

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Biodisponibilidade, distribuição tecidual e atividade
antioxidante do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis*
hidrolisado e não hidrolisado

Diogo Pineda Rivelli

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a Tit. Silvia Berlanga de Moraes Barros

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Rivelli, Diogo Pineda

R621b Biodisponibilidade, distribuição tecidual e atividade
antioxidante do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis*
hidrolisado e não hidrolisado / Diogo Pineda Rivelli. -- São
Paulo, 2010.

60p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Barros, Silvia Berlanga de Moraes

1. Farmacognosia 2. Biodisponibilidade : Farmacocinética
3. Antioxidante : Farmacognosia I. T. II. Barros, Silvia
Berlanga de Moraes, orientador.

615.321 CDD

Diogo Pineda Rivelli

Biodisponibilidade, distribuição tecidual e atividade
antioxidante do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis*
hidrolisado e não hidrolisado

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a. Tit. Silvia Berlanga de Moraes Barros
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

SUMÁRIO

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Abreviaturas.....	3
1. Introdução.....	4
2. Objetivos.....	14
3. Material e métodos.....	15
3.1 Obtenção do extrato.....	15
3.2 Determinação quantitativa de compostos fenólicos, flavonóides, cafeína e ácido ascórbico no extrato hidroetanólico de <i>Ilex paraguariensis</i> por CLAE/UV.....	15
3.3 Determinação de compostos fenólicos totais.....	16
3.4 Determinação de flavonóides totais.....	16
3.4.1 Determinação de flavonas e flavonóis totais.....	17
3.4.2 Determinação de flavanonas totais.....	17
3.5 Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de <i>Ilex paraguariensis</i>	17
3.5.1 Método de ORAC.....	17
3.5.2 Método do DPPH.....	18
3.6 Hidrólise do ácido clorogênico isolado e presente no extrato de <i>Ilex paraguariensis</i>	19
3.7 Estudos <i>in vivo</i>	20
3.7.1 Ensaio de recuperação de ácido ascórbico e úrico no plasma e ácido clorogênico, ácido cafeico e cafeína no plasma, pele, fígado e cérebro de ratos.....	20
3.7.2 Avaliação da biodisponibilidade plasmática de ácido cafeico e ácido clorogênico em ratos.....	21
3.7.3 Tratamento dos animais com o extrato hidroetanólico de <i>Ilex paraguariensis</i> hidrolisado e não hidrolisado.....	21
3.7.4 Capacidade antioxidante <i>in vivo</i>	22
3.7.4.1 Determinação de TBARS em pele, fígado e cérebro.....	23
3.7.4.2 Avaliação de atividade antioxidante no plasma, pele, fígado e cérebro pelo método de ORAC.....	24

3.8	Análise estatística.....	24
4.	Resultados.....	25
4.1	Validação dos métodos analíticos.....	25
4.2	Hidrólise do ácido clorogênico e do extrato hidroetanólico de <i>Ilex paraguariensis</i>	32
4.2.1	Determinação do tempo de incubação e parâmetros cinéticos da enzima clorogenato esterase.....	32
4.3	Determinação de flavonóides totais.....	35
4.4	Determinação de compostos fenólicos totais.....	35
4.5	Determinação quantitativa de ácido clorogênico, cafeína, ácido cafeico, quercetina e canferol no extrato não hidrolisado por CLAE.....	35
4.5.1	Determinação de ácido clorogênico e cafeico no extrato hidrolisado de <i>Ilex paraguariensis</i>	35
4.6	Determinações da atividade antioxidante do extrato não hidrolisado e hidrolisado.....	37
4.7	Ensaio de recuperação de ácido clorogênico, ácido cafeico e cafeína em plasma, pele, fígado e cérebro e de ácido ascórbico e ácido úrico no plasma.....	37
4.8	Biodisponibilidade de ácido cafeico e clorogênico em função do tempo de administração.....	38
4.9	Atividade antioxidante do plasma, pele, fígado e cérebro.....	40
4.10	Determinação de TBARS em pele, fígado e cérebro.....	41
4.11	Determinação no plasma, pele, fígado e cérebro da concentração de ácido cafeico, ácido clorogênico e cafeína e no plasma de ácido úrico ácido ascórbico após administração única (U) ou repetida (R) de extrato hidroetanólico de <i>Ilex paraguariensis</i> hidrolisado (H) e não hidrolisado (NH).....	42
5.	Discussão.....	45
6.	Conclusão.....	49
7.	Referências bibliográficas.....	50
8.	Anexo: parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA).....	60

Lista de figuras

Figura 1: Estrutura molecular do ácido cafeico (A) e do ácido clorogênico (B).....	11
Figura 2: Curvas padrão da quantificação de quercetina e canferol por CLAE com detecção UV.....	26
Figura 3: Curvas padrão da quantificação de ácido clorogênico e ácido cafeico por CLAE com detecção eletroquímica.....	27
Figura 4: Curvas padrão da quantificação de ácido ascórbico e ácido úrico por CLAE com detecção UV.....	28
Figura 5: Curvas padrão da quantificação de flavonóis e flavanonas totais, empregando quercetina e naringenina respectivamente como referência.....	29
Figura 6: Curva padrão da quantificação de fenólicos totais empregando ácido cafeico como substâncias de referência.....	30
Figura 7: Curvas padrão da quantificação da atividade antioxidante pelo método do DPPH e de ORAC empregando Trolox [®] como referência.....	31
Figura 8: Relação entre o tempo de incubação da enzima clorogenato esterase, consumo de ácido clorogênico (1411 µM de concentração inicial) e formação de ácido cafeico.....	33
Figura 9: Velocidade de formação de ácido cafeico x concentração inicial de ácido clorogênico para a enzima clorogenato esterase.....	34
Figura 10: Relação entre a concentração de substrato (ácido clorogênico) e a razão entre concentração de substrato e velocidade para a enzima clorogenato esterase.....	34
Figura 11: Perfis cromatográficos (CLAE) de ácido clorogênico (seta vermelha) e ácido cafeico (seta azul) (A), do extrato bruto - não hidrolisado - de <i>Ilex paraguariensis</i> (B) e do extrato de <i>Ilex paraguariensis</i> tratado com clorogenato esterase (C).....	36
Figura 12: Concentração no plasma em função do tempo após a administração de dose oral única de 200mg/kg de ácido cafeico (A) e 393,33mg/kg de ácido clorogênico (B). Valores médios de três determinações.....	39

Lista de tabelas

Tabela 1: Resultados de validação das técnicas empregadas na caracterização do extrato hidroetanólico de <i>Ilex paraguariensis</i>	32
Tabela 2: Atividade antioxidante do extrato antes e após a hidrólise.....	37
Tabela 3: Porcentagem de recuperação de ácido cafeico, ácido clorogênico e cafeína no plasma, pele, fígado e cérebro e de ácido ascórbico e úrico no plasma.....	38
Tabela 4: Valores de atividade antioxidante do plasma avaliados por ORAC dos animais tratados com dose única com o extrato hidroetanólico de <i>Ilex paraguariensis</i> (valores em $\mu\text{mol eq. Trolox}^{\text{®}}$ /L de plasma).....	40
Tabela 5: Valores de atividade antioxidante do plasma, pele, cérebro e fígado avaliados por ORAC dos animais tratados em regime de doses repetidas do extrato hidroetanólico de <i>Ilex paraguariensis</i> (valores em $\mu\text{mol eq. Trolox}^{\text{®}}$ /L de plasma ou $\mu\text{mol eq. Trolox}^{\text{®}}$ /g de proteína para os homogeneizados).....	40
Tabela 6: Eficiência da recuperação de TBARS em cérebro, fígado e pele.....	41
Tabela 7: Valores de TBARS para as amostras de pele, fígado e cérebro dos animais tratados por via oral com extrato hidrolisado em regime de doses repetidas.....	41
Tabela 8: Valores de TBARS para as amostras de pele, fígado e cérebro dos animais tratados por via oral com extrato não hidrolisado em regime de doses repetidas.....	42
Tabela 9: Concentração de cafeína, ácido cafeico, clorogênico, ascórbico e úrico no plasma dos animais tratados com o extrato hidroetanólico de <i>Ilex paraguariensis</i> (valores em $\mu\text{mol/L}$).....	43
Tabela 10: Concentração de ácido cafeico no fígado dos animais tratados com doses repetidas do extrato hidroetanólico de <i>Ilex paraguariensis</i> hidrolisado e não hidrolisado (valores em $\mu\text{g/g}$ de proteína).....	43

Resumo

Ilex paraguariensis (erva mate) é uma planta amplamente usada na América Latina sob a forma de infusão aquosa. Dentre as propriedades atribuídas a esta planta encontra-se a atividade antioxidante que sugere um papel importante desta droga vegetal na prevenção e tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo como a aterosclerose, fotocarcinogênese e fotoenvelhecimento, entre outras.

No entanto alguns compostos presentes nesta planta se encontram sob a forma esterificada, o que poderia dificultar a sua adequada absorção. Uma maneira de aumentar a biodisponibilidade de antioxidantes em extratos vegetais é promover a sua hidrólise visando à liberação dos compostos ativos.

O objetivo deste trabalho foi estudar comparativamente o extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* antes e após hidrólise enzimática quanto à composição fitoquímica, atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, biodisponibilidade de compostos antioxidantes e distribuição tecidual destes compostos em animais de experimentação.

Para tanto o extrato foi obtido por percolação etanol:água (50% v/v) e sua hidrólise realizada por reação enzimática. A caracterização fitoquímica foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria e a atividade antioxidante dos extratos pelos métodos de DPPH e ORAC.

Para os ensaios *in vivo* os extratos (hidrolisado e não hidrolisado) foram administrados oralmente (por gavagem) a ratos Wistar machos em sistema de dose única ou doses repetidas (30 dias). Coletou-se o sangue, pele, fígado e cérebro, analisando-se a concentração dos compostos de interesse e a atividade antioxidante destes tecidos pelo método de ORAC.

O extrato apresentou boa atividade antioxidante e conteúdo fenólico, sendo que estes valores não foram significativamente alterados pela hidrólise. No entanto, a hidrólise possibilitou uma maior absorção dos compostos de interesse, aumentando a atividade antioxidante plasmática.

Palavras chave: *Ilex paraguariensis*. Atividade antioxidante. Biodisponibilidade. Distribuição tecidual.

Bioavailability, tissue distribution and antioxidant activity of hydrolyzed and non hydrolyzed hydroethanolic extract of *Ilex paraguariensis*

Abstract

Ilex paraguariensis (yerba mate) is a plant broadly used in Latin America as an aqueous infusion. Among its biological properties is the antioxidant activity, which suggests an important role in prevention and treatment of oxidative stress associated diseases, such as atherosclerosis, photocarcinogenesis and photoaging among others.

However some of the compounds responsible for that activity are, in crude plant extract, under esterified form, which could make absorption more difficult. An approach to increase the bioavailability of antioxidants from plant extracts is to submit the extract to hydrolysis in order to release the active compounds.

The goal of this work was comparatively evaluate the hydroethanolic extract of *Ilex paraguariensis* before and after enzymatic hydrolysis concerning phytochemical composition, *in vivo* and *in vitro* antioxidant activity, bioavailability and tissue distribution of antioxidant compounds in rats.

The extract was obtained by percolation with ethanol:water (50% v/v) and the hydrolysis performed by enzymatic reaction. The phytochemical characterization was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometry and the antioxidant activity by DPPH and ORAC methods.

Hydrolyzed and non hydrolyzed extracts were given orally (by gavage) to male Wistar rats in single and multiple dose (30 days) regimen. Blood, skin, liver and brain were removed, and the concentration of antioxidant compounds and antioxidant activity by ORAC method were evaluated.

The crude hydroethanolic extract showed antioxidant activity and phenolic content, but these values were not significantly changed by hydrolysis. However the hydrolysis increased the absorption of the compounds and the plasma antioxidant activity.

Keywords: *Ilex paraguariensis*. Antioxidant activity. Bioavailability. Tissue distribution.

Abreviaturas

AAPH: 2,2'-Azobis-2-methyl-propanimidamide dihydrochloride

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

COMT: catecol-O-metiltransferase

COX-2: ciclooxigenase-2

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EPR: ressonância paramagnética de elétron

ERO: espécies reativas de oxigênio

H: extrato hidrolisado

HDL: lipoproteína de alta densidade

IL-1 β : interleucina-1 β

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

LDL: lipoproteína de baixa densidade

MMP: metaloproteinase de matriz

NF κ B: fator nuclear- κ B

NH: extrato não hidrolisado

NO: óxido nítrico

ORAC: Oxygen radical absorbance capacity

PGE-2: prostaglandina-E2

R: doses repetidas

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

U: dose única

UV: ultravioleta

VEGF: fator de crescimento de endotélio vascular

1. Introdução

Espécies reativas de oxigênio (ERO) estão envolvidas na fisiopatologia de várias doenças, como infecções respiratórias, doenças reumáticas, cardiovasculares, e diabetes tipo II. Um fenômeno comum em todos eles é o desbalanço entre a velocidade de produção e eliminação de ERO (ULRICH-MERZENICH *et al.*, 2009).

Os níveis de ERO são mantidos sob controle em sistemas biológicos por enzimas antioxidantes (como superóxido dismutase, sistema glutaciona peroxidase-redutase e catalase), antioxidantes não enzimáticos (α -tocoferol, β -caroteno, ascorbato e glutaciona) e pela ação de seqüestradores de radicais livres de baixa eficiência (aminoácidos livres, peptídeos e proteínas). Além disso, polifenóis oriundos de vegetais comumente consumidos na dieta podem influenciar os níveis de ERO (ULRICH-MERZENICH *et al.*, 2009).

Vários estudos epidemiológicos têm indicado que um aumento no consumo de frutas e vegetais está associado com a diminuição na incidência de várias doenças associadas ao envelhecimento. Os efeitos antioxidantes dos polifenóis e de outros compostos presentes nestes alimentos podem ser os responsáveis por essa atividade (PRIOR *et al.*, 2007).

ERO também são gerados pela exposição à radiação ultravioleta (UV) e podem causar uma série de mudanças na pele, induzindo a formação de lesões pré-cancerosas e cancerosas além da progressão do envelhecimento cutâneo. De fato tem-se mostrado que as radiações UVA e UVB penetram significativamente na epiderme e na derme, onde induzem degradação de componentes celulares como lipídeos, proteínas e DNA e extracelulares como colágeno e elastina (YAMADA *et al.*, 2006).

Portanto esforços adicionais são necessários para prevenir o câncer de pele que resulta da exposição à radiação. Como o câncer de pele é um problema associado com mortalidade e morbidade torna-se necessário desenvolver novas estratégias para a prevenção da resposta a essa exposição. Uma abordagem neste aspecto é a quimioprevenção, ou seja, uma situação em que a ocorrência da doença pode ser totalmente prevenida, retardada ou revertida pela administração tópica ou oral de compostos naturais, sintéticos ou misturas (AFAQ *et al.*, 2005).

A flora brasileira é rica em plantas medicinais com um grande potencial para fornecer estes compostos. Um exemplo recente disto é o emprego de extrato de raiz de *Pothomorphe umbellata*, conhecida popularmente como pariparoba, como um potente antioxidante e fotoprotetor (SILVA *et al.*, 2005, SILVA *et al.*, 2009 e ROPKE *et al.*, 2006).

De origem oriental, outra planta bastante estudada é o chá verde. Em uma revisão recente Kidd *et al.* (2009) citam estudos em que a administração oral de seus polifenóis a humanos mostrou diminuir marcadores de estresse oxidativo e de lipoperoxidação, além de mediadores pró-inflamatórios. Em outro estudo verificou-se a inibição da atividade de VEGF (fator de crescimento de endotélio vascular) o que poderia explicar parcialmente o efeito antiinflamatório. Notou-se também que, em ratos, estes polifenóis diminuem o edema cerebral e o dano ao hipocampo causado por isquemia e que a epigallocatequina-3-galato inibe a COMT (catecol-O-metiltransferase), o que seria útil no tratamento de doença de Parkinson. Esta substância foi também responsável pela parada do ciclo celular e indução da apoptose em diversas linhagens celulares de câncer (como pele, pulmão e pâncreas) .

Outros estudos foram realizados empregando compostos isolados. YAMADA *et al.* (2006) administraram ácido cafeico oralmente e o aplicaram topicamente em camundongos medindo a formação de radicais livres após a exposição à luz UVA. Verificaram que o ácido cafeico diminuiu a formação de radicais livres em ambos os casos. Hwang *et al.* (2006) usaram um modelo semelhante, mas administraram oral e topicamente uma mistura de 11 polifenóis extraídos de algas marrons e notaram que a quantidade e o volume dos tumores formados após a irradiação crônica com UVB era menor nos grupos tratados.

Ilex paraguariensis St. Hilaire (Aquifoliaceae), conhecido popularmente como erva mate é uma planta sul-americana bastante cultivada no nordeste da Argentina, sul do Brasil e leste do Paraguai. Suas partes aéreas são utilizadas para preparar um chá muito apreciado por seu sabor e propriedades estimulantes (FILIP *et al.*, 2001).

O mate também costuma ser consumido na forma de chimarrão, onde repetidas adições de água quente são feitas à planta, que é colocada dentro de

uma cuia, sendo a infusão resultante sugada através de um canudo metálico conhecido como bomba. A erva mate também pode ser ingerida na forma de infusão fria, conhecida como tererê (MEINHART, *et al.*, 2010).

Esta bebida contém cafeína e teobromina, o que confere um amargor característico (DUGO *et al.*, 2009) e devido a isto é considerada a principal fonte de metilxantinas da dieta. No extrato aquoso de mate foram também identificados sacarose, frutose, ácido fólico, trigonelina, colina, tiamina e riboflavina, além de diversos compostos fenólicos, flavonóides (GUGLIUCCI & STAHL, 1995), saponinas (COELHO, *et al.* 2010), vários derivados do ácido cafeico e do ácido ferúlico como os ácidos dicafeoilquínicos e feruoilquínicos (DUGO *et al.*, 2009).

Alguns estudos epidemiológicos têm verificado uma correlação positiva entre o consumo de erva mate e a incidência de alguns tipos de câncer, principalmente esôfago, cavidade oral, laringe e orofaringe. A revisão de Loria *et al.* 2009 analisou vários artigos e concluiu que este fenômeno poderia ser causado pela alta temperatura em que a infusão é consumida e agravada pelo consumo de álcool e tabaco. No entanto, Silva *et al.* (2009) mostraram que o consumo de mate por ratos pode diminuir os níveis de danos ao DNA em leucócitos e a carcinogênese esofágica induzida por lesão térmica e dietilnitrosamina.

Prediger *et al.* (2008) verificaram o efeito da administração do extrato hidroetanólico de erva mate nas funções cognitivas de ratos. Notou-se uma melhora na memória de curto tempo e os autores atribuíram este fenômeno à presença de cafeína no extrato.

A atividade antioxidante de *Ilex paraguariensis* foi demonstrada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O extrato aquoso da planta mostrou-se ativo quando ingerido por pacientes sadios inibindo a peroxidação da LDL induzida por Cu^{+2} (GUGLIUCCI, 1996). O extrato aquoso de erva mate também foi capaz de inibir a peroxidação lipídica causada tanto por um sistema Fe^{+2} /ascorbato quanto pelo sistema $\text{CCl}_4/\text{NADPH}$ (SCHINELLA *et al.*, 2000).

Em um estudo comparativo entre o extrato aquoso e o extrato etanólico verificou-se que este possuía uma atividade 40 vezes menor na inibição da oxidação da LDL (GUGLIUCCI & STAHL, 1995). Já Rivelli *et al.*

(2007) compararam a atividade antioxidante por DPPH do extrato aquoso com a do extrato hidroetanólico (50% v/v) obtido por percolação, e verificaram que este possuía atividade ligeiramente superior à do extrato aquoso.

Mosimann *et al.* (2006) verificaram que coelhos hipercolesterolêmicos tratados com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* não mostraram alteração nos níveis de lipídeos no soro. Por outro lado ocorreu uma redução das lesões ateroscleróticas e diminuição da quantidade de colesterol, ambos na aorta. Estes autores sugeriram a existência de outros mecanismos de atuação do extrato de *Ilex paraguariensis* como alteração da agregação plaquetária, inibição da expressão de moléculas de adesão ou indução de produção de óxido nítrico.

Pang *et al.* (2008) analisaram o potencial do extrato de *Ilex paraguariensis* (etanol:água 15:85 v/v) em reduzir a obesidade induzida por dieta hipercolesterolêmica em ratos. Os resultados indicaram que a suplementação diminuiu o ganho de peso dos animais assim como a concentração plasmática de LDL e de gordura acumulada em tecidos viscerais. Já, Sugimoto *et al.* (2009) verificaram que o extrato metanólico de erva-mate inibe a atividade da lipase pancreática de porco sugerindo o uso como agente antiobesidade.

Morais *et al.* (2009) quantificaram saponinas e fenólicos totais, além de 12 outros compostos (como o ácido clorogênico, metilxantinas e catequinas) em extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e o administraram diariamente e por via oral (1 litro) durante 40 dias a indivíduos normolipidêmicos, dislipidêmicos e hipercolesterolêmicos submetidos a tratamento com estatinas. Estes autores verificaram uma diminuição da concentração de LDL e aumento da HDL em todos os grupos e especularam que o consumo regular do extrato poderia diminuir o risco de doenças cardiovasculares.

Matsumoto *et al.* (2009) mediram a concentração de cafeína, teobromina, ácido clorogênico e cafeico no extrato aquoso de mate e o administraram a seres humanos. Eles verificaram um aumento na expressão gênica de enzimas antioxidantes como glutatona peroxidase, catalase e superóxido dismutase em leucócitos além da diminuição da peroxidação lipídica no plasma.

Martins *et al.* (2009 a) verificaram que o consumo de mate durante 60 dias aumentou a concentração de ácidos graxos poliinsaturados no fígado e diminuiu a peroxidação lipídica no fígado e no plasma em cerca de 50% em camundongos. Outro artigo deste mesmo autor mostrou que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* pôde inibir *in vitro* a enzima lipase pancreática tanto humana quanto de suínos e *in vivo* foi capaz de diminuir o ganho de peso em camundongos alimentados com dieta hipercalórica, assim como reduzir a lipídemia (colesterol total, LDL e triglicérides). Os autores sugeriram um potencial uso do mate no tratamento da obesidade (MARTINS *et al.*, 2009 b).

Em um modelo similar ao de Martins *et al.* 2009 (a e b), Arçari *et al.* (2009) também observaram diminuição no ganho de peso e na lipídemia de animais submetidos à dieta hipercalórica, assim como na taxa de glicose e de gordura epididimal. A análise dos níveis de mRNA de diversas adipocinas (expressas em tecido adiposo branco epididimal e marrom intercapsular) também foi avaliada e verificou-se que o tratamento com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* diminuiu sua expressão em relação ao grupo hipercalórico.

O extrato aquoso de erva mate foi capaz de promover uma redução na lipoperoxidação das células do líquido de lavagem brônquio-alveolar, assim como da atividade de MMP-9 (metaloproteinase de matriz-9) e do número de macrófagos e neutrófilos em camundongos tratados com fumaça de cigarro (LANZETTI *et al.*, 2008). Uma possível explicação para esse fenômeno talvez seja a presença de ácido clorogênico no extrato, pois Jin *et al.* (2005) demonstraram que esse composto isolado foi capaz de inibir a atividade de MMP-9, sugerindo um possível uso desta substância na quimioprevenção do câncer.

Xu *et al.* (2009 e 2010) verificaram que compostos isolados do extrato metanólico de *Ilex paraguariensis* (flavonóides, derivados do ácido cafeico e glicosídeos megastigmanos) foram capazes de inibir a elastase de neutrófilos humanos, sendo que os dicafeoilquínicos tiveram a maior atividade e de forma dose dependente sugerindo o uso destes compostos como ingredientes de cosméticos antienvhecimento. Compostos presentes no extrato de erva mate também foram utilizados por Gugliucci *et al.* (2009) para avaliar a sua capacidade de inibir a formação de produtos finais de glicação avançada

(AGE), induzida por metilglioxal, à albumina e histonas. Pôde-se verificar que tanto o ácido cafeico quanto o ácido clorogênico, em menor extensão, exerceram esta atividade.

Leonard *et al.* (2010) verificaram que o extrato aquoso de erva mate foi capaz de remover, de maneira dose dependente, radicais hidroxila e superóxido (avaliado por EPR – ressonância paramagnética de elétron), assim como inibir o "burst" respiratório, a peroxidação lipídica e a fragmentação do DNA em cultura de células de monócitos de camundongos.

Miranda *et al.* (2008) demonstraram por meio do ensaio de cometa que a ingestão regular de chá mate aumenta a resistência à fragmentação de DNA induzida por H₂O₂ em células de fígado de ratos.

Puangraphant e Mejia (2009) mediram as propriedades antiinflamatórias de diferentes constituintes da erva mate e investigaram potenciais interações entre eles. Eles verificaram que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* não mostrou redução na produção de NO e inibiu fracamente a expressão de iNOS (óxido nítrico sintase induzível) de forma dose-dependente. Já as saponinas presentes no mate conseguiram inibir o sistema iNOS/NO preferencialmente ao COX-2/PGE-2 (ciclooxigenase-2/prostaglandina E2). O ácido clorogênico apresentou inibição modesta dos marcadores pró-inflamatórios, inibindo somente o COX-2/PGE-2. Eles encontraram também que a mistura de quercetina com as saponinas do mate foi capaz de inibir a expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 β , a translocação nuclear da subunidade p65 do NF κ B assim como decréscimo de NO e PGE-2 e reduziram a produção de IL-6, sugerindo um efeito sinérgico. Em oposição, a combinação destas saponinas com o ácido clorogênico resultou em efeito antagônico/inibitório.

A propriedade antioxidante do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* *in vitro* também foi demonstrada em microsossomos de fígado de ratos utilizando um sistema de geração de radicais livres. O extrato inibiu a peroxidação lipídica enzimática e não enzimática de modo concentração-dependente. Além disto, foi capaz de inibir a peroxidação de membranas de glóbulos vermelhos induzida por peróxido de hidrogênio e exibiu propriedade seqüestradora de ânion superóxido. O extrato não foi capaz de neutralizar o radical hidroxila. Os

resultados deste estudo apóiam a utilização de extratos de *Ilex paraguariensis* para aumentar a defesa antioxidante do organismo contra os radicais livres (SCHINELLA *et al.*, 2000).

Bixby *et al.* (2005) realizaram um estudo comparativo de três bebidas comumente consumidas com alto teor de polifenóis e com comprovada capacidade antioxidante (*Ilex paraguariensis* - mate; *Camellia sinensis* - chá verde, e vinhos branco e tinto), para analisar a eficácia dos flavonóides em neutralizar o efeito do peroxinitrito no estresse nitrosativo induzido em células epiteliais e macrófagos de ratos. *Ilex paraguariensis* demonstrou ser o melhor inibidor de nitração de proteínas e o melhor promotor de sobrevivência celular. Os autores sugeriram que as bebidas contendo flavonóides podem representar uma alternativa coadjuvante de tratamento das complicações do diabetes.

Wnuk *et al.* (2009) indicaram que a infusão das folhas de erva-mate na concentração de 10 µg/mL pode diminuir o índice de divisão nuclear, aumentar em cerca de 3,2 vezes o número de células apoptóticas e em 3,3 vezes o número de micronúcleos, sugerindo atividade citostática, citotóxica e genotóxica em culturas de linfócitos humanos. No entanto, os autores não conseguiram encontrar condições para fazer uma extrapolação para as condições *in vivo*. Eles especularam ainda que esta atividade possa ser, pelo menos em parte, devida à presença de cafeína no extrato, pois este composto isolado apresentou atividade similar nos ensaios realizados.

Dudonné *et al.* (2009) avaliaram o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante por cinco métodos diferentes de 30 espécies de plantas e notaram que *Ilex paraguariensis* estava entre aquelas que apresentaram os melhores resultados.

Filip *et al.* (2001) confirmaram a presença de grande quantidade dos ácidos clorogênico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico, além de outros derivados fenólicos e traços de quercetina, rutina e canferol no extrato aquoso das folhas de *Ilex paraguariensis*. Os autores sugeriram que estas substâncias podem ser responsáveis pela atividade antioxidante.

Os ácidos fenólicos são derivados hidroxilados do ácido benzóico ou do ácido cinâmico. Nos últimos dez anos eles têm recebido particular atenção devido às suas propriedades antioxidantes, por seu papel na prevenção de

diversas doenças, particularmente aterosclerose e câncer e por proteger a pele contra o eritema induzido por radiação UVB (MATTILA & KUMPULAINEN, 2002 e YAMADA *et al.*, 2006).

O principal representante da família do ácido hidroxicinâmico é o ácido cafeico, que ocorre nas plantas principalmente em sua forma esterificada, como por exemplo, o ácido clorogênico (figura 1). Os derivados hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos estão raramente presentes nas plantas em sua forma livre. Frequentemente eles ocorrem na forma de ésteres e glicosídeos, sendo as moléculas livres liberadas por hidrólise ácida ou alcalina ou ambas (ROMMEL & WROLSTAD, 1993).

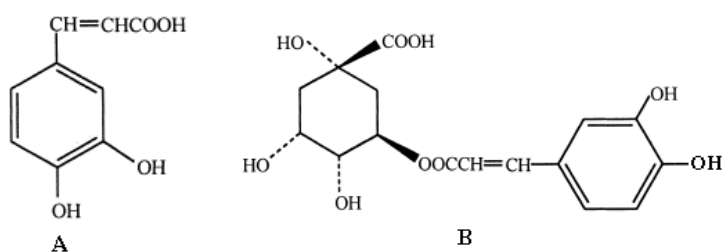


Figura 1. Estrutura molecular do ácido cafeico (A) e do ácido clorogênico (B).

O metabolismo e a biodisponibilidade dos ingredientes funcionais dos alimentos tem recentemente atraído à atenção, assim como a sua atividade. Muitos destes ingredientes podem não ser absorvidos na forma inalterada, devido à degradação enzimática que ocorre quando estes compostos sofrem a ação do sistema digestório. O conhecimento da distribuição destes compostos nos tecidos e onde eles podem satisfatoriamente exercer as suas atividades é essencial para avaliação de suas funções biológicas (TAKENAKA *et al.*, 2000).

Renouf *et al.* (2010) verificaram, em humanos, que compostos fenólicos presentes no café possuíam biodisponibilidade maior do que os do chá verde. Além disso, o tempo para se atingir o pico de concentração plasmática era diferente, indicando absorção no intestino delgado para o ácido cafeico e ferúlico (presentes no café) e todos os compostos do chá verde e absorção colônica para os ácidos dihidroferúlico e dihidrocafeico.

Já Lafay *et al.* (2006a) infundiram ácido clorogênico diretamente ao estômago de ratos e notaram que este composto foi absorvido de forma inalterada neste órgão, no entanto ao administrar uma dieta adicionada de ácido clorogênico eles puderam verificar que houve hidrólise deste composto, originando ácido cafeico. Os autores concluíram que este processo deve ter ocorrido no intestino delgado dos animais. Em um outro trabalho do mesmo grupo, ratos tiveram o intestino delgado perfundido no segmento jejuno-íleo e administraram-se ácido clorogênico ou ácido cafeico, analisando-se o plasma e o efluente. Verificou-se que a absorção do ácido cafeico era cerca de 2,5 vezes maior que a do ácido clorogênico (LAFAY *et al.*, 2006b).

Uma estratégia para modificar a biodisponibilidade de compostos presentes em alimentos e extratos vegetais é promover a hidrólise visando aumentar a concentração das substâncias ativas de interesse (GERMANÒ *et al.*, 2006). Alguns estudos têm mostrado diferenças na atividade e na biodisponibilidade de extratos vegetais hidrolisados e não hidrolisados.

Germanò *et al.* (2006) demonstraram a atividade antioxidante *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo* de compostos fenólicos dos extratos de *Trichilia emetica*. A avaliação dos constituintes do extrato por CLAE mostrou que após a hidrólise ocorre um aumento significativo na quantidade de componentes não esterificados, como o ácido cafeico e diminuição dos compostos esterificados como o ácido clorogênico. Além disso, em ensaios de avaliação de atividade antioxidante *in vitro* o extrato hidrolisado apresentou atividade superior ao não hidrolisado. Neste mesmo estudo a avaliação da biodisponibilidade de compostos fenólicos em ratos que ingeriram o extrato hidrolisado ou não hidrolisado mostrou que esta é maior para as formas livres do que para as formas conjugadas. Outro resultado importante mostra que microsomas de fígado tratados com extrato hidrolisado se mostraram mais resistentes à peroxidação lipídica.

Nardini *et al.* (2002) mediram a diferença de concentração existente entre as formas conjugada e livre dos compostos fenólicos presentes no café antes e após a hidrólise, sendo as formas livres predominantes depois da hidrólise e as conjugadas predominantes no extrato bruto. No ensaio *in vivo* administraram-se café à pacientes saudáveis e coletaram-se amostras de plasma,

notando-se a presença predominante de compostos livres em relação aos conjugados, sugerindo que a hidrólise, ou mecanismo semelhante, possa ocorrer *in vivo*.

A grande maioria dos trabalhos envolvendo *Ilex paraguariensis* utiliza o extrato aquoso, obtido por decocção da planta. Neste estudo utilizaremos o extrato hidroetanólico obtido por percolação visando a obter extração de maior quantidade de compostos fenólicos como os derivados cafeoílicos e flavonóides, uma vez que estes últimos têm sido encontrados apenas em quantidades muito pequenas no extrato aquoso (FILIP *et al.*, 2001).

2. Objetivos

Verificar se a hidrólise do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* modifica suas propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo* e a biodisponibilidade e distribuição tecidual do ácido clorogênico e cafeico em ratos.

Para atingir este objetivo foi delineado o seguinte plano de trabalho:

- Obtenção do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis*
- Caracterização fitoquímica (ácido clorogênico, ácido cafeico, cafeína, quercetina, canferol) por CLAE e (flavonóides e fenólicos totais) espectrofotometria.
 - Determinação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato.
 - Obtenção do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* hidrolisado.
 - Caracterização do extrato hidrolisado (atividade antioxidante, quantificação de compostos fenólicos totais, ácido clorogênico e ácido cafeico).
 - Avaliação da concentração de ácido cafeico e cafeína no plasma de ratos após a administração oral de dose única do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* hidrolisado e não hidrolisado e no plasma, pele, fígado, cérebro após a administração oral de doses repetidas.
 - Determinação da atividade antioxidante do plasma de ratos após administração oral de dose única do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* hidrolisado e não hidrolisado e do plasma, pele, fígado e cérebro após a administração oral de doses repetidas.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção do extrato

As folhas de erva mate (doadas pela Anidro do Brasil Extrações S.A., código ETMP124356, lote 2.0607.0215) foram trituradas em moinho de facas (Arthur H. Thomas CO., PA, USA), tamisados em 40 mesh e percolados com etanol:água (50% v/v) até o esgotamento da droga. O extrato foi concentrado em temperatura entre 55-60°C e a seguir liofilizado (Edwards do Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

3.2 Determinação quantitativa de compostos fenólicos, flavonóides, cafeína e ácido ascórbico no extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* por CLAE/UV

As análises foram realizadas por CLAE empregando sistema isocrático, consistindo de bomba Constametric modelos 3500 (Fremont, CA, USA), injetor manual Rheodyne 7161 (Rohnert Park, CA, USA) equipado com loop de 20µL e detector UV/Vis Lab Alliance 525 (San Jose, CA, USA). Para a separação foi utilizada coluna Phenomenex (Torrance, CA, USA) Bondclone 10µm C18 (300 x 4,6mm) para ácido clorogênico, ácido cafeico, cafeína e ácido ascórbico e Phenomenex Luna 10µm C18 (250 x 4,6mm) para quercetina e canferol.

As fases móveis consistiram de: solução aquosa de ácido metafosfórico 0,2%:acetonitrila (80:20 v/v) e fluxo de 1mL/min com detecção em 330nm para ácido cafeico e clorogênico e em 275nm para cafeína (RIVELLI *et al.*, 2007); solução aquosa de ácido metafosfórico 0,2% e detecção em 254nm (fluxo 0,7mL/min) (ROPKE, 1998) para o ácido ascórbico e metanol:acetonitrila:água (40:15:45 v/v/v) contendo 1% de ácido acético, fluxo 1mL/min e detecção em 368nm (ZU *et al.*, 2006) para quercetina e canferol.

3.3 Determinação de compostos fenólicos totais

Este método se baseia na transferência de elétrons, em meio alcalino, dos compostos fenólicos para complexos fosfotúngsticos/fosfomolibdênicos, formando complexos azuis que podem ser determinados espectrofotometricamente (AINSWORTH & GILLESPIE, 2007).

Adicionou-se 50µL de reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 0,4N a 50µL de padrão ou amostra. Então, colocou-se 100µL de carbonato de sódio 700mM. A mistura foi incubada por uma hora no escuro à temperatura ambiente e a absorbância lida em 760nm em leitor de microplaca Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). Ácidos gálico e cafeico foram empregados como substâncias de referência (AINSWORTH & GILLESPIE, 2007) sendo o resultado expresso em µmol eq. ác. gálico/g ou µmol eq. ác. cafeico/g de amostra. Como o ácido ascórbico é um interferente deste método procedemos à quantificação deste na amostra (item 3.2), pois caso sua presença fosse confirmada seria necessário estabelecer uma curva de correção baseada na concentração deste composto (SINGLETON *et al.*, 1999).

3.4 Determinação de flavonóides totais

O procedimento mais comum para determinar o conteúdo total de flavonóides é um ensaio espectrofotométrico baseado na formação de um complexo entre o íon Al^{+3} e o grupo carbonílico. No entanto, dependendo da estrutura molecular, as diferentes classes de flavonóides interagem diferentemente com este íon, formando complexos que absorvem em diferentes comprimentos de onda. Sabe-se que ocorre uma mudança drástica na absorbância se não existir uma ligação dupla entre os carbonos 2-3 do anel C do esqueleto do flavonóide (flavanonas). Portanto foi necessário o desenvolvimento de dois métodos separados, um para a quantificação de flavonas e flavonóis e o outro para flavanonas (POPOVA, *et al.*, 2004).

3.4.1 Determinação de flavonas e flavonóis totais

Em microplacas de 96 poços, adicionou-se 100µL de água, 60µL de etanol, 10µL de cloreto de alumínio (solução aquosa 40mg/mL), 10µL de acetato de sódio (solução aquosa 32,81mg/mL) e 20µL de amostra ou substância de referência (quercetina). A microplaca foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos e a absorbância lida em 415nm em leitor de microplaca Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) (KOSALEC *et al.*, 2005 e POPOVA *et al.*, 2004). O resultado foi expresso em µmol eq. quercetina/g amostra.

3.4.2 Determinação de flavanonas totais

Esta determinação seguiu o método descrito por Nagy *et al.* (1996) em que 0,5mL da amostra ou naringenina (utilizada como referência), ambos diluídos em metanol, foi adicionado a 1mL de solução 1% de 2,4-dinitrofenilhidrazina e 1mL de metanol. A mistura foi aquecida a 50°C por 50 minutos. A seguir adicionou-se 2,5mL de hidróxido de potássio (10% p/v em metanol 70% v/v) e após dois minutos 2,5mL de metanol, seguido de centrifugação a 1000g durante 10 minutos e leitura em 495nm realizada em leitor de microplaca Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA).

A solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina foi preparada dissolvendo-se 1g deste reagente em 2mL de ácido sulfúrico 96% completando-se o volume para 100mL de metanol. O resultado foi expresso em µmol eq. naringenina/g amostra.

3.5 Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis*

3.5.1 Método de ORAC

Neste método a amostra ou a substância de referência é misturada com um indicador fluorescente (fluoresceína sódica - Riedel-de Haën, Seelze,

Germany) e incubada uma temperatura constante. Então uma solução do iniciador (AAPH - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) é adicionada, fazendo com que o indicador seja consumido em função do tempo, diminuindo sua fluorescência. Na presença de um antioxidante este decaimento é inibido (HUANG *et al.* 2005).

O extrato hidroetanólico hidrolisado e não hidrolisado foi diluído para 1mg/mL em acetona:água (50% v/v). As diluições subseqüentes foram realizadas em tampão fosfato 75mM pH 7,0.

Alíquotas de 25 μ L da amostra diluída, Trolox[®] (um análogo hidrossolúvel da vitamina E, utilizado como referência) ou tampão (branco) foram distribuídas em placa de 96 poços seguidas da adição de 150 μ L de solução de fluoresceína sódica (40nM em tampão fosfato 75mM pH 7,0). A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 25 μ L de AAPH (153mM em tampão fosfato 75mM pH 7.0) seguido de agitação por 10 segundos.

A fluorescência foi monitorada cineticamente, a cada minuto durante uma hora, em leitor de microplaca Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) com filtro de excitação de 485/20nm e de emissão de 528/20nm. A fluorescência foi medida a partir do fundo de cada poço com a sensibilidade ajustada para 60. Os poços externos foram preenchidos com 300 μ L água para garantir a homogeneidade térmica da placa (OU *et al.*, 2001 e HELD, 2005).

3.5.2 Método do DPPH

O DPPH é um radical de nitrogênio relativamente estável, colorido e comercialmente disponível. Na presença de um antioxidante ele é reduzido fazendo com que a cor da solução mude de roxo para amarelo, sendo que a reação pode ser medida em espectrofotômetro pelo decréscimo da absorbância.

A amostra foi diluída em metanol 80% (v/v) sendo 50 μ L adicionados a 150 μ L da solução de DPPH (100 μ M em metanol). A placa foi mantida no escuro por duas horas e a seguir a absorbância lida em 517nm em leitor de

microplaca Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). Trolox foi usado como substância de referência (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

3.6 Hidrólise do ácido clorogênico isolado e presente no extrato de *Ilex paraguariensis*

Inicialmente foi proposto realizar hidrólise ácida ou alcalina do ácido clorogênico (NARDINI *et al.* 2002, GERMANÒ *et al.*, 2006). Entretanto, estudos piloto mostraram que por este método não era possível recuperar o ácido cafeico, levando a concluir que o mesmo era degradado durante a hidrólise (resultados não mostrados).

Assim optou-se por realizar a hidrólise empregando um sistema enzimático descrito por Asther *et al.* (2005) que emprega a enzima clorogenato esterase isolada de *Aspergillus niger* (Kikkoman, Noda, Chiba, Japão). O método foi aplicado para o ácido clorogênico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) isolado e para o extrato de *Ilex paraguariensis* tendo sido determinados os parâmetros cinéticos da reação (K_m e V_{max}).

Para a determinação do tempo necessário de incubação da enzima para se obter a hidrólise total do ácido clorogênico, 0,5mL de uma solução 0,5mg/mL de ácido clorogênico (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) foi incubado com 30 μ L de enzima (0,6U/mL) em tampão fosfato 75mM pH7,0 a 30°C e analisada a formação de produto/consumo de substrato em função do tempo.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos incubamos 0,5mL de diversas concentrações de ácido clorogênico diluído em tampão fosfato 75mM pH7,0 juntamente com 30 μ L de enzima (0,6U/mL) a 30°C durante o tempo determinado anteriormente.

O extrato foi hidrolisado nas mesmas condições descritas acima para o ácido clorogênico utilizando-se uma solução de 1mg/mL do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis*.

3.7 Estudos *in vivo*

O uso dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo sob o protocolo CEEA nº131 em 11/12/2006.

Em todos os experimentos foram utilizados ratos Wistar machos com aproximadamente 200g provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.7.1 Ensaio de recuperação de ácido ascórbico e úrico no plasma e ácido clorogênico, ácido cafeico e cafeína no plasma, pele, fígado e cérebro de ratos

Para a preparação dos homogeneizados, um fragmento de tecido (pele depilada, cérebro ou fígado) foi pesado e adicionado de tampão fosfato 140mM pH 7,4. A mistura foi triturada em Ultra Turrax Metabo GE700 (Nürtingen, Alemanha), seguida de homogeneização em sistema tipo Potter-Elvehjem Marconi MA099 (Piracicaba, São Paulo, Brasil) e centrifugada a 1000g durante 20 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi doseado para a concentração de proteínas totais pelo método de Lowry (1951). Resumidamente prepara-se uma solução (I) contendo 0,0018mol/L de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado, 0,19mol/L de carbonato de sódio e 0,1mol/L de hidróxido de sódio e uma solução (II) contendo 0,004mol/L de sulfato de cobre pentahidratado. Então prepara-se o reativo cupro-alcálico misturando-se a solução (I) com a (II) na proporção (9:1). Adiciona-se 1mL deste reativo a 20µL da amostra e após 10 minutos na ausência de luz adiciona-se 200µL de uma solução 1N do reagente de Folin-Ciocalteu. Os tubos são conservados 30 minutos na ausência de luz e a seguir realiza-se a leitura em 620nm empregando-se albumina de soro bovino como padrão (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

Concentrações conhecidas de ácido úrico e ascórbico foram adicionadas ao plasma, e de ácido cafeico, ácido clorogênico e cafeína aos homogeneizados de pele, fígado, cérebro e plasma. Depois a amostra foi

adicionada de ácido metafosfórico 10% (v/v), agitado em vórtex por 2 minutos, centrifugado durante 4 minutos a 10000rpm, filtrado em membrana 0,22µm e analisada por CLAE/UV como descrito no item 3.2. O ácido úrico seguiu o mesmo sistema analítico descrito para o ácido ascórbico, no entanto sua avaliação foi acompanhada em 292nm.

3.7.2 Avaliação da biodisponibilidade plasmática de ácido cafeico e ácido clorogênico em ratos

Ratos Wistar machos com peso aproximado de 200g foram tratados oralmente com 200mg/kg de ácido cafeico ou 393,33mg/kg de ácido clorogênico (1,11mmol/kg) (Yamada *et al.*, 2006), sacrificados em diferentes tempos e o sangue coletado e centrifugado durante 10 minutos à 3000rpm. O plasma foi adicionado de ácido metafosfórico (10% p/v, para a precipitação das proteínas), agitado em vórtex por 2 minutos, centrifugado durante 4 minutos a 10000rpm, filtrado em membrana 0,22µm e analisado por CLAE.

Como as concentrações de ácido cafeico e de ácido clorogênico estavam abaixo dos limites de detecção para o sistema CLAE/UV, estes foram avaliados em CLAE com detecção eletroquímica. O sistema era constituído por uma Bomba Waters modelo 510 (Milford, CA, USA), injetor manual Rheodyne 7125 (Cotati, CA, USA) equipado com loop de 20µL. A separação foi realizada em coluna Phenomenex (Torrance, CA, USA) Luna 3µm C8 (75 x 4,6mm). Utilizou-se como fase móvel solução aquosa de ácido metafosfórico 0,2%:acetonitrila (80:20 v/v) contendo 20mM de LiClO₄ e 2mM de KCl em fluxo de 0,7mL/min. A detecção foi realizada em detector eletroquímico HP 1049A (San Jose, CA, USA) utilizando-se eletrodo de carbono vítreo, com potencial ajustado em 0,600V no modo amperométrico.

3.7.3 Tratamento dos animais com o extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* hidrolisado e não hidrolisado

Ratos Wistar machos com peso aproximado de 200g receberam dose oral única do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* hidrolisado ou não

hidrolisado (200mg eq. ac. cafeico/kg) ou foram tratados durante 4 semanas com o mesmo extrato (10 animais tratados e 5 controles que receberam água). A administração foi realizada por volta das 15h. Os animais foram anestesiados por via intramuscular com xilazina (15mg/kg)/ketamina (100mg/kg) e o sangue foi coletado no tempo de máxima concentração plasmática determinado no item 3.7.2. Os animais submetidos ao regime de doses múltiplas também tiveram sua pele, fígado e cérebro coletados. A concentração de ácido clorogênico, ácido cafeico e cafeína foi avaliada conforme descrito nos itens 3.7.2 e 3.2.

Para verificar se parte do ácido cafeico presente no plasma e no fígado estava sob a forma conjugada com o ácido glicurônico, a amostra foi tratada com β -glicuronidase tipo HP-2 de *Helix pomatia*, com atividade de 100000U/mL de glicuronidase e 7500U/mL de sulfatase (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Para tanto, 100 μ L de plasma ou homogeneizado de fígado foram adicionados de 300 μ L de etanol. A mistura foi agitada em vórtex e em seguida centrifugada a 10000rpm (4°C) durante 5 minutos. O sobrenadante (300 μ L) foi seco sob fluxo de nitrogênio e ressuspenso em 0,5mL de tampão acetato pH 5,0 (0,1M), adicionado de 500U da enzima β -glicuronidase e incubado a 37°C durante a noite sob agitação. A mistura foi filtrada em membrana 0,22 μ m e analisada segundo descrito no item 3.7.2 (GERMANÒ *et al.*, 2006).

3.7.4 Capacidade antioxidante *in vivo*

Para avaliar a capacidade antioxidante foi empregado o método de TBARS para a pele, fígado e cérebro (YEUM *et al.*, 2005) e ORAC para o plasma, fígado, cérebro e pele (PRIOR *et al.*, 2003).

3.7.4.1 Determinação de TBARS em pele, fígado e cérebro (YEUM *et al.*, 2005)

Este método se baseia em medir a extensão da formação de um composto vermelho originado da reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico com lipídeos oxidados (SINNHUBER & YU, 1957).

O homogeneizado de pele (100µL), cérebro (100µL) ou fígado (150µL) descrito no item 3.7.1 foi adicionado de 125µL de ácido tricloroacético (10% p/v), agitado em vórtex durante 1 minuto e aquecido a 95°C durante 20 minutos. Em seguida a amostra foi centrifugada a 10000rpm (4°C, 10minutos) e coletou-se 150µL do sobrenadante que foi acrescido de 325µL de ácido tiobarbitúrico (0,4% p/v em tampão acetato 200mM, pH 3,5). A amostra foi aquecida a 95°C durante 45 minutos, posteriormente resfriada em banho de gelo durante 5 minutos. A mistura foi analisada por CLAE em um sistema constituído por uma Bomba Waters modelo 510 (Milford, CA, USA), injetor manual Rheodyne 7125 (Cotati, CA, USA) equipado com loop de 20µL. A separação foi realizada em coluna Phenomenex (Torrance, CA, USA) Luna 3µm C8 (150 x 4,6mm). Utilizou-se como fase móvel tampão fosfato 20mM pH 7,0:acetonitrila (80:20 v/v) em fluxo de 0,8mL/min. A detecção foi realizada em detector de fluorescência HP 1046A (San Jose, CA, USA) utilizando-se comprimento de onda de excitação de 525nm e emissão em 540nm, gain 10, lamp 2 (2,5W, 100Hz), response time 3 (500ms) e gate 0,03ms. Empregou-se solução de 1,1,3,3-tetraetoxipropano como padrão. Para tanto esta substância foi hidrolisada em ácido sulfúrico (1% v/v) durante 2 horas à temperatura ambiente.

Para avaliar a eficiência de recuperação de TBARS nos tecidos de interesse, concentrações conhecidas do padrão foram adicionadas aos homogeneizados e medidos conforme descrito acima.

3.7.4.2 Avaliação de atividade antioxidante no plasma, pele, fígado e cérebro pelo método de ORAC (PRIOR *et al.*, 2003)

A 100µL de plasma ou homogeneizado foram adicionados 200µL de etanol e 100µL de água. A mistura foi agitada por 1 minuto e acrescentada de 400µL de hexano, seguida de nova agitação de 1 minuto. O tubo foi centrifugado a 12000rpm durante 5 minutos. Removeu-se 350µL da camada hexânica que foi transferida para tubo âmbar. Uma segunda extração com 400µL de hexano foi realizada e a camada hexânica foi combinada com a primeira e evaporada sob nitrogênio. Esta fração foi utilizada para a análise da atividade antioxidante lipofílica.

À parcela remanescente adicionou-se 400µL de ácido perclórico 0,5M seguido de centrifugação a 12000rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi diluído em tampão fosfato 75mM pH7,0 e analisado como fração hidrofílica, seguindo protocolo descrito no item 3.5.1.

Para o ensaio da atividade antioxidante lipofílica, o extrato hexânico evaporado foi dissolvido em 250µL (125µL para pele e cérebro) de acetona e então diluído com 750µL (375µL para pele e cérebro) de uma solução 7% (p/v) de β-ciclodextrina randomicamente metilada (Cyclodex Technologies, High Springs, FL, USA) em acetona:água 50%. As diluições subseqüentes foram feitas nesta mesma solução, assim como o preparo da substância de referência (Trolox[®]) e do branco. O protocolo de análise segue aquele descrito no item 3.5.1.

3.8 Análise estatística

Os dados foram analisados por análise fatorial de variância (ANOVA). O nível de 0,05 foi utilizado como o ponto de mínima significância estatística.

4. Resultados

4.1 Validação dos métodos analíticos

Os ensaios de ORAC, DPPH, quantificação de flavonóis totais, flavanonas totais, fenólicos totais, canferol, quercetina, ácido ascórbico, ácido úrico e ácido clorogênico e cafeico (com detecção eletroquímica) foram validados segundo o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA, resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Para cada método foram realizadas curvas com determinações em triplicata diária em três dias diferentes totalizando nove replicatas (figura 2 a 7 e tabela 1). Para a análise de ácido clorogênico e cafeico (com detecção UV) e cafeína empregou-se técnica validada previamente (RIVELLI *et al.*, 2007).

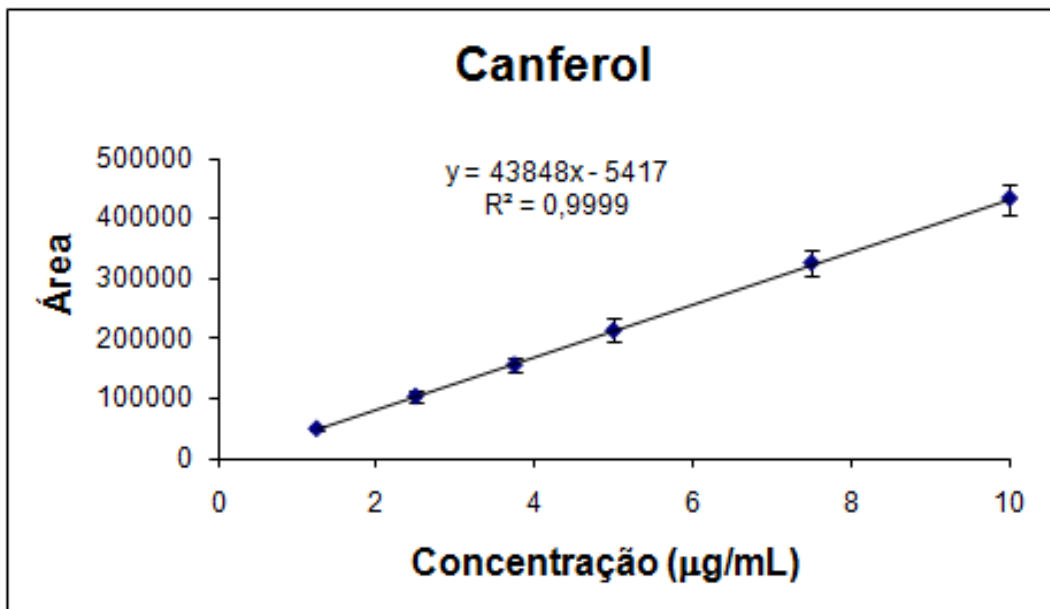
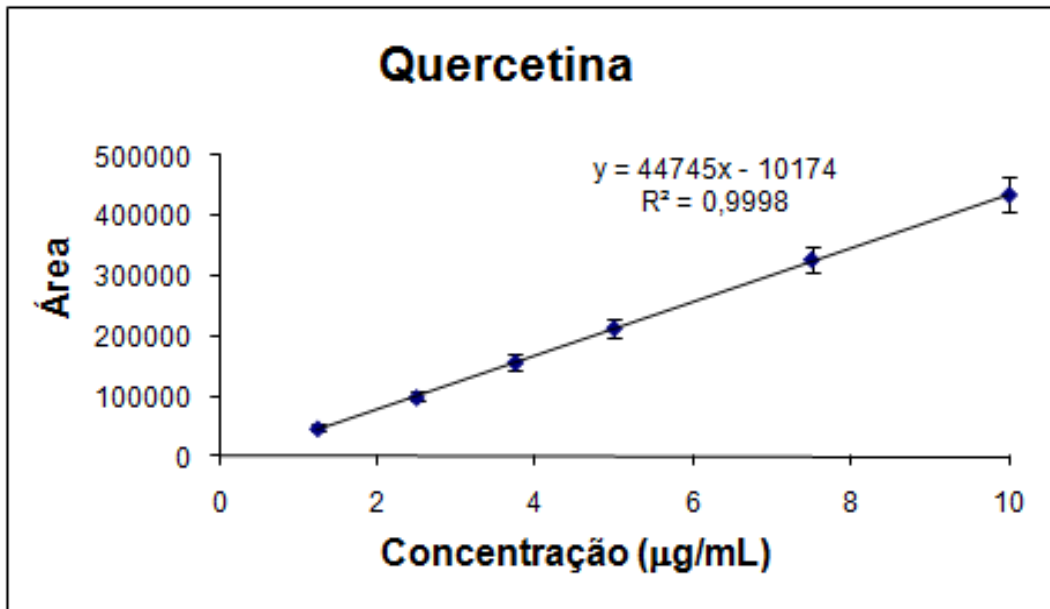


Figura 2. Curvas padrão da quantificação de quercetina e canferol por CLAE (metanol:acetonitrila:água (40:15:45 v/v/v) contendo 1% de ácido acético, fluxo 1mL/min e detecção em 368nm, coluna Phenomenex Luna 10µm C18 (250 x 4,6mm)).

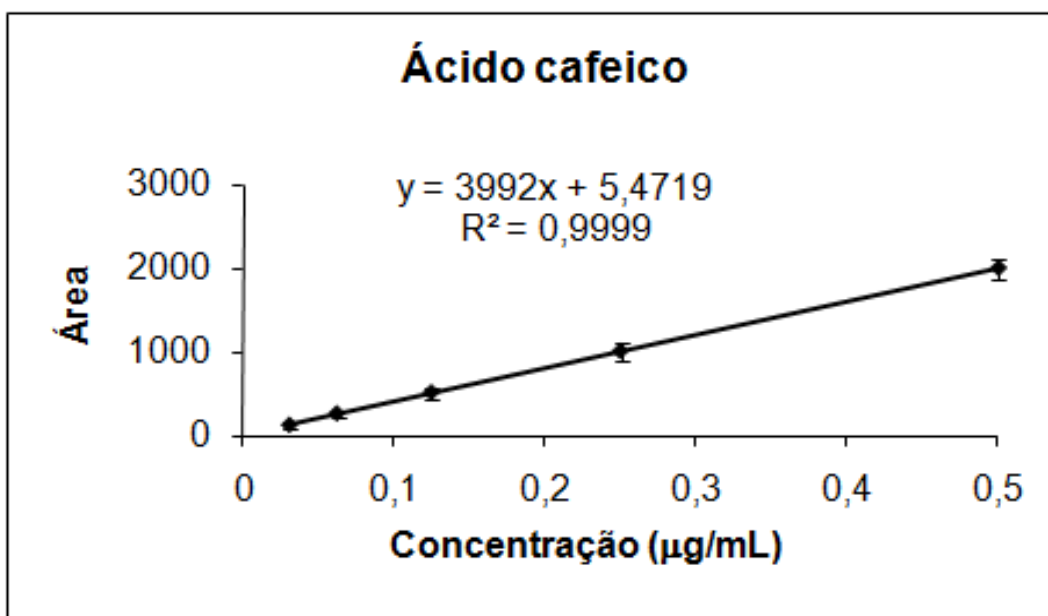
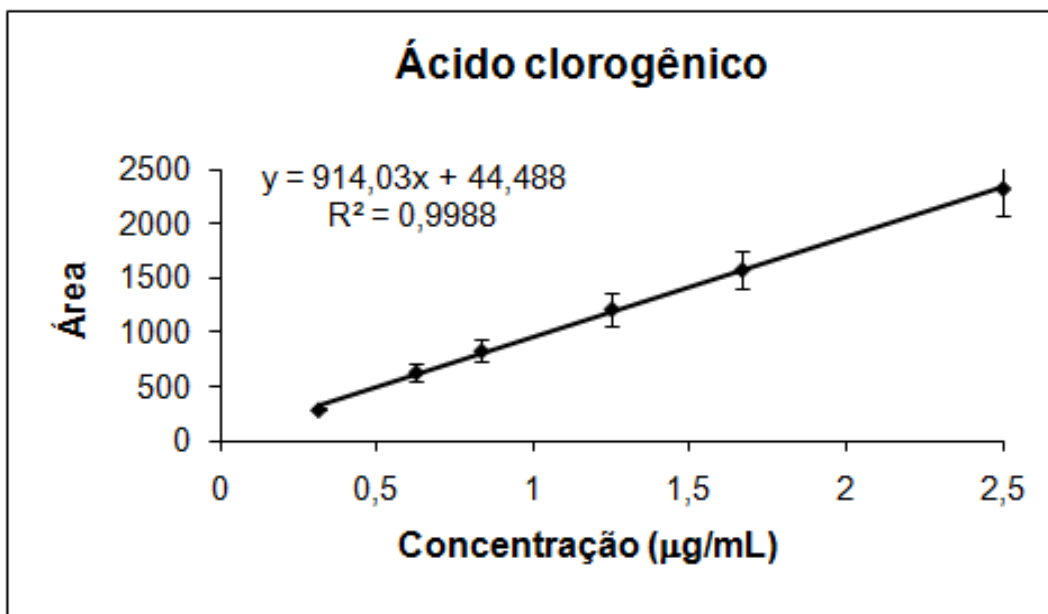


Figura 3. Curvas padrão da quantificação de ácido clorogênico e ácido cafeico por CLAE com detecção eletroquímica (ácido metafosfórico 0,2%:acetonitrila (80:20 v/v) contendo 20mM de LiClO₄ e 2mM de KCl em fluxo de 0,7mL/min; coluna Luna 3µm C8 (75 x 4,6mm) e detector utilizando eletrodo de carbono vítreo, com potencial ajustado em 0,600V no modo amperométrico).

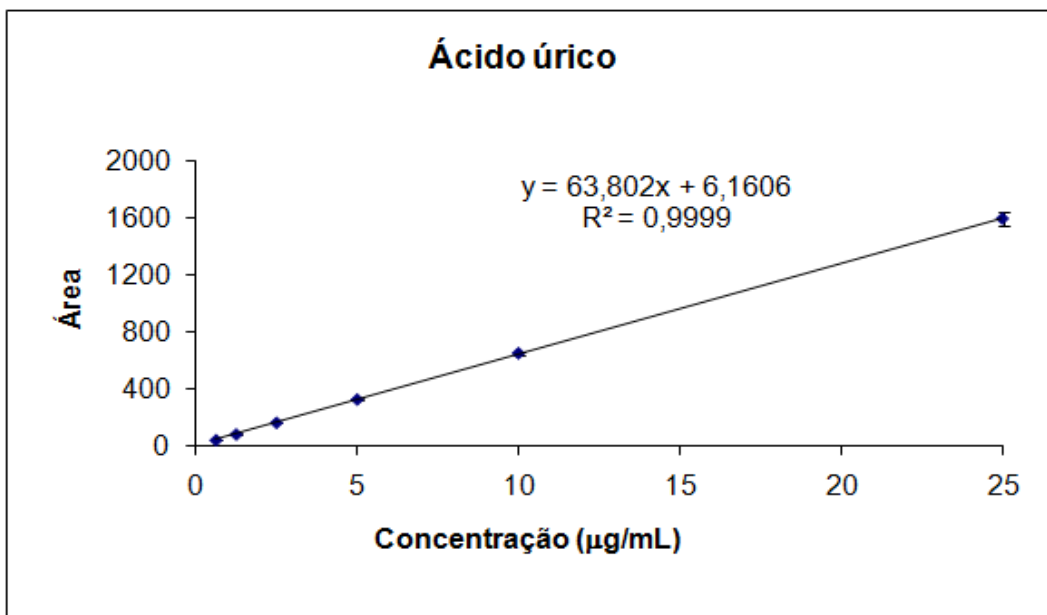
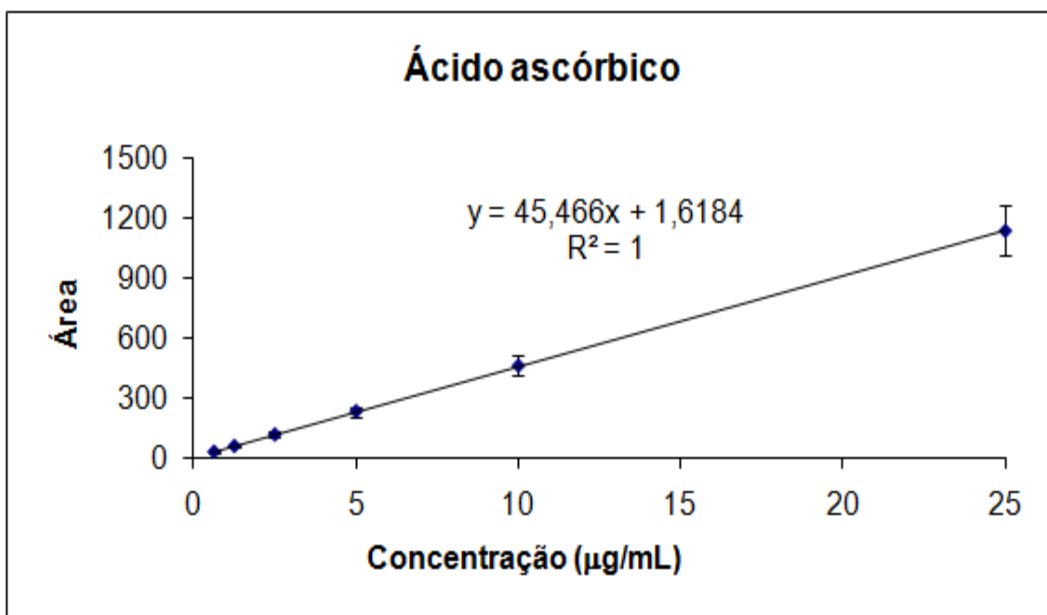


Figura 4. Curvas padrão da quantificação de ácido ascórbico e ácido úrico por CLAE (solução aquosa de ácido metafosfórico 0,2%, fluxo 0,7mL/min e detecção em 254nm para o ácido ascórbico e 292nm para o ácido úrico).

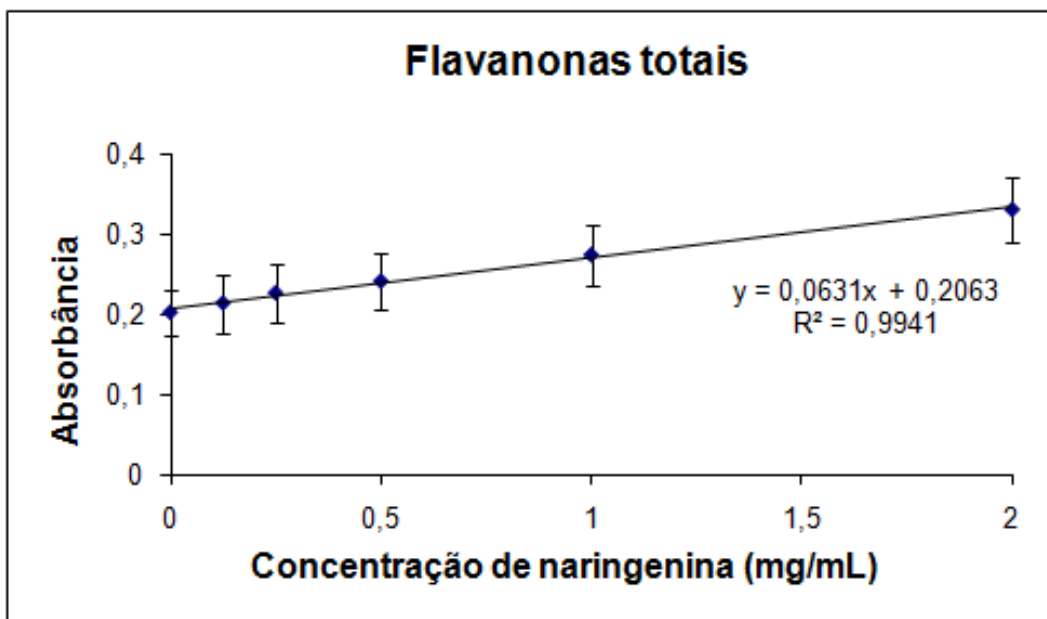
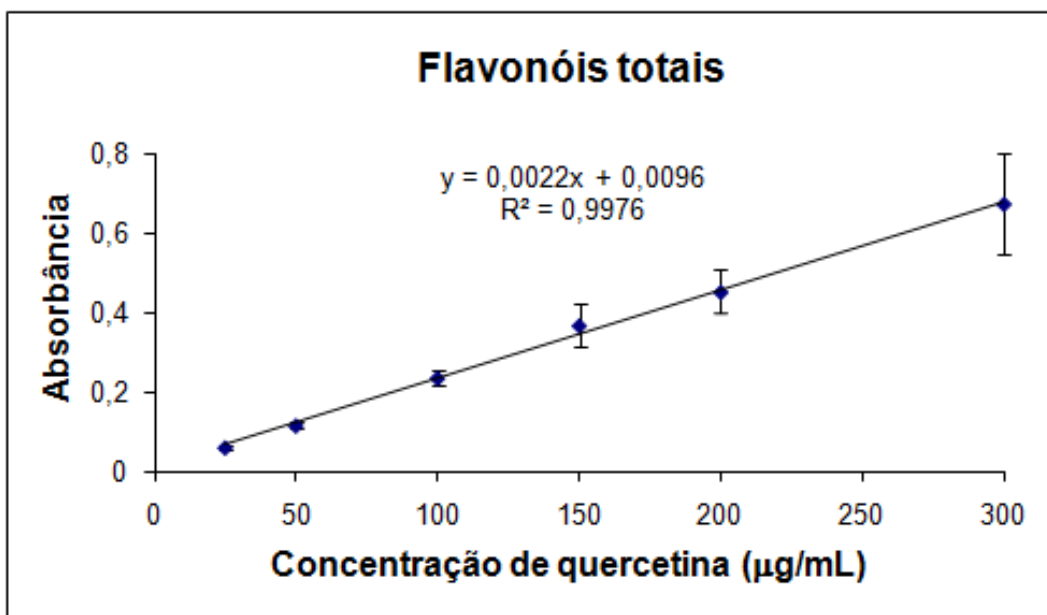


Figura 5. Curvas padrão da quantificação de flavonóis e flavanonas totais, empregando quercetina e naringenina respectivamente como substâncias de referência.

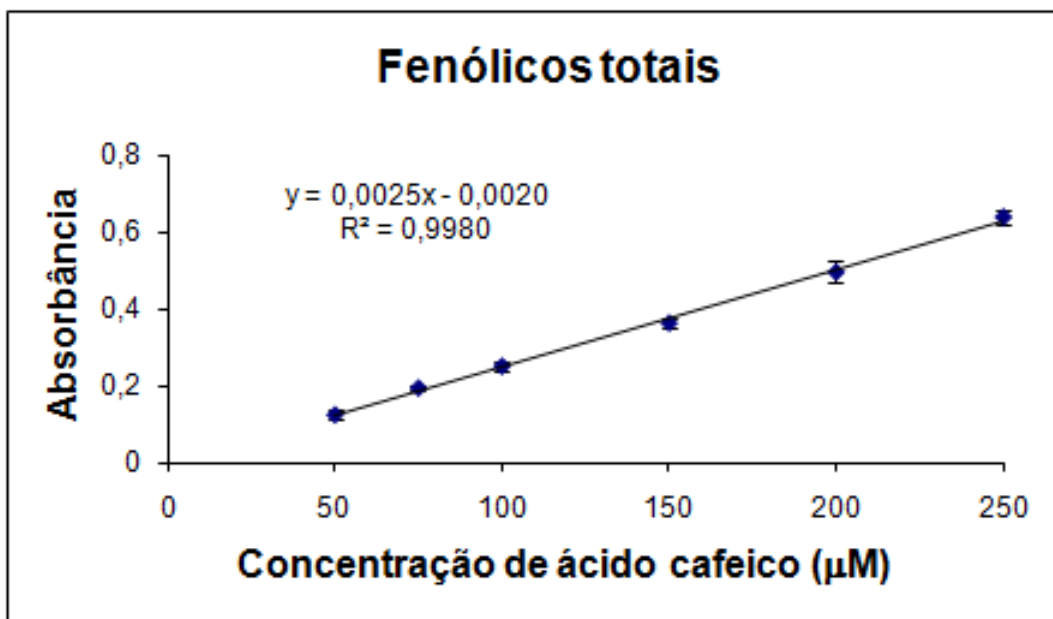


Figura 6. Curva padrão da quantificação de fenólicos totais empregando ácido cafeico como substância de referência.

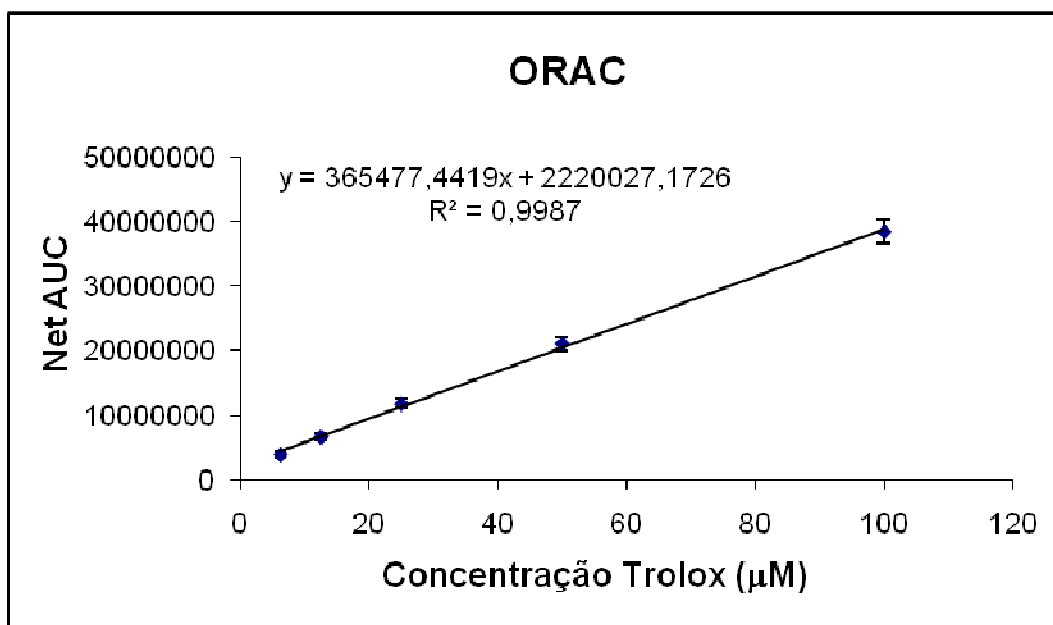
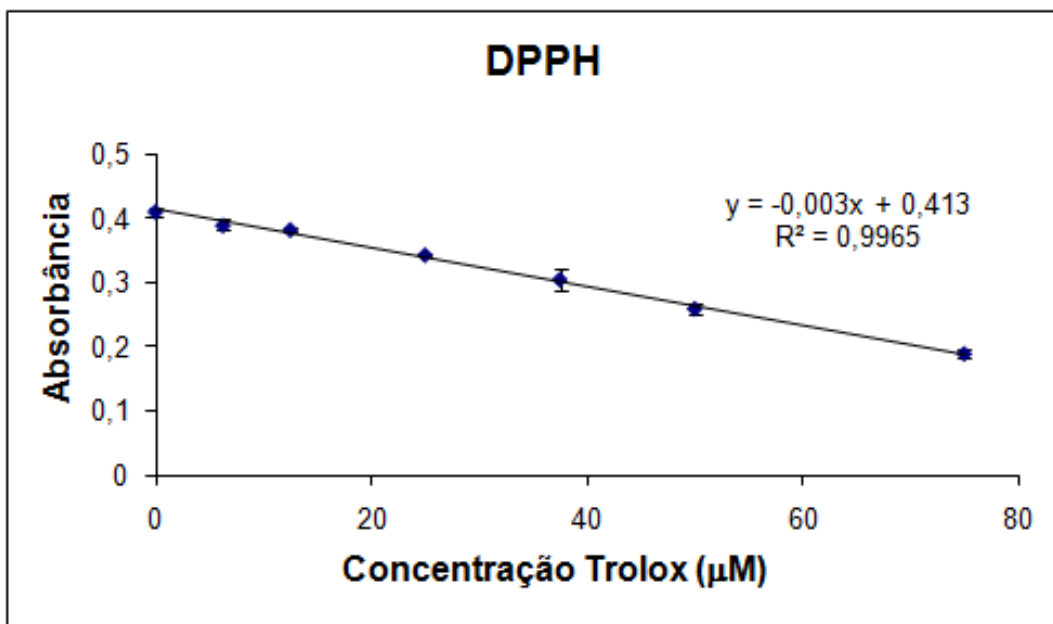


Figura 7. Curvas padrão da quantificação da atividade antioxidante pelo método do DPPH e de ORAC empregando Trolox[®] como substância de referência.

Tabela 1. Resultados de validação das técnicas empregadas na caracterização do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis*.

Método	LD	LQ	Exatidão	Precisão
Quercetina (CLAE)	0,4µg/mL	1,25µg/mL	102,97%	8,16%
Canferol (CLAE)	0,16µg/mL	1,25µg/mL	99,43%	8,23%
Flavonóis totais	7,41µg/mL	25µg/mL	99,14%	9,12%
Flavanonas totais	55µg/mL	125µg/mL	95,56%	14,61%
Fenólicos totais (ácido cafeico)	11,28µM	50µM	99,2%	3,57%
DPPH	1,792µM	3,125µM	107,49%	4,39%
ORAC	1,8µM	6,25µM	103,41%	4,52%
Ácido clorogênico	98,77 ng/mL	312,5 ng/mL	96,68%	3,93%
Ácido cafeico	8,18 ng/mL	31,25 ng/mL	103,54%	2,83%
Ácido ascórbico	0,19 µg/mL	0,625 µg/mL	95,09%	4,34%
Ácido úrico	0,22 µg/mL	0,625 µg/mL	99,46%	2,40%

LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação

4.2 Hidrólise do ácido clorogênico e do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis*

4.2.1 Determinação do tempo de incubação e parâmetros cinéticos da enzima clorogenato esterase

A figura 8 mostra o ensaio cinético da hidrólise do ácido clorogênico pela enzima clorogenato esterase tendo sido determinadas as concentrações de ácido clorogênico (substrato) e de ácido cafeico (produto) após tempos crescentes de incubação.

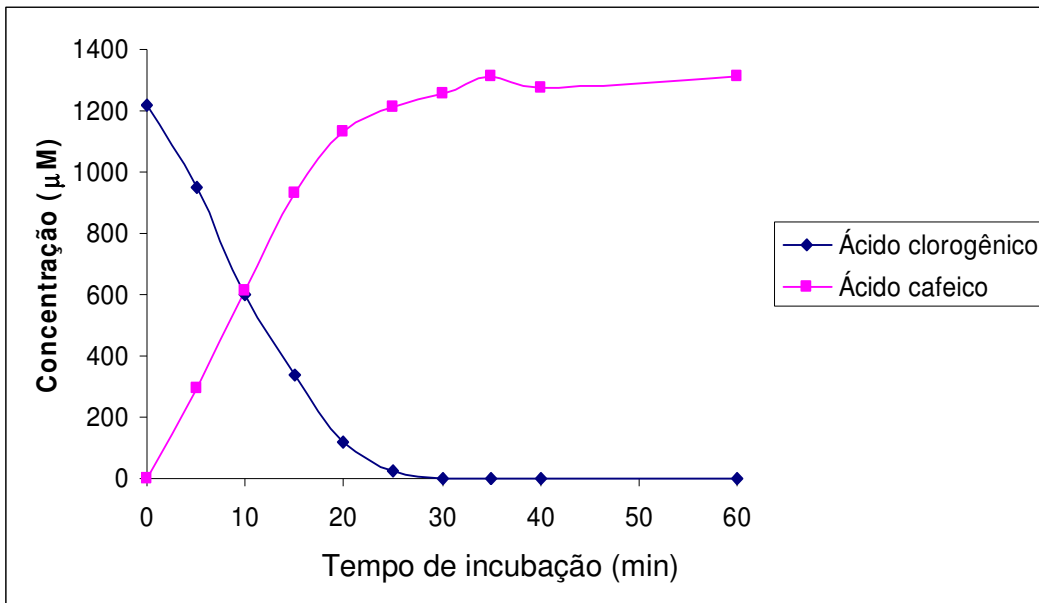


Figura 8. Relação entre o tempo de incubação da enzima clorogenato esterase, consumo de ácido clorogênico (1221 μM de concentração inicial) e formação de ácido cafeico.

O gráfico mostra que após 30 minutos de incubação houve total hidrólise do ácido clorogênico. Deste modo estabeleceu-se o tempo de 30 minutos para o tratamento do extrato.

Para o cálculo das constantes enzimáticas (K_m e V_{max}) variou-se a concentração de ácido clorogênico e determinou-se o gráfico de velocidade de formação de produto em função da concentração inicial de substrato após incubação de 30 minutos (figura 9).

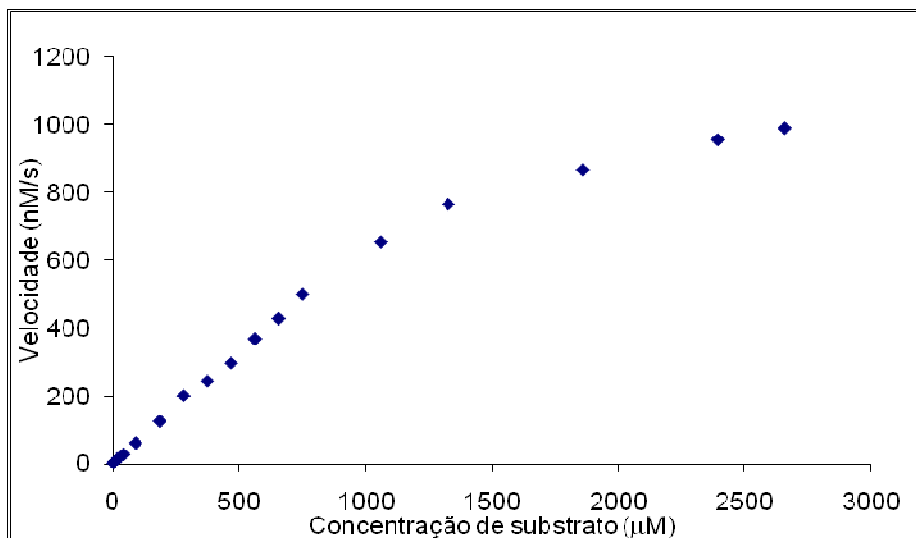


Figura 9. Velocidade de formação de ácido cafeico x concentração inicial de ácido clorogênico para a enzima clorogenato esterase.

A partir da figura 9 é possível estabelecer o gráfico de Hanes-Woolf que relaciona o valor da concentração de substrato dividido pela velocidade em função da concentração de substrato. Por este gráfico o intercepto do eixo “y” expressa K_m/V_{max} e o do eixo “x” $-K_m$ (figura 10). Assim, foram calculados o V_{max} de 1667nmol/s e K_m de 1597µM.

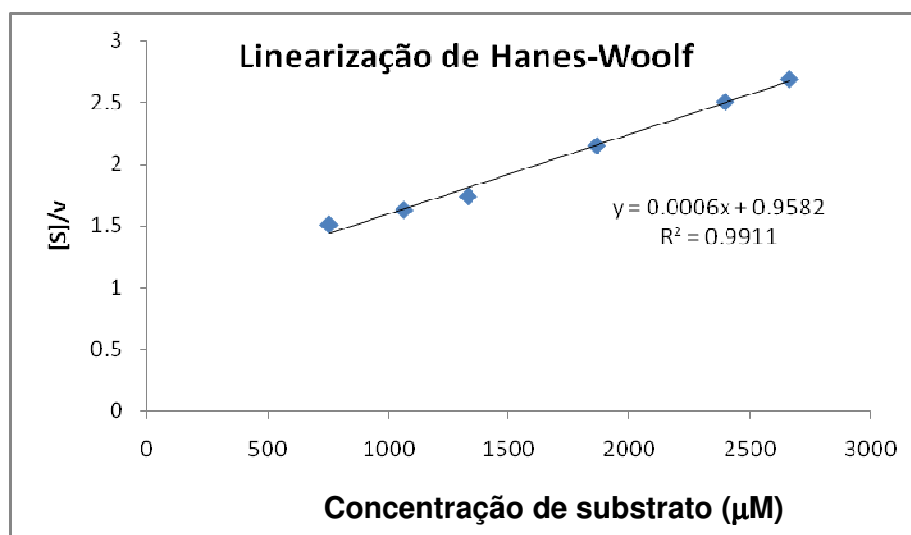


Figura 10. Relação entre a concentração de substrato (ácido clorogênico) e a razão entre concentração de substrato e velocidade para a enzima clorogenato esterase.

4.3 Determinação de flavonóides totais

A concentração de flavonóis encontrados no extrato não hidrolisado foi de 162 ± 5 $\mu\text{mol eq. quercetina/g}$ extrato, enquanto que para flavanonas os valores encontraram-se abaixo do limite de detecção do método (tabela 1).

4.4 Determinação de compostos fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais foi de 1157 ± 69 $\mu\text{mol eq. ácido cafeico/g}$ de extrato não hidrolisado e 1120 ± 64 $\mu\text{mol eq. ácido cafeico/g}$ de extrato hidrolisado. Não foi encontrado ácido ascórbico no extrato, logo não foi necessária a realização da curva de correção.

4.5 Determinação quantitativa de ácido clorogênico, cafeína, ácido cafeico, quercetina e canferol no extrato não hidrolisado por CLAE

A análise por CLAE mostrou que o extrato não hidrolisado possui uma concentração de ácido clorogênico e de cafeína de 7,93% p/p e 1,48% p/p, respectivamente. As quantidades de ácido cafeico, quercetina e canferol estavam abaixo do limite de detecção (tabela 1).

4.5.1 Determinação de ácido clorogênico e cafeico no extrato hidrolisado de *Ilex paraguariensis*

A figura 11 apresenta os cromatogramas do extrato após tratamento com clorogenato esterase.

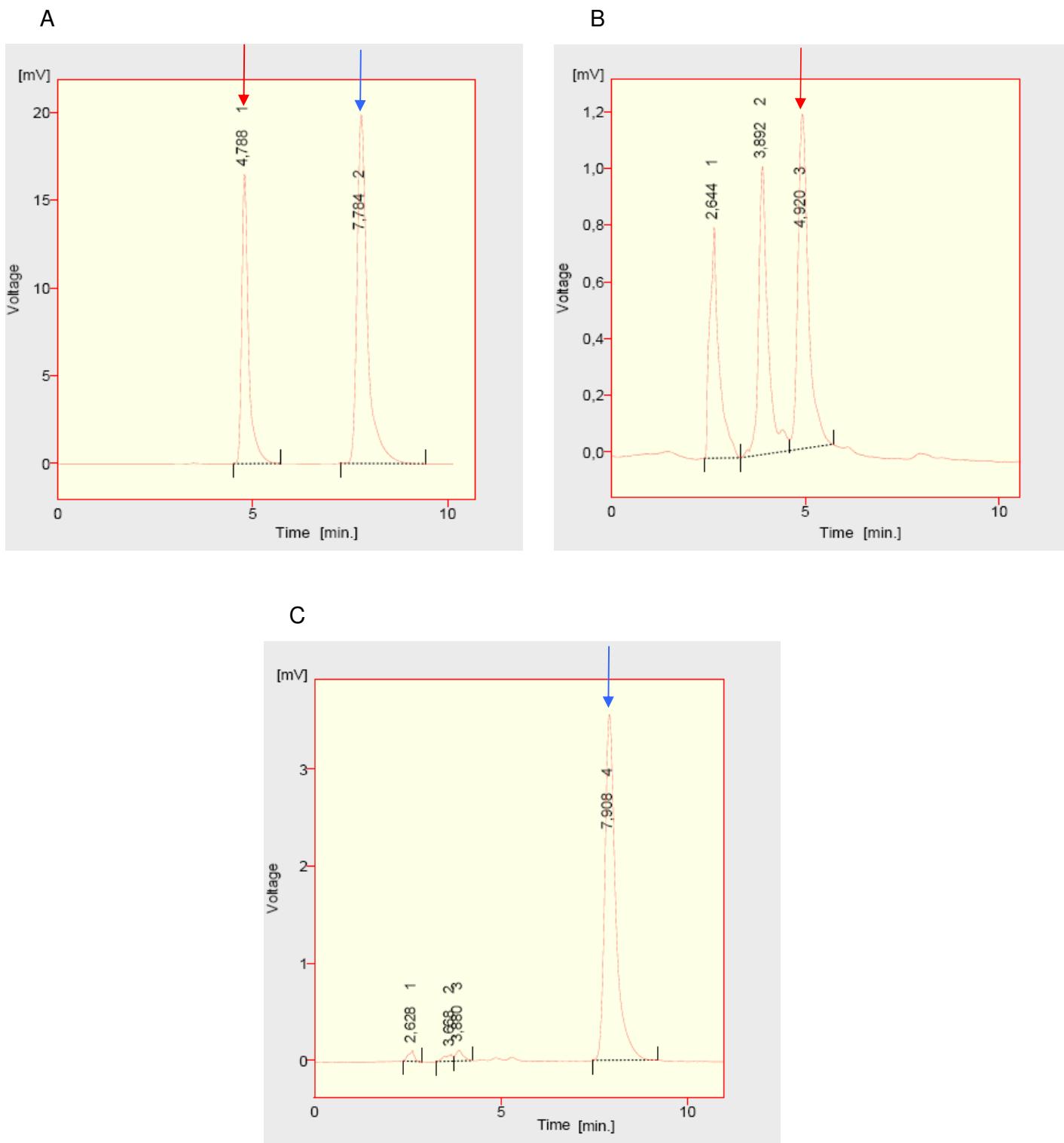


Figura 11. Perfis cromatográficos (CLAE) de ácido clorogênico (seta vermelha) e ácido cafeico (seta azul) (A), do extrato bruto - não hidrolisado - de *Ilex paraguariensis* (B) e do extrato de *Ilex paraguariensis* tratado com clorogenato esterase (C).

Conforme se observa na figura 11 (C) após o tratamento com clorogenato esterase não foi possível detectar ácido clorogênico no extrato indicando que o mesmo foi totalmente hidrolisado. Nota-se também que outros dois compostos não identificados que estavam presentes no extrato não hidrolisado (B - tempo de retenção 2,644 e 3,892 minutos) tiveram sua concentração bastante reduzida. A concentração encontrada de ácido cafeico foi de 20,13%.

4.6 Determinações da atividade antioxidante do extrato não hidrolisado e hidrolisado

A tabela 2 mostra a atividade antioxidante do extrato hidrolisado e não hidrolisado de *Ilex paraguariensis*.

Tabela 2. Atividade antioxidante do extrato antes e após a hidrólise

	Extrato não hidrolisado	Extrato hidrolisado
ORAC ($\mu\text{mol eq. Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$)	4221 \pm 319	4287 \pm 456
DPPH ($\mu\text{mol eq. Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$)	1492 \pm 83 *	2161 \pm 133*

* estatisticamente significativo ($p < 0,0001$).

Nota-se que não houve diferença significativa entre os valores de fenólicos totais e de atividade antioxidante pelo método de ORAC. No entanto ocorreu uma variação estatisticamente relevante entre os valores de DPPH (aumento de cerca de 45%).

4.7 Ensaios de recuperação de ácido clorogênico, ácido cafeico e cafeína em plasma, pele, fígado e cérebro e de ácido ascórbico e ácido úrico no plasma.

Os resultados referentes às técnicas de extração de cafeína, ácido cafeico e clorogênico nos homogeneizados de pele, fígado e cérebro e de cafeína, ácido cafeico, clorogênico, úrico e ascórbico em plasma estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de recuperação de ácido cafeico, ácido clorogênico e cafeína no plasma, pele, fígado e cérebro e de ácido ascórbico e úrico no plasma.

	Ácido cafeico	Ácido clorogênico	Cafeína	Ácido úrico	Ácido ascórbico
Plasma	70,9%	53,2%	99,6%	91,0%	78,4%
Pele	100,5%	33,9%	109,1%	N/A	N/A
Cérebro	79,4%	34,0%	122,4%	N/A	N/A
Fígado	54,6%	66,4%	124,0%	N/A	N/A

N/A: não avaliado

4.8 Biodisponibilidade de ácido cafeico e clorogênico em função do tempo de administração

A figura 12 mostra a concentração de ácido cafeico (A) e de ácido clorogênico (B) no plasma de animais tratados por via oral com dose única de 200mg/kg de peso corpóreo de ácido cafeico ou 393,33mg/kg de ácido clorogênico (1,11mmol/kg) em função do tempo.

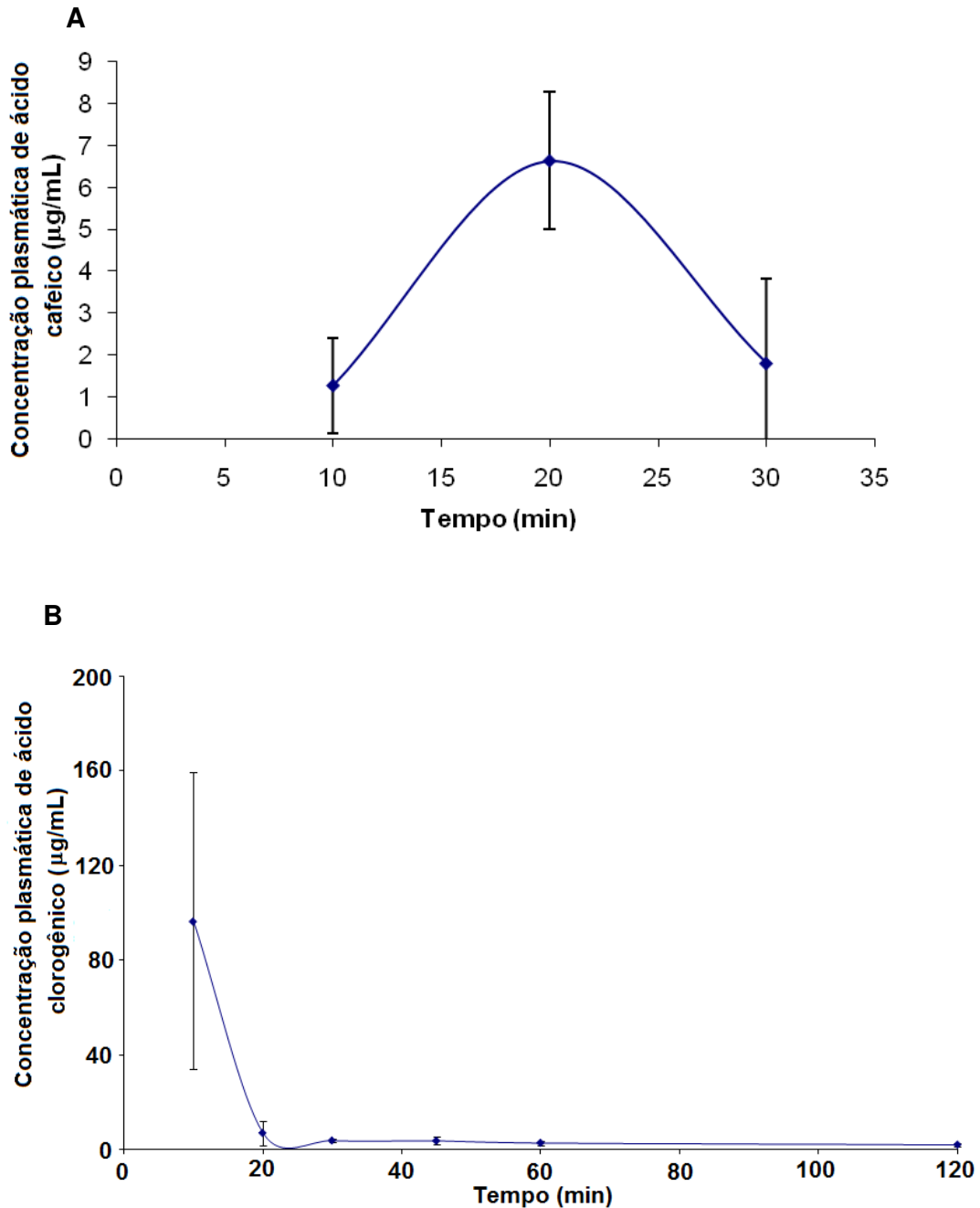


Figura 12. Concentração no plasma em função do tempo após a administração de dose oral única de 200mg/kg de ácido cafeico (**A**) e 393,33mg/kg de ácido clorogênico (**B**). Valores médios de três determinações.

A partir destes resultados (figura 12) foi definido o tempo de sacrifício dos animais para os experimentos seguintes em 20 minutos após a administração do extrato hidrolisado e 10 minutos para o extrato não hidrolisado.

4.9 Atividade antioxidante do plasma, pele, fígado e cérebro

As tabelas 4 e 5 mostram os valores encontrados pelo método de ORAC para atividade antioxidante do plasma e da pele dos animais submetidos à administração, respectivamente, de dose única e doses repetidas do extrato hidroetanólico hidrolisado e não hidrolisado de *Ilex paraguariensis*.

Tabela 4. Valores de atividade antioxidante do plasma avaliados por ORAC dos animais tratados com dose única com o extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* (valores em $\mu\text{mol eq. Trolox}^{\text{®}}$ /L de plasma).

	U-NH	Controle-NH	U-H	Controle-H
Hidrofílico	1730 \pm 211	1952 \pm 378	2019 \pm 336*	1176 \pm 149
Lipofílico	269 \pm 112	194 \pm 23	132 \pm 27	130 \pm 32

Resultados expressos como média de 10 animais tratados ou 5 controles \pm desvio padrão. U: dose única; NH: extrato não hidrolisado; H: extrato hidrolisado. * $p < 0,0002$ em relação ao controle do mesmo regime de administração.

Tabela 5. Valores de atividade antioxidante do plasma, pele, cérebro e fígado avaliados por ORAC dos animais tratados em regime de doses repetidas do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* (valores em $\mu\text{mol eq. Trolox}^{\text{®}}$ /L de plasma ou $\mu\text{mol eq. Trolox}^{\text{®}}$ /g de proteína para os homogeneizados).

	R-NH	Controle-NH	R-H	Controle-H
Plasma hidrofílico	2312 \pm 474	1979 \pm 338	2361 \pm 268*	1467 \pm 379*
Plasma lipofílico	230 \pm 58	171 \pm 60	182 \pm 90	157 \pm 51
Pele hidrofílico	130 \pm 22	147 \pm 17	178 \pm 32	180 \pm 53
Pele lipofílico	40 \pm 6	40 \pm 9	71 \pm 9	85 \pm 16
Cérebro hidrofílico	97 \pm 14	80 \pm 23	62 \pm 9	69 \pm 20
Cérebro lipofílico	25 \pm 6	26 \pm 8	39 \pm 5	39 \pm 4
Fígado hidrofílico	44 \pm 14	50 \pm 7	48 \pm 13	51 \pm 13
Fígado lipofílico	21 \pm 3	20 \pm 6	11 \pm 2	13 \pm 3

Resultados expressos como média de 10 animais tratados ou 5 controles \pm desvio padrão. R: doses repetidas; NH: extrato não hidrolisado; H: extrato hidrolisado.

* $p < 0,005$

Nota-se que houve um aumento no valor da atividade antioxidante em relação ao controle na fração hidrofílica do plasma dos animais tratados com o extrato hidrolisado de *Ilex paraguariensis*, tanto no ensaio de dose única como no de doses repetidas.

4.10 Determinação de TBARS em pele, fígado e cérebro

Os valores da eficiência de recuperação de TBARS são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Eficiência da recuperação de TBARS em cérebro, fígado e pele.

Tecido	% de recuperação
Pele	90,3%
Fígado	70,8%
Cérebro	74,5%

As tabelas 7 e 8 apresentam os valores de TBARS para os tecidos avaliados.

Tabela 7. Valores de TBARS para as amostras de pele, fígado e cérebro dos animais tratados por via oral com extrato hidrolisado em regime de doses repetidas.

Tecido	[] MDA (nmol/g proteína) R-H
Pele tratado	59 ± 24
Pele controle	57 ± 45
Cérebro tratado	38 ± 6
Cérebro controle	44 ± 10
Fígado tratado	15 ± 1
Fígado controle	14 ± 1

Resultados expressos como média de 10 animais tratados ou 5 controles ± desvio padrão. R: doses repetidas; H: extrato hidrolisado.

Tabela 8. Valores de TBARS para as amostras de pele, fígado e cérebro dos animais tratados por via oral com extrato não hidrolisado em regime de doses repetidas.

Tecido	[] MDA (nmol/g proteína) R-NH
Pele tratado	273 ± 202
Pele controle	293 ± 115
Cérebro tratado	324 ± 59
Cérebro controle	402 ± 96
Fígado tratado	28 ± 4
Fígado controle	23 ± 3

Resultados expressos como média de 10 animais tratados ou 5 controles ± desvio padrão. R: doses repetidas; NH: extrato não hidrolisado.

4.11 Determinação no plasma, pele, fígado e cérebro da concentração de ácido cafeico, ácido clorogênico e cafeína e no plasma de ácido úrico e ascórbico após a administração única (U) ou repetida (R) de extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* hidrolisado (H) e não hidrolisado (NH)

A tabela 9 resume os valores da concentração plasmática de ácido cafeico, clorogênico, ascórbico, úrico e cafeína dos animais tratados com o extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis*.

Um dos objetivos do projeto era o de avaliar a atividade antioxidante do plasma em animais tratados com os extratos. Parte da atividade antioxidante do plasma é devida a presença de ácido ascórbico e ácido úrico (ALDINI *et al.*, 2001). Como observamos que a administração do extrato aos animais aumentou a atividade antioxidante da fração hidrofílica do plasma (tabelas 4 e 5) e sabendo-se que os compostos antioxidantes do mate possuem características hidrofílicas determinamos a concentração plasmática do ácido ascórbico e do ácido úrico visando avaliar se a administração do extrato poderia influenciar a concentração destes compostos no plasma e conseqüentemente sua atividade antioxidante.

Tabela 9. Concentração de cafeína, ácido cafeico, clorogênico, ascórbico e úrico no plasma dos animais tratados com o extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* (valores em $\mu\text{mol/L}$).

Plasma	U-NH	U-H	R-NH	R-H
Ácido clorogênico	-	N/A	*	N/A
Ácido cafeico livre	-	13,99 \pm 10,27	*	26,25 \pm 14,26
Ácido cafeico total	-	97,08 \pm 18,76	5,61 \pm 7,60	100,52 \pm 35,41
Cafeína	22,04 \pm 5,15	17,92 \pm 4,43	25,93 \pm 6,69	17,40 \pm 5,05
Ácido ascórbico controle	58,99 \pm 14,99	58,71 \pm 1,99	40,31 \pm 7,95	41,87 \pm 9,08
Ácido ascórbico tratado	47,86 \pm 4,09	50,53 \pm 5,56	35,49 \pm 15,44	45,99 \pm 7,61
Ácido úrico controle	51,90 \pm 18,57	22,02 \pm 3,63	28,10 \pm 7,50	46,37 \pm 24,28
Ácido úrico tratado	46,96 \pm 9,11	23,69 \pm 13,81	41,07 \pm 17,32	32,74 \pm 8,63

Resultados expressos como média de 10 animais tratados ou 5 controles \pm desvio padrão. N/A: não avaliado; U: dose única; R: doses repetidas; NH: extrato não hidrolisado; H: extrato hidrolisado.

* abaixo do limite de quantificação

Nenhum dos compostos analisados foi detectado na pele ou no cérebro dos animais submetidos a ambos os regimes de tratamento.

A tabela 10 resume os valores da concentração de ácido cafeico, no fígado dos animais tratados com doses repetidas do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis*.

Tabela 10. Concentração de ácido cafeico no fígado dos animais tratados com doses repetidas do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* hidrolisado e não hidrolisado (valores em $\mu\text{g/g}$ de proteína).

	R-NH	R-H
Ácido cafeico livre	-	52,18 \pm 36,73
Ácido cafeico total	-	70,83 \pm 56,36

Resultados expressos como média de 10 animais tratados ou 5 controles \pm desvio padrão. R: doses repetidas; NH: extrato não hidrolisado; H: extrato hidrolisado.

O ácido cafeico foi apenas encontrado no fígado dos animais tratados com o extrato hidrolisado. Não foram detectados cafeína e ácido clorogênico neste tecido.

5. Discussão

Os ensaios para a quantificação da atividade antioxidante *in vitro* e doseamento total de classes de compostos no material de partida não fornecem resultados absolutos, mas tem utilidade como métodos de triagem e comparação entre moléculas, extratos, matérias primas e seleção para ensaios *in vivo*.

Os resultados apresentados acima demonstram que o extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* apresenta um alto conteúdo fenólico (cerca de 20,8%) em relação a outros extratos previamente descritos (DUDONNÉ *et al.*, 2009) com uma pequena contribuição dos flavonóides (cerca de 4,8%). A atividade antioxidante se mostrou alta comparada a outros extratos presentes na literatura (OU *et al.*, 2001) e ao padrão utilizado (Trolox[®]) que é um análogo hidrossolúvel do α -tocoferol e possui atividade de 4000 μ mol/g. No entanto nota-se uma diferença entre os valores de atividade antioxidante dependendo do método de análise (DPPH ou ORAC). Provavelmente isto ocorre porque o método de ORAC utiliza radical peroxila e meio reacional aquoso tamponado, enquanto que o DPPH utiliza radical de nitrogênio e meio reacional orgânico, permitindo que os antioxidantes presentes no extrato reajam melhor com o radical do método de ORAC. (HUANG *et al.*, 2005).

Outro momento em que isto pôde ser notado foi durante a avaliação da atividade antioxidante do extrato hidrolisado. A comparação estatística dos resultados indicou que não existe diferença significativa entre o extrato hidrolisado e não hidrolisado quanto ao valor de ORAC e de fenólicos totais. No entanto houve diferença significativa ($p < 0,0001$) com relação ao DPPH, sugerindo que o ácido cafeico (presente apenas no extrato hidrolisado) possui maior afinidade pelo radical de nitrogênio utilizado neste método do que o ácido clorogênico (presente apenas no extrato não hidrolisado). Este fenômeno já foi descrito previamente em trabalhos que compararam a atividade antioxidante destes compostos em diversos métodos, verificando-se que o ácido cafeico e o ácido clorogênico apresentam respostas parecidas em relação ao método de ORAC, mas em relação ao DPPH o primeiro possui

atividade quase 3 vezes superior (CAPITANI *et al.*, 2009 e TABART *et al.*, 2009).

Analisando os resultados da hidrólise do extrato verificou-se diferença nos parâmetros cinéticos da enzima clorogenato esterase e a descrita na literatura. Estes valores são bastante discordantes, pois Asther *et al.* (2005) encontraram $K_m = 10\mu\text{M}$ (contra $1597\mu\text{M}$ em nosso trabalho). Esta diferença pode ser explicada porque no artigo citado foi utilizada a enzima purificada e neste estudo empregamos a enzima comercial, que contém adjuvantes que podem exercer caráter inibitório, tornando-se necessária a utilização de maior quantidade de substrato para se alcançar a velocidade máxima.

Quando a hidrólise foi realizada com o extrato pode-se notar a existência de outros compostos derivados do ácido cafeico em quantidades bastante significantes, pois nesta hidrólise espera-se que 1 mol de ácido clorogênico gere 1 mol de ácido cafeico. No entanto, analisando-se uma concentração de extrato de $23,74\mu\text{g/mL}$ obtivemos $8,01\mu\text{M}$ de ácido clorogênico antes da hidrólise e $26,53\mu\text{M}$ de ácido cafeico. Esta observação é corroborada pelo cromatograma B (figura 11) que mostrou outras substâncias não identificadas no extrato (tempo de retenção de 2,644 e 3,892 minutos) que tiveram redução de seus picos após a hidrólise. Este fenômeno foi relatado previamente por Germanò *et al.* (2006) em extrato de *Trichilia emetica* que verificaram que a quantidade de ácido cafeico liberado depois da hidrólise era maior que a quantidade esperada (baseando-se na concentração de ácido clorogênico).

Quanto aos ensaios *in vivo* deve-se notar que a concentração máxima de ácido cafeico encontrada no plasma dos animais no ensaio de administração cinética foi de $6,64\mu\text{g/mL}$, bem menor do que aquela determinada por Yamada *et al.* (2006) que ao administrar a mesma dose de ácido cafeico a camundongos obteve $55\mu\text{g/mL}$ no plasma como concentração máxima. Uma das explicações possíveis para esta aparente discrepância diz respeito à espécie animal, uma vez que o autor utilizou camundongos e em nosso estudo utilizamos ratos. Outro argumento que reforça esta hipótese é o fato de que o pico de concentração plasmática do ácido cafeico em camundongos foi de 5 minutos, segundo Yamada *et al.* (2006) e em ratos perto

de 30 minutos (GERMANÒ *et al.*, 2006), sugerindo que a cinética de absorção/metabolização nestas duas espécies animais é diferente.

Germanò *et al.* (2006) administrou a ratos extrato de *Trichilia emetica* também rico em ácidos fenólicos, obtendo níveis plasmáticos próximos de 40ng/mL após administração de 6,6125 mg/kg de conteúdo de ácido cafeico. Supondo-se que a concentração plasmática deva seguir uma ordem de absorção independente da dose, podemos inferir que se a dose empregada pelo autor fosse de 200mg/kg de ácido cafeico a concentração plasmática estaria próximo de 1,2µg/mL, o que está coerente com os nossos resultados.

Pode-se notar também que a hidrólise do extrato aumentou a biodisponibilidade do ácido cafeico em ambos os regimes de administração, assim como a atividade antioxidante da fração hidrofílica do plasma (analisado por ORAC), o que é bastante coerente dado à característica hidrofílica dos compostos presentes no extrato de erva mate. Além disso, a concentração de outros compostos antioxidantes intrínsecos a esta fração (ácido úrico e ácido ascórbico) não se mostraram alterados, indicando que o aumento da atividade antioxidante se deu pela presença dos compostos absorvidos e não por indução de síntese/inibição da degradação destas substâncias.

Farah *et al.*, (2008) administraram 400mg extrato de café verde contendo cerca de 170mg eq. ác. cafeico a humanos e encontraram uma concentração plasmática máxima de 1,1 µM ou 0,198 µg/mL de ácido cafeico. Levando-se em consideração o peso médio dos voluntários e extrapolando-se para as condições utilizadas em nosso experimento, se fosse usada a dose de 200mg/kg a concentração máxima seria de 14,94µg/mL, o que está dentro da ordem de grandeza encontrada no ensaio de administração do extrato hidrolisado, no entanto o tempo para se alcançar tal concentração foi de 3,6h, mostrando que existem grandes diferenças no perfil de absorção entre humanos e ratos.

Para o ensaio de doses repetidas do extrato hidrolisado detectou-se a presença de ácido cafeico no homogeneizado de fígado, ainda que a concentração não tenha sido suficiente para aumentar a atividade antioxidante.

A atividade antioxidante da pele, do cérebro e do fígado não se mostrou alterada tanto no ensaio de ORAC quanto no de TBARS, indicando

que os compostos presentes no extrato não se distribuem para estes tecidos de forma considerável a modificar este parâmetro.

A concentração plasmática da cafeína se manteve praticamente estável em ambos os regimes de tratamento, tanto com o extrato hidrolisado quanto com o não hidrolisado, indicando que a hidrólise não afeta a biodisponibilidade deste composto.

Outro fenômeno de destaque é que nenhum dos compostos medidos foi distribuído para a pele de forma quantificável, o que está em discordância com Yamada *et al.* (2006). Isto pode ter sido causado pela presença de outros compostos no extrato que podem interferir nas vias de absorção/distribuição, visto que aquele artigo utiliza ácido cafeico isolado. Outra explicação viável poderia ser o modelo animal utilizado, pois como foi dito anteriormente o Yamada utilizou camundongos e não ratos e diferenças nos perfis de metabolização puderam ser notados na determinação da biodisponibilidade do ácido cafeico (55µg/mL no artigo em questão contra 6,64µg/mL em nosso estudo).

6. Conclusão

A partir dos resultados acima apresentados podemos concluir que:

- O extrato hidroalcoólico de *Ilex paraguariensis* possui alta atividade antioxidante e conteúdo fenólico com uma baixa contribuição dos flavonóides.
- A hidrólise do extrato com a enzima clorogenato esterase se deu de forma quantitativa para o ácido clorogênico, promovendo um aumento na concentração de ácido cafeico. Este aumento deveu-se não apenas à hidrólise do ácido clorogênico, mas também à hidrólise de outros cafeico derivados presentes no extrato.
- O extrato hidrolisado administrado aos animais aumentou a concentração plasmática do ácido cafeico, em relação ao extrato não hidrolisado assim como a atividade antioxidante da fração hidrofílica do plasma tanto no regime de dose única como no de doses repetidas.
- Nas condições deste experimento a hidrólise aumentou a distribuição do ácido cafeico no fígado, mas não influenciou a distribuição no cérebro e na pele.
- A concentração e distribuição da cafeína não foram influenciadas pelo tipo de extrato administrado ou pelo regime de dose empregado.

Em suma o extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* se mostrou uma importante fonte de compostos fenólicos com atividade antioxidante e sua absorção/distribuição pode ser melhorada pela hidrólise dos compostos esterificados.

7. Referências Bibliográficas

AFAQ, F., ADHAMI, V.M., MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and Photocarcinogenesis. **Mutation Research**, v.571, p.153–173, 2005.

AINSWORTH, E.A., GILLESPIE, K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. **Nat. Protoc.**, v.2, n.4, 875-877, 2007.

ALDINI, G., YEUM, K.J., RUSSELL, R.M., KRINSKY, N.I. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. **Free Radic. Biol. Med.**, v.31, n.9, p.1043-1050, 2001.

ANVISA, Guia Brasileiro para a Validação de Métodos Analíticos. Resolução RE nº 899, 05/29/2003.

ARÇARI, D.P., BARTCHEWSKY, W., SANTOS, T.W., OLIVEIRA, K.A., FUNCK, A., PEDRAZZOLI, J., SOUZA, M.F.F., SAAD, M.J., BASTOS, D.H.M., GAMBERO, A., CARVALHO, P.O., RIBEIRO, M.L. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, v.17, p.2127-2133, 2009.

ASTHER, M., ALVARADO, M.I.E., HAON, M., NAVARRO, D., ASTHER, M., LESAGE-MEESSEN, L., RECORD, E., Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* catalyzing the hydrolysis of chlorogenic acid. **J. Biotechnol.**, v. 115, n.1, p.47-56, 2005.

BIXBY, M., SPIELER, L., MENINI, T., GUGLIUCCI A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**, v.77, p.345-358, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. u. Technol.**, v.28, p.25-30, 1995.

CAPITANI, C.D., CARVALHO, A.C.L., RIVELLI, D.P., BARROS, S.B.M., CASTRO, I.A. Evaluation of natural and synthetic compounds according to their antioxidant activity using a multivariate approach. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** v.111, p.1090-1099, 2009.

COELHO, G.C., GNOATTO, S.B., BASSANI, V.L., SCHENKEL, E.P. Quantification of saponins in extractive solution of mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) **J. Med. Food**, v.13, n.2, p.1-5, 2010.

DUDONNÉ, S., VITRAC, X., COUTIÈRE, P., WOILLET, M., MÉRILLON, J.-M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, p.1768-1774, 2009.

DUGO, P., CACCIOLA, F., DONATO, P., JACQUES, R.A., CARAMÃO, E.B., MONDELLO, L. High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 7213-7221, 2009.

FARAH, A., MONTEIRO, M., DONANGELO, C.M., LAFAY, S. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. **J. Nutr.**, v.138, n.12, p.2309-2315, 2008.

FILIP, R., LÓPEZ, P., GIBERTI, G., COUSSIO, J., FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p.774-778, 2001.

GERMANÒ, M.P., D'ANGELO, V., BIASINI, T., SANOGO, R., DE PASQUALE, R., CATANIA, S. Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. **J. Ethnopharmacol.**, v.105, p.368-373, 2006.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex Paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.224, p.338-344, 1996.

GUGLIUCCI, A., BASTOS, D.H.M., SCHULZE, J., SOUZA, M.F.F. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v.80, p.339-344, 2009.

GUGLIUCCI, A., STAHL, A.J.C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v.35, p.47-56, 1995.

HELD, P. Performing oxygen radical absorbance capacity assays with Synergy™HT. Disponível em http://www.biotek.com/resources/docs/ORAC_Assay_Application_Note.pdf, 17/08/2005, acessado em 02/06/2008.

HUANG, D., OU, B., PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.1841-1856, 2005.

HWANG, H., CHEN, T., NINES, R.G., SHIN, H.C., STONER, G.D. Photochemoprevention of UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by brown algae polyphenols. **Int. J. Cancer**, v.119, n.12, p.2742-2749, 2006.

JIN, U.H., LEE, J.Y., KANG, S.K., KIM, J.K., PARK, W.H., KIM, J.G., MOON, S.K., KIM, C.H. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor:

isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. **Life Sci.**, .77, n.22, p.2760-2769, 2005.

KIDD, P.M. Bioavailability and Activity of Phytosome Complexes from Botanical Polyphenols: The Silymarin, Curcumin, Green Tea, and Grape Seed Extracts. **Altern. Med. Rev.** v.14, n.3, p.226-246, 2009.

KOSALEC, I., PEPELJNJAK, S., BAKMAZ, M., VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. **Acta Pharm.**, v.55, p.423-430, 2005.

a LAFAY, S., GIL-IZQUIERDO, A., MANACH, C., MORAND, C., BESSON, C., SCALBERT, A. Chlorogenic Acid Is Absorbed in Its Intact Form in the Stomach of Rats. **J. Nutr.**, v.136, p.1192-1197, 2006.

b LAFAY, S., MORAND, C., MANACH, C., BESSON, C., SCALBERT, A., Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. **Br. J. Nutr.**, v.96, p.39-46, 2006.

LANZETTI, M., BEZERRA, F.S., ROMANA-SOUZA, B., BRANDO-LIMA, A.L., KOATZ, V.L.G., PORTO, L.C., VALENCA, S.S. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v.24, p.375-381, 2008.

LEONARD, S.S., HOGANS, V.J., COPPES-PETRICORENA, Z., PEER, C.J., VINING, T.A., FLEMING, D.W., HARRIS, G.K. Analysis of Free-Radical Scavenging of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) using Electron Spin Resonance and Radical-Induced DNA Damage. **J. Food Sci.**, v.75, n.1, p.14-20, 2010.

LORIA, D., BARRIOS, E., ZANETTI, R. Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. **Pan Am. J. Public Health**, v.25, n.6, p.530-539, 2009.

LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, A.L., FARR, A.L., RANDALL, R.J., Protein measurement with the Folin-Ciocalteu reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.

a MARTINS, F., SUZAN, A.J., CERUTTI, S.M., ARÇARI, D.P., RIBEIRO, M.L., BASTOS, D.H.M., CARVALHO, P.O. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. **Br. J. Nutr.**, v.101, n.4, p.527-532, 2009.

b MARTINS, F., NOSO, T.M., PORTO, V.B., CURIEL, A., GAMBERO, A., BASTOS, D.H.M., RIBEIRO, M.L., CARVALHO, P.O. Maté tea inhibits *in vitro* pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, v.18, p.42-47, 2009.

MATTILA, P., KUMPULAINEN, J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by CLAE with diode-array detection. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.3660-3667, 2002.

MATSUMOTO, R.L., BASTOS, D.H., MENDONÇA, S., NUNES, V.S., BARTCHEWSKY, W., RIBEIRO, M.L., CARVALHO, P.O. Effects of Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Ingestion on mRNA Expression of Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation, and Total Antioxidant Status in Healthy Young Women. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p.1775-1780, 2009.

MEINHART, A.D., BIZZOTTO, C.S., BALLUS, C.A., RYBKA, A.C.P., SOBRINHO, M.R., CERRO-QUITANA, R.S., TEIXEIRA-FILHO, J., GODOY, H.T. Methyxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages. **J. Agric. Food Chem.** v. 58, p. 2188-2193, 2010.

MIRANDA, D.D.C., ARÇARI, D.P., PEDRAZZOLI Jr, J., CARVAHO, P.O., CERUTTI, S.M., BASTOS, D.H.M., RIBEIRO, M.L., Protective effects of

mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, v.23, n.4, p.261-265, 2008.

MORAIS, E.C., STEFANUTO, A., KLEIN, G.A., BOAVENTURA, B.C.B., ANDRADE, F., WAZLAWIK, E., DI PIETRO, P.F., MARASCHIN, M., SILVA, E.L. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*), improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals of statin therapy. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, p.8316-8324, 2009.

MOSIMANN, A.L.P., WILHELM-FILHO, D., SILVA, E.L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors**, v.26, p.59-70, 2006.

NAGY, M., GRANCAI, D., Colorimetric determination of flavanones in propolis. **Pharmazie**, v.51, p.100–101, 1996.

NARDINI, M., CIRILLO, E., NATELLA, F., SCACCINI, C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.5735-5741, 2002.

OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.4619-4626, 2001.

PANG, J., CHOI, Y., PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.476, n.2, p.178-185, 2008.

POPOVA, M., BANKOVA, V., BUTOVSKA, D., PETKOV, V., NIKOLOVA-DAMYANOVA, B., SABATINI, A.G., MARCAZZAN, G.L.,

BOGDANOV, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochem. Anal.**, v.15, p.235-240, 2004.

PREDIGER, R.D.S., FERNANDES, M.S., RIAL, D., WOPEREIS, S., PEREIRA, V.S., BOSSE, T.S., SILVA, C.B., CARRADORE, R.S., MACHADO, M.S., CECHINEL-FILHO, V., COSTA-CAMPOS, L. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **J. Ethnopharmacol.**, v.120, p.465-473, 2008.

PRIOR, R.L., HOANG, H., GU, L., WU, X., BACCHIOCCA, M., HOWARD, L., HAMPSCH-WOODILL, M., HUANG, D., OU, B., JACOB, R., Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.3273-3279, 2003.

PRIOR, R.L., GU, L., WU, X., JACOB, R.A., SOTOUDEH, G., KADER, A.A., COOK, R.A. Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.26, n.2, p.170-181, 2007.

PUANGPRAPHANT, S., MEJIA, E.G. Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NFκB pathways. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, p.8873-8883, 2009.

RENOUF, M., GUY, P., MARMET, C., LONGET, K., FRAERING, A.L., MUOLIN, J., BARRON, D., DIONISI, F., CAVIN, C., STEILING, H., WILLIAMSON, G. Plasma appearance and correlation between coffee and green tea metabolites in human subjects. **Br. J. Nutr.** no prelo, 2010.

RIVELLI, D.P., SILVA, V.V., ROPKE, C.D., MIRANDA, D.V., ALMEIDA, R.L., SAWADA, T.C.H., BARROS, S.B.M. Simultaneous determination of

chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by CLAE and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH· reduction. **RBCF**, v.43, n.2, p.215-222, 2007.

ROMMEL, A., WROLSTAD, R. Influence of acid and base hydrolysis on the phenolic composition of red raspberry juice. **J. Agric. Food Chem.**, v.41, p.1237–1241, 1993.

ROPKE, C.D. **Avaliação da atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata* na pele.** São Paulo, 1998. 83p. (Dissertação de Mestrado-Faculdade de Ciências farmacêuticas – Universidade de São Paulo).

ROPKE, C.D., SILVA, V.V., KERA, C.Z., MIRANDA, D.V., ALMEIDA, R.L., SAWADA, T.C., BARROS, S.B.M. *In vitro* and *in vivo* inhibition of skin matrix metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* root extract. **Photochem. Photobiol.**, v.82, n.2, p.439-442, 2006.

SCHINELLA, G.R., TROIANI, G., DÁVILA, V., BUSCHIAZZO, P.M. DE, TOURNIER, H.A. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.269, p.357-360, 2000.

SILVA, J.F., BIDINOTTO, L.T., FURTADO, K.S., SALVADORI, D.M.F., RIVELLI, D.P., BARROS, S.B.M., RODRIGUES, M.A.M., BARBISAN, L.F. Maté attenuates DNA damage and carcinogenesis induced by diethylnitrosamine and thermal injury in rat esophagus. **Food Chem. Toxicol.**, v.49, p.1521-1529, 2009.

SILVA, V.V., ROPKE, C.D., ALMEIDA, R.L., MIRANDA, D.V., KERA, C.Z., RIVELLI, D.P., SAWADA, T.C.H., BARROS, S.B.M. Chemical stability and SPF determination of *Pothomorphe umbellata* extract gel and photostability of 4-nerolidylcatechol. **Int. J. Pharm.**, v.303, p.125-131, 2005.

SILVA, V.V., ROPKE, C.D., MIRANDA, D.V., ALMEIDA, R.L., SAWADA, T.C.H., RIVELLI, D.P., BARROS, S.B.M. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* on UVB radiation-induced biomarkers involved in carcinogenesis of hairless mouse epidermis. **Cutan. Ocul. Toxicol.** v.28, n.2, p.54-60, 2009.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.**, v.299, p.152-178, 1999.

SINNHUBER, R.O., YU, T.C. 2-thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II The quantitative determination of malonaldehyde. **Food Technol.**, v.12, n.1, p.9-12, 1957.

SUGIMOTO, S., NAKAMURA, S., YAMAMOTO, S., YAMASHITA, C., ODA, Y., MATSUDA, H., YOSHIKAWA, M. Brazilian Natural Medicines. III. Structures of Triterpene Oligoglycosides and Lipase Inhibitors from Mate, Leaves of *Ilex paraguariensis*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.57, n.3. p.257-261, 2009.

TABART, J., KEVERS, C., PINCEMAIL, J., DEFRAIGNE, J.O., DOMMES, J., Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chem.** v.113, p.1226-1233, 2009.

TAKENAKA, M., NAGATA, T., YOSHIDA, M. Stability and bioavailability of antioxidants in Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.64, n.12, p.2689-2691, 2000.

ULRICH-MERZENICH, G., ZEITLER, H., VETTER, H., KRAFT, K. Synergy research: vitamins and secondary plant components in the maintenance of the redox-homeostasis and in cell signaling. **Phytomedicine**, v.16, n.2, p.2-16, 2009.

WNUK, M., LEWINSKA, A., OKLEJEWICZ, B., BUGNO, M., SLOTA, E., BARTOSZ, G. Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes *in vitro*. **Mutat. Res.**, v. 679, p. 18-23, 2009.

XU, G.-H., KIM, Y.-H., CHOO, S.-J., RYOO, I.-J., YOO, J.-K., AHN, J.-S., YOO, I.-D. Chemical constituents from the leaves of *Ilex paraguariensis* inhibit human neutrophil elastase. **Arch. Pharm. Res.**, v.32, n.9, p.1215-1220, 2009.

XU, G.-H., KIM, Y.-H., CHOO, S.-J., RYOO, I.-J., YOO, J.-K., AHN, J.-S., YOO, I.-D. Two Acetylated Megastigmane Glycosides from the Leaves of *Ilex paraguariensis*. **Arch. Pharm. Res.**, v.33, n.3, p.369-373, 2010.

YAMADA, Y., YASUI, H., SAKURAI, H. Suppressive Effect of Caffeic Acid and its Derivatives on the Generation of UVA-induced Reactive Oxygen Species in the Skin of Hairless Mice and Pharmacokinetic Analysis on Organ Distribution of Caffeic Acid in ddY Mice. **Photochem. Photobiol.**, v.82, n.6, p.1668-1676, 2006.

YEUM, K.-J., ALDINI, G., JOHNSON E.J., RUSSELL, M.R., KRINSKY, N.I. Effect of Feeding and Then Depleting a High Fruit and Vegetable Diet on Oxidizability in Human Serum. In: PACKER, L., OBERMULLER-JEVIC, U., KRAEMER, K., SIES, H. **Carotenoids & Retinoids; Molecular Aspects and Health Issues**. Urbana, IL, USA: AOCS Press, 2005. cap.13. n.p.

ZU, Y., LI, C., FU, Y., ZHAO, C. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-CLAE with DAD. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.41, p.714–719, 2006.

8. Anexo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 89/2006

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “Biodisponibilidade, distribuição na pele e atividade de compostos antioxidantes do extrato hidroalcoólico de ‘Ilex paraguariensis’ hidrolisado e não hidrolisado” (Protocolo CEEA nº131), sob a responsabilidade da Profa. **Silvia Berlanga de Moraes Barros**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 11/12/2006.*

São Paulo, 11 de dezembro de 2006.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA