Epigallocatechin-3-gallate enhances CD8⁺ T cell-mediated antitumor immunity induced by DNA vaccination. **Cancer Research**, v. 67, n. 2, p. 802-811, 2007.

KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 12, p. 984-993, 2003.

KAY, M. M.; MENDOZA, J.; DIVEN, J.; DENTON, T.; UNION, N.; LAJINESS, M. Age-related changes in the immune system of mice of eight medium and long-lived strains and hybrids. I. Organ, cellular, and activity changes. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 11, n. 5-6, p. 295-346 295, 1979.

KENNEDY, D. O.; HASKELL, C. F.; WESNES, K. A.; SCHOLEY, A. B. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guaraná (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 79, n. 3, p. 401-411, 2004.

KENNEDY, D. O.; HASKELL, C. F.; ROBERTSON, B.; REAY, J.; BREWSTER-MAUNDB, C.; LUEDEMANN, J.; MAGGINI, S.; RUF, M.; ZANGARAA, A.; SCHOLEYA, A. B. Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin and mineral supplement with added guarana (*Paullinia cupana*). **Appetite**, v. 50, p. 506–513, 2008.

KIM, S.; LEE, M. J.; HONG, J.; LI, C.; SMITH, T. J.; YANG, G. Y.; SERIL, D. N.; YANG, C. S. Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols. **Nutrition and Cancer**, v. 37, n. 1, p. 41–48, 2000.

KLEIN, C.; SATO, T.; MEGUID, M. M.; MIYATA, G. From food to nutritional support to specific nutraceuticals: a journey across time in the treatment of disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 35, p. 1–6, 2000. Supplementum 12.

KOBAYASHI, K.; KANEDA, K.; KASAMA, T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. **Microscopy Research and Technique**, v. 53, n. 4, p. 241–245, 2001.

KREWER, C. C.; RIBEIRO, E. E.; RIBEIRO, E. A. M.; MORESCO, R. N.; ROCHA, M. I. U. M.; MONTAGNER, G. F. F. S.; MACHADO, M. M.; VIEGAS, K.; BRITO, E.; CRUZ, I. B. M. Habitual intake of guaraná and metabolic morbidities: an epidemiological study of an elderly Amazonian population. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1367–1374, 2011.

LANIER, L. L. NK Cell Recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 225–274, 2005.

LATORRE, A.O; FURLAN, M.S; SAKAI, M.; FUKUMASU, H.; HUEZA, I.M.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S.L. Immunomodulatory effects of *Pteridium aquilinum* on Natural Killer cell activity and select parts of the cellular immune response of mice. **Journal of Immunotoxicology**, v. 6, n. 2, p. 104–114, 2009.

LEITE, R. P.; WADA, R. S.; MONTEIRO, J. C.; PREDES, F. S.; DOLDER, H. Protective effect of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) pre-treatment on cadmium-induced damages in adult Wistar testis. **Biological Trace Element Research**, v. 141, v. 1–3, p. 262–274, 2011.

LIGUORI, A.; HUGHES, J. R.; GRASS, J. A. Absorption and subjective effects of caffeine from coffee, cola, and capsules. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, n. 58, n. 3, p. 721–726, 1997.

LIMA, W. P.; CARNEVALI, L. C.; EDER, R.; ROSA, L. F. B. P. C.; BACCHI, E. M.; SEELAENDER, M. C. L. Lipid metabolism in trained rats: Effect of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clinical Nutrition**, v. 24, n. 6, p. 1019–1028, 2005.

LIN, A.; SCHILDKNECHT, A.; NGUYEN, L. T.; OHASHI, P. S. Dendritic cells integrate signals from the tumor microenvironment to modulate immunity and tumor growth. **Immunology Letters**, v. 127, n. 2, p. 77–84, 2010.

LORIST, M. M.; TOPS, M. Caffeine, fatigue and cognition. **Brain and Cognition**, v. 53, n. 1, p. 82–94, 2003.

LUM G, LEAL-KHOURI S. Significance of low serum urea nitrogen concentrations. **Clinical Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 639–640, 1989.

MAINARDI, T.; KAPOOR, S.; BIELORY, L. Complementary and alternative medicine: herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 2, p. 283-294, 2009.

MAK, J. C. Potential role of green tea catechins in various disease therapies: progress and promise. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 3, p. 265–273, 2012.

MARIA, A. S.; LOPES, A.; DIAZ, M. M.; MUNOZ-MINGARRO, D.; POZUELO, J. M. Evaluation of the toxicity of guarana with in vitro bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 39, n. 3, p. 164-167, 1998.

MARTIN-FONTECHA, THOMSEN, L.; BRETT, S.; GERARD, C.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T_H1 priming. **Nature Immunology**, v. 5, n. 12, p. 1260-1265, 2004.

MATTEI, R.; DIAS, R. F.; ESPÍNOLA, E. B.; CARLINI, E. A.; BARROS, S. B. M. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 111–116, 1998.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. The role of tea in human health: an update. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n.1, p. 1–13, 2002.

MERCADANTE, S.; SERRETTA, R.; CASUCCIO, A. Effects of caffeine as an adjuvant to morphine in advanced cancer patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 21, n. 5, p. 369-372, 2001.

MIRANDA, M. V.; METZNER, B. S. *Paullinia cupana*: revisão da materia médica. **Revista de Homeopatia**, v. 73, n.1/2, p. 1-17, 2010.

MITCHISON, N. A. T-cell-B-cell cooperation. **Nature Reviews Immunology**, v.4, n. 4, p. 308-312, 2004.

MORGAN, D. O. **The Cell Cycle**: principles of Control. 1. ed. London: Oxford University Press, 2007. 297 p.

MOSMANN, T. R.; KOBIE, J. J.; LEE, F. E.; QUATAERT, S. A. T helper cytokine patterns: defined subsets, random expression, and external modulation. **Immunology Research**, v. 45, p. 173–184, 2009.

NAWROT, P.; JORDAN, S.; EASTWOOD, J.; ROTSTEIN, J.; HUGENHOLTZ, A.; FEELEY, M. Effects of caffeine on human health. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 1, p. 1–30, 2003.

OGAWA, N.; UEKI, H. Clinical importance of caffeine dependence and abuse. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 61, n. 3, p. 263–268, 2007.

OHTA, A.; GORELIK, E.; PRASAD, S. J.; ROCHESE, F.; LUKASHEV, D.; WONG, M. K.; HUANG, X.; CALDWELL, S.; LIU, K.; SMITH, P.; CHEN, J. F.; JACKSON, E. K.; APASOV, S.; ABRAMS, S.; SITKOVSKY, M. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 35, p. 13132–13137, 2006.

OLIVEIRA, C. H.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O.; BEZERRA, F. A. F.; ABIB, E.; DE NUCCI, G. Clinical Toxicology Study of an herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale* (Catuama®) in healthy volunteers. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 54–57, 2005.

OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C. C.; NAGAE, R.; MARTINS, J. V. C.; SELA, V. R.; DE MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 531–535, 2007.

OTTAVIANI, J. I.; MOMMA, T. Y.; HEISS, C.; KWIK-URIBE, C.; CHROETER, H.; KEEN, C. L. The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 2, p. 237–244, 2011.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S. T. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4631–4636, 2008.

PAE, M.; REN, Z.; MEYDANI, M.; SHANG, F.; MEYDANI, S. N.; WU, D. Epigallocatechin-3-gallate directly suppresses T cell proliferation through impaired IL-2 utilization and cell cycle progression. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 8, p. 1509–1515, 2010.

PARK, J. P.; KIM, J. H.; PARK, M. K.; YUN, J. W. potential agents for cancer and obesity treatment with herbal medicines from the Green Garden. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 1065-1076, 2011.

PECK, J. D.; LEVITON, A.; COWAN, L. D. A review of the epidemiologic evidence concerning the reproductive health effects of caffeine consumption: a 2000–2009 update. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 2549–2576, 2010.

PINCHEIRA, J.; BRAVO, M.; NAVARRETE, M. H.; MARCELAIN, K.; LÓPEZ-SÁEZ, J. F.; DE LA TORRE, C. Ataxia telangiectasia: G₂ checkpoint and chromosomal damage in proliferating lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 16, n. 5, p. 419-422, 2001.

PISKULA, M. K.; TERAQ, J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 7, p. 1172-1178, 1998.

QUEZADA, S. A.; PEGGS, K. S.; SIMPSON, T. R.; ALLISON, J. P. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. **Immunological Reviews**, v. 241, n. 1, p. 104-118, 2011.

RAMANAVICIENE, A.; ACAITE, J.; RAMANAVICIUS, A. Chronic caffeine intake affects lysozyme activity and immune cells in mice. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 671-676, 2004.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M. Caffeine and adenosine. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, p. S3-S15, 2010. Supplementum 1.

RIKSEN, N. P.; RONGEN, G. A.; SMITS, P. Acute and long-term cardiovascular effects of coffee: implications for coronary heart disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 121, n. 2, p. 185–191, 2009.

RINALDO, D.; BATISTA JR., J. M.; RODRIGUES, J.; BENFATTI, A. C.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; FURLAN, M.; VILEGAS, W. Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD. **Chirality**, v. 22, n. 8, p. 726–733, 2010.

RITTER, M.; HOHENBERGER, K.; ALTER, P.; HERZUM, M.; TEBBE, J.; MAISCH, M. Caffeine inhibits cytokine expression in lymphocytes. **Cytokine**, v. 30, n. 4, p. 177–181, 2005.

RIVERA-MUNOZ, P.; MALIVERT, L.; DERDOUCH, S.; AZERRAD, C.; ABRAMOWSKI, V.; REVY, P.; VILLARTAY, J. P. DNA repair and the immune system: from V(D)J recombination to aging lymphocytes. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. S71-82, 2007. Supplementum 1.

RONCON, C. M.; ALMEIDA, C. B.; KLEIN, T.; DE MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Anxiolytic effects of a semipurified constituent of guaraná seeds on rats in the Elevated T-Maze test. **Planta Medica**, v. 77, n. 3, p. 236-241, 2011.

ROSENTHAL, L. A.; TAUB, D. D.; MOORS, M. A. Methylxanthine-induced inhibition of the antigen- and superantigen-specific activation of T and B cells. **Immunopharmacology**, v. 24, n. 3, p. 203–217, 1992.

RUXTON, C. H. S.; KIRKWOOD, L.; MCMILLAN, B.; ST JOHN, D.; EVANS, C. E. L. Effectiveness of a herbal supplement (Zotrim TM) for weight management. **British Food Journal**, v. 109, n. 6, p. 416-428, 2007.

SAFRANOW, K.; MACHOY, Z. Methylated purines in urinary stones. **Clinical Chemistry**, v. 51, n.8, p. 1493-1498, 2005.

SANTOS, F. M.; LATORRE, A. O.; HUEZA, I. M.; SANCHES, D. S.; LIPPI, L. L.; GARDNER, D. R.; SPINOSA, H. S. Increased antitumor efficacy by the combined administration of swainsonine and cisplatin in vivo. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1096–1101, 2011.

SAWYNOK, J. Caffeine and pain. **Pain**, v. 152, n. 4, p. 726-729, 2010.

SAWYNOK, J.; YAKSH, T. L. Caffeine as an analgesic adjuvant: a review of pharmacology and mechanisms of action. **Pharmacological Reviews**, v. 45, n. 1, p. 43-85, 1993.

SCHMIDT-WEBER, C. New T-helper subsets controlling the immune system and tissue cells. **Immunotherapy**, v. 2, n. 4, p. 427–429, 2010.

SCHOLEY, A.; HASKELL, C. Neurocognitive effects of guaraná plant extract. **Drugs of the Future**, v. 33, n. 10, p. 869-874, 2008.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565-1570, 2011.

SELBERG, O.; SEL, S. The adjunctive value of routine biochemistry in nutritional assessment of hospitalized patients. **Clinical Nutrition**, v. 20, n. 6, p. 477–485, 2001.

SIANI, A. C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica**. Rio de Janeiro: Scriptorio, 2003. 97 p.

SIGMA ALDRICH - SUPELCO. **Relato de aplicação 271**. Disponível em:

<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Application_Notes/t005271.Par.001.File.tmp/t005271.pdf>. Acesso em: 02/05/2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2004. 1102 p.

SINGH, B. N.; SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R. K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 12, p. 1807-1821, 2011.

SMITH, N.; ATROCH, A. L. Guaraná's journey from regional tonic to aphrodisiac and global energy drink. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 279-282, 2010.

SPOOR, M. S.; RADT, Z. A.; DUNSTAN, R. W. Characterization of age-and gender-related changes in the spleen and thymus from control *Cynomolgus macaques* used in toxicity studies. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 5, p. 695-704, 2008.

SUBBIAH, M. T. R.; YUNKER, R. Studies on the nature of anti-platelet aggregatory factors in the seeds of the amazonian herb guarana (*Paullinia cupana*). **Internacional Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 78, n. 2, p. 96–101, 2008.

TAVANI, A.; NEGRI, E.; LA VECCHIA, C. Coffee intake and risk of hip fracture in women in northern Italy. **Preventive Medicine**, v. 24, n. 4, p. 396–400, 1995.

TAVARES, C.; SAKATA, R. K. Cafeína para o tratamento de dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 62, n. 3, p. 387-401, 2012.

THAKUR, V. S.; GUPTA, K.; GUPTA, S. Green tea polyphenols causes cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells by suppressing class I histone deacetylases. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 2, p. 377–384, 2012.

TIAN, L.; HUMBLET-BARON, S.; LISTON, A. Immune tolerance: are regulatory T cell subsets needed to explain suppression of autoimmunity? **BioEssays**, v. 34, n. 7, p. 569-575, 2012.

TICHÝ, A.; MUTHNÁ, D.; VÁVROVÁ, J.; PEJCHAL, J.; ŠINKOROVÁ, Z.; ZÁRYBNICKÁ, L.; ŘEZÁČOVÁ, M. Caffeine-suppressed ATM pathway leads to decreased p53 phosphorylation and increased programmed cell death in gamma-irradiated leukaemic molt-4 cells. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 9, n. 1, p. 49-56, 2011.

TUMPEY, T. M.; FENTON, R.; MOLESWORTH-KENYON, S.; OAKES, J. E.; LAUSCH, R. N. Role for macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2), MIP-1 and interleukin-1 in the delayed-type hypersensitivity response to viral antigen. **Journal of Virology**, v. 76, n. 16, p. 8050–8057, 2002.

TURKMEN, N.; VELIOGLU, Y. S. Determination of alkaloids and phenolic compounds in black tea processed by two different methods in different plucking seasons. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 1408-1416, 2007.

URPI-SARDA, M.; RAMIRO-PUIG, E.; KHAN, N.; RAMOS-ROMERO, S.; LLORACH, R.; CASTELL, M.; GONZALEZ-MANZANO, S.; SANTOS-BUELGA, C.; ANDRES-LACUEVA, C. Distribution of epicatechin metabolites in lymphoid tissues and testes of young rats with a cocoa-enriched diet. **The British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 10, p. 1393–1397, 2010.

WALTON, K.; DORNE, J. L.; RENWICK, A. G. Uncertainty factors for chemical risk assessment: interspecies differences in the in vivo pharmacokinetics and metabolism of human CYP1A2 substrates. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 7, p. 667–680, 2001.

WESTERTERP-PLANTENGA, M. S.; LEJEUNE, M. P. G. M.; KOVACS, E. M. R. Body Weight Loss and Weight Maintenance in Relation to Habitual Caffeine Intake and Green Tea Supplementation. **Obesity Research**, v. 13, n. 7, p. 1195-1204, 2005.

WU, D.; GUO, Z.; REN, Z.; GUO, W.; MEYDANI, S. N. Green tea EGCG suppresses T cell proliferation through impairment of IL-2/IL-2 receptor signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, n. 5, p. 636–643, 2009.

XU, K.; BASTIA, E.; SCHWARSCHILD, M. Therapeutic potential of adenosine A2a receptor antagonists in Parkinson's disease. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 105, n. 3, p. 267-310, 2005.

YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L. A.; CANTELI, V. C. D.; USHIROBIRA, T. M. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, p. 1950-1963, 2007.

YANG, H.; ROUSE, J.; LUKES, L.; LANCASTER, M.; VEENSTRA, T.; ZHOU, M.; SHI, Y.; PARK, Y. G.; HUNTER, K. Caffeine suppresses metastasis in a transgenic mouse model: a prototype molecule for prophylaxis of metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 21, n. 8, p. 719-735, 2004.

YONEYAMA, S.; KAWAI, K.; TSUNO, N. H.; OKAJI, Y.; ASAKAGE, M.; TSUCHIYA, T.; YAMADA, J.; SUNAMI, E.; OSADA, T.; KITAYAMA, J.; TAKAHASHI, K.; NAGAWA, H. Epigallocatechin gallate affects human dendritic cell differentiation and maturation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 1, p. 209-214, 2008.

ZHANG, W. Y. A benefit-risk assessment of caffeine as an analgesic adjuvant. **Drug Safety**, v. 24, n. 15, p. 1127-1142, 2001.

ZHOU, B. S.; CHATURVEDI, P.; SPRING, K.; SCOTT, S. P.; JOHANSON, R. A.; MISHRA, R.; MATTERN, M. R.; WINKLER, J. D.; KHANNA, K. K. DNA Caffeine abolishes the mammalian G(2)/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 14, p. 10342-10348, 2000.