



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

Ingrid Vicente Farias

Desenvolvimento de extratos padronizados de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. com potencial atividade de captação de radicais livres e ação anti-inflamatória

Florianópolis

2022

Ingrid Vicente Farias

Desenvolvimento de extratos padronizados de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. com potencial atividade de captação de radicais livres e ação anti-inflamatória

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Título de Doutora em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto

Coorientadora: Prof. Dr^a Angela Machado de Campos.

Florianópolis

2022

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

Vicente Farias, Ingrid

Desenvolvimento de extratos padronizados de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. com potencial atividade de captação de radicais livres e ação anti-inflamatória / Ingrid Vicente Farias ; orientador, Flavio Henrique Reginatto, coorientadora, Ângela Machado Campos, 2022.

82 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Ilex paraguariensis* . 3. Fenólicos totais. 4. Captação de radicais livres . 5. Atividade Anti inflamatória . I. Reginatto, Flavio Henrique. II. Machado Campos, Ângela . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Ingrid Vicente Farias

Título: Desenvolvimento de extratos padronizados de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. com potencial atividade de captação de radicais livres e ação anti-inflamatória

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Felipe Dal Pizzol, Dr.

Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC)

Prof. Alexandre Ferraz Dr.

Universidade IFSC-PI

Prof.(a) Thiago Caon, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Farmácia pelo Programa de Pós Graduação em Farmácia

Prof. Dr. (a) Thaís Cristiane Marques Sincero

Coordenador(a) do Programa

Prof. Dr. Flavio Henrique Reginatto

Orientador

Florianópolis, 02 de junho de 2022

**Dedico este trabalho *in memoriam* a minha
vozinha Diva Fernandes Vicente.**

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, por cada obstáculo e dificuldade dentro desses anos de doutorado e até a forma como entrei no doutorado, se não fosse ele abrindo as portas ou janelas, não teria ido tão longe.

Ao meu orientador Prof^o Dr^o Flavio Henrique Reginatto, por me aceitar e acreditar no meu potencial mesmo quando eu duvidei de tudo.

A minha coorientadora Prof^a Dr^a Angela Campos, pelos ensinamentos e direcionamentos ao longo desses anos.

Em memória a minha vizinha Diva, queria muito você aqui, mas infelizmente não foi possível, espero que você tenha encontrado o que sempre esperou encontrar quando chegasse esse momento e que você tenha orgulho de mim vó, foi uma honra poder viver esses últimos anos com você.

Aos meus pais Romu Romualdo Farias e Leticia Fernandes Vicente Farias por sempre acreditarem em mim e me incentivar a lutar pelos meus sonhos e me apoiar em todos os momentos. Ao meu irmão Aldo Vicente Farias, você sempre será minha estrela guia.

As minhas primas Jessica Vicente e Franciele Vicente Rosa por todo o companheirismo e cuidado nesses anos todos que sempre estivemos juntos, amo vocês.

A minha madrinha Maisa e ao meu tio Aquidabã por estarem presentes em minha vida. Aos meus primos Jucelio Jr e Dirceu que foram o meu farol para recobrar a consciência quando estava internada por COVID.

A minha analista Luana, porque sem análise eu não conseguiria racionalizar e virar a página necessária e com isso obter meu título de doutora.

Ao COVID, pois por incrível que parece, ele me tirou tudo: os rumos dessa tese, uma das pessoas mais importantes da minha vida e me fez passar o pior momento da minha vida quando fui acometida, mas me permitiu um aprendizado muito importante: aproveitar a vida porque ela é curta.

Aos meus amigos do doutorado que me deixaram a herança de um laboratório inteiro só para mim: Vitor Chaves, Larissa Constantino e Caroline Ortmann, mas que também foram uma fonte infinita de aprendizado e companheirismo.

Aos meus amigos do doutorado que espero levar para a vida inteira: Amanda, Larissa Faqueti, Larissa F., Luiz, Layzon, Guilherme, Geovana e Mariana, por todos os cafés, chás, bolos e cervejas, que faziam com que desabafássemos sobre nossos medos e inseguranças, mas que no final, ajudavam de alguma forma a levantar, sacudir a poeira e seguir em frente no próximo experimento.

Aos amigos que carrego no peito Michelle, Bruna, Simone, Amanda e Manuela por toda a amizade e por sempre estarem prontas para comemorar ou me ouvir.

A todos os professores, técnicos e secretários do Programa de Pós-graduação em Farmácia e do Departamento de Ciências Farmacêuticas, os quais me ajudaram de alguma forma ao longo desses anos de doutorado.

Ao PGFAR/UFSC e a CAPES pelo suporte e pela bolsa.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

As folhas de *Ilex paraguariensis* (erva-mate) vêm sendo utilizadas há séculos pela população sob a forma de chimarrão, impulsionando pesquisas sobre seu potencial biológico e seus constituintes químicos. Nesse sentido, o objetivo dessa Tese foi de desenvolver extratos padronizados de erva-mate com potencial atividades anti-inflamatória e de captação de radicais livres. Para isso foram preparados 8 extratos utilizando diferentes combinações de variáveis: método de extração [infusão (I) e turboextração (T)], líquido extrator [água (A) e hidroetanólico (E)] e método de secagem [liofilização (L) e nebulização por *spray drying* (S)]. Os extratos foram caracterizados quimicamente por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE ou LC) acoplado a detector DAD e massas (MS), e pelo teor de compostos fenólicos utilizando dois métodos colorimétricos, Folin-Ciocalteu (FC) e Fast-Blue (FBBB). A avaliação das atividades anti-inflamatória e de captação de radicais livres destes extratos padronizados foi conduzida com metodologias *in vitro*. A atividade de captação de radicais livres foi utilizada a metodologia por DPPH, enquanto que para a atividade anti-inflamatória foi avaliada pelo doseamento do NOx, TNF- α e IL-6 em células de macrófagos. Na análise por LC/MS os constituintes majoritários identificados foram: ácido cítrico, ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido neoclorogênico, ácido ferroilquínico, ácido quínico, cafeína, cafeoilglicose, kampfrol-raminosideo, quercetina 3-O-glicosideo, rutina e teobromina. E na análise por LC/DAD os constituintes majoritários quantificados foram: ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido neoclorogênico, cafeína, rutina e teobromina. O teor de fenólicos totais, variou entre 163 a 313 mg EAC.g⁻¹ de extrato seco para a técnica por Folin Ciocalteu e de 248 a 893 mg EAC.g⁻¹ de extrato seco por Fast Blue BB. Dentre os extratos avaliados, o extrato IAS (Infusão Aquosa seca por *spray drying*) apresentou a menor EC₅₀ na captação de radicais livres quando comparada aos demais extratos. Adicionalmente, os compostos majoritários presentes nos extratos foram avaliados quanto a atividade de captação de radicais livres, sendo o ácido neoclorogênico o composto que apresentou a menor EC₅₀ (18,72 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Na avaliação da atividade anti-inflamatória, a determinação de secreção do NOx indicou que os extratos IAS e IES apresentaram os maiores percentuais de inibição (50,10 e 53,57%). Os seis compostos avaliados na concentração presente no extrato da IAS (3 $\mu\text{g/ml}$) apresentaram atividade sobre a inibição da secreção do NOx, com destaque para a teobromina. Outro parâmetro avaliado na atividade anti-inflamatória foi a inibição do TNF- α pelos extratos secos por *spray drying* e pelos compostos isolados, sendo possível observar que o método de preparo influenciou na redução do TNF- α , visto que os extratos preparados por turboextração (TAS e TES) apresentaram os melhores resultados (inibição de 63,15 e 67,10%, respectivamente). Os compostos também foram avaliados na inibição do TNF- α e todos eles foram capazes de reduzir os níveis deste parâmetro. Por fim, a secreção do IL-6 foi avaliada nos extratos secos por *spray drying*, sendo os extratos IAS e TAS as amostras que apresentaram os maiores percentuais de inibição na dose de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (62,43 e 52,91%). De acordo com os resultados obtidos em nosso trabalho, o extrato preparado por infusão aquosa e seco por nebulização apresentou os melhores resultados de atividade anti-inflamatória, captação de radicais livres e teor fenólicos totais. Além disso, todos os principais marcadores químicos presentes nesse extrato mostraram uma forte atividade de inibição de NOx e TNF- α , sugerindo que as atividades biológicas aqui detectadas estejam relacionadas à composição química e ao teor de marcadores químicos presentes nos extratos de *I. paraguariensis*.

Palavras Chaves: *Ilex paraguariensis*, Fenólicos totais, LC-DAD, Captação de radicais livres, atividade anti-inflamatória

ABSTRACT

The leaves of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) have been used for centuries by the population in the form of mate, boosting research on its biological potential and its chemical constituents. In this sense, the objective of this thesis was to develop standardized extracts of yerba mate with potential anti-inflammatory and free radical scavenging activities. For this, 8 extracts were prepared using different combinations of variables: extraction method [infusion (I) and turbo-extraction (T)], extractor liquid [water (A) and hydroethanolic (E)] and drying method [lyophilization (L) and nebulization by Spray Drying (S)]. The extracts were chemically characterized by ultraperformance liquid chromatography (CLUE) coupled to a PDA detector, and by the content of phenolic compounds using two colorimetric methods, Folin-Ciocalteu (FC) and Fast-Blue (FBBB). The evaluation of the anti-inflammatory and free radical scavenging activities of these standardized extracts was conducted with in vitro methodologies. The anti-inflammatory activity was evaluated by measuring NO_x, TNF- α and IL-6 in macrophage cells, while the DPPH methodology was used to evaluate the free radical scavenging activity. In the LC/DAD analysis, the major constituents identified were: chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, neochlorogenic acid, caffeine, rutin and theobromine. The total phenolic content ranged from 163 to 313 mg EAC.g⁻¹ of dry extract for the technique by Folin Ciocalteu and from 248 to 893 mg EAC.g⁻¹ of dry extract by Fast Blue BB. Among the extracts evaluated, the IAS extract (Aqueous Infusion Spray drying) showed the lowest EC₅₀ in the capture of free radicals in relation to the other extracts whose EC₅₀ was 54.43 \pm 5.14 μ g mL⁻¹. Additionally, the major compounds present in the extracts were evaluated for free radical scavenging activity, with neochlorogenic acid being the compound that presented the lowest EC₅₀ (18.72 μ g mL⁻¹). In the evaluation of anti-inflammatory activity, the determination of NO_x secretion indicated that the IAS and IES extracts showed the highest percentages of inhibition (50.10 and 53.57%). The 6 compounds evaluated at the concentration present in the IAS extract at the lowest dose (3 μ g/ml) showed activity on the inhibition of NO_x secretion, with emphasis on theobromine. This indicates that the compounds are related to the results found for the extract. Another parameter evaluated in the anti-inflammatory activity was the TNF- α in the extracts dried by Spray drying and, in the compounds, and it was possible to observe that the preparation method influenced the reduction of TNF- α , and the extracts prepared by turboextraction (TAS and TES) had the best results (63.15 and 67.10%). And the compounds were also evaluated in the inhibition of TNF- α and all of them were able to reduce the levels of TNF- α . Finally, IL-6 secretion was evaluated in the dried extracts by Spray drying, and the solvent used and the drying method influenced the reduction of IL-6 secretion, so that IAS and TAS showed the highest percentages of inhibition at the highest dose of 30 μ g mL⁻¹ (62.43 and 52.91%). According to the results obtained in our work, the extract prepared by aqueous infusion and dried by Spray drying showed the best results in anti-inflammatory activity, free radical scavenging and total phenolic content. Furthermore, all the main chemical markers present in this extract showed strong NO_x and TNF- α activity, suggesting that the biological activities detected here are related to the chemical composition and content of chemical markers present in the *I. paraguariensis* extract.

Keywords: *Ilex paraguariensis*, Total phenolics, LC-DAD, Free radical scavenging, anti-inflammatory activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Compostos identificados em <i>Ilex paraguariensis</i>	21
Figura 2 – Mecanismos de avaliação da atividade antioxidante.....	34
Figura 3 – Reação do radical do DPPH em presença do antioxidante (AO).....	35
Figura 4 – Representação esquemática das etapas executadas nesta Tese.....	50
Figura 5 – Teor de fenólicos totais pela técnica de Folin Ciocalteu. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido por Teste de Tukey; $p < 0,05$).....	53
Figura 6 – Teor de fenólicos totais pela técnica de Fast Blue BB. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido por Teste de Tukey; $p < 0,05$).....	54
Figura 7 - Perfil Cromatográfico por LC-MS dos compostos presentes no extrato de <i>Ilex paraguariensis</i>	55
Figure 8- Perfil Cromatográfico por LC-DAD a 270 nm dos compostos presentes no extrato de <i>Ilex paraguariensis</i>	57
Figura 9 – Teor dos compostos majoritários dos extratos de <i>I. paraguariensis</i> por LC-DAD. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido do teste de Tukey; $p < 0,05$).....	58
Figure 10 – Captação de radicais livres por DPPH expresso em CE_{50} . Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido pelo test Tukey; $p < 0,05$).....	61
Figura 11 – Correlação de Pearson entre os resultados obtidos nas análises de Teor de Fenólicos Totais por Folin e a atividade antioxidante por DPPH ($r = - 0,8491$; $p = 0,007$).....	62
Figura 12 – Percentual de redução do radical DPPH dos compostos na que eles se encontram na CE_{50} de 54,43 $\mu\text{g/mL}$. ($n=3$).....	62
Figura 13 – Resultado do ensaio de captação de radicais livres dos compostos isolados por DPPH expresso em CE_{50} . Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido por Teste de Tukey $p < 0,05$).....	63
Figura 14 – Efeito citotóxico dos extratos de <i>Ilex</i> em células RAW 264.7.....	65
Figura 15 – Efeito dos extratos de <i>Ilex</i> nos níveis de LPS em células de macrófagos RAW 264.7 tratadas.....	66
Figura 16 – Efeito dos marcadores químicos nos níveis de LPS em células de macrófagos RAW 264.7 tratadas com LPS.....	68
Figura 17 - Efeitos dos extratos nos níveis de secreção de TNF- α em macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS. B: células não tratadas; LPS: células tratadas apenas com lipopolissacarídeo 1 $\mu\text{g/ml}$; DEX: células pré-tratadas com dexametasona (7 μM) antes da administração de LPS. Os resultados foram expressos como média \pm SEM; $n=3$. (A) Extratos. (B) Compostos.....	70
Figura 18 - Efeitos dos compostos químicos nos níveis de secreção de TNF- α em macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS. B: células não tratadas; LPS: células tratadas apenas com lipopolissacarídeo 1 $\mu\text{g/ml}$; DEX: células pré-tratadas com dexametasona (7 μM) antes da administração de LPS. Os resultados foram expressos como média \pm SEM; $n=3$. (A) Extratos. (B) Compostos.....	71
Figura 19 - Efeitos dos extratos nos níveis de secreção de IL-6 em macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS. B: células não tratadas; LPS: células tratadas apenas com lipopolissacarídeo 1 $\mu\text{g/ml}$; DEX: células pré-tratadas com dexametasona (7 μM) antes da administração de LPS. Os resultados foram expressos como média \pm SEM; $n=3$	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Teores dos principais marcadores químicos presentes em partes aéreas de <i>Ilex paraguariensis</i>	23
Quadro 2 – Atividade antioxidante de <i>Ilex paraguariensis</i>	26
Quadro 3 – Programação da mistura de solventes do método cromatográfico.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual do rendimento dos extratos obtidos Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido por Teste de Tukey; $p < 0,05$).....	52
Tabela 2 – Razão entre FBBB e FC dos extratos de <i>Ilex</i>	54
Tabela 3 – Caracterização dos constituintes majoritários de <i>Ilex paraguariensis</i> por LC-MS.	56
Tabela 4 – Parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação do método de <i>Ilex</i>	59
Tabela 5 – Comparação dos teores obtidos com a literatura	60
Tabela 6 – Efeito dos compostos detectados no extrato IAS de <i>Ilex</i> sobre a concentração de NOX em células de macrófagos RAW264.7.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-CQA: ácido clorogênico ou ácido 3-cafeoilquinico

4-CQA: ácido criptoclorogênico ou ácido 4-cafeoilquinico

5-CQA: ácido neoclorogênico ou ácido 5-cafeoilquinico

3,4-DCQA: Ácido 3,4- dicafeoilquínico

3,5-DCQA: Ácido 3,5-dicafeoilquínico

4,5-DCQA: Ácido 4,5- dicafeoilquínico

EC₅₀: Concentração necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH

FC: Folin Ciocalteu

FBBB: Fast Blue BB

IAS: Infusão Água *Spray Drying*

IES: Infusão Hidroetanol 20 % *Spray Drying*

IL-6: Interleucina 6

LC-DAD: Cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos

LC-MS: Cromatografia líquida acoplada ao detector de espectrômetro de massas

LPS: Lipopolissacarideo

NO: óxido nítrico

NOx: Metabólitos do óxido nítrico

TAS: Turboextração Água *Spray Drying*

TES: Turboextração Hidroetanol 20 % *Spray Drying*

TFT: Teor de Fenólicos Totais

TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVO GERAL.....	18
2.1 Objetivo Específico:	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	19
3.1.2 Atividade Antioxidante de <i>Ilex paraguariensis</i>	26
3.1.3 Atividade Anti-inflamatória da <i>Ilex paraguariensis</i>	29
3.3 Inflamação	36
3.4 Desenvolvimento tecnológico de extratos	39
4 MATERIAIS E METODOS.....	42
4.1 Material vegetal	42
4.2 Caracterização da Matéria Prima Vegetal e da Solução Extrativa	42
4.3 Preparação dos extratos	43
4.3.1 Infusão	43
4.3.2 Turboextração	44
4.4 Condições de secagem dos extratos.....	44
4.4.1 Nebulização por aspersão ou <i>Spray Dryer</i>	44
4.4.1 Liofilização	44
4.5 Caracterização química.....	45
4.5.1 Determinação do teor de fenólicos totais (TFT).....	45
4.5.2 Análise por LC-DAD.....	45
4.5.3 Análise por LC-MS	46
4.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	47
4.7.1 Cultura celular	47
4.7.2 Ensaio de viabilidade celular	47
4.7.3 Ensaio de inflamação in vitro e desenho experimental	48

4.7.4	Quantificação <i>in vitro</i> dos metabólitos do óxido nítrico	48
4.8	Análise Estatística	49
5	Resultados e Discussão.....	51
5.1	Caracterização extrativa segundo a Farmacopeia.....	51
5.1.1	Perda por dessecação (Farmacopeia Brasileira 2019)	51
5.1.2	Teor de Extrativos	51
5.1.3	Caracterização da Solução Extrativa	51
5.2	Obtenção dos extratos.....	51
5.3	Teor de fenólicos totais (TFT).....	52
5.4	Análise por LC-MS e LC-DAD	55
5.5	Ensaio de captação de radical livre – DPPH	60
5.6	Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos e compostos <i>in vitro</i>	64
6	CONCLUSÕES	74
	Referências	76

1 INTRODUÇÃO

As propriedades biológicas das espécies vegetais estão principalmente relacionadas aos seus metabolitos secundários, os quais são compostos formados como resposta a algum fator estressante ou de perigo (CRAGG; NEWMAN, 2013; LAHLOU, 2013). A partir do estudo dos metabólitos secundários e o potencial biológico desses, a literatura científica tem descrito a obtenção de medicamentos fitoterápicos, fármacos isolados e compostos precursores para processos de síntese e semissíntese orgânica. Uma revisão sobre os fármacos disponíveis no mercado no período de 1981-2019 indicou que mais de 65% destes fármacos são derivados ou inspirados em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020). Como exemplo de fármacos derivados de produtos naturais podem ser citados a morfina, o ácido acetilsalicílico, o captopril, a digoxina, a vincristina, entre outros (LAHLOU, 2013).

Uma planta medicinal, antes de virar um medicamento, precisa garantir a qualidade e autenticidade tanto da droga vegetal (planta *in natura*) quanto do derivado vegetal (extratos). A espécies vegetais podem sofrer influência de fatores ambientais na biossíntese dos metabolitos secundários como o local de cultivo, a idade da planta, clima, qualidade do solo, entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Já o derivado vegetal pode ser influenciado pelas técnicas de extração, secagem, o tipo do solvente utilizado no processo extrativo e as condições de armazenamento. A influência destes diferentes fatores sobre a composição química da planta pode gerar uma alteração na atividade biológica e também na sua toxicidade. Por isso, é indispensável a realização de estudos para padronizar o processo de cultivo, para a obtenção de derivados vegetais, visando a obtenção de um insumo farmacêutico com eficácia e segurança (NAFIU et al., 2017).

Nesse contexto, uma espécie que tem despertado o interesse dos pesquisadores é *Ilex paraguariensis*. Estudos farmacológicos *in vitro* e *in vivo* possibilitaram constatar que esta espécie apresenta propriedades antioxidante (BLUM-SILVA et al., 2015; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; CUELHO et al., 2018; DARTORA et al., 2011; DELADINO et al., 2013; MESQUITA et al., 2021; SANTOS et al., 2017; SCHINELLA et al., 2014), antidiabética (BRACESCO et al., 2011; HAO et al., 2013), estimulante do sistema nervoso central (SANTOS et al., 2015), antiobesidade (GAMBERO; RIBEIRO, 2015), inibidora da proliferação de células do câncer de colón (DE MEJÍA et al., 2010), anti-inflamatória (LANZETTI et

al., 2008; LUZ et al., 2016; MESQUITA et al., 2021; MUÑOZ-CULLA et al., 2016; PETRILLI et al., 2016; PIMENTEL et al., 2013; PUANGPRAPHANT et al., 2013; SCHINELLA et al., 2014), entre outras.

Estudos fitoquímicos identificaram diversos metabólitos secundários nas folhas da erva-mate como as metilxantinas cafeína e teobromina (FILIP et al., 1998; REGINATTO et al., 1999), saponinas, flavonoides (principalmente rutina, canferol, quercetina e glicosídeos da quercetina) e ácidos fenólicos (ácido clorogênico, ácido neoclorogênico, ácido criptoclorogênico, os ácidos 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico e o ácido tricafeoilquínico) (DE SOUZA et al., 2011; FILIP et al., 2001; HAO et al., 2013).

No que concerne ao tema central do presente trabalho, a atividade antioxidante está bem estabelecida para *I. paraguariensis* (BOAVENTURA et al., 2013; BRAVO et al., 2014; DE MEJÍA et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2015; DELADINO et al., 2008; FERNANDES et al., 2016; HECK; DE MEJIA, 2007; MATEOS et al., 2018a; SANTOS et al., 2022, 2017), enquanto a atividade anti-inflamatória apresenta os estudos de Lanzetti e colaboradores (2008), Pimentel e colaboradores (2013), Puangpraphant e colaboradores (2013), Schinella e colaboradores (2014), Luz e colaboradores (2016), Muñoz-Culla e colaboradores (2016), e Mesquita e colaboradores (2021), avaliaram o potencial anti-inflamatório de diferentes tipos de extratos, hidroalcoólicos e aquoso, de *I. paraguariensis* em modelos *in vivo*.

Com base nos dados apresentados, é possível constatar que *I. paraguariensis*, apresenta potencial antioxidante e anti-inflamatório (DELADINO et al., 2008; LUZ et al., 2016; SCHINELLA et al., 2014) embora a maioria do estudos realizados tenham sido conduzidos sem uma padronização extrativa mais rígida. Considerando que a falta dessa padronização pode impactar na reprodutibilidade dos resultados e na estabilidade físico-química e microbiológica dos extratos e de seus compostos isolados (BERINGHS et al., 2013; HENG et al., 2013; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010), o presente trabalho teve por objetivo desenvolver extratos padronizados de *I. paraguariensis* e avaliar as potenciais atividades de captação de radicais livres e anti-inflamatória de extratos e de seus constituintes químicos majoritários.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de captação de radicais livres e anti-inflamatória *in vitro* de extratos padronizados de *Ilex paraguariensis* e de seus constituintes químicos majoritários.

2.1 Objetivo Específico:

- Caracterizar a droga vegetal utilizada pelas técnicas de perda por dessecação, teor de extrativos e pH da solução extrativa;
- Avaliar a influência de diferentes condições de extração: (infusão e turboextração), líquido extrator (etanol e água) e método de secagem (liofilização e aspensão) sobre o teor de fenólicos totais, e nos teores dos marcadores químicos: ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido neoclorogênico, cafeína, rutina e teobromina;
- Determinar a composição química dos diferentes extratos por LC/DAD e LC-MS e o teor dos constituintes majoritários por LC/DAD;
- Investigar a atividade de captação de radicais livres dos diferentes extratos e dos compostos majoritários pela técnica de DPPH;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* dos extratos obtidos e compostos majoritários identificados nesse trabalho através do doseamento de NOX;
- Determinar a potencial atividade anti-inflamatória *in vitro* dos extratos obtidos e compostos majoritários identificados nesse trabalho através do doseamento das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α ;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* dos extratos secos por aspensão através do doseamento das citocinas inflamatórias como IL-6.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste primeiro item da revisão iremos abordar de uma forma geral a temática central da Tese (*Ilex paraguarensis*, captação de radicais livres e atividade anti-inflamatória) para, posteriormente, descrever de forma mais detalhada, ao longo dos tópicos, os estudos sobre as atividades investigadas em nosso trabalho.

3.1 *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.

Ilex paraguariensis (erva-mate) pertence à família Aquifoliaceae e está distribuída na região subtropical da América do Sul, sendo amplamente utilizada na Argentina, Paraguai e Uruguai, e no sul do Brasil (HAO et al., 2013). *I. paraguariensis* é uma árvore que pode atingir de 8 a 15 metros de altura, cujas folhas apresentam cerca de 8 cm de comprimento e 5 cm de largura. O período de floração é durante a primavera, enquanto o de frutificação é durante os meses de março a junho (BRACESCO et al., 2011).

Tradicionalmente, as folhas de *I. paraguariensis* são utilizadas no preparo do chimarrão, tereré e do chá mate. O cultivo desta se dá principalmente pela agricultura familiar ou pequeno agricultor (RAMALLO; LOVERA; SCHMALKO, 2010).

Após o processo de colheita e poda, as folhas passam a sofrer um processo de degradação induzido pelas enzimas peroxidases e polifenoloxidase, as quais catalisam as reações de oxidação dos compostos fenólicos, levando a alteração de cor nas folhas. Buscando evitar esse processo bioquímico, as folhas de *I. paraguariensis* passam pelo processo de *cancheamento*, etapa na qual as folhas são submetidas ao sapeco e a secagem, etapas que irão inibir a ação dessas enzimas. O sapeco promove o branqueamento térmico e a secagem finaliza a etapa de estabilização e inativação enzimática. As etapas do beneficiamento é que irão diferenciar o tipo de produto desenvolvido com a erva-mate (RAMALLO; LOVERA; SCHMALKO, 2010).

O chimarrão é uma das bebidas mais difundidas no sul da América do Sul, o que caracteriza a importância social da planta. Já a importância econômica deve-se à comercialização da erva-mate para o preparo de diferentes tipos de bebidas, além do amplo emprego na indústria de alimentos (BRACESCO et al., 2011; GAN et al., 2018; HAO et al., 2013).

Na medicina popular há o relato do uso de *I. paraguariensis* na proteção hepática, auxiliando na digestão, inflamação, redução do peso e do colesterol, fatos que tem impulsionado as pesquisas com esta espécie no sentido de elucidar a relação entre sua composição química e suas propriedades biológicas (GAMBERO; RIBEIRO, 2015; HAO et al., 2013) (GAN et al., 2018).

Os estudos fitoquímicos possibilitaram a identificação de diversos metabólitos secundários nas folhas da erva-mate, como as metilxantinas cafeína (**1**), teobromina (**2**) (FILIP et al., 1998; MESQUITA et al., 2021; REGINATTO et al., 1999), saponinas (COELHO et al., 2010; GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005; GOSMANN; SCHENKEL; SELIGMANN, 1989; KRAEMER et al., 1996; MARTINET et al., 2001), flavonoides (glicosídeos de quercetina - principalmente rutina (**3**) - glicosídeos de kaempferol (**4**) e os ácidos fenólicos (DE SOUZA et al., 2011; FILIP et al., 2001). Da classe dos ácidos fenólicos foram identificados o ácido clorogênico ou 3-cafeoilquinico (**5, 3-CQA**), ácido neoclorogênico ou 5-cafeoilquinico (**6, 5-CQA**), ácido criptoclorogênico ou 4-cafeoilquinico (**7, 4-CQA**), os ácidos 3,4-dicafeoilquinico (**8, 3,4-DCQA**), 4,5- dicafeoilquinico (**9, 4,5-DCQA**) e 3,5-dicafeoilquinico (**10, 3,5-DCQA**), o ácido tricafeoilquinico (**11**), derivados do ácido caféico (**12**), ácido coumaroilquinico (**13**), ácido feruloilquinico (**14**), ácido cafeoilferroilquinico (**15**), ácido cafeoilcoumaroilquinico (**16**) e ácido cafeoilsinapilquinico (**17**) (Figura 1) (BLUM-SILVA et al., 2016; DE SOUZA et al., 2011; HAO et al., 2013).

Na literatura, existem diversos estudos que indicam os teores de alguns dos principais compostos presentes na erva-mate (Quadro 1). Pode-se observar uma diferença no teor dos marcadores químicos da erva-mate, principalmente quando se compara erva brasileira com a argentina. A erva argentina apresenta concentrações menores dos ativos que a erva brasileira.

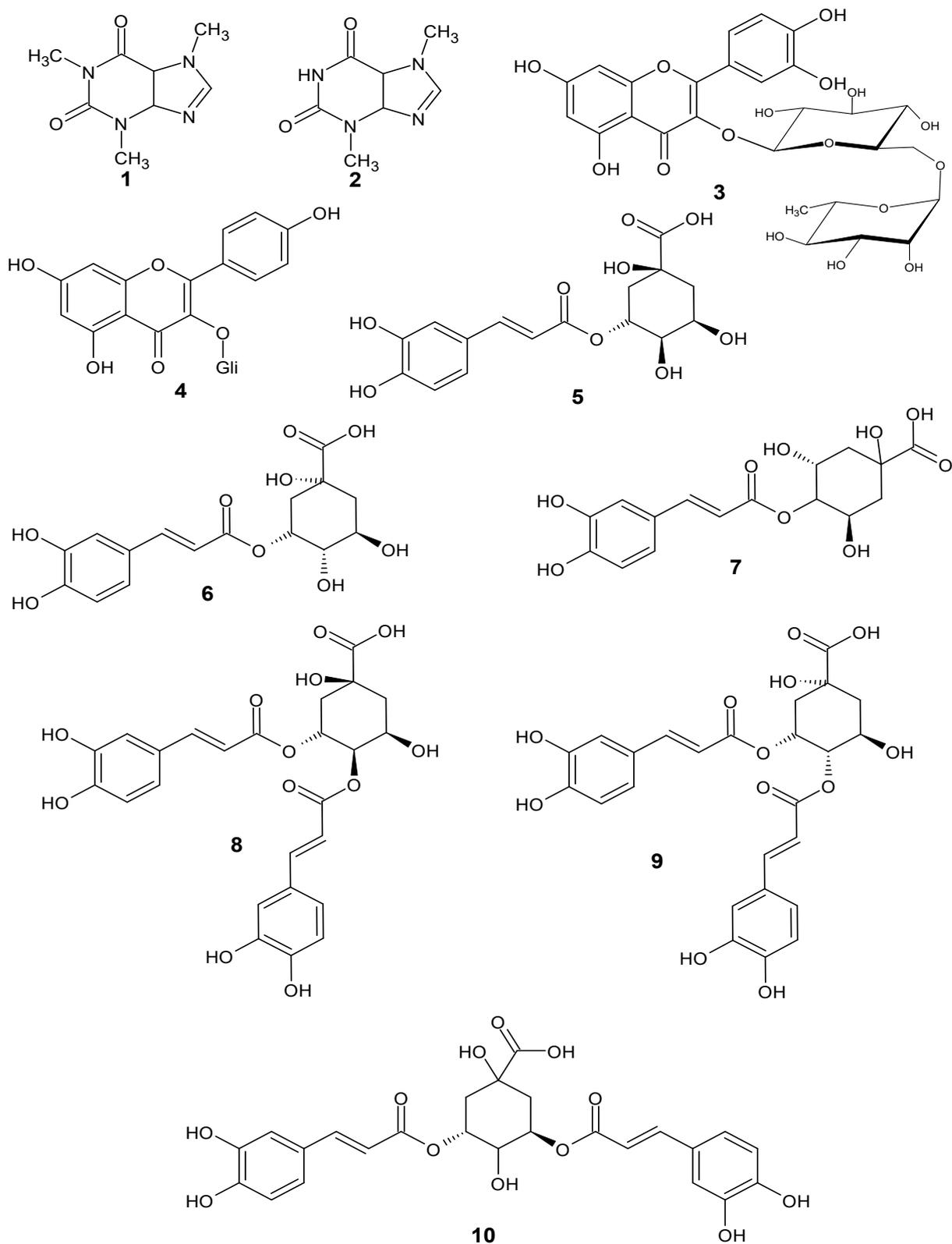
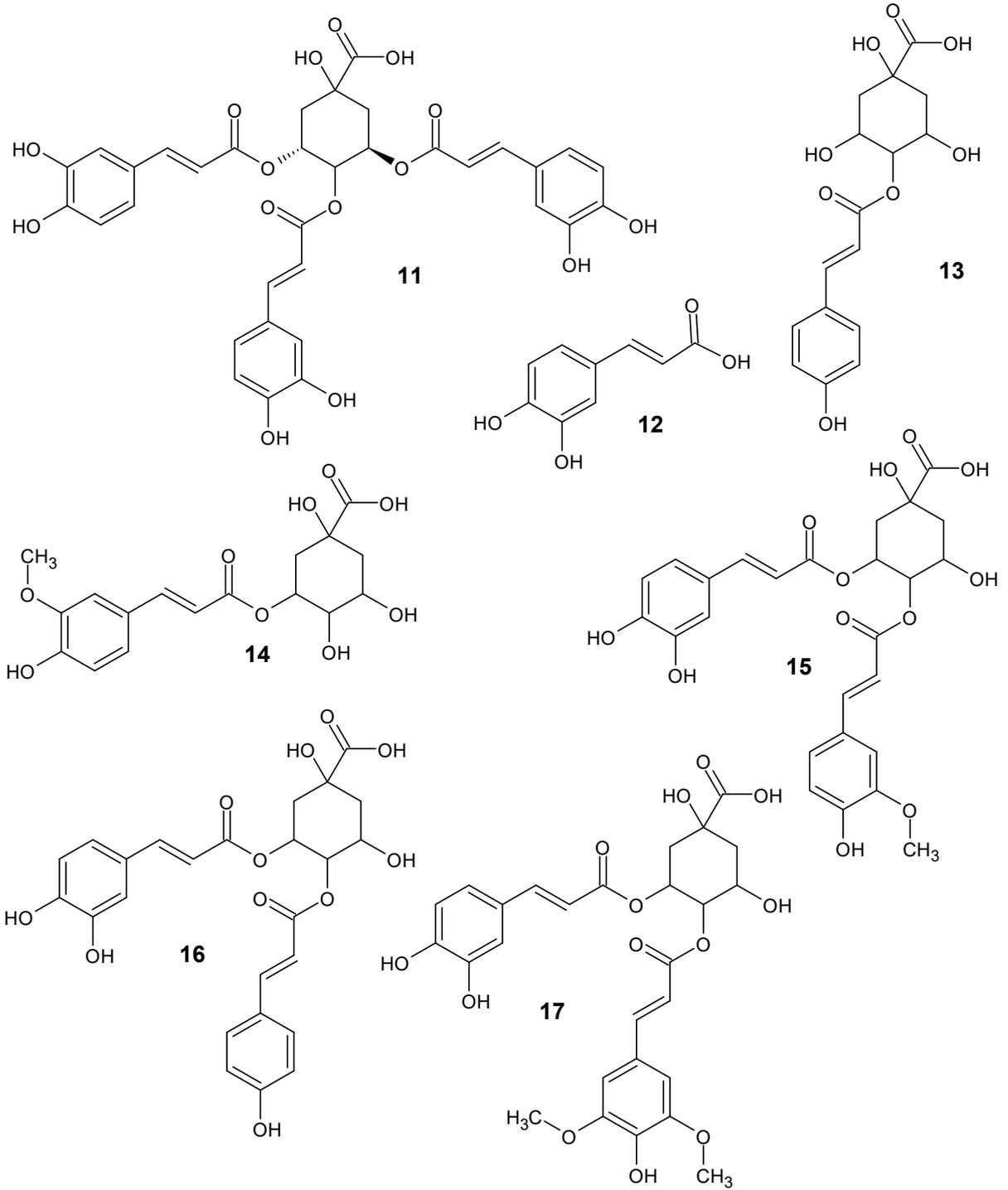
Figura 1 – Compostos identificados em *Ilex paraguariensis*.

Figura 1 (cont.) – Compostos identificados em *Ilex paraguariensis*

Quadro 1 – Teores dos principais marcadores químicos presentes em partes aéreas de *Ilex paraguariensis*

Origem da erva-mate	Tipo de extração	D:S	Teores						Unidade de medida	Referência
			THEO	5-CQA	4-CQA	3-CQA	CAF	RUT		
PR/ Brasil	Infusão Aquosa	50 mg/mL ¹	0,96	-	-	16,08	3,15	-	mg/g	De Morais et al. 2009 ³
		20 mg/mL ²	1,35	-	-	8,50	5,49	-		
Misiones/ Argentina	Infusão Aquosa	10 mg/mL	13,1	58,7	36,1	43,1	28,4	23,1	µg/mg	Mejía et al. 2010 ⁴
PR/ Brasil Cultivar	Infusão Aquosa	10 mg/mL	2,28	24,09	11,01	16,12	12,4	-	mg/g	Balzan et al. 2013 ⁵
	Maceração EtOH 70%	400 mg/mL	7,68	24,18	31,12	33,57	19,25	-		
RS/ Brasil	Turboextração EtOH 20%	200 mg/mL	-	-	-	67,5	29,3	12,4	mg/g	Luz et al. 2016
RS/ Brasil	Infusão aquosa	250 mg/ml ¹	0,19	-	-	-	1,07	-	g%	Rocha et al. 2020
RS/Brasil	Sonicação com Metanol	100 mg/mL	1,73	19,37	-	29,84	8,58	3,82	mg/g	Kaltbach et al., 2020
RS/Brasil	Chimarrão	1,21 g/mL	6,03	38,63	-	-	21,61	-	µg/ml	Mesquita et al., 2021 ⁵
	Tereré	850 mg/mL	4,88	42,63	-	-	13,06	-		
	Chá Mate	50 mg/mL	2,40	27,87	-	-	19,51	-		

Nota: ¹ Erva-mate verde comercial ² erva-mate torrada comercial ³Nomenclatura comum de ácido clorogênico ⁴especificado o tipo de isômero dos ácidos clorogênico ⁵Troca entre o 5-CQA e o 3-CQA, manteve o descrito no artigo, porém está fora das definições da IUPAC. D:S – proporção droga:solvente. T: Teobromina; 5-CQA: ácido neoclorogênico; 4-CQA: ácido criptoclorogênico; 3-CQA: ácido clorogênico; CAF: cafeína; RUT: rutina.

Segundo Bajko et al. (2016) o teor de derivados do ácido clorogênico quando somados podem chegar a 60% dos marcadores presentes na planta, com destaque para a quantidade do 5-CQA ou ácido neoclorogênico, que pode chegar a representar de 15-25% entre essa classe de metabólitos. No entanto, existe um trabalho na literatura que aborda a troca da nomenclatura dos derivados do ácido clorogênico, recomendada pela IUPAC em 1976. Antes dessa troca o 5-CQA era conhecido como ácido clorogênico e o 3-CQA era conhecido como ácido neoclorogênico. Dessa forma, devido a um novo entendimento da estereoquímica destas moléculas, atualmente o 5-CQA é o ácido neoclorogênico e o 3-CQA é o ácido clorogênico. Apesar dessa nova classificação, existem muitos trabalhos posteriores a essa alteração cujas nomenclaturas não foram alteradas, o que pode dificultar as comparações (BAJKO et al., 2016).

Outra informação importante é a abordada no estudo de Dartora e colaboradores (2011) que avaliaram diferentes extratos preparados por infusão com diferentes idades da planta (jovem: 1 mês x madura: 6 meses), exposição ao sol ou sombra, folhas *in natura* x processadas (branqueamento e sapeco) x oxidadas. Os

autores observaram que as folhas cultivadas no sol apresentaram maiores teores dos marcadores: ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido neoclorogênico, cafeína, rutina e teobromina. Já as folhas processadas apresentaram redução no teor de metilxantinas e aumento no teor de fenólicos, enquanto que as folhas oxidadas apresentaram menor teor de fenólicos quando comparadas às folhas verdes ou *in natura*.

Muitos autores colocam o ácido clorogênico como um marcador para *I. paraguariensis* por apresentar altos teores desse composto e por este estar relacionado com as atividades observadas para a erva-mate (GAMBERO; RIBEIRO, 2015; HAO et al., 2013; LUZ et al., 2016). Por outro lado, existem relatos na literatura que descrevem a instabilidade do ácido clorogênico quando em contato com o ar ou o oxigênio (BENINCÁ, 2009), o que, segundo esses autores, limitaria seu potencial como marcador químico para *I. paraguariensis*. Essa instabilidade química seria a principal justificativa para a indústria ervateira realizar o sapeco com a matéria-prima vegetal logo após a colheita.

Conforme anteriormente citado, na literatura ocorre uma falta de padronização na designação do ácido clorogênico e do ácido neoclorogênico. Nos trabalhos utilizados para ilustrar o Quadro 1, a nomenclatura não segue o definido pela IUPAC, ou ainda os autores optam por usar a nomenclatura comum de ácido clorogênico inclusive para os isômeros (BAJKO et al., 2016).

No que concerne às propriedades farmacológicas do mate, diversos estudos lhe conferem atividade estimulante do sistema nervoso central (SANTOS et al., 2015), antioxidante (BLUM-SILVA et al., 2015; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; CUELHO et al., 2018; DARTORA et al., 2011; DELADINO et al., 2013; MESQUITA et al., 2021; SANTOS et al., 2022, 2017; SCHINELLA et al., 2014), antidiabética (BOAVENTURA et al., 2013; BRACESCO et al., 2011; HAO et al., 2013), no distúrbio energético da diabetes (ROCHA et al., 2018), antiobesidade (GAMBERO; RIBEIRO, 2015; LIMA et al., 2014; PANG; CHOI; PARK, 2008), proteção cardiovascular (BRAVO et al., 2014), no metabolismo de lipídeos (adipogênese, lipogênese e na gordura localizada) (DE RESENDE et al., 2015; ROCHA et al., 2020), sendo a cafeína definida como o composto responsável pela atuação no metabolismo de lipídeos da *I. paraguariensis* (ZAPATA et al., 2020).

Para a espécie, é relatado ainda potencial hipolipidêmico (FERNANDES et al., 2016), capacidade de atuar na inibição da proliferação de células do câncer de cólon

(DE MEJÍA et al., 2010), propriedades anti-inflamatórias (LUZ et al., 2016; MESQUITA et al., 2021; SCHINELLA et al., 2014), redução da inflamação associada a obesidade de baixo grau (PIMENTEL et al., 2013), redução da hiperglicemia gerando a normalização dos parâmetros de estresse oxidativo e prevenção da neuropatia periférica (DE LIMA et al., 2018), além de atuar no aumento da proliferação de células estromais mesenquimais de humanos durante a diferenciação de osteoblastos (BALERA BRITO et al., 2019), efeito esse atribuído ao ácido 3,5-dicafeoilquinico (KARADENIZ et al., 2020).

Já a respeito das atividades atribuídas aos compostos majoritários da *I. paraguayensis*, a cafeína, assim como o ácido clorogênico, teobromina, rutina e ácido 3,5-dicafeoilquinico são os compostos mais estudados em relação às suas atividades biológicas (HAO; GU; XIAO, 2015).

Na literatura existe ainda um estudo que investiga os efeitos condroprotetores e antinociceptivos do ácido 3,5-dicafeoilquinico (50 mg/Kg) em ratos em um modelo de osteoartrite. Os resultados sugerem que a administração de 3,5-diCQA protege contra a degeneração da cartilagem articular, equilibrando a homeostase da matriz extracelular da cartilagem e reduzindo o estresse oxidativo. (LIU; LI, 2017).

Em um estudo mais recente, foram avaliados os efeitos combinados do ácido clorogênico com a cafeína no metabolismo de lipídeos, em camundongos obesos com dieta hipercalórica induzida. Os autores observaram que a combinação apresentou efeitos antiobesidade (redução do ganho de peso e no peso do tecido adiposo intraperitoneal) e regulou o metabolismo lipídico (melhorando os níveis dos indicadores lipídicos no soro e fígado), sugerindo que a ingestão crônica de 3-CQA e cafeína pode ser utilizado na prevenção da obesidade e de doenças metabólicas relacionadas ao estilo de vida (XU et al., 2019).

Na literatura, temos ainda um estudo que investiga o efeito neuroprotetor da cafeína em neurotoxicidade induzida por cloreto de alumínio em ratos. A dose utilizada foi de 20 mg/kg (*i.p.*), e os dados obtidos indicaram que a cafeína melhorou o estresse oxidativo induzido por $AlCl_3$ no córtex cerebral, hipocampo e corpo estriado, assim como restaurou o nível de TNF-alfa no hipocampo e estriado, além de melhorar a atividade da acetilcolinesterase nas regiões descritas. Os autores concluíram que a cafeína fornece neuroproteção significativa contra neurotoxicidade induzida por $AlCl_3$ devido a suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticolinesterase (HOSNY et al., 2019).

Entre as atividades investigadas para *I. paraguariensis*, tanto no número de trabalhos como nos resultados obtidos, destaca-se a atividade antioxidante. Nesse sentido o próximo tópico irá abordar sobre os estudos descritos na literatura sobre a atividade antioxidante da *I. paraguariensis*.

3.1.2 Atividade Antioxidante de *Ilex paraguariensis*

Na literatura muito se tem descrito a respeito da atividade antioxidante da *I. paraguariensis*. O quadro 2, descreve alguns trabalhos que usaram diferentes modos de preparo do extrato de *I. paraguariensis* e diferentes metodologias para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*.

Quadro 2 – Atividade antioxidante de *Ilex paraguariensis*

Extrato	Atividade	Referência
Infusão a 1%	FRAP: 846,37 μmol Trolox por g extrato seco ABTS: 1,65 μmol Trolox por g extrato seco	Bravo; Goya; Lecumberri, 2007
Infusão a 20 %: comparação de 12 extratos (variáveis: a idade da folha, procedência, técnica de extração).	DPPH (0,1mM ou 100 μM): 158-1439 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Dartora et al. 2011
Infusão a 2 %	DPPH (25 mg/mL ou 60 μM): 1,07 g erva-mate por g de DPPH.	Deladino et al. 2013
Infusão a 5 %	FRAP: 33 mg equivalente de ácido gálico por mg de extrato. ABTS: 6 mg equivalente de ácido gálico por mg de extrato.	Schinella et al. 2014
Infusão a 5 %, avaliou a idade das folhas em 1, 2 e 6 meses	DPPH (60 μM): 70 (1 mês), 85 (2 meses) e 150 (6 meses) g/g DPPH	Blum-Silva et al. 2015
Turboextração a 10% em EtOH 20%	DPPH (60 μM): 15,70 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Santos et al., 2017
Maceração com EtOH 40%	DPPH (0,3 mM ou 300 μM): 39,73 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Beta-caroteno: 50,48%	Cuelho et al., 2018
Chimarrão	DPPH: 14,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ORAC: 8622 μmol TE/g extrato	Mesquita et al., 2021*
Tererê	DPPH: 22,26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ORAC: 7003 μmol TE/g extrato	
Chá Mate	DPPH: 27,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ORAC: 1775 μmol TE/g extrato	

*Não traz a informação da concentração do DPPH.

Bravo e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antioxidante da erva-mate por FRAP e ABTS de preparações obtidas por infusão e por extração com ácido/metanol/acetona. Em ambas as preparações a erva-mate apresentou efeito antioxidante, tendo os autores relacionado o consumo de erva-mate na forma de infusão na ingestão de compostos com essa propriedade.

Dartora e colaboradores (2011) avaliaram a atividade antioxidante por DPPH e pelo teste de ácido linoleico e β -caroteno de diferentes processamentos da erva-mate após a colheita. Nesse sentido, a erva que é submetida ao branqueamento e sapeco apresentou maior teor de compostos fenólicos e conseqüentemente uma atividade antioxidante mais intensa ($EC_{50} = 158,40$ mg de extrato/mL) além de apresentar também atividade sobre a lipoperoxidação.

Deladino e colaboradores (2013) avaliaram se o processo de secagem, influência ou não na atividade antioxidante por DPPH, sendo avaliado o extrato líquido e o extrato seco por liofilização, que tiveram EC_{50} de 0,74 g antioxidante/ g DPPH e 1,07 g antioxidante/ g DPPH, respectivamente. Nesse sentido foi possível observar que a secagem por liofilização pode modificar a capacidade antioxidante dos extratos de erva-mate, assim como reduzir o teor de ácido clorogênico em 20%.

Blum-Silva e colaboradores (2015) avaliaram a influência da idade das folhas de *I. paraguariensis* na captação de radicais livres por meio do ensaio de DPPH. O estudo observou que a idade das folhas influenciou no efeito da habilidade de captação de radicais livres por DPPH, no qual as folhas com 1 mês de vida apresentaram valor de EC_{50} de 24,51 g/g DPPH, enquanto que para as folhas com 2 meses este valor foi de EC_{50} de 80,79 g/g DPPH. Já para as folhas com 6 meses, o valor de EC_{50} observado foi de 148,91 g/g DPPH.

Em um outro trabalho, foi descrito o desenvolvimento de uma suspensão de nanopartículas poliméricas contendo extrato padronizado de *I. paraguariensis* visando uso tópico com ação antioxidante. O extrato foi preparado por turboextração, utilizando uma relação droga: solvente de 5%, etanol a 20% (v/v) como líquido extrator e velocidade de agitação de 13500 rpm. O extrato obtido foi avaliado quanto a sua capacidade de captação e radicais livres, utilizando o ensaio por DPPH, e apresentou uma EC_{50} de 51,7 μ g/mL. Além disso, a incorporação do extrato padronizado às nanopartículas preparadas a base de poli-e-caprolactona pela técnica dedupla emulsão seguida de evaporação do solvente proporcionou

efeito protetor ao extrato, permitindo seu emprego como antioxidante tópico (SANTOS et al., 2017).

Cuelho e colaboradores (2018) avaliaram a atividade antioxidante por DPPH do extrato preparado por maceração com 40% de etanol. O extrato a 200 µg/mL apresentou uma redução da ABS de 92,2% no teste de DPPH, enquanto o extrato a 100 µg/mL a redução foi de 89,42%. A EC₅₀ do extrato para o DPPH foi de 39,73 µg/mL.

Mesquita et al. (2021) avaliaram as preparações clássicas da erva-mate (chimarrão, tererê e chá mate) e suas respectivas atividades antioxidante por DPPH e ORAC. Em ambos os ensaios as preparações de erva-mate apresentaram atividade antioxidante com destaque para o ensaio por DPPH, onde a EC₅₀ verificada foi de 14,71; 22,26; e 27,10 µg/mL para o chimarrão, tererê e chá mate, respectivamente.

Já Santos et al. (2022) avaliaram o extrato preparado por Soxhlet com água e a sua capacidade antioxidante por DPPH e teste de Fosfomolibdênio, o qual avalia a capacidade antioxidante total. Em ambos os ensaios o extrato apresentou atividade antioxidante, com destaque para o teste do DPPH onde foi detectada uma EC₅₀ de 47,11 µg/mL.

Já a respeito da atividade antioxidante atribuída aos compostos majoritários de *I. paraguayensis*, o ácido clorogênico e seus derivados, e a rutina são os compostos mais estudados em relação às suas atividades antioxidante (HAO; GU; XIAO, 2015).

A atividade antioxidante dos derivados do ácido clorogênico (3-CQA, 4-CQA, 5CQA, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA e 4,5-DCQA) foram avaliados pelas metodologias de DPPH, FRAP, ABTS, íon metálico quelato, β-caroteno e proteção ao dano do DNA. Todos os derivados do ácido clorogênico apresentaram atividade antioxidante pelas diferentes metodologias e efeitos protetores do DNA em diferentes graus. Os autores observaram ainda que os ácidos dicafeoilquínicos possuem atividades antioxidantes mais significativas, por possuírem maior número de hidroxilas quando comparado aos ácidos cafeoilquínicos. Outro dado observado foi que os derivados do ácido cafeoilquínico apresentaram atividade antioxidante semelhante, o que indica que a posição da esterificação na porção quínico não interfere na atividade antioxidante. Por fim os autores detectaram que a atividade antioxidante pode ser influenciada pela posição da esterificação na porção quínico, fazendo com que o

ICAC tenha atividade mais potente quando comparado com os demais isômeros (XU; HU; LIU, 2012).

Com esses relatos é possível perceber que a investigação e comprovação da atividade antioxidante de preparações a partir das folhas de *Ilex paraguariensis* é extensa. Se considerarmos também que a origem de muitas doenças inflamatórias acaba ocorrendo devido ao desequilíbrio da cadeia redox do organismo, a capacidade antioxidante da espécie *I. paraguariensis* a torna um potencial alternativo para o tratamento da inibição de processos inflamatórios.

3.1.3 Atividade Anti-inflamatória da *Ilex paraguariensis*

A atividade anti-inflamatória de *Ilex paraguariensis* também vem sendo investigada por vários estudos (LANZETTI et al., 2008; LUZ et al., 2016; MESQUITA et al., 2021; MUÑOZ-CULLA et al., 2016; PIMENTEL et al., 2013; PUANGPRAPHANT et al., 2013; SCHINELLA et al., 2014) , e também constitui outro foco deste trabalho.

Lanzetti e colaboradores (2008) avaliaram o efeito da infusão aquosa (150 mg/Kg) na prevenção do desenvolvimento do processo inflamatório pulmonar em ratos expostos a fumaça de cigarro. Os resultados indicaram que o extrato foi capaz de reduzir o processo inflamatório pulmonar por reduzir o influxo de macrófagos e neutrófilos alveolar, causar redução do dano oxidativo e nos níveis de TNF- α , além de minimizar a expressão da metaloproteinase-9.

Na literatura há o relato do estudo que avaliou o efeito do extrato de erva-mate (maceração) na inflamação periférica e central em ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica. Os ratos foram divididos em quatro grupos: o grupo alimentado com a dieta de ração; grupo alimentado com a dieta de ração mais o extrato (dose de 0,01 a 0,02 g/dia por 4 meses); grupo alimentado com uma dieta rica em gordura saturada; e grupo alimentado com uma dieta rica em gordura saturada mais extrato. Os autores observaram que a ingestão do extrato de erva-mate reduziu os efeitos pró-inflamatórios da obesidade induzida pela dieta. Por outro lado, nos grupos que receberam o extrato foi possível observar um efeito anti-inflamatório, o que permitiu aos autores inferir que o extrato de erva-mate pode ser útil na redução da inflamação associada à obesidade de grau leve (PIMENTEL et al., 2013).

Outro trabalho presente na literatura, afirma que a erva-mate apresenta um papel quimiopreventivo e nesse sentido o extrato preparado por infusão a 2% e saponinas isoladas do mate foram avaliados na prevenção da inflamação colônica induzida por azoximetano em ratos. Como resultado os autores encontraram que os tratamentos (extrato e saponinas) reduziram a expressão das moléculas pró-inflamatórias da COX-2 e iNOS com concomitante redução da p-p65. Foi possível observar também que os tratamentos reduziram a expressão de moléculas como NF- κ B, p-I- κ -B- κ e p-GSK-3 β . Com esses dados, os autores conseguiram determinar que o mecanismo envolvido no efeito quimiopreventivo dos tratamentos na inflamação colônica induzida por azoximetano em ratos é através da inibição do NF- κ B (PUANGPRAPHANT et al., 2013).

Schinella e colaboradores (2014) avaliaram o extrato aquoso preparado por infusão no modelo de edema de pata induzido por carragenina (dose: 125 e 250 mg/Kg) e no modelo agudo e crônico de orelha de camundongo (dose: 1 mg/orelha). Neste trabalho, os autores também determinaram o teor de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu e identificaram os constituintes químicos presentes no extrato (ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido ferúlico, cafeína, ácido 3,4-dicafeioilquinico, ácido 3,5-dicafeioilquinico, ácido 4,5-dicafeioilquinico e rutina). Como resultado dos parâmetros avaliados, os autores verificaram que houve inibição significativa em todas as etapas do processo inflamatório.

O estudo de Muñoz-Culla e colaboradores (2016) avaliou o efeito do chá mate em células mononucleares de sangue periférico *in vitro* para verificar se há propriedades anti-inflamatórias. Os resultados indicaram que o extrato atuou inibindo a ativação de linfócitos *in vitro* o que sugere a possibilidade do uso de erva-mate em doenças de fundo inflamatório.

Luz et al. (2016) avaliaram o efeito anti-inflamatório do extrato hidroetanólico 20% (dose: 10 a 50 mg/Kg), fração butanólica (dose: 1 a 10 mg/Kg), fração residual aquosa (dose: 1 a 10 mg/Kg) e dos compostos isolados: ácido clorogênico (dose: 0,01 a 1 mg/Kg), cafeína (dose: 5 a 0,1 mg/Kg) e rutina (dose: 0,01 a 1 mg/Kg) em modelo de pleurisia induzido por carragenina *in vivo*. Em relação à atividade, o estudo concluiu que os extratos de *I. paraguariensis* e os compostos apresentam atividade anti-inflamatória e indica que a atividade anti-inflamatória ocorre por inibição da migração de leucócitos para o local da inflamação e atenuação da polarização do Th1/Th17.

Complementando as informações encontradas para os compostos majoritários presentes em *I. paraguayensis*, há o relato sobre a atividade anti-inflamatória para os compostos cafeína (KANG et al., 2012), rutina (ARRUDA-SILVA et al., 2014) e ácido clorogênico (HWANG et al., 2014), cuja propriedade biológica baseia-se em atenuar a ativação do NF-κB.

O estudo do Correa et al (2019) visou fornecer informações sobre a ingestão contínua e regular de infusão de erva-mate em ratos com predisposição à artrite reumatoide, modelo que é caracterizado por induzir uma resposta inflamatória generalizada, chegando a ser considerado um modelo de artrite grave em ratos. A infusão foi preparada pela metodologia do preparo do chimarrão e foi possível identificar 10 compostos (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, derivados do ácido caféico, derivados do ácido di-cafeoilquínico e rutina). Os animais foram tratados com doses de 400 e 800 mg kg⁻¹ do extrato. Os autores concluíram que a administração do extrato de erva-mate foi benéfica, uma vez que foi possível observar redução da ROS devido a atividade antioxidante do extrato e potencial anti-inflamatório devido a redução do edema e da migração de leucócitos.

Extrato de *I. paraguayensis* produzido por refluxo com água como líquido extrator e seco por rota-evaporador foi avaliado quanto à composição química, toxicidade e no tratamento da dor sendo comparado com a carbamazepina. Os constituintes químicos identificados no extrato por LC-MS foram ácidos fenólicos, flavonoides, metilxantinas e saponinas, totalizando 25 compostos majoritários. Os autores observaram também que o extrato apresentou atividade hepatoprotetora e analgésica, agindo por dois tipos de mecanismo de ação: estimulação imediata do sistema opioide ou ação semelhante à carbamazepina, que estabiliza a membrana nervosa superexcitada, inibindo o disparo neuronal repetitivo e redução da propagação de impulsos excitatórios sinápticos (NOWACKI et al., 2021).

Já a respeito da atividade anti-inflamatória atribuída à *I. paraguayensis*, os compostos majoritários cafeína, ácido clorogênico, teobromina, rutina e ácido 3,5-dicafeoilquínico são os compostos mais estudados (HAO; GU; XIAO, 2015).

A atividade anti-inflamatória da cafeína foi avaliada *in vitro* em células micróglias BV2. Neste trabalho, verificou-se que a cafeína suprime a expressão dos mediadores pro-inflamatórios (NO, PGE₂, TNF-α) (KANG et al., 2012).

As propriedades anti-inflamatórias dos compostos 3-CQA, cafeína e rutina foram avaliados usando o modelo de pleurisia induzida por carragenina em

camundongos. Nesse estudo os autores observaram efeito anti-inflamatório dos compostos, os quais agem atenuando a ativação do NF-kB (LUZ et al., 2016).

Outro estudo avaliou a propriedade anti-inflamatória *in vivo* no modelo de edema de orelha do ácido neoclorogênico (5-CQA). Os autores observaram que o composto inibiu a inflamação por reduzir a permeabilidade vascular, o edema e migração de leucócitos (SEGHETO et al., 2018).

Considerando o potencial antioxidante e anti-inflamatório demonstrado nos trabalhos citados para diferentes extratos e constituintes de *I. paraguariensis*, (BOAVENTURA et al., 2013; BRACESCO et al., 2011; BRAVO et al., 2014; DE MEJÍA et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2015; DELADINO et al., 2008; FERNANDES et al., 2016; GAMBERO; RIBEIRO, 2015; HAO et al., 2013; HECK; DE MEJIA, 2007; LUZ et al., 2016; MATEOS et al., 2018a; SANTOS et al., 2017; SEGHETO et al., 2018) e sendo estas propriedades objeto de investigação do presente trabalho, é importante contextualizar a fisiopatologia do estresse oxidativo e da inflamação.

3.2 Estresse Oxidativo e a Atividade Antioxidante

A oxidação é um processo que acontece naturalmente no corpo humano formando os radicais livres. Estes radicais são espécies altamente reativas que apresentam um elétron livre na sua camada de valência, e conhecidas como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON). Estas espécies reativas podem ser formadas nos processos metabólicos como subprodutos ou produtos primários, entre os quais podemos citar a fagocitose dos micro-organismos pelos leucócitos, o envolvimento na sinalização intercelular e intracelular, promoverem a taxa de replicação do DNA, produção de energia celular e também como metabólitos nas cascatas de reações catalisadas por enzimas e na exposição à radiação solar (ANSARI; AHMAD; HAQQI, 2020; IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Esses processos podem formar radicais de oxigênio ou ainda novos subprodutos, tendo como exemplo o Superóxido ($O_2^{\bullet-}$), Hidroxila ($\bullet OH$), Peroxila (RO_2^{\bullet}), Alcoxila (RO^{\bullet}), Hidroperoxila (HO_2^{\bullet}), Óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o Dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}). Como exemplo de espécies redoxi-ativas não radicais temos: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO), ácido hipobromoso

(HBrO), ozônio (O₃), oxigênio singleto (¹O₂), peroxinitrito (ONOO⁻) e alquil peroxinitrito (ROONO) (HALLIWELL, 2001).

Embora os ERON's sejam produzidos buscando manter a homeostase celular, pode ocorrer um desequilíbrio nessas reações, ocasionando um aumento da expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias, o que causa oxidação de macromoléculas celulares como proteínas, lipídios e DNA, gerando o estresse oxidativo. Na literatura, tem sido observado um aumento nos relatos da presença do estresse oxidativo na incidência e progressão de algumas doenças crônicas (STEPHENIE et al., 2020). Dentre estes, podemos citar diabetes (HALIM; HALIM, 2019), osteoartrite (ANSARI; AHMAD; HAQQI, 2020), doenças cardiovasculares (ZHONG et al., 2019), entre outras (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

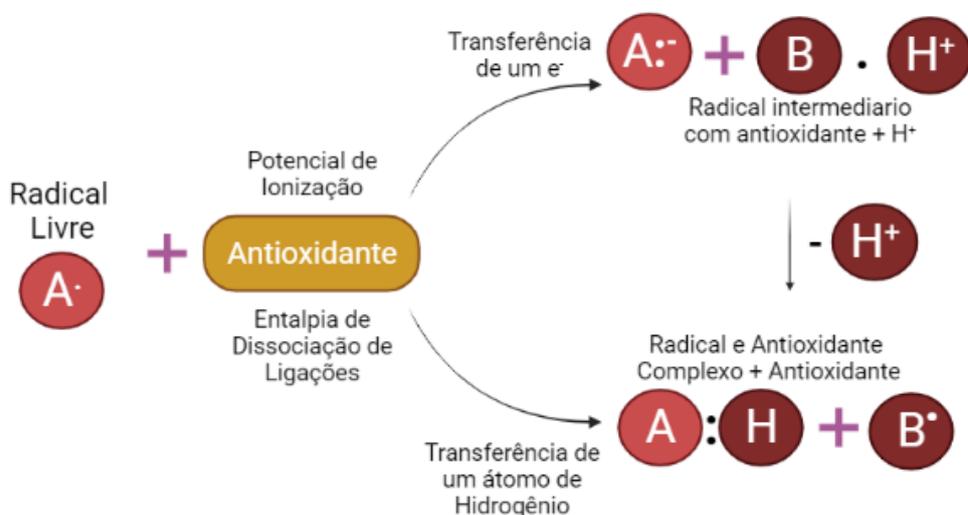
Buscando evitar os efeitos deletérios dos radicais livres ao organismo, surge a necessidade da ingestão de moléculas com potencial antioxidante. Na literatura existem trabalhos descrevendo o potencial antioxidante para os polifenóis, ácido ascórbico, vitamina A, vitamina E entre outras (SIDDEEG et al., 2021).

De maneira geral, a capacidade das moléculas antioxidantes é a de atuar em 4 diferentes níveis como linhas de defesa. A primeira linha de defesa seriam moléculas capazes de suprimir ou prevenir a formação de espécies reativas; como exemplo temos a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, que atuam removendo o radical superóxido ou quebram os peróxidos de hidrogênio e os hidroperóxidos. A segunda linha de defesa é conhecida como antioxidantes eliminadores, eles neutralizam ou eliminam os radicais livres doando elétrons a eles e tornando-se eles próprios os radicais livres, mas com efeitos menos danosos. Como exemplos temos a maioria dos antioxidantes utilizados na indústria como vitamina A, vitamina C, vitamina E, ácido úrico, glutathione e ubiquinol. A terceira linha são enzimas que irão reparar o dano causado pelos radicais livres às biomoléculas e que reconstituem a membrana celular danificada, e denominadas como enzimas para reparo do DNA (polimerases, glicosilases e nucleases), proteínas (enzimas proteolíticas, como as proteinases, proteases e peptidases) e lipídios danificados. Por fim, a quarta linha de defesa é um mecanismo de adaptação no qual esses "antioxidantes" utilizam os sinais necessários para a produção de radicais livres, que irá induzir a formação e o transporte de um antioxidante ao local de ação necessário (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Conforme relatado anteriormente, a primeira linha de defesa é composta por enzimas que pertencem ao organismo, como a superóxido dismutase, catalase, entre outras. Quando essas enzimas falham em exercer sua função fisiológica, temos a segunda linha de defesa natural não enzimática, como as vitaminas, os flavonoides, ácidos fenólicos, entre outros, que são adquiridos na alimentação. (MARCHI et al., 2022).

Na literatura, a busca por moléculas que atuem eliminando os radicais livres (os antioxidantes) pode ser realizada empregando métodos *in vitro* e *in vivo*. As possibilidades mais utilizadas para avaliação de moléculas com potencial atividade antioxidante são: 1) método de transferência de átomo de hidrogênio que irá doar um íon de hidrogênio de uma molécula estável, permitindo assim que o antioxidante elimine o radical e 2) uma transferência de elétron único que depende do potencial antioxidante de reduzir certas moléculas e compostos por meio de transferência de um elétron (figura 2) (DE OLIVEIRA et al., 2015; SIDDEEG et al., 2021).

Figura 2 – Mecanismos de avaliação da atividade antioxidante.



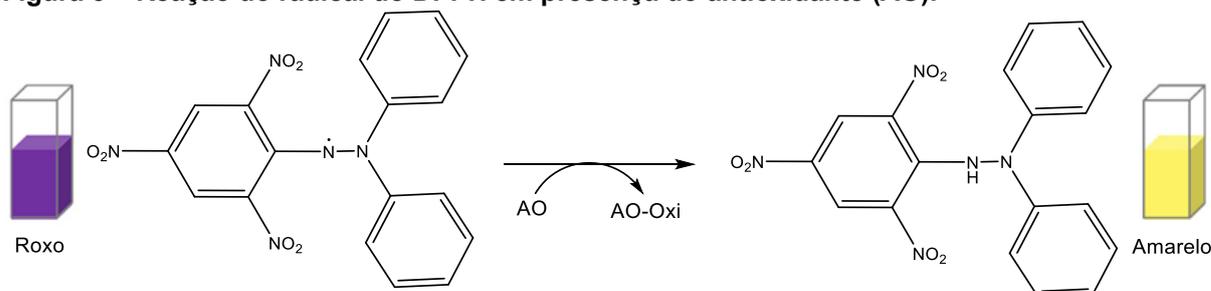
Nota: Siddeeg et al. (2021) com modificações. Figura criada no BioRender.com.

Os ensaios antioxidantes *in vitro* descritos para investigar moléculas doadoras de hidrogênio são a capacidade de absorção dos radicais oxigenados (ORAC) e o potencial antioxidante total (TRAP). Já os ensaios que avaliam compostos capazes de serem doadores de elétrons são a capacidade antioxidante de equivalência de Trolox (TEAC), poder antioxidante redutor de íons férricos (FRAP) e o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Por fim, o ensaio por DPPH é classificado como um

método que realiza a triagem de compostos capazes de atuarem como doadores de elétrons (YARLEY et al., 2021).

O ensaio do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi um dos primeiros ensaios a ser utilizado para avaliar a capacidade antioxidante, sendo desenvolvido na década de 1950. O DPPH encontra-se na forma de um radical que é estável e possui um elétron deslocado que garante a coloração roxa com absorção máxima em 517 nm (Figura 3). No entanto, a limitação da técnica está no impedimento estérico entre o DPPH e as moléculas antioxidantes, uma vez que o sitio do radical encontra-se no centro da molécula, fazendo com que moléculas com impedimento estérico necessitem de um tempo maior para que a reação ocorra, podendo o tempo de reação variar de 1 a 6 horas (MARCHI et al., 2022).

Figura 3 – Reação do radical do DPPH em presença do antioxidante (AO).



Nota: Marchi et al. (2022) com modificações.

Nesse sentido, Brand-Williams e colaboradores (1995) estabeleceram a classificação dos compostos segundo o tempo de reação: cinética rápida (menos de 1 min), cinética intermediária (de 5 a 30 min) e cinética lenta (1-6h). Como exemplo para cada cinética podemos citar: a vitamina C (ácido ascórbico) para cinética rápida; ácido rosmarínico e a vitamina E (tocoferol) para cinética intermediária; e o BHT e ácido gálico como cinética lenta (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSÉ, 1995).

Nos últimos tempos, os pesquisadores tem relacionado que muitas doenças são desencadeadas pelo estresse oxidativo, pois esse desequilíbrio redox pode gerar diferentes processos fisiopatológicos, dentre os quais processos inflamatórios (KISHORE et al., 2019; TASNEEM et al., 2019). Nesse sentido, o próximo item irá apresentar alguns detalhes sobre a inflamação e essa relação com o estresse oxidativo

3.3 Inflamação

A inflamação é um processo fisiológico desencadeado como uma resposta protetora direcionada para reconhecer e eliminar a causa inicial da lesão e o agente lesivo, eliminando assim as consequências dessa lesão: células e tecidos necróticos. Na formação do processo inflamatório, a lesão inicial pode ocorrer devido a uma ruptura mecânica dos tecidos (cortes) ou por uma resposta à presença de agentes físicos, químicos (poluentes) ou biológicos (patógenos ou hipersensibilidade) no organismo (KISHORE et al., 2019).

Nesse sentido, o processo inflamatório pode ser dividido em três fases: a fase inicial, onde os mediadores pró-inflamatórios agem dando início a cascata inflamatória; seguido da fase de resolução, no qual outro conjunto de mediadores desencadeia eventos que encerram o processo inflamatório, e por fim, a fase pós-resolução, que ocorre quando o tecido afetado desenvolve imunidade adaptativa e recupera o status de homeostase adaptada. Quando o processo inflamatório evolui pelas três etapas, levando à recuperação do tecido lesionado, tem-se a inflamação aguda (SUGIMOTO et al., 2019).

A inflamação aguda se manifesta como os quatro sinais cardinais: rubor, calor, tumor ou inchaço e dor (SUGIMOTO et al., 2019). Este tipo de inflamação se caracteriza pelo influxo de granulócitos, normalmente neutrófilos, seguido de monócitos, os quais amadurecem em macrófagos inflamatórios, que se proliferam, afetando assim as funções dos macrófagos teciduais residentes (SERHAN; SAVILL, 2005).

Ao desencadear o processo inflamatório, o corpo humano tem por objetivo retornar a sua homeostase, através da resolução da inflamação, que ocorre quando os granulócitos são eliminados e as células mononucleares retornam ao número e fenótipo normais pré-inflamação (SERHAN; SAVILL, 2005). Caso a inflamação aguda não consiga regular o estímulo pró-inflamatório, está se torna uma inflamação crônica, autoimune e com dano tecidual excessivo, podendo levar à perda da função do mesmo, que a medicina moderna reconhece como o quinto sinal cardinal (KUMAR, 2019; TASNEEM et al., 2019).

Essa perda da função do tecido tem explicado a relação da inflamação crônica com doenças degenerativas crônicas, como asma, câncer, artrite, doença inflamatória intestinal, síndrome metabólica, problemas cardíacos; doenças

neurodegenerativas, como o Alzheimer e Parkinson, entre outros (KISHORE et al., 2019; TASNEEM et al., 2019). Sabe-se que essas doenças degenerativas crônicas tem relação com a superprodução dos mediadores inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral, TNF- α), interleucinas (IL-1, IL-6, IL-15, IL-17, IL-23), citocinas anti-inflamatórias (interleucinas IL-4, IL-10, IL-13), fator de crescimento β (TGF β), interferon γ (IFN γ); prostaglandinas (PGs), óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (KISHORE et al., 2019). Há ainda o relato que a interação tanto de neutrófilos quanto de monócitos com as células epiteliais pode levar à lesão dos órgãos, caracterizando algumas doenças degenerativas já descritas (KUMAR, 2019).

A busca por novos agentes anti-inflamatórios cresceu nos últimos tempos, especialmente com o crescimento da farmacologia da resolução. Nela busca-se por terapias pré-resolução, as quais devem ser melhores que as terapias convencionais disponíveis. Dessa forma, a busca por novas terapias mais eficientes, que sejam capazes de suprimir a inflamação com menores efeitos colaterais e que promovam a cicatrização e a modulação da imunidade adaptativa são cada vez mais o foco no desenho de novas moléculas ativas (SUGIMOTO et al., 2019).

Considerando o panorama atual na busca de novos fármacos anti-inflamatórios, as metas atuais focam no sentido de gerar protótipos eficientes e seguros diante de patologias muitas vezes refratárias a tratamentos conhecidos. Neste cenário podemos inserir a asma, a artrite reumatoide e a doença de Crohn, doenças há muito tempo estudadas, mas que ainda hoje demandam um grande esforço na pesquisa de fármacos para seu tratamento que sejam eficazes em aumentar a qualidade de vida dos pacientes dentro de uma margem de segurança adequada no que diz respeito a toxicidade (BARNES, 2012; KAMM, 2006; MING DI et al., 2011).

Além das patologias descritas acima, podemos citar também a asma neutrofílica. Embora este tipo de asma esteja bem descrito na literatura e seu diagnóstico consolidado, o tratamento para esta patologia permanece ineficiente. A grande maioria de indivíduos portadores do fenótipo neutrofílico na asma não responde bem ao tratamento com fármacos comumente utilizados na clínica, como os corticosteroides inalatórios. Além disso, apesar do fenótipo neutrofílico ser transiente em uma parcela dos pacientes asmáticos, a grande maioria de pacientes com asma que morre de forma súbita possui uma contagem de leucócitos

característica da asma neutrofílica. Ou seja, apesar de uma parcela dos pacientes com asma neutrofílica apresentar melhora gradativa mesmo com a resistência a corticosteroides, pacientes que não apresentam esta melhora tem maior chance de vir a óbito em decorrência desta doença (NAIR; AZIZ-UR-REHMAN; RADFORD, 2015; NAKAGOME; MATSUSHITA; NAGATA, 2012). Ainda, para a inflamação de forma geral, a inibição de fatores de transcrição e proteínas intracelulares, como o NF- κ B e as MAPKs, já são investigados por seu papel fundamental nas cascatas inflamatórias (NAIR; AZIZ-UR-REHMAN; RADFORD, 2015).

O uso de plantas medicinais pode constituir uma alternativa na busca de novos agentes que combatam doenças degenerativas e que apresentem um menor índice de efeitos colaterais (CONTE et al., 2017; MOURA et al., 2015; PERERA et al., 2016). No mercado brasileiro existem alguns medicamentos fitoterápicos registrados a base de plantas medicinais com ação anti-inflamatória podendo citar: Arnica gel[®] (*Arnica montana*), Acheflan[®] (*Cordia verbenacea*), Motore[®] (*Curcuma longa*), Arpadol[®] ou Bioflan[®] (*Harpagophytum procumbens*), Ad-muc[®] (*Matricaria recutita*), Galenogal elixir[®] (*Salix alba*), Arnica-do-mato EC[®] (*Solidago chilensis*), Flexive[®] (*Symphytum officinale*) e Artrinson[®] ou unha-de-gato orient[®] (*Uncaria tomentosa*) (ANVISA, 2020).

Dos medicamentos citados anteriormente, podemos destacar o Acheflan[®], que foi desenvolvido por pesquisadores brasileiros (DUTRA et al., 2016), e elaborado com o óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC., o qual é constituído por monoterpenos (29,45%), sesquiterpenos (46,19%), monoterpenos oxigenados (1,89%) e sesquiterpenos oxigenados (16,21%), para uso tópico (SCIARRONE et al., 2017).

Com base nesses dados apresentados, *I. paraguariensis* pode ser considerada um potencial insumo para obtenção de um produto fitoterápico com ação anti-inflamatória. Estudos prévios demonstraram por diferentes metodologias que esta espécie apresenta atividade anti-inflamatória, inclusive já sendo estabelecido o mecanismo de ação desta atividade, a qual ocorre pela inibição do influxo de neutrófilos e a ativação destes no vazamento de fluidos, por reduzir a atividade da MPO, atenuar a polarização do Th1/Th17 e o efeito da ativação do NF- κ B (LUZ et al., 2016).

Além disso, os dados apresentados anteriormente sugerem que *I. paraguariensis* possui potencial para auxiliar em diversas patologias, como doenças

autoimunes, doenças cardíacas, alguns tipos de câncer, o que torna relevante o desenvolvimento de extrato padronizado tecnologicamente viável e de uma forma farmacêutica intermediária visando um produto final que possa vir a contribuir no manejo de diferentes protocolos terapêuticos.

3.4 Desenvolvimento tecnológico de extratos

Espécies medicinais apresentam inúmeros compostos com potencial atividade farmacológica podendo ser utilizado na indústria de alimentos (suplementos alimentares); na indústria de cosméticos (fitocosméticos); e na indústria de medicamentos (fitoterápicos). Para o uso terapêutico é necessário o desenvolvimento de um extrato padronizado, que inicia com os cuidados na seleção do material vegetal como cultivo, secagem, armazenamento e trituração do material. No processamento da matéria-prima, a etapa de trituração é importante, pois garante uma amostragem homogênea e ajuda na cinética de extração das substâncias presentes no material vegetal em estudo (HENG et al., 2013).

Seguindo com o processo de padronização do extrato, a etapa de extração pode utilizar combinações de diferentes parâmetros, como: método de extração (infusão, Soxhlet, turboextração, entre outros), líquido extrator, a proporção droga:solvente, a temperatura (a quente ou a frio) e o tempo de extração. A variação em qualquer etapa do processo de extração pode vir a gerar respostas qualitativas diferentes no perfil químico e, por consequência, na atividade biológica que o extrato apresenta. Dessa forma, nos últimos anos tem sido intensificada a preocupação no desenvolvimento de extratos padronizados que garantam a qualidade, eficácia e segurança dessas preparações (BILIA; BERGONZI, 2019).

A proporção droga:solvente é definida como a concentração de matéria-prima vegetal em relação ao líquido extrator utilizado durante o preparo do extrato e tem grande influência na extração. Dessa forma, é importante estabelecer o menor volume de solvente capaz de extrair os constituintes de interesse, de modo mais seletivo e quantitativo, ao mesmo tempo evitando que a solubilidade destes compostos seja um fator limitante da extração (OLIVEIRA, 2014). Nos quadros 2 e 3, relatados anteriormente, foi possível observar que na literatura muitas formas são utilizadas para preparar extratos de *I. paraguayensis*, o que pode dificultar o

estabelecimento das condições para obtenção de uma preparação de qualidade, eficaz e segura a partir desta planta.

Devido à complexidade de sua composição, a estabilidade química, física e microbiológica de um extrato vegetal é uma preocupação constante no desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos. A presença de água em soluções extrativas e extratos pode facilmente causar alterações que comprometam a qualidade das preparações obtidas. Neste sentido, é sempre desejável submeter o extrato a uma operação de secagem, uma vez que um extrato seco apresenta inúmeros benefícios, não somente com respeito à estabilidade, mas também redução de volume, facilidade de manuseio e armazenamento, entre outros. A secagem do extrato pode ser realizada em rotaevaporador, o que pode resultar em extrato contendo traços do solvente, ou ainda por métodos de mais fácil transposição de escala, como a secagem por aspersão ou liofilização (WALTERS et al., 2014).

A liofilização é um método de secagem bem estabelecido na indústria farmacêutica, que pode ser classificado como um método de secagem a frio. O princípio desta técnica consiste na remoção do solvente, normalmente água, por sublimação a pressão reduzida a partir de uma amostra congelada, seguido de uma etapa de dessorção para remoção do solvente descongelado. A desvantagem da metodologia pode ser o custo de funcionamento e manutenção do equipamento e o tempo de secagem, embora apresente como vantagem o uso em amostras sensíveis ao calor (ASSEGEHEGN et al., 2019).

Na nebulização por aspersão ou *spray drying* uma solução é transportada por uma bomba peristáltica até um atomizador que cria um spray, o qual é exposto a uma corrente de gás aquecido para promover evaporação rápida. Quando essa massa líquida evapora, o material sólido forma partículas individualizadas que são separadas da corrente de gás através do ciclone, sendo então depositado no coletor. Esta operação pode ser resumida em três etapas fundamentais: (1) atomização, (2) secagem de gotículas ou formação da partícula e (3) coleta das partículas. O uso do *Spray Dryer* tem como vantagens o tempo de secagem, controle sobre as propriedades do pó, método escalonável industrialmente, entre outros. Como desvantagens deste método aparecem o uso de temperatura e a limitação no uso de solventes orgânicos como líquidos extratores (WALTERS et al., 2014).

A obtenção de um extrato padronizado seco obtido por uma dessas metodologias agrega uma maior estabilidade ao extrato, favorecendo assim o desenvolvimento de um insumo ativo para a indústria. No entanto, é importante conhecer as características físico-químicas e biofarmacêuticas desse insumo, uma vez que a baixa solubilidade, possível toxicidade, reprodutibilidade, estabilidade e limitações biofarmacêuticas são alguns dos parâmetros que comprometem a biodisponibilidade e, portanto, devem ser controlados e otimizados de maneira a conservar, valorizar e maximizar o potencial terapêutico da planta (KHOGTA et al., 2019).

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 Material vegetal

Folhas de *Ilex paraguariensis* sapecadas e moídas, foram adquiridas no comércio de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil em 2018. O material vegetal foi fracionado utilizando um tãmis com abertura de malha de 1.4 Mesh. A fração retida no tãmis, em que predominam caules e pecíolos, foi excluída e a fração coletada, constituída de folhas moídas, foi acondicionada em freezer a -20°C aguardando a realização dos experimentos.

4.2 Caracterização da Matéria Prima Vegetal e da Solução Extrativa

A matéria-prima vegetal (MPV) foi submetida a caracterização por métodos farmacopeicos: perda por dessecação, teor de extrativos, pH da solução extrativa e resíduo seco.

4.2.1 Perda por dessecação (Farmacopéia Brasileira, 2019)

A perda por dessecação da matéria prima foi avaliada por balança digital de infravermelho (Ohaus, MB45), conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 6 ed. Cerca de 1,0 g de material vegetal foram exatamente pesados em um prato de alumínio previamente tarado. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em percentual ponderal representando a média das três determinações.

4.2.2 Teor de Extrativos

O teor de extrativos foi determinado segundo a metodologia descrita na literatura, no qual cerca de 1,0 g da MPV foi exatamente pesado e submetido a extração a quente por decocção com 100 g de água, durante 10 min. Após o resfriamento, a massa de 100 g foi reconstituída com adição de água purificada, sendo filtrada em papel filtro e os 20 mL iniciais descartados (SANTOS, 2016). O restante do filtrado, em torno de 20 g foi exatamente pesada em pesa-filtro previamente tarado, e os pesa-filtros colocados em banho maria, sob eventual

agitação, até a secura. Após a evaporação completa do solvente, os pesa-filtros foram colocados em estufa a 105 °C por 2 horas, resfriado em dessecador e então pesados. Este procedimento, repetido até peso constante, foi realizado em triplicata.

O teor de extrativos (TE) foi calculado em percentual ponderal representando a média das oito determinações da massa de resíduo seco, segundo a equação (1):

$$TE = (RS \times fd \times 100)/m - (m \times PD/100)$$

onde:

TE = teor percentual de extrativos (% , m/m)

PD = perda por dessecação (%)

RS = massa do resíduo seco (g)

m = massa do material vegetal (g)

fd = Fator de diluição (5).

4.2.3 pH da Solução extrativa

O pH das soluções extrativas foi avaliado utilizando um pHmetro digital, calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. A leitura foi realizada com 40 mL da solução extrativa e aguardou-se a estabilização da leitura. O resultado foi expresso pela média das medições dos três extratos preparados em triplicata (n = 9).

4.3 Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados usando dois métodos diferentes de extração: infusão e turboextração. Nas duas técnicas, os extratos foram produzidos utilizando uma relação droga: solvente de 5 % (m/v) (SANTOS et al., 2017). Além dos diferentes métodos de extração, houve variação no líquido extrator: água ou solução hidroetanólica (20%). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

4.3.1 Infusão

Folhas secas trituradas de *I paraguariensis* foram submetidas à extração, na qual o líquido extrator foi colocado sobre a droga vegetal por 30 minutos com água quente a 100°C ou solução hidroetanólica (20%) a 90°C, em recipiente fechado. Em

seguida, os extratos foram filtrados à vácuo e separados em duas frações de 500 mL. Uma destas frações foi seca por aspersão, enquanto outra foi seca por liofilização.

4.3.2 Turboextração

Os extratos foram preparados por turboextração usando equipamento tipo Ultra-TURRAX® (modelo T25, IKA, Alemanha), com haste de agitação S25N-10G (IKA, Alemanha), velocidade de agitação a 9500 rpm por 5 minutos com água ou solução hidroetanólica (20 %). Posteriormente, o extrato foi filtrado à vácuo, o líquido extrator dividido em duas frações iguais (500 mL), sendo uma seca por aspersão enquanto a outra seca por liofilização.

4.4 Condições de secagem dos extratos

4.4.1 Nebulização por aspersão ou *Spray Dryer*

A secagem por aspersão foi realizada utilizando equipamento Mini Spray Dryer B-290 (Buchi®, Suíça) sob as seguintes condições de secagem: temperatura de entrada: 160 °C; temperatura de saída: 100 °C; fluxo de alimentação: 10 % (3 mL/min); fluxo de ar: 100 %; diâmetro do atomizador 0,7 mm. Não foi adicionado nenhum adjuvante de secagem. Após a secagem, os extratos secos por aspersão foram armazenados em freezer a - 20 °C e identificados de acordo com o processo de extração e líquidos extratores utilizados, conforme Figura 4.

4.4.1 Liofilização

Previamente ao processo de liofilização, os extratos hidroalcoólicos foram submetidos a desalcoholização em evaporador rotatório (Buchi®, Suíça). Após a eliminação do álcool, as amostras foram congeladas a - 20 °C por 72 horas, sendo transferidas para liofilizador (LD1500, Terroni®, Brasil) estabilizado a -40 °C. Transcorridas 72 horas, as amostras foram retiradas e armazenadas em freezer a - 20 °C até utilização. Os diferentes extratos foram identificados de acordo com o

processo de extração e líquidos extratores utilizados, conforme apresentado na Figura 4.

4.5 Caracterização química

4.5.1 Determinação do teor de fenólicos totais (TFT)

O teor de fenólicos totais foi determinado pelos métodos de Folin-Ciocalteu (FC) (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999) e Fast Blue BB (FBBB) (MEDINA, 2011a).

Para ambas as técnicas, amostras e padrões foram analisados em triplicata e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido clorogênico por grama de extrato seco (mg EAC g⁻¹ ES). Uma curva analítica foi elaborada com ácido clorogênico na faixa de 500 - 15 µg mL⁻¹ como substância de referência (R² = 0,999 para ambas as técnicas).

4.5.2 Análise por LC-DAD

Com base no estudo de Blum-Silva e colaboradores (2017) foi desenvolvido a metodologia por LC-DAD com modificações. As análises foram realizadas em cromatógrafo UPLC (Acquity HClass - Waters®) acoplado a detector de fotodiodo (PDA - Waters®). A separação cromatográfica ocorreu em coluna de fase reversa Phenomenex® modelo Kinetex (C18 – 2,1 x 150 mm) com tamanho de partícula de 2,6 µm. A fase móvel utilizada foi em forma de gradiente, com a combinação do solvente A (água+0,1% ácido fórmico) e solvente B (MeOH), sendo a composição do gradiente utilizado demonstrada no Quadro 3. O fluxo utilizado foi de 0,9 mL min⁻¹.

Foram construídas curvas analíticas com os seguintes padrões: teobromina, ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido neoclorogênico), ácido 4-O-cafeoilquinico (ácido criptoclorogênico), ácido 3-O-cafeoilquinóico (ácido clorogênico), cafeína e rutina. Todos os marcadores químicos utilizadas foram adquiridos da Sigma-Aldrich® Co. (St. Louis, EUA). Os comprimentos de onda utilizados para a detecção foram de 280 nm para metilxantinas e 320 nm para ácidos fenólicos e flavonoides. A metodologia

analítica foi avaliada quanto a linearidade, limite de detecção e limite de quantificação (BRASIL, 2017; ICH - GUIDELINE HT, 2005).

Quadro 3 – Programação da mistura de solventes do método cromatográfico.

Tempo (min)	H ₂ O + ácido fórmico 0,1% (A-%)	Metanol (B-%)
0	90	10
4	85	15
5	80	20
7	70	30
10	60	40
12	50	50
13	90	10
15	90	10

4.5.3 Análise por LC-MS

Utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de ultra performace (Acquity-UPLC™) acoplado com um detector de fotodiodo (PDA) e um espectrômetro de massas de alta resolução (Xevo® G2 QToF model – WATERS®) equipado com uma fonte de ionização de eletrospray (ESI) operado no modo positivo.

Para a separação e identificação dos compostos presentes no extrato de *I. paraguariensis* foi utilizado o sistema cromatográfico com uma coluna Kinetex™ da marca Phenomenex® (150 x 2,1 mm x 2,6 µm) sob temperatura de forno de 40°C e o volume de injeção foi de 3 µL. A eluição foi realizada empregando uma solução aquosa a 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e metanol (solvente B).

O sistema de eluição foi na forma de gradiente: 0-2 min: de 15 a 25% (B), 2-4 min 25 a 60% (B), 4-9 min 60-70% (B), 9-10 min 70-15% (B), 10-12 min método isocrático com 15% de B. O fluxo foi de 0,5 mL/min. A detecção do espectro de massas foi realizada usando uma varredura completa, que variou de 50 – 1500 m/z com tempo de varredura de 1 s. Para aquisição e processamento de dados foi utilizado software MassLynx v4.1. Nas análises por MS/MS utilizou-se energia de colisão variando de 10, 20 e 30 eV do gás de argônio, conforme o composto

analisado. A voltagem do capilar foi 2,5 kV com temperatura de 100°C, a temperatura de dessolvatação foi de 300°C; o fluxo do gás foi de 150 L/h e a voltagem do cone foi de 40 V, controlado pelo software MassLynx v.4.1. Todas as análises foram realizadas em triplicata, no modo positivo e negativo (FELTRIN et al., 2020).

4.6 Ensaio de captação de radical livre – ensaio do DPPH

A determinação da atividade de captação de radicais livres foi realizada utilizando o ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e modificado por Zhu et al. (2018). As análises foram realizadas em triplicata, com todos os extratos obtidos (TAS, TAL, TES, TEL, IAS, IAL, IES e IEL), sendo plotada uma curva para cada extrato e compostos, a fim de definir a concentração que reduziu 50% a concentração de DPPH (126 µM) (EC₅₀), durante 30 minutos. Os valores foram expressos em µg mL⁻¹ para os extratos e µM para os compostos.

4.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.7.1 Cultura celular

As células RAW 264.7 (células de macrófagos) foram cultivadas em frascos de cultura celular com Meio Essencial Mínimo Modificado de Eagle (DMEM) Dulbecco®, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativo (PBS), penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 ug/mL, em incubadora a 37 °C com e 5% de CO₂. Inicialmente, o número de células viáveis foi determinado pelo método de azul de Tripano, com contagens realizadas em câmara de Neubauer.

4.7.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular dos extratos de *I. paraguariensis* foi avaliada em células RAW 264.7, através do método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983).

As células foram colocadas em microplacas de cultura de 96 cavidades (1×10^4 células/poço) e incubadas com os extratos em diferentes concentrações (3 a 1000 $\mu\text{g/mL}$). Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado para solubilização das substâncias teste em uma concentração máxima de 1%. Após o período de tratamento (24 h), o meio foi removido e 100 μL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados e incubados por 2 horas. Após este período, o meio foi removido, o precipitado de formazana formado dissolvido em 100 μL de DMSO/poço, e a absorbância medida a 540 nm. A densidade óptica obtida no grupo controle - células não tratadas foi considerada como 100% de células viáveis. A concentração citotóxica (CC_{10}), que significa a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 90%, foi calculada através de uma curva de concentração-resposta de Hill, utilizando o software Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7.3 Ensaio de inflamação in vitro e desenho experimental

Para induzir os macrófagos RAW 264.7 a uma condição inflamatória, as células foram cultivadas em estufa de CO_2 em placas de 96 poços (2×10^5 células/poço) por 48 h até completar a aderência e confluência. A seguir, as células foram designadas para diferentes grupos ($n = 3/\text{grupo}$), consistindo em: (a) controle em branco; (b) controle negativo (LPS, células inflamadas); (c) controle positivo (Dexametasona (7 μM) e (d) grupos experimentais (extratos e compostos). Após 1 h, as células foram estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g} / \text{mL}$) por 24 h, e os sobrenadantes coletados para futuras investigações sobre a produção de metabólitos de nitrito/nitrato (NO_x).

4.7.4 Quantificação in vitro dos metabólitos do óxido nítrico

O acúmulo de nitrito nos sobrenadantes da cultura foi medido como um indicador da produção de NO com base na reação de Griess (GREEN et al., 1982). Resumidamente, 100 μL de meio de cultura de células foram coletados 24 h após a estimulação por LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), misturados com um volume igual de reagente de Griess e mantidos em temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, foi

realizada leitura em 540 nm para construção da curva padrão de nitrito (0–100 μM). A produção de nitrito foi determinada e os resultados expressos em μM .

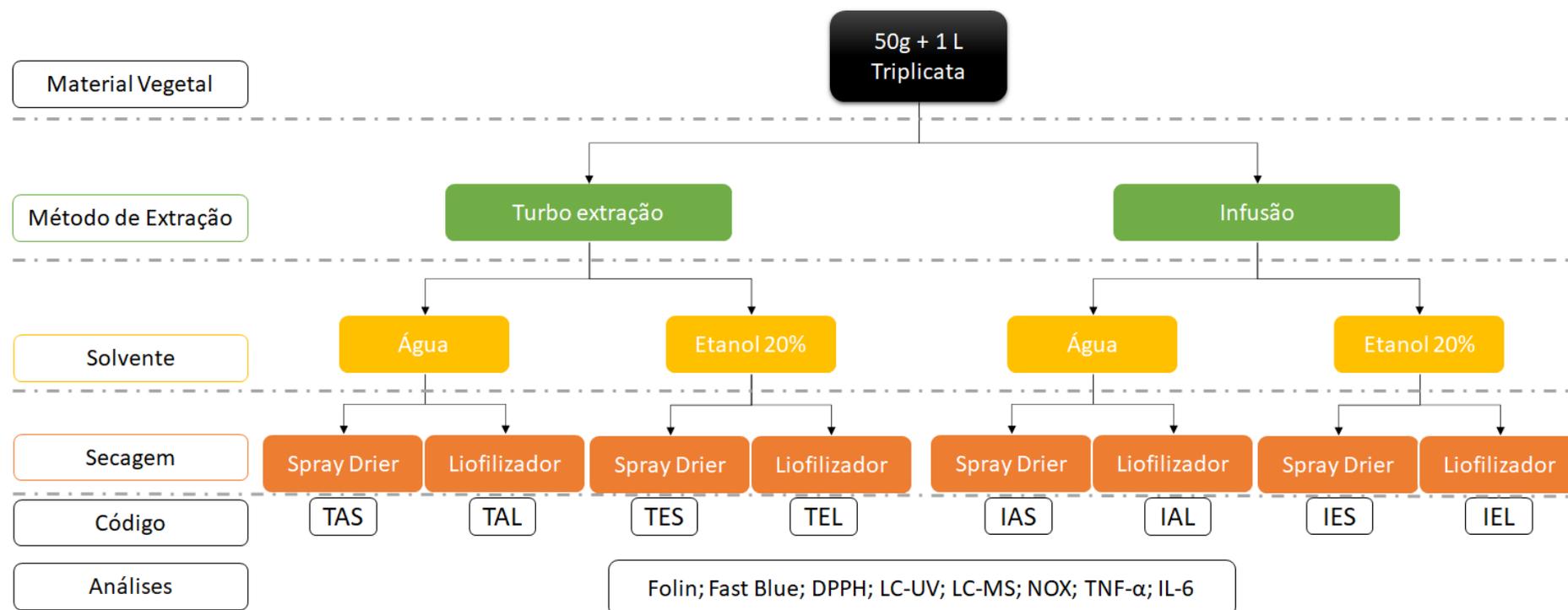
4.7.5 Quantificação de citocinas pro-inflamatória (TNF- α e IL-6)

Os níveis de TNF- α e IL-6 no sobrenadante celular foram quantificados após tratamento com os extratos secos por Spray Dryer (IAS, IES, TAS e TES). Adicionalmente, para os compostos isolados, foram avaliados os níveis de TNF- α na concentração presente no extrato IA a 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os grupos para estes experimentos foram os seguintes: (a) THEO a 0,033 μM ; (b) NCA a 1,97 μM ; (c) CCA a 0,35 μM ; (d) CGA a 0,56 μM ; (e) CAF a 0,52 μM e (f) RUT a 0,16 μM . As concentrações de TNF- α foram determinadas usando um kit de ensaio imunoenzimático disponível comercialmente (PeproTech®, Rocky Hill, NJ, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O nível de citocinas foi estimado por interpolação da curva padrão e os resultados são expressos em pg/mL.

4.8 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas no software Graphpad Prisma 6. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 4 – Representação esquemática das etapas executadas nesta Tese.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização extrativa segundo a Farmacopeia

5.1.1 Perda por dessecação (Farmacopeia Brasileira 2019)

A avaliação do teor de umidade presente na droga vegetal foi avaliada pelo ensaio de perda por dessecação. O resultado encontrado foi de 8,82% ($\pm 0,073$) e DPR de 0,83 % (n = 3). A Farmacopeia Brasileira 6ª edição define como valor máximo um teor de umidade de 14%, indicando que os valores obtidos no ensaio estão de acordo com o estabelecido. Adicionalmente, nossos dados são semelhantes ao estabelecido por Santos (2016).

5.1.2 Teor de Extrativos

O teor de extrativos em água obtido para a matéria-prima vegetal foi de 36,30% ($\pm 0,45$). Na literatura, Santos (2016) avaliou o teor de extrativos de folhas e caules e observou que as folhas apresentavam um teor de 39,73 % e os caules de 25,35 %. Comparando os trabalhos, o presente estudo foi detectado um valor próximo ao previamente descrito na literatura.

5.1.3 Caracterização da Solução Extrativa

O extrato foi preparado pela técnica de infusão com proporção droga solvente de 5 % (m/v). O experimento foi realizado em triplicata e resultou em um volume de solução extrativa de 900 mL. O valor do pH foi de 5,91 ($\pm 0,017$). O teor de resíduo seco obtido foi de 0,634 % (m/m) ($\pm 0,007$).

5.2 Obtenção dos extratos

Conforme descrito na figura 4, foram obtidos 8 extratos, sendo que cada um deles foi preparado em triplicata. O rendimento dos extratos pode ser observado na tabela 1. Os extratos secos por aspensão demonstraram um menor rendimento

quando comparados aos secos por liofilização e isso ocorreu devido ao material ficar retido no ciclone.

Tabela 1 – Percentual do rendimento dos extratos obtidos Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido por Teste de Tukey; $p < 0,05$).

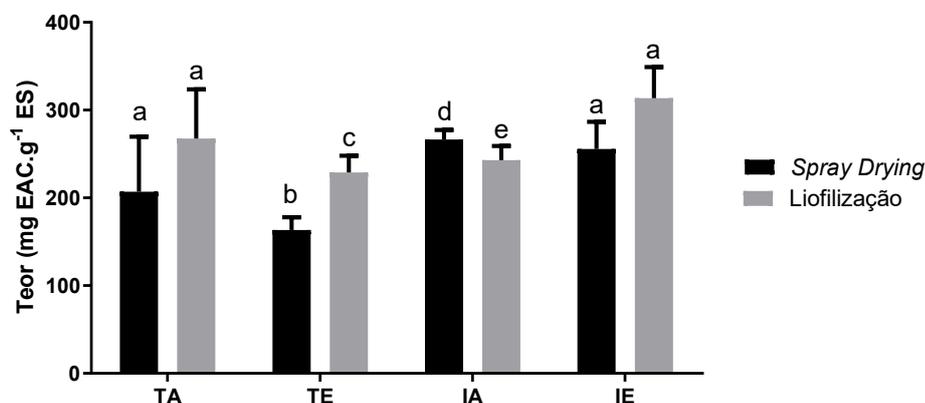
Extrato	n	m planta (g)	m extrato (g)	Rendimento (%)	Valor médio \pm DPR
	1	50	0,42796	0,21	
TAS	2	50	3,48	1,74	0,98 \pm 0,76 ^a
	3	50	1,99	0,99	
	1	50	3,33	1,67	
TES	2	50	4,62	2,31	1,76 \pm 0,50 ^a
	3	50	2,62	1,31	
	1	50	1,80	0,90	
IAS	2	50	4,55	2,28	1,76 \pm 0,75 ^a
	3	50	4,21	2,10	
	1	50	3,69	1,85	
IES	2	50	3,68	1,84	2,07 \pm 0,39 ^a
	3	50	5,04	2,52	
	1	50	9,26	4,63	
TAL	2	50	9,63	4,82	4,40 \pm 0,57 ^b
	3	50	7,47	3,74	
	1	50	6,90	3,45	
TEL	2	50	7,05	3,52	3,54 \pm 0,10 ^b
	3	50	7,32	3,66	
	1	50	7,90	3,95	
IAL	2	50	9,54	4,77	4,55 \pm 0,53 ^b
	3	50	9,9	4,95	
	1	50	7,30	3,65	
IEL	2	50	4,92	2,46	3,21 \pm 0,65 ^b
	3	50	7,08	3,54	

5.3 Teor de fenólicos totais (TFT)

Na análise por FC (Figura 5), o extrato que apresentou maior teor de fenólicos totais foi o IEL ($313,70 \pm 35,48$ mg EAC.g⁻¹ ES), seguido pelo TAL ($267,49 \pm 56,07$ mg EAC.g⁻¹ ES) e pelo IAS ($266,62 \pm 10,85$ mg EAC.g⁻¹ ES). O extrato que apresentou o menor TFT foi o TAS com ($163,40 \pm 14,45$ mg EAC.g⁻¹ ES). Estatisticamente os extratos preparados por infusão aquosa, tanto o seco por Spray

Drying quanto o seco por liofilização, apresentaram diferença quando comparado com os demais extratos preparados.

Figura 5 – Teor de fenólicos totais pela técnica de Folin Ciocalteu. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido por Teste de Tukey; $p < 0,05$).



Legenda: TA (turboextração com água), TE (turboextração com hidroetanol 20 %), IA (infusão com água) e IE (infusão com hidroetanol 20%).

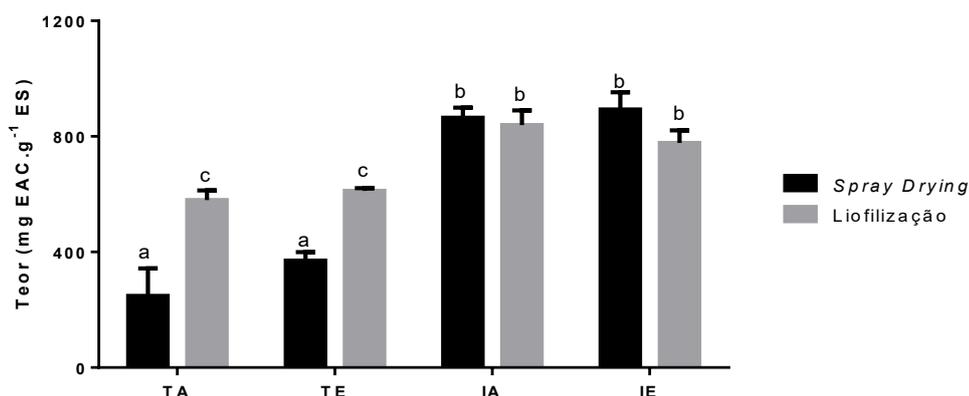
Na literatura, há apenas um relato de extrato aquoso preparado por infusão de erva-mate liofilizado, que foi avaliado quanto ao teor de fenólicos totais expresso em equivalente de ácido clorogênico, assim como o nosso trabalho. Esses autores encontraram o valor de 94 mg EAC.g⁻¹ ES (DELADINO et al., 2013). O valor obtido em nosso estudo foi superior ao trabalho citado, fato que pode ocorrer por diferença do local de coleta da matéria-prima vegetal, proporção droga:solvente, tempo de contato da droga vegetal com o líquido extrator, entre outros (BILIA; BERGONZI, 2020).

Na técnica FBBB (Figura 6), os extratos com maior teor de fenólicos totais foram IES (893,289 ± 59,577 mg EAC.g⁻¹ ES), IAS (864,44 ± 35,252 mg EAC.g⁻¹ ES) e IAL (839,045 ± 51,391 mg EAC.g⁻¹ ES), enquanto que o TAS (248,133 ± 94,828 mg EAC.g⁻¹ ES) foi o extrato que apresentou o menor teor de fenólicos totais. Além disso, foi possível observar diferença entre os extratos preparados por infusão x turboextração (independente do solvente ou do método de secagem), indicando que o método de extração influencia nos valores do TFT.

Na literatura, são poucos os trabalhos que usam a técnica de Fast Blue BB para a quantificação do TFT, de forma que a maioria dos trabalhos utiliza a metodologia de Folin para a quantificação colorimétrica de fenólicos totais. O método

Folin é um método bem difundido na comunidade científica, embora seja um método inespecífico para a quantificação de compostos fenólicos, tendo como interferentes compostos nitrogenados, açúcares, enquanto o Fast Blue B é um ensaio mais específico, uma vez que estará quantificando somente os compostos fenólicos, eliminando os interferentes observados no ensaio de Folin (MEDINA, 2011b).

Figura 6 – Teor de fenólicos totais pela técnica de Fast Blue BB. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido por Teste de Tukey; $p < 0,05$).



Legenda: TA (turboextração com água), TE (turboextração com hidroetanol 20 %), IA (infusão com água) e IE (infusão com hidroetanol 20%).

Segundo Medina (2011) é possível estabelecer uma relação entre as duas técnicas, através da razão entre Fast Blue BB / Folin Ciocalteu, no qual valores superiores a 1 indicam que os compostos quantificados por ambas as técnicas são apenas compostos fenólicos. Por outro lado, quando essa razão for menor que 1, o autor sugere que houve influência de compostos não fenólicos nos valores obtidos no ensaio por Folin. No presente trabalho, todos os extratos de *Ilex* preparados (Tabela 2) apresentaram uma razão maior que 1, sugerindo que os valores encontrados estão relacionados aos compostos fenólicos, presentes nos extratos de *Ilex*.

Tabela 2 – Razão entre FBBB e FC dos extratos de *Ilex*.

Extrato	TAS	TES	IAS	IES	TAL	TEL	IAL	IEL
Razão	2,26 ^a	2,42 ^{a,b}	3,46 ^c	3,03 ^{b,c}	2,44 ^{a,b}	3,20 ^c	3,44 ^c	3,42 ^c

Legenda: TAS (turboextração com água + *spray drying*), TES (turboextração com hidroetanol 20 % + *spray drying*), IAS (infusão com água + *spray drying*) e IES (infusão com hidroetanol 20 % + *spray drying*), TAL (turboextração com água + liofilização), TEL (turboextração com hidroetanol 20 % + liofilização), IAL (infusão com água + liofilização) e IEL (infusão com hidroetanol 20 % + liofilização). Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido por Teste de Tukey; $p < 0,05$).

Nesse sentido, os extratos com razão superior a 1 e que apresentaram os maiores valores foram o IEL (3,42), IAL (3,44) e IAS (3,46), os quais não demonstraram diferença estatística entre si. Por fim, a análise dos dados indicou que os extratos preparados por infusão apresentaram os maiores teores de TFT, independente do solvente utilizado. Tal fato sugere que a temperatura influencia no processo de extração, assim como o tempo de extração que foi diferente entre as técnicas.

5.4 Análise por LC-MS e LC-DAD

A análise por LC-MS de todos os extratos, indicou a presença dos compostos ácido quínico, ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido neoclorogênico, ácido 3,4 di-cafeoilquínico, ácido 3,5 di-cafeoilquínico, ácido 4,5 di-cafeoilquínico, cafeoilglicose, ácido ferúlico, rutina, quercetina-glicosilada, campferol-raminosideo, no modo negativo e no modo positivo foi possível observar a presença da cafeína e teobromina (figura 7 e tabela 3). Esse resultado é semelhante ao descrito na literatura por Bravo et al. (2007) e Mesquita et al. (2021), no qual ambos avaliaram diferentes preparações tradicionais de erva-mate (chimarrão, tererê e chá mate). Destes estudos, o de Bravo et al. (2007) se destaca por ter encontrado 28 compostos, incluindo a presença de diferentes isômeros dos ácidos fenólicos como ácido cafeoilsinapticoquínico ou cafeoilferruoilquínico ou a presença do ácido tricafeoilquínico.

Figura 7 - Perfil Cromatográfico por LC-MS dos compostos presentes no extrato de *Ilex paraguariensis*.

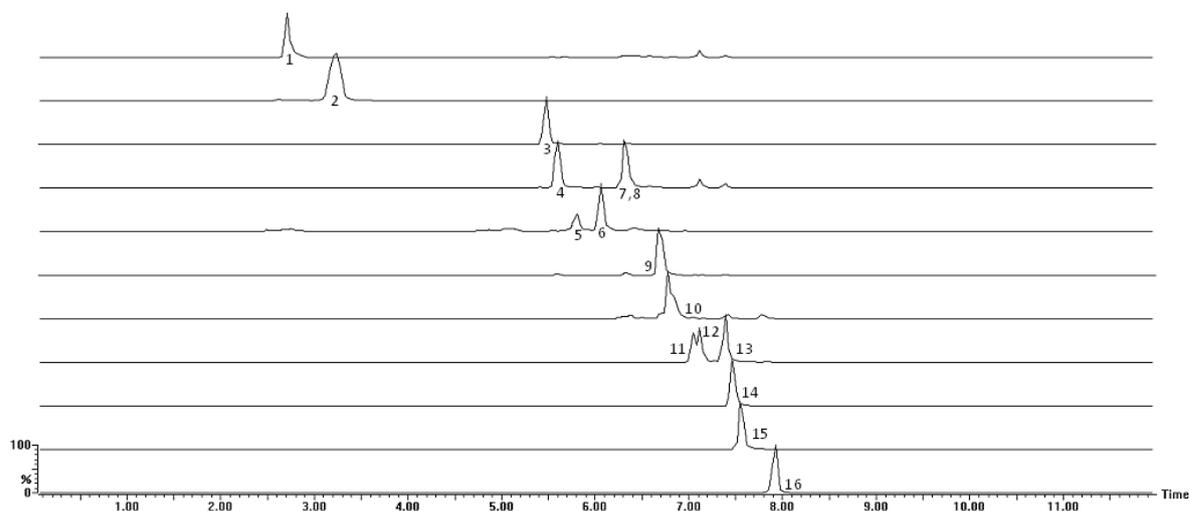


Tabela 3 – Caracterização dos constituintes majoritários de *Ilex paraguariensis* por LC-MS.

Nº	Modo	Tr (min)	(m/z)	Fragmentos m/z	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Sugestão de Identificação
1	(-)	2.70	191.0550	85.0295 127.0399 173.0990	C ₇ H ₁₂ O ₆	-3.1	Ácido Quínico ^{a**}
2	(-)	3.22	191.0183	85.0266 87.0088 111.0080 173.0101	C ₆ H ₈ O ₇	-4.7	Ácido Cítrico ^{a*}
3	(+)	5.48	181.0734	108.0562 122.0582 138.0664 163.0607	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	4,4	Teobromina ^b
4	(-)	5.58	353.0873	135.0445 179.0343 191.0550	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	0,0	Ácido 5-O-cafeoilquínico ^b
5	(-)	5.81	341.0887	161.0267 179.0349 203.0353 221.0402 323.0784	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	4.1	Cafeoilglicose ^{a**}
6	(-)	6.07	341.0887	161.0267 179.0349 203.0353 221.0402 323.0784	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	4.1	Cafeoilglicose ^{a**}
7	(-)	6.34	353.0873	135.0445 173.0451 179.0343 191.0550	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	0,0	Ácido 4-O-cafeoilquínico ^b
8	(-)	6.34	353.0873	135.0445 173.0451 179.0343 191.0550	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	0,0	Ácido 3-O-cafeoilquínico ^b
9	(+)	6.67	195.0886	110.0723 123.0430 138.0664	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	2,1	Cafeína ^b
10	(-)	6.77	367.1033	135.0445 173.0456 179.0343	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	-2.5	Ácido Ferroilquínico ^{**}
11	(-)	7.03	515.1195	135.0445 173.0451 179.0343 191.0550 353.0873	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	1,0	Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico ^{a*}
12	(-)	7.1	515.1195	135.0445 173.0451 179.0343 191.0550 353.0873	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	1,0	Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico ^{a*}
13	(-)	7.4	515.1195	135.0445 173.0451 179.0343 191.0550 353.0873	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	1,0	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico ^{a*}
14	(-)	7.5	609.1490	301.0358 463.0884	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-	Rutina ^b

15	(-)	7.6	463.0884	301.0358	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	1.5	Quercetina-3-O-glicosídeo**
16	(-)	7.9	593.1522	285.0425	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	2.7	Kampferol-raminosídeo**

^aIdentificação por dados na literatura.

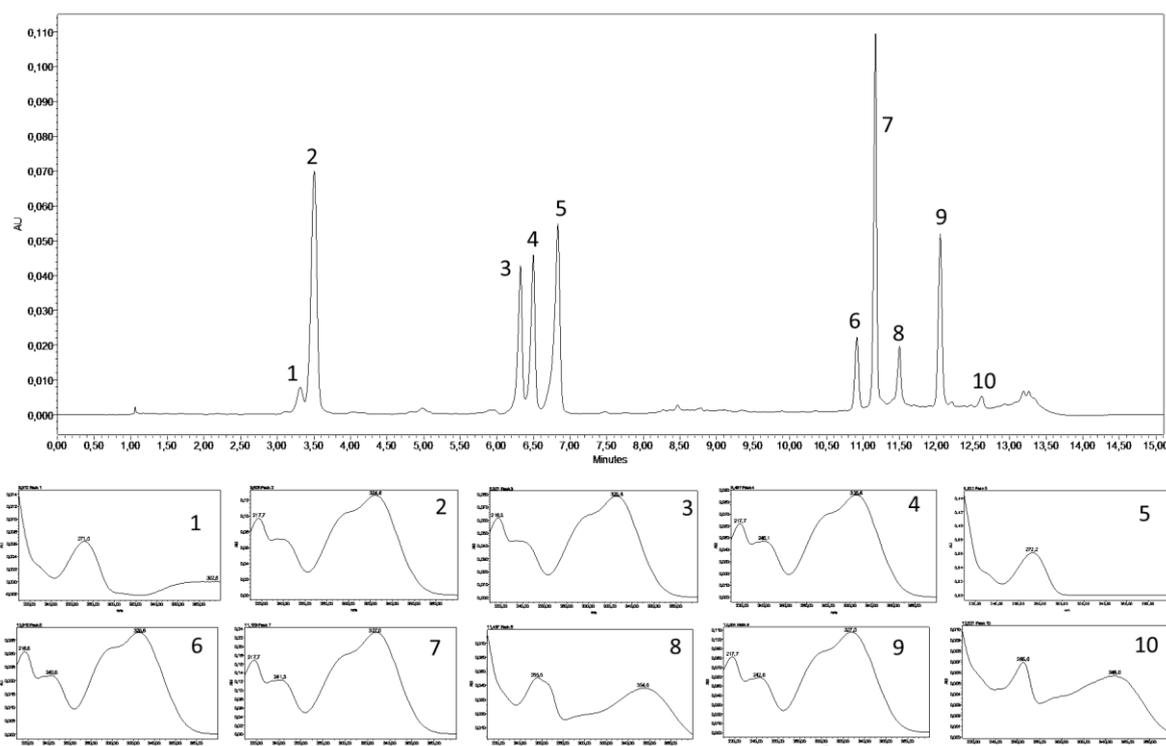
^bIdentificação com o uso de padrões autênticos.

* (SOKENG et al., 2019)

** (MATEOS et al., 2018b)

Sob o ponto de vista qualitativo, os diferentes extratos preparados apresentaram o mesmo perfil químico. Os perfis de UV observados para todos os compostos analisados foram semelhantes aos descritos na literatura. Na figura 8 está apresentado o cromatograma e o perfil de UV dos marcadores químicos presentes no extrato IAS.

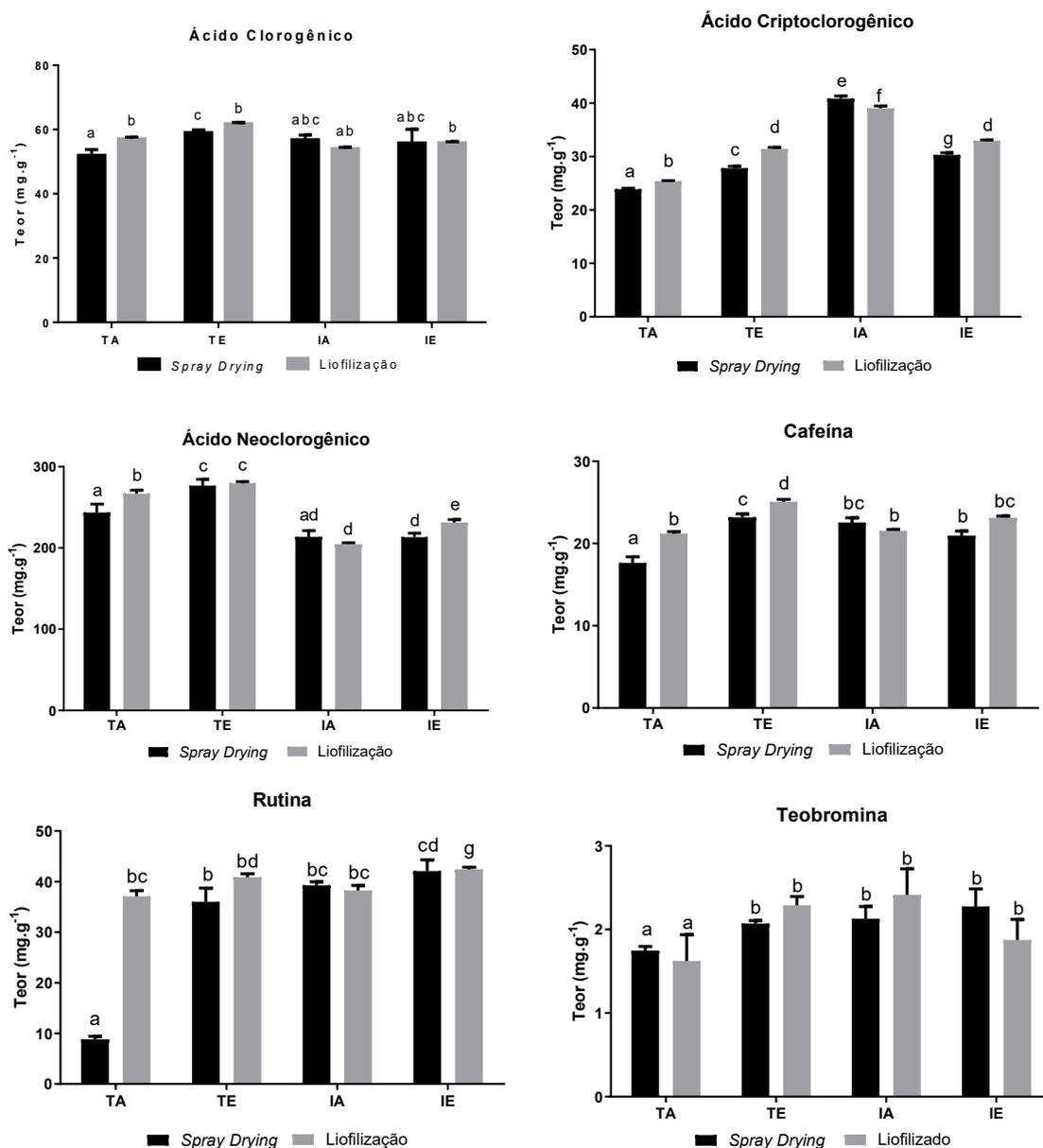
Figure 8- Perfil Cromatográfico por LC-DAD a 270 nm dos compostos presentes no extrato de *Ilex paraguariensis*.



Note: 1) Teobromina; 2) Ácido neoclorogênico; 3) Ácido criptoclorogênico; 4) Ácido clorogênico; 5) Cafeína; 6) Derivados do Ácido di-O-cafeoilquínico; 7) Derivado do Ácido di-O-cafeoilquínico; 8) Rutina; 9) Derivados do Ácido di-O-cafeoilquínico; 10) Não identificado.

Os teores obtidos dos principais marcadores químicos são apresentados na Figura 9 e é possível observar que cada composto apresentou um tipo de resposta considerando os parâmetros de preparação do extrato.

Figura 9 – Teor dos compostos majoritários dos extratos de *I. paraguariensis* por LC-DAD. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido do teste de Tukey; $p < 0,05$).



Legenda: TA (turboextração com água), TE (turboextração com hidroetanol 20%), IA (infusão com água) e IE (infusão com hidroetanol 20%).

Para os marcadores, os dados de linearidade, limite de detecção e quantificação obtidos nas análises por LC/DAD podem ser observados na Tabela 4.

Para teobromina, o extrato IAL ($2,414 \pm 0,31 \text{ mg.g}^{-1} \text{ ES}$) foi o que apresentou maior teor deste metabólito quando comparado aos demais extratos avaliados. É possível observar também que o extrato TEL apresentou os maiores teores de ácido neoclorogênico ($279,71 \pm 1,78 \text{ mg g}^{-1} \text{ ES}$), ácido clorogênico ($61,82 \pm 0,36 \text{ mg g}^{-1}$

ES) e cafeína ($25,07 \pm 0,29 \text{ mg g}^{-1} \text{ ES}$). Já o extrato com maior teor de ácido criptoclorogênico foi IAS ($40,84 \pm 1,19 \text{ mg g}^{-1} \text{ ES}$), enquanto o maior teor de rutina foi detectado no extrato IEL ($42,40 \pm 0,42 \text{ mg g}^{-1} \text{ ES}$).

Tabela 4 – Parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação do método de *llex*.

Compostos	Linearidade			
	Faixa de Linearidade ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	r^2	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Ácido Clorogênico	0,31 – 250	0,9997	0,081	0,245
Ácido Criptoclorogênico	0,48 – 250	0,9998	0,025	0,075
Ácido Neoclorogênico	0,48 – 250	0,9998	0,046	0,138
Cafeína	0,31 – 500	0,9998	0,022	0,068
Rutina	0,31 – 500	0,9998	0,0082	0,026
Teobromina	0,48 – 125	0,9999	0,0066	0,020

Complementando o descrito anteriormente, os parâmetros solvente e secagem não influenciaram de forma significativa no teor dos marcadores, o que sugere que o método de extração é o fator que influencia de forma mais intensa os teores dos compostos. O ácido criptoclorogênico, por exemplo, apresentou maiores teores nos extratos preparados por infusão independente do solvente ou método de secagem utilizado. Já o ácido neoclorogênico apresentou maiores teores nos extratos preparados por turboextração. Para os demais compostos analisados, não houve diferença no teor extraído.

Na tabela 5, estão expostos os valores ou faixa de concentração descritos na literatura em comparação aos teores encontrados no presente trabalho. É possível verificar que o teor dos compostos ácido neoclorogênico, ácido criptoclorogênico e rutina são superiores nos extratos preparados em nosso trabalho aos relatados na literatura. Já para os demais compostos analisados, os teores obtidos estão próximos ou dentro da faixa relatada na literatura. A diferença observada no teor pode estar relacionada com a proporção droga: solvente utilizada no preparo dos extratos ou nas características da matéria-prima utilizada ou no método de extração empregado (BILIA; BERGONZI, 2020).

Tabela 5 – Comparação dos teores obtidos com a literatura

Marcadores	Faixa na literatura	Faixa encontrada
Ácido clorogênico	8,50 a 67,5 mg g ⁻¹ ES ^a	51,99 a 61,82 mg g ⁻¹ ES
Ácido Criptoclorogênico	11,01 mg g ⁻¹ ES ^b	23,88 a 40,84 mg g ⁻¹ ES
Ácido Neoclorogênico	24,09 mg g ⁻¹ ES ^b	204,59 a 279,71 mg g ⁻¹ ES
Cafeína	3,15 a 29,3 mg g ⁻¹ ES ^c	17,64 a 25,07 mg g ⁻¹ ES
Rutina	12,4 mg g ⁻¹ ES ^d	8,81 a 42,40 mg g ⁻¹ ES
Teobromina	0,96 a 7,68 mg g ⁻¹ ES ^e	1,62 a 2,41 mg g ⁻¹ ES

^a (BALZAN et al., 2013; DE MORAIS et al., 2009; LUZ et al., 2016)

^b (BALZAN et al., 2013)

^c (BALZAN et al., 2013; DE MORAIS et al., 2009; LUZ et al., 2016)

^d (LUZ et al., 2016)

^e (BALZAN et al., 2013; DE MORAIS et al., 2009)

5.5 Ensaio de captação de radical livre – DPPH

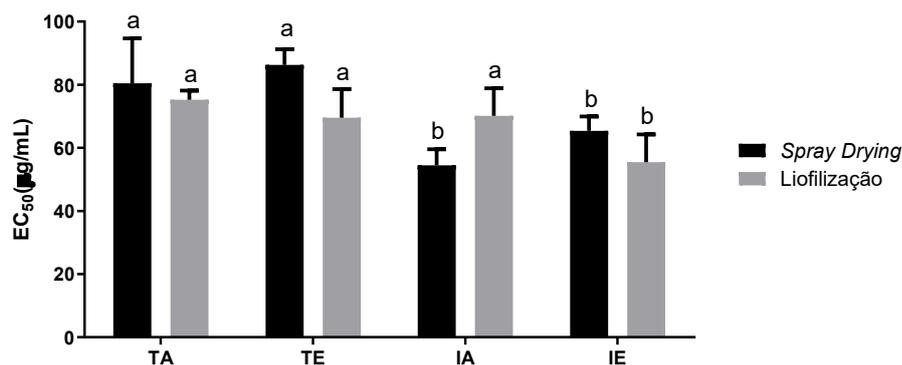
A atividade antioxidante das folhas de *Ilex paraguariensis* está bem estabelecida na literatura, de forma que temos inúmeros trabalhos que avaliaram essa atividade (CUELHO et al., 2018; MATEOS et al., 2018a; SANTOS et al., 2017). Dentre eles, alguns autores estudaram a cinética de reação para os extratos de *I. paraguariensis* e classificaram os extratos como cinética intermediária que levam até 30 minutos para que aconteça a reação antioxidante (DE OLIVEIRA et al., 2015).

A ampla investigação dessa atividade está relacionada à constituição química da planta, que também influencia na cinética da reação, a qual é rica em compostos fenólicos, substâncias cuja estrutura química lhes confere capacidade de neutralizar radicais livres e com isso apresentar atividade antioxidante. O presente estudo buscou monitorar a atividade de captação de radicais livres dos diferentes extratos preparados e assim estabelecer qual método de preparo forneceria um extrato com melhor atividade. Para isso, usamos o ensaio do radical DPPH para avaliar a captação de radicais livres dos extratos e das principais substâncias presentes. Os resultados podem ser observados nas Figura 10 e 11.

A CE₅₀ variou de 86,26 a 54,43 µg mL⁻¹ nos extratos testados, sendo o extrato IAS o que apresentou a menor CE₅₀ (54,43 ± 5,14 µg mL⁻¹) e o extrato TES a maior CE₅₀ (86,26 ± 4,99 µg mL⁻¹). Foi possível observar também que, com exceção do extrato IAL, os extratos preparados por infusão apresentaram diferença quando comparado a turboextração, independente do líquido extrator utilizado. Quando

avaliada a influência do processo de secagem na capacidade de captação de radicais livres dos diferentes extratos, é possível observar que para o extrato preparado por Infusão Aquosa (IA) não houve diferença significativa no valor da CE_{50} entre os diferentes tipos de secagem.

Figure 10 – Captação de radicais livres por DPPH expresso em CE_{50} . Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido pelo test Tukey; $p < 0,05$).



Legenda: TA (turboextração com água), TE (turboextração com hidroetanol 20 %), IA (infusão com água) e IE (infusão com hidroetanol 20%).

Na literatura, embora existam muitos estudos que avaliam a atividade antioxidante de *Ilex* pela metodologia do DPPH, cada estudo utilizou uma concentração de DPPH diferente e a proporção droga:solvente também variou, o que pode justificar a diferença dos valores encontrados na literatura e os obtidos em nosso trabalho. Dartora et al. (2011) usaram DPPH a 100 µM, gerando uma CE_{50} de 158 µg/mL. Já no trabalho de Santos et al. (2017) foi utilizada uma solução de DPPH a 60 µM, obtendo uma CE_{50} 51,70 µg/mL.

Corroborando o que tem sido descrito na literatura sobre a correlação entre o conteúdo fenólico e o potencial de captação de radicais livres de extratos vegetais, foi realizado a correlação entre o DPPH e o TFT, no qual encontrou-se uma forte correlação negativa ($r = -0,8491$; $p = 0,007$), o que indica que quanto maior o teor do TFT menor será o valor da CE_{50} da amostra (figura 11).

Buscando avaliar a relação dos compostos presentes nos extratos e a atividade antioxidante observada, os compostos foram testados isoladamente na concentração que se apresentavam no extrato com menor CE_{50} . Na figura 12, é possível observar que o ácido neoclorogênico foi capaz de reduzir 40% do DPPH, na

concentração de $11,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($32,82 \mu\text{M}$), enquanto os demais compostos não tiveram uma redução tão significativa, principalmente teobromina, cafeína e rutina.

Figura 11 – Correlação de Pearson entre os resultados obtidos nas análises de Teor de Fenólicos Totais por Folin e a atividade antioxidante por DPPH ($r = -0,8491$; $p = 0,007$)

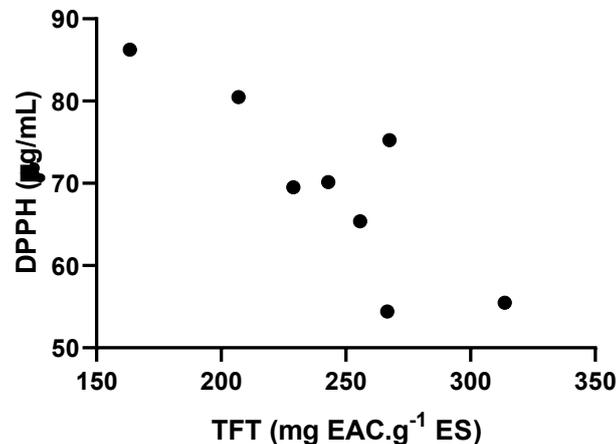
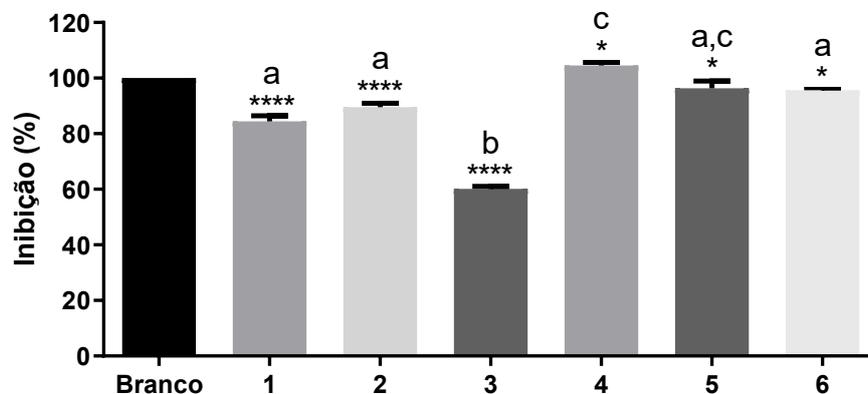


Figura 12 – Percentual de redução do radical DPPH dos compostos na que eles se encontram na CE_{50} de $54,43 \mu\text{g/mL}$. ($n=3$)

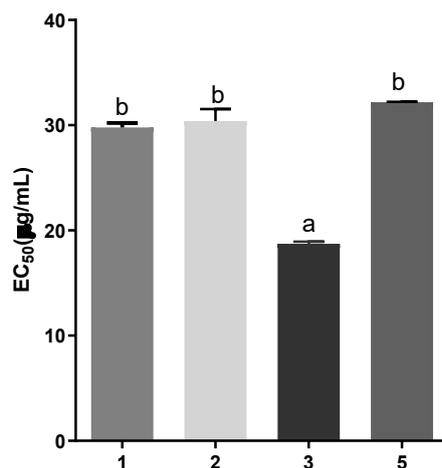


Note: 1) Ácido clorogênico – $8,8 \mu\text{M}$; 2) Ácido criptoclorogênico – $6,2 \mu\text{M}$; 3) Ácido neoclorogênico – $32,8 \mu\text{M}$; 4) Cafeína – $6,3 \mu\text{M}$; 5) Rutina – $3,3 \mu\text{M}$; 6) Teobromina – $8,9 \mu\text{M}$. Os * correspondem a diferença em relação ao branco. Diferentes letras correspondem a diferença no percentual de inibição dos compostos.

A seguir, foi determinado a CE_{50} dos compostos individualmente, conforme demonstrado na figura 13. Destes, a teobromina e cafeína não estão apresentados pois não mostraram atividade antioxidante pela metodologia de sequestro de radicais DPPH, nas concentrações testadas. Por outro lado, ácido neoclorogênico (2), ácido criptoclorogênico (3), ácido clorogênico (4) e rutina (6) apresentaram atividade significativa, com uma CE_{50} de $18,72$ ($52,83 \mu\text{M}$), $30,40$ ($85,80 \mu\text{M}$), $29,40$ ($85,80 \mu\text{M}$) e $32,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($52,71 \mu\text{M}$), respectivamente. Foi possível observar

ainda que há diferença no valor da CE_{50} entre os derivados do ácido clorogênico, de forma que o ácido neoclorogênico apresentou uma menor CE_{50} quando comparado aos demais compostos.

Figura 13 – Resultado do ensaio de captação de radicais livres dos compostos isolados por DPPH expresso em CE_{50} . Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, seguido por Teste de Tukey $p < 0,05$).



Note: 1) Ácido clorogênico; 2) Ácido criptoclorogênico; 3) Ácido neoclorogênico; 5) Rutina.

De acordo com a literatura, os metabólitos derivados do ácido clorogênico são constituídos por uma união entre o ácido caféico e o ácido quínico, o que permite a formação de três isômeros diferentes do ácido clorogênico, que se diferenciam devido a posição dos radicais ligados ao anel do ácido quínico e a estereoquímica da molécula (BAJKO et al., 2016). Essa diferença pode explicar a CE_{50} menor observada para o ácido neoclorogênico, embora os dados descritos na literatura (CE_{50} de $13,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o ácido clorogênico; $13,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o ácido criptoclorogênico e $13,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o ácido neoclorogênico), por Xu, Hu e Liu (2012), demonstrem que não há diferença entre as CE_{50} .

A rutina é um flavonoide glicosilado sobre a qual existem inúmeros trabalhos na literatura que trazem a avaliação do potencial antioxidante por inúmeras metodologias (WANG et al., 2021). Nesse sentido, a CE_{50} da rutina encontrada na literatura foi de $22 \mu\text{g mL}^{-1}$ na metodologia por DPPH (NGUYEN et al., 2013), o que pode ser explicado pela diferença na metodologia utilizada, uma vez que os autores

utilizaram a concentração do DPPH de 100 μM e os nossos valores são para a concentração de DPPH de 60 μM .

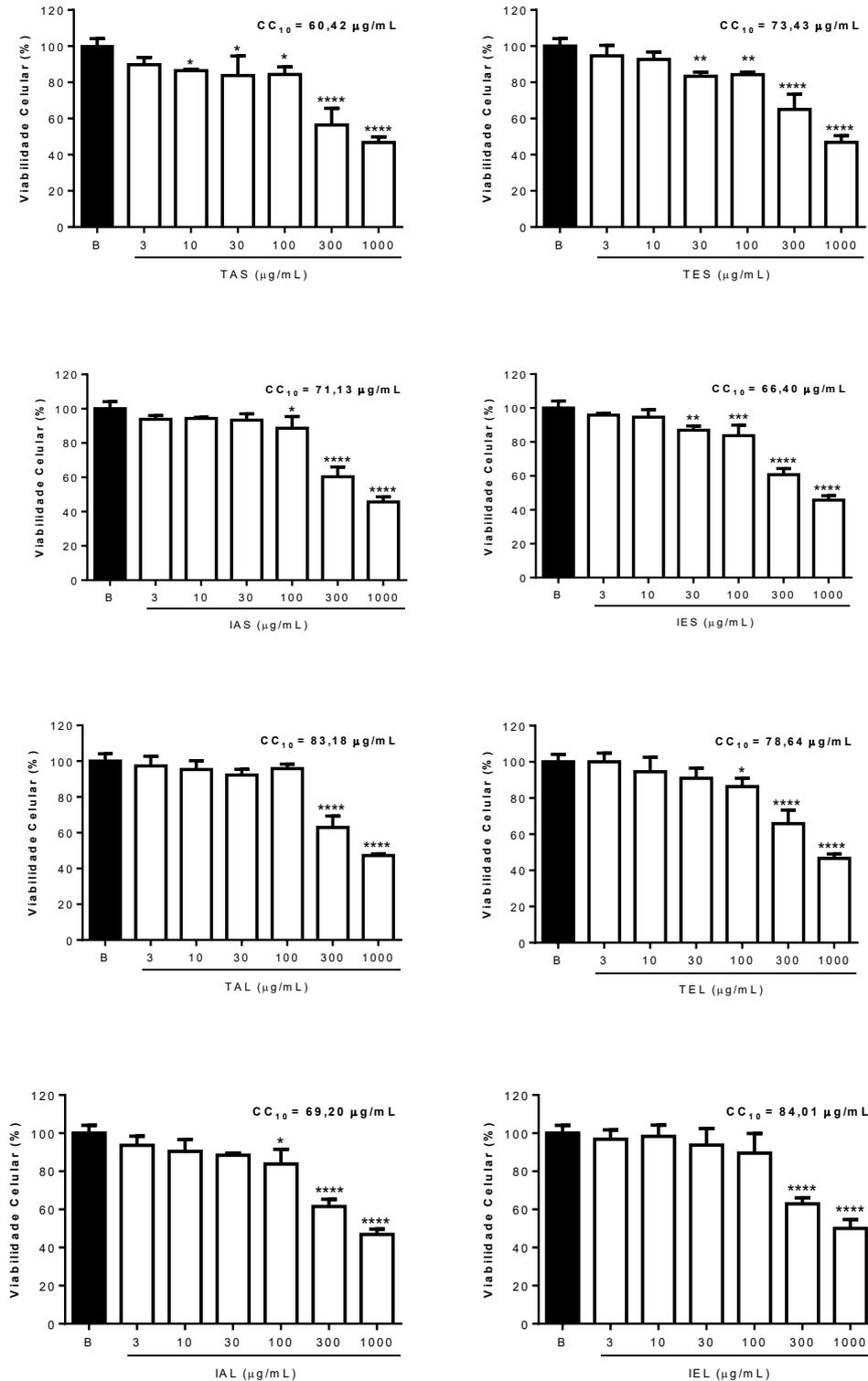
Na literatura, já foi descrito que a cafeína não apresenta atividade quando submetida ao ensaio por DPPH, confirmando o que foi encontrado neste trabalho (ANESINI et al., 2012). Em outro estudo, foi avaliada a atividade antioxidante das metilxantinas pelos métodos de ORAC, TBARS e Conjugação com dieno. Os autores observaram que em nenhuma das metodologias utilizadas as metilxantinas apresentaram atividade antioxidante (LEE, 2000).

5.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos e compostos *in vitro*

O efeito da citotoxicidade dos extratos de *Ilex* sobre os macrófagos RAW 264.7 foi determinado usando o ensaio do MTT. Para isso, as células foram incubadas com diferentes concentrações dos extratos (3-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Todos os extratos apresentaram citotoxicidade em concentrações superiores a 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo a menor CC_{10} do TAS de 60,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 14). Nesse contexto, todos os experimentos subsequentes foram realizados em concentrações não citotóxicas para a cultura de macrófago (3, 10 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

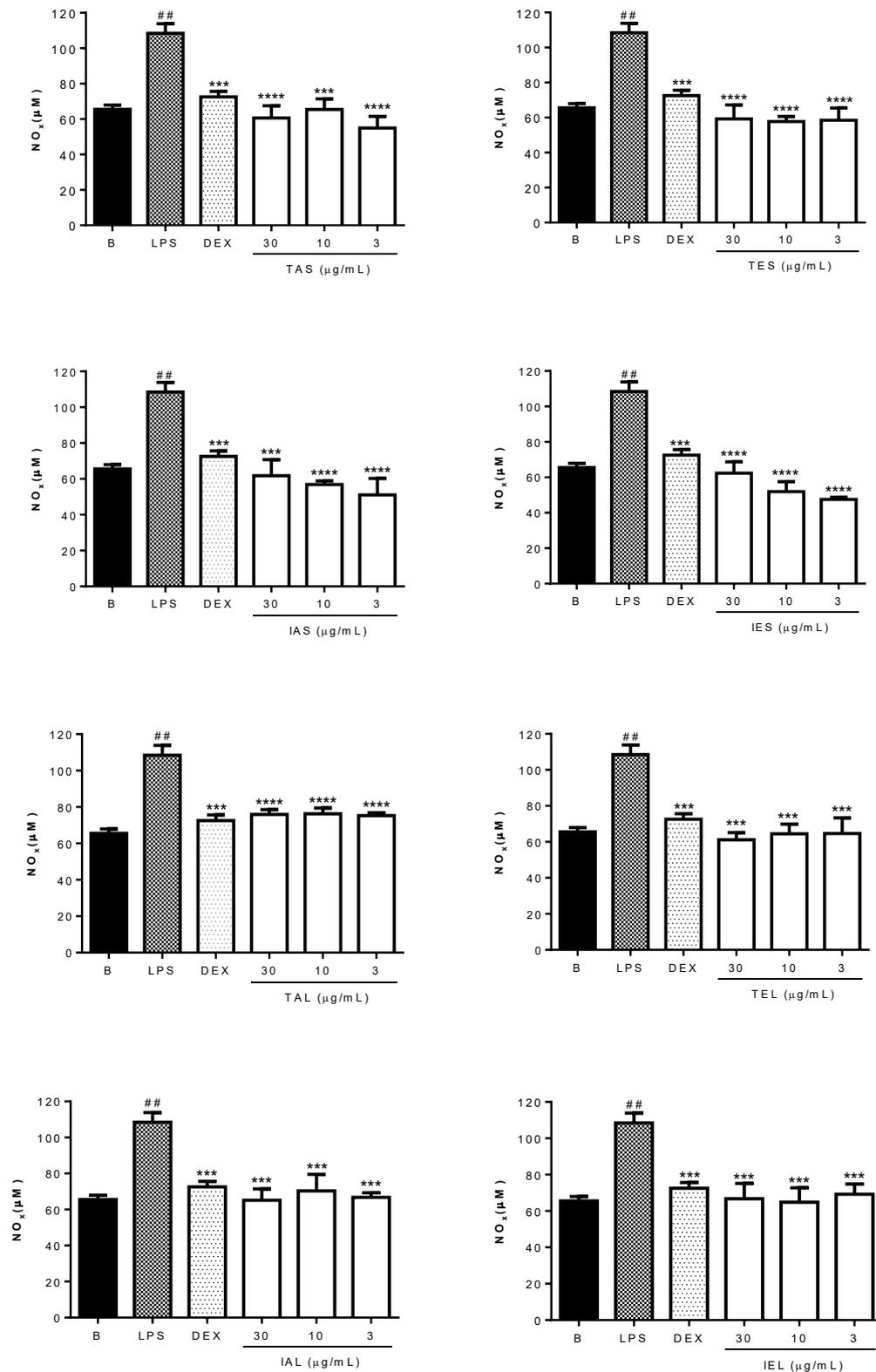
A secreção de NO_x (Figura 15) nos macrófagos tratados com LPS foi significativamente inibida pelos diferentes extratos de *Ilex* em todas as concentrações testadas (3, 10 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $p < 0,01$, 0,001 e 0,0001). Como esperado, a dexametasona (DEX) a 7 μM também reduziu os níveis de liberação do mediador pró-inflamatório dos macrófagos RAW 264.7 ($p < 0,001$). O percentual de inibição nos diferentes extratos variou de 25 a 53%, enquanto o extrato IES a 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou $53,57 \pm 1,25\%$ de inibição, seguido de IAS ($50,10 \pm 8,97\%$) na mesma concentração, com doseamento de NO_x de $47,13 \pm 1,65$ e $45,08 \pm 1,57 \mu\text{M}$ para o IES e IAS.

Figura 14 – Efeito citotóxico dos extratos de *Ilex* em células RAW 264.7.



Legenda: B: células não tratadas; Resultados expressos em média \pm desvio padrão; n=3; *P < 0.1, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 vs grupo B. TAS (turboextração com água + *spray drying*), TES (turboextração com hidroetanol 20% + *spray drying*), IAS (infusão com água + *spray drying*) e IES (infusão com hidroetanol 20% + *spray drying*), TAL (turboextração com água + liofilização), TEL (turboextração com hidroetanol 20% + liofilização), IAL (infusão com água + liofilização) e IEL (infusão com hidroetanol 20% + liofilização).

Figura 15 – Efeito dos extratos de *Ilex* nos níveis de LPS em células de macrófagos RAW 264.7 tratadas.



Legenda: B: células não tratadas; LPS: células tratadas com lipopolissacarídeo somente (1 µg/ml); DEX: células pré-tratadas com dexametasona (7 µM) antes da administração do LPS;

Resultados expressos em média \pm desvio padrão; n=3; *P < 0.1, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 vs grupo B. TAS (turboextração com água + *spray drying*), TES (turboextração com hidroetanol 20 % + *spray drying*), IAS (infusão com água + *spray drying*) e IES (infusão com hidroetanol 20 % + *spray drying*), TAL (turboextração com água + liofilização), TEL (turboextração com hidroetanol 20 % + liofilização), IAL (infusão com água + liofilização) e IEL (infusão com hidroetanol 20 % + liofilização).

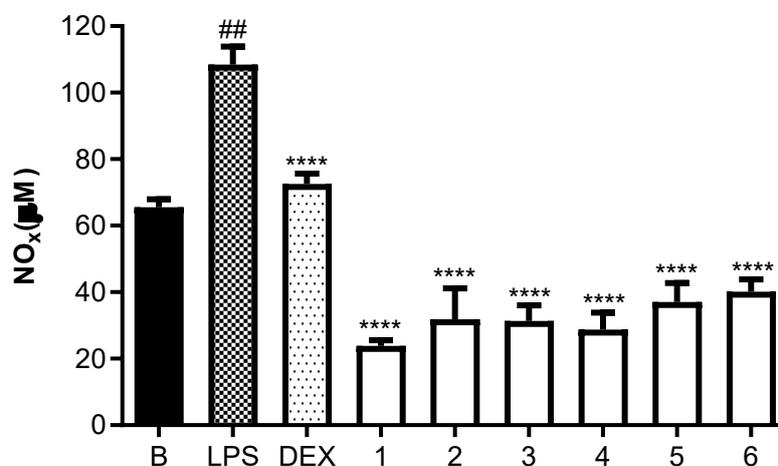
Schinella et al. (2014) avaliaram a atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato de *I. paraguariensis* preparado por infusão aquosa, com proporção droga:solvente de 5%, seco por liofilização. Já Luz et al. (2016) investigaram a atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato de *I. paraguariensis* preparado por turboextração, com proporção droga:solvente de 20 % (m/v), utilizando uma solução hidroetanólica a 20%, seco por liofilização. Em ambos os estudos o extrato de *I. paraguariensis* apresentou atividade anti-inflamatória, sendo que Schinella et al. (2014) avaliaram essa atividade conforme as características físicas da lesão, enquanto que Luz et al. (2016) avaliaram essa atividade através dos marcadores químicos ou citocinas envolvidas no processo inflamatório.

Na presente Tese foi avaliada a influência das diferentes formas de preparo dos extratos de *I. paraguariensis* sobre a secreção do óxido nítrico *in vitro*. Com base nos dados obtidos foi possível concluir que existe diferença na atividade anti-inflamatória conforme o método de secagem, visto que os extratos secos por aspersão foram mais ativos que os extratos liofilizados [IAS (NO_x de 45,8 μ M) vs IAL (NO_x de 66,76 μ M); IES (NO_x de 47,13 μ M) vs IEL (NO_x de 69,23 μ M); TAS (54,91 μ M) vs TAL (75,20 μ M); TES (58,47 μ M) vs TEL (64,68 μ M)], especialmente na concentração mais baixa (3 μ g mL⁻¹).

Com base nos resultados da inibição de NO_x dos diferentes extratos de *I. paraguariensis*, de suas atividades de captação de radicais livres, e também nos teores dos marcadores químicos presentes nos extratos, o extrato IAS foi selecionado para investigações adicionais de seu potencial na inibição de NO_x.

Os experimentos de inibição da secreção de NO_x (Figura 16) nos macrófagos tratados com LPS foi significativamente inibida por todos os compostos testados, sendo melhor que o padrão dexametasona, na concentração presente no extrato IAS (p < 0,0001). A teobromina foi o composto mais potente (48,18 μ M e potência de 212 vezes dexametasona) entre os compostos isolados testados (tabela 6).

Figura 16 – Efeito dos marcadores químicos nos níveis de LPS em células de macrófagos RAW 264.7 tratadas com LPS.



Legenda: B: células não tratadas; LPS: células tratadas com lipopolissacarídeo somente (1 µg/ml); DEX: células pré-tratadas com dexametasona (7 µM) antes da administração do LPS; Resultados expressos em média ± desvio padrão; n=3; *P < 0.1, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 vs grupo B. 1) Ácido clorogênico; 2) Ácido criptoclorogênico; 3) Ácido neoclorogênico; 4) Cafeína; 5) Rutina; 6) Teobromina.

Tabela 6 – Efeito dos compostos detectados no extrato IAS de *Ilex* sobre a concentração de NOX em células de macrófagos RAW264.7.

Compostos	Concentração (µM)	Potência vs dexta
Teobromina (1)	0,033	212,12
Ácido Neoclorogênico (2)	1,97	3,55
Ácido Criptoclorogênico (3)	0,353	19,83
Ácido Clorogênico (4)	0,565	12,39
Cafeína (5)	0,515	13,59
Rutina (6)	0,164	42,68

Luz et al. (2016) demonstraram atividade anti-inflamatória de três compostos encontrados em *I. paraguariensis* [ácido clorogênico (Dose: 0,01 a 1 mg Kg⁻¹), cafeína (Dose: 0,1 a 5 mg Kg⁻¹) e rutina (Dose: 0,01 a 1 mg Kg⁻¹)] através do modelo murino de pleurisia induzido por carragenina. Assim como relatado para o extrato, os compostos também demonstraram ter atividade anti-inflamatória, por atenuar a ativação do NF-KB e conseqüentemente reduzir o acúmulo de neutrófilos e edema no espaço pleural.

Já Segheto et al. (2018) descreveram a atividade anti-inflamatória para o ácido neoclorogênico (5-CQA; Dose: 0,5 e 1,0 mg/orelha) em modelo de edema de

orelha. Nesse estudo o composto apresentou atividade anti-inflamatória por atuar reduzindo o edema e a migração dos leucócitos.

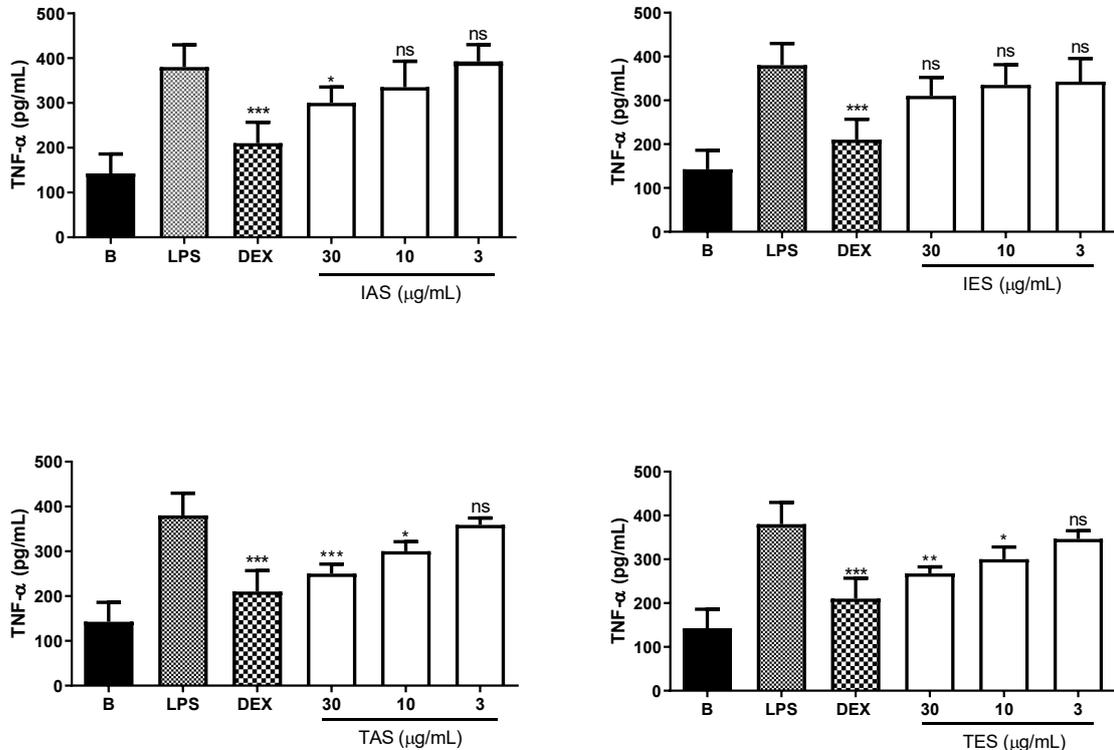
Na literatura existem poucos trabalhos sobre a atividade anti-inflamatória da teobromina. Um estudo avaliou o efeito da teobromina no tratamento de osteoartrite *in vitro*, pelos mecanismos do estresse oxidativo induzido pela IL-1 β , resposta inflamatória e degradação do colágeno tipo II em condrócitos humanos. O estudo conclui que a teobromina suprimiu a ativação da via NF- κ B mediada por IL-1 β , conseqüentemente há uma redução na produção dos mediadores da inflamação como a COX-2 e a iNOS, que são ativados com a ativação da NF- κ B (GU et al., 2020).

Dando continuidade ao estudo, avaliou-se o efeito dos extratos secos por aspersão e compostos (presentes no extrato IAS na menor dose testada 3 μ g mL⁻¹) sobre a secreção de TNF- α .

O TNF- α está relacionado a inúmeros processos biológicos, sendo o mais importante na indução da inflamação em diversas patologias. Ele é uma das citocinas inflamatórias mais importantes sendo produzida pelos macrófagos/monócitos durante a inflamação aguda, e responsável por uma gama de eventos de sinalização dentro das células podendo levar à necrose ou apoptose (IDRISS, HAITHAM T.; NAISMITH, 2000).

A secreção do ensaio de TNF- α foi significativamente inibida pelos extratos IAS, TAS e TES a 30 μ g.mL⁻¹ (Figura 17). A secreção de TNF- α foi significativamente diminuída por IAS em doses de 30 μ g.mL⁻¹ (% de inibição: 83,33 \pm 4,01) ($p < 0,05$), 10 μ g.mL⁻¹ (% de inibição: 75,00 \pm 1,86) ($p > 0,05$) e 3 μ g.mL⁻¹ (% de inibição: 107,89 \pm 4,55) ($p > 0,05$), bem como por IES nas doses de 30 μ g.mL⁻¹ (% de inibição: 86,84 \pm 4,55) ($p > 0,05$), 10 μ g.mL⁻¹ (% de inibição: 88,15 \pm 5,58) ($p > 0,05$) e 3 μ g.mL⁻¹ (% de inibição: 78,94 \pm 7,44) ($p > 0,05$), bem como por TAS em doses de 30 μ g.mL⁻¹ (% de inibição: 63,15 \pm 2,63) ($p < 0,005$), 10 μ g.mL⁻¹ (% de inibição: 76,31 \pm 2,63) ($p > 0,05$) e 3 μ g.mL⁻¹ (% de inibição: 92,54 \pm 2,00) ($p > 0,05$), bem como por TES em doses de 30 μ g.mL⁻¹ (% de inibição: 67,10 \pm 1,86) ($p < 0,005$), 10 μ g.mL⁻¹ (% de inibição: 75,43 \pm 3,03) ($p > 0,05$) e 3 μ g.mL⁻¹ (% de inibição: 93,42 \pm 2,27) ($p > 0,05$). Como esperado, o LPS aumentou os níveis de secreção de TNF- α , enquanto a dexametasona (DEX), a 7 μ M, reduziu os níveis desse mediador pró-inflamatório (% de inibição: 23,92 \pm 5,05) ($p < 0,0001$).

Figura 17 - Efeitos dos extratos nos níveis de secreção de TNF- α em macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS. B: células não tratadas; LPS: células tratadas apenas com lipopolissacarídeo 1 $\mu\text{g/ml}$; DEX: células pré-tratadas com dexametasona (7 μM) antes da administração de LPS. Os resultados foram expressos como média \pm SEM; n=3. (A) Extratos. (B) Compostos.

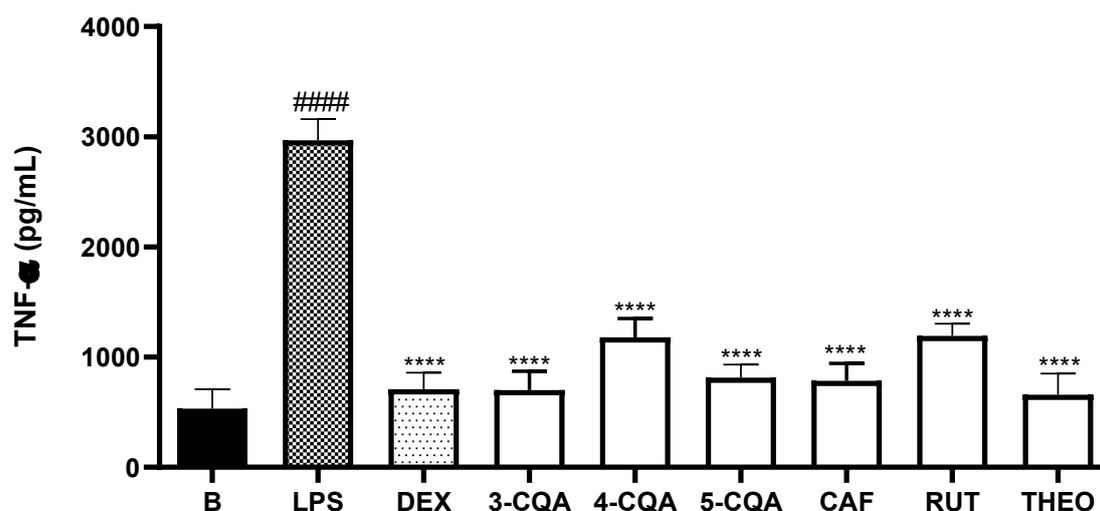


N: (A) Extratos: * $p < 0,05$ vs grupo B ou ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$. IAS (infusão aquosa seco por *Spray Drier*), IES (infusão etanólica seco por *Spray Drier*), TAS (turbo extração aquosa seco por *Spray Drier*) e TES (turbo extração etanólica seco por *Spray Drier*).

Na avaliação de forma isolada, os compostos foram testados, separadamente, nas concentrações que se encontravam no extrato IAS na dose de 3 $\mu\text{g/mL}$. Nesse sentido, a secreção do ensaio de TNF- α foi significativamente inibida por todos os marcadores químicos presentes no extrato IAS (Figura 18). A secreção de TNF- α foi significativamente diminuída pelo 3-CQA a 0,56 μM (% de inibição: $23,58 \pm 5,79$) ($p < 0,0001$), 4-CQA a 0,35 μM (% de inibição: $39,76 \pm 5,73$) ($p < 0,0001$), 5-CQA a 1,97 μM (% de inibição: $27,46 \pm 3,98$) ($p < 0,0001$), CAF a 0,52 μM (% de inibição: $26,45 \pm 5,34$) ($p < 0,0001$), RUT a 0,16 μM (% de inibição: $40,18 \pm 3,70$) ($p < 0,0001$) e THEO testado a 0,033 μM (% de inibição: $22,15 \pm 6,49$) ($p < 0,0001$).

Na literatura existem alguns estudos que avaliaram a ação dos extratos e compostos de *Ilex* na capacidade de suprimir a secreção de TNF- α em modelos animais (CARMO et al., 2013; LANZETTI et al., 2008; LUZ et al., 2016).

Figura 18 - Efeitos dos compostos químicos nos níveis de secreção de TNF- α em macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS. B: células não tratadas; LPS: células tratadas apenas com lipopolissacarídeo 1 μ g/ml; DEX: células pré-tratadas com dexametasona (7 μ M) antes da administração de LPS. Os resultados foram expressos como média \pm SEM; n=3. (A) Extratos. (B) Compostos.



N: Compostos: ####p < 0,0001 vs grupo LPS; ****p < 0,01 vs grupo B. (THEO) teobromina, (NCA) ácido neoclorogênico, (CCA) ácido criptoclorogênico, (CGA) ácido clorogênico, (CAF) cafeína e (RUT) rutina.

Dentre estes estudos, Lanzetti e colaboradores (2008) avaliaram o efeito do extrato aquoso preparado por infusão na prevenção do desenvolvimento do processo inflamatório pulmonar em ratos expostos a fumaça de cigarro, sendo a dose utilizada de 150 mg/Kg. Os autores observaram que o extrato foi capaz de reduzir o processo inflamatório pulmonar por reduzir o influxo de macrófagos e neutrófilos alveolar, redução do dano oxidativo e isso indica uma ação sobre a peroxidação lipídica, redução dos níveis de TNF- α e redução das metaloproteinase-9.

Em alguns estudos o foco não é a avaliação do processo anti-inflamatório, mas das citocinas inflamatórias que podem estar envolvidas com outros processos bioquímicos do organismo, como acontece em um trabalho que avaliou a influência do consumo da erva-mate na modulação da produção das citocinas pro-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α e IL-10) em células da medula óssea de ratos sob

dieta hipercalórica. Os autores observaram que o extrato de *Ilex* reduziu a produção de TNF- α em células da medula óssea (CARMO et al., 2013).

No estudo de Luz e colaboradores (2016) foi avaliado o potencial anti-inflamatório do extrato preparado por turboextração (dose: 25 mg/kg) e os compostos, ácido clorogênico (dose: 0,01 mg/Kg), cafeína (dose: 5 mg/Kg) e rutina (dose: 1 mg/Kg) em modelo de pleurisia induzido por carragenina *in vivo*. Os autores observaram um percentual de inibição de 23,20% para o extrato, e de 39,24; 40,75 e 28,56% respectivamente para os compostos, enquanto a dexametasona apresentou um percentual de inibição de 58,69%.

Outro parâmetro avaliado em nosso trabalho foi secreção de IL-6 em macrófagos RAW 264.7 A IL-6 está envolvida na regulação imune e inflamatória durante a hematopoiese, metabolismo ósseo, e desenvolvimento embrionário e fetal dos sistemas cardiovasculares e neuronais, tendo assim uma importância patológica e clínica, pois exerce papel como uma citocina pró-inflamatória, o que faz dela um importante alvo terapêutico (PRAIRIE et al., 2021).

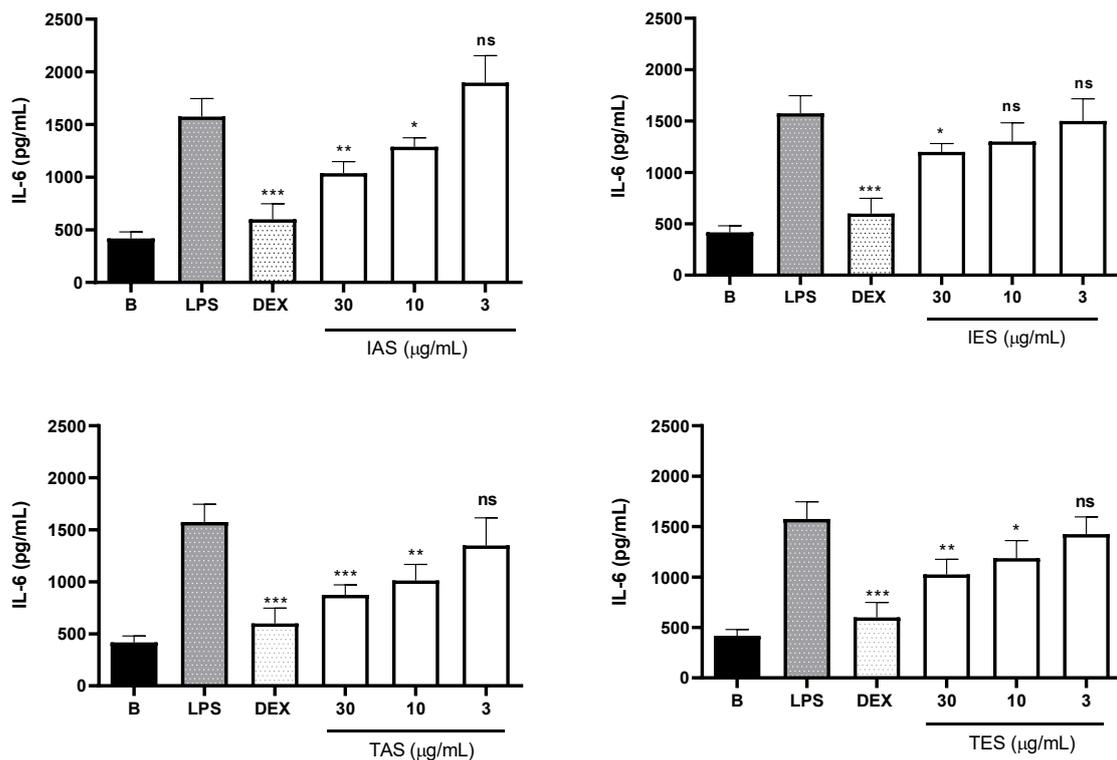
Com isso, avaliamos a secreção da IL-6 na presença dos extratos preparados por Spray Drier e foi possível observar que houve uma significativa inibição na secreção de IL-6 pelos extratos IAS, TAS e TES nas doses de 30 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 19). A secreção de IL-6 também foi significativamente diminuída por IAS em doses de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (% de inibição: $62,43 \pm 1,83$) ($p < 0,05$), 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (% de inibição: $83,59 \pm 4,84$) ($p < 0,05$) e 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (% de inibição: $126,77 \pm 12,70$) ($p > 0,05$), bem como por IES nas doses de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (% de inibição: $78,30 \pm 3,66$) ($p < 0,05$), 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (% de inibição: $86,77 \pm 9,69$) ($p > 0,05$) e 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (% de inibição: $88,88 \pm 6,35$) ($p > 0,05$), bem como por TAS em doses de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (% de inibição: $52,91 \pm 3,66$) ($p < 0,005$), 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (% de inibição: $68,78 \pm 4,84$) ($p < 0,05$) e 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (% de inibição: $93,12 \pm 9,69$) ($p > 0,05$), bem como por TES em doses de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (% de inibição: $61,37 \pm 7,33$) ($p < 0,005$), 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (% de inibição: $70,89 \pm 7,98$) ($p < 0,05$) e 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (% inibição: $95,23 \pm 6,34$) ($p > 0,05$). O LPS aumentou os níveis de secreção de IL-6, enquanto a dexametasona (DEX), a 7 μM , reduziu os níveis desse mediador pró-inflamatório (% de inibição: $36,50 \pm 6,14$) ($p < 0,0005$).

No estudo de Carmo e colaboradores (2013) os autores avaliaram o consumo da erva-mate (Dose: 1g/Kg/dia) na modulação da produção das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α e IL-10) das células da medula óssea em ratos em

dieta hipercalórica. Os autores observaram que o extrato de *Ilex* reduziu a produção de IL-6 em células da medula óssea.

Anteriormente, Luz et al. (2016) também avaliaram as concentrações de IL-6 em camundongos tratados com extrato e compostos isolados (3CQA e RUT) de *I. paraguariensis*. Assim como verificado em nosso estudo, o extrato produzido por turboextração, no trabalho da Luz e colaboradores (2016) reduziu a concentração da IL-6 em 91,63% assim como da rutina (64,1%). O ácido clorogênico reduziu os níveis de IL-6 de forma intensa, ficando abaixo dos níveis de detecção do Kit. Já a cafeína não foi capaz de reduzir os níveis da IL-6.

Figura 19 - Efeitos dos extratos nos níveis de secreção de IL-6 em macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS. B: células não tratadas; LPS: células tratadas apenas com lipopolissacarídeo 1 µg/ml; DEX: células pré-tratadas com dexametasona (7 µM) antes da administração de LPS. Os resultados foram expressos como média ± SEM; n=3.



N: *p < 0,05 vs grupo B ou ** p < 0,005 ou *** p < 0,0005. IA (infusão aquosa), IE (infusão etanólica), TA (turbo extração aquosa) e TE (turbo extração etanólica).

6 CONCLUSÕES

O material vegetal cumpriu o especificado pela farmacopeia brasileira, bem como seguiu o que já está descrito em trabalhos prévios.

O teor de compostos fenólicos preparados por infusão aquosa foram os que apresentaram os maiores teores de fenólicos totais, independente da forma de secagem quando avaliado por Folin Ciocalteu. Já por Fast Blue BB foi possível observar que houve diferença quando comparado os métodos de preparo (infusão vs turboextração), independente do líquido extrator e método de secagem.

Os extratos obtidos foram avaliados por HPLC; o extrato IAL apresentou o maior teor para o marcador teobromina, enquanto que para o ácido neoclorogênico, ácido clorogênico e cafeína o extrato que apresentou os maiores teores foi o TEL. Já para o ácido criptoclorogênico o extrato com o maior teor foi o IAS. O maior teor de rutina foi observado no extrato IEL.

Na avaliação da captação de radicais livres por DPPH o método de extração influenciou os valores de EC_{50} de forma que o extrato com menor EC_{50} foi o IAS ($EC_{50} = 54,43 \pm 5,14 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Os compostos majoritários presentes foram avaliados quanto a atividade de captação de radicais livres, sendo o ácido neoclorogênico o composto que apresentou a menor EC_{50} ($18,72 \mu\text{g mL}^{-1}$) no ensaio de DPPH.

A atividade anti-inflamatória foi avaliada *in vitro* através dos parâmetros de secreção de NOx (extratos e compostos), TNF- α (extratos secos por Spray Drier e compostos) e IL-6 (extratos secos por Spray Drier). Na secreção do NOx os extratos IAS e IES apresentaram os melhores resultados.

Na secreção do TNF- α , o método de preparo dos extratos influenciou na redução da secreção do TNF- α , sendo que os extratos preparados por turboextração (TAS e TES) mostraram os melhores resultados. Os compostos também foram capazes de reduzir a secreção de TNF- α , tendo destaque o ácido clorogênico e a teobromina.

Por fim, na secreção do IL-6, o método de extração não influenciou na redução da secreção da IL-6, sendo que o IAS e TAS apresentaram os maiores percentuais de inibição na maior concentração testada ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$).

De acordo com os resultados obtidos em nosso trabalho, elegemos o extrato preparado por infusão aquosa e seco por Spray drying para continuidade dos

estudos uma vez que apresentou os melhores resultados de atividade anti-inflamatória, captação de radicais livres e teor fenólicos totais.

Todos os principais marcadores químicos mostraram uma forte atividade de inibição de NOX e TNF- α , sugerindo que as atividades aqui detectadas estejam relacionadas com a presença dessas substâncias nos extratos de *I. paraguariensis*, as quais podem estar agindo de forma sinérgica.

REFERÊNCIAS

- ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, p. 299–304, 2012.
- ANSARI, M. Y.; AHMAD, N.; HAQQI, T. M. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 129, p. 1–9, 2020.
- ANVISA, A. N. DE V. S. **Consulta Bulário Eletrônico ANVISA**. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/>>.
- ARRUDA-SILVA, F. et al. Polygala molluginifolia A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF-κB activation. **International Immunopharmacology**, v. 19, p. 334–341, 2014.
- ASSEGEHEGN, G. et al. The Importance of Understanding the Freezing Step and Its Impact on Freeze-Drying Process Performance. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, p. 1378–1395, 2019.
- BAJKO, E. et al. 5-O-Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 471–479, 2016.
- BRITO, V. G. B. et al. Soluble yerba mate (*Ilex Paraguariensis*) extract enhances in vitro osteoblastic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 244, p. 1–9, 2019.
- BALZAN, S. et al. Lipid-lowering effects of standardized extracts of *Ilex paraguariensis* in high-fat-diet rats. **Fitoterapia**, v. 86, p. 115–122, 2013.
- BARNES, P. New drugs for asthma. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 33, p. 685–694, 9 out. 2012.
- BENINCÁ, C. **Estabilidade Do Ácido 5-O-Cafeoilquínico: Relação Entre a Cinética Química E O Processamento De Erva-Mate**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2009.
- BERINGHS, A. O. et al. Technological development of *Cecropia glaziovii* extract pellets by extrusion-spheronization. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 160–168, 2013.
- BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C. The G115 standardized ginseng extract: an example for safety, efficacy, and quality of an herbal medicine. **Journal of Ginseng Research**, v. 44, p. 179–193, 2020.
- BLUM-SILVA, C. H. et al. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, p. 1–6, 2015.
- BLUM-SILVA, C. H. et al. Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of *Ilex paraguariensis* leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS. **Data in Brief**, v. 8, p. 295–299, 2016.
- BOAVENTURA, B. C. B. et al. Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1057–1064, 2013.
- BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378–384, 2011.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1 jan. 1995.
- BRASIL. **RDC nº 166 de 24 de julho de 2017: Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e**

dá outras providências. 2017

BRAVO, L. et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. **Fitoterapia**, v. 92, p. 219–229, 2014.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393–405, 2007.

CARMO, L. S. et al. The Effects of Yerba Maté (*Ilex Paraguariensis*) Consumption on IL-1 , IL-6 , TNF-alfa and IL-10 Production by Bone Marrow Cells in Wistar Rats fed a High-Fat Diet. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 83, p. 26–35, 2013.

COELHO, G. C. et al. Quantification of saponins in extractive solution of mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Journal of medicinal food**, v. 13, p. 439–443, 2010.

CONTE, R. et al. Recent advances in nanoparticle-mediated delivery of anti-inflammatory phytochemicals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 1–23, 2017.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, p. 3670–3695, 2013.

CUELHO, C. H. F. et al. Topical formulation containing *Ilex Paraguariensis* extract increases metalloproteinases and myeloperoxidase activities in mice exposed to UVB radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 189, p. 95–103, 2018.

DARTORA, N. et al. UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1453–1461, 2011.

DE LIMA, M. E. et al. *Ilex paraguariensis* extracts reduce blood glucose, peripheral neuropathy and oxidative damage in male mice exposed to streptozotocin. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 9–16, 2018.

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

DE MORAIS, E. C. et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8316–8324, 2009.

DE OLIVEIRA, C. C. et al. Statistical approaches to assess the association between phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of *Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis* teas. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, p. 1456–1473, 2015.

DE RESENDE, P. E. et al. Influence of crude extract and bioactive fractions of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on the Wistar rat lipid metabolism. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 440–451, 2015.

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

DELADINO, L. et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 126–134, 2008.

DELADINO, L. et al. Major Phenolics in Yerba Mate Extracts (*Ilex paraguariensis*) and Their Contribution to the Total Antioxidant Capacity. **Food and Nutrition Sciences**, v. 04, p. 154–162, 2013.

- DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.
- FELTRIN, C. et al. Effects of Standardized Medicinal Plant Extracts on Drug Metabolism Mediated by CYP3A4 and CYP2D6 Enzymes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 33, p. 2408–2419, 2020.
- FERNANDES, C. E. F. et al. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 139–146, 2016.
- FILIP, R. et al. Mate substitutes or adulterants: Study of xanthine content. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 129–131, 1998.
- FILIP, R. et al. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 774–778, 2001.
- GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The positive effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) in obesity. **Nutrients**, v. 7, p. 730–750, 2015.
- GAN, R. Y. et al. Health Benefits of Bioactive Compounds from the Genus *Ilex*, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. **Nutrients**, v. 10, p. 1682–1699, 2018.
- GNOATTO, S. C. B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 723–726, 2005.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS Leonardo Gobbo-Neto e Norberto P. Lopes*. **Quim. Nova**, v. 30, p. 374–381, 2007.
- GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; SELIGMANN, O. A new saponin from mate, *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1367–1370, 1989.
- GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131–138, 1982.
- GU, R. et al. Theobromine mitigates IL-1 β -induced oxidative stress , in fl ammatory response , and degradation of type II collagen in human chondrocytes. **International Immunopharmacology**, v. 82, p. 1-8, 2020.
- HALIM, M.; HALIM, A. The effects of in fl ammation , aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes). **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, p. 1165–1172, 2019.
- HALLIWELL, B. Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases Therapeutic Implications for Antioxidant Treatment. **Drugs & Aging**, v. 18, p. 685–716, 2001.
- HAO, D. et al. Research progress in the phytochemistry and biology of *Ilex* pharmaceutical resources. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, n. 1, p. 8–19, 2013.
- HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, 2007.
- HENG, M. Y. et al. Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 1–10, 2013.
- HOSNY, E. N. et al. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory efficacy of caffeine in rat model of neurotoxicity. **Nutritional Neuroscience**, v. 22, p. 789–796, 2019.

HWANG, S. J. et al. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide- stimulated RAW 264.7 cells. **Inflammation Research**, v. 63, p. 81–90, 2014.

ICH - GUIDELINE HT. **VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)**. International Conference on Harmonization (2005). **Anais...**2005Disponível em:

<https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2020

IDRISS, HAITHAM T.; NAISMITH, J. H. TNF α and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship (s). **MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE**, v. 50, p. 184–195, 2000.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, p. 287–293, 2018.

KAMM, M. A. Review article: biological drugs in Crohn's disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, p. 80–89, 2006.

KANG, C. H. et al. Caffeine suppresses lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells by suppressing Akt-mediated NF- κ B activation and ERK phosphorylation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 4270–4276, 2012.

KARADENIZ, F. et al. 3,5-dicafeoyl-epi-quinic acid from *Atriplex gmelinii* enhances the osteoblast differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells via Wnt/BMP signaling and suppresses adipocyte differentiation via AMPK activation. **Phytomedicine**, v. 71, p. 1-11, 2020.

KHOGTA, S. et al. Herbal nano-formulations for topical delivery. **Journal of Herbal Medicine**, v. 20, p. 1-9, 2020.

KISHORE, N. et al. Human disorders associated with inflammation and the evolving role of natural products to overcome. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 179, p. 272–309, 2019.

KRAEMER, K. H. et al. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1119–1122, 1996.

KUMAR, V. Inflammation research sails through the sea of immunology to reach immunometabolism. **International Immunopharmacology**, v. 73, p. 128–145, 2019.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 04, p. 17–31, 2013.

LANZETTI, M. et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v. 24, p. 375–381, 2008.

LEE, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. **Clinica Chimica Acta**, v. 295, p. 141–154, 2000.

LIMA, N. D. S. et al. Effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) treatment on leptin resistance and inflammatory parameters in obese rats primed by early weaning. **Life Sciences**, v. 115, p. 29–35, 2014.

LIU, L.; LI, Y. Chondroprotective and anti-nociceptive effects of caffeoylquinic acid in osteoarthritis by downregulating catabolic activity and oxidative damage in chondrocytes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 93, p. 985–994, 2017.

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

- MARCHI, R. C. et al. Chemical implications and considerations on techniques used to assess the in vitro antioxidant activity of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 451, p. 1-26, 2022.
- MARTINET, A. et al. NMR and LC-MSn characterisation of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemical Analysis**, v. 12, p. 48–52, 2001.
- MATEOS, R. et al. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 241, p. 232–241, 2018.
- MEDINA, M. B. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1565–1571, 2011a.
- MEDINA, M. B. Simple and Rapid Method for the Analysis of Phenolic Compounds in Beverages and Grains. **J. Agric. Food Chem**, v. 59, p. 1565–1571, 2011b.
- MESQUITA, M. et al. Chimarrão, terere and mate-tea in legitimate technology modes of Chimarr preparation and consume: A comparative study of chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-anxiety properties of the mostly consumed beverages of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 279, p. 1-11, 2021.
- MING DI, Y. et al. Current and Future Therapeutic Targets of Rheumatoid Arthritis. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 92–120, 2011.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- MOURA, F. A. et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? **Redox Biology**, v. 6, p. 617–639, 2015.
- MUÑOZ-CULLA, M. et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) inhibits lymphocyte activation in vitro. **Food and Function**, v. 7, p. 4556–4563, 2016.
- NAFIU, M. O. et al. Preparation, Standardization, and Quality Control of Medicinal Plants in Africa. In: VICTOR KUETE (Ed.). **Medicinal Spices and Vegetables from Africa**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 171–204.
- NAIR, P.; AZIZ-UR-REHMAN, A.; RADFORD, K. Therapeutic implications of “neutrophilic asthma”. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 21, p. 33–38, 11 jan. 2015.
- NAKAGOME, K.; MATSUSHITA, S.; NAGATA, M. Neutrophilic Inflammation in Severe Asthma. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 158, p. 96–102, 2012.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, p. 770-803, 2020.
- NGUYEN, T. A. et al. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin / cyclodextrin inclusion complex. **Food Chemistry**, v. 136, p. 186–192, 2013.
- NOWACKI, L. C. et al. *Ilex paraguariensis* extract as an alternative to pain medications. v. 71, p. 383–398, 2021.
- OLIVEIRA, G. A. R. Otimização de Processos de Extração. **Revista Processos Químicos**, v. 8, p. 33-41, 2014.
- OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: Bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 641–650, 2010.

- 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. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, p. 178–185, 2008.
- PERERA, H. D. S. M. et al. In vitro anti-inflammatory and anti-oxidant activities of Sri Lankan medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 610–620, 2016.
- PETRILLI, A. A. et al. Effect of Chocolate and Yerba Mate Phenolic Compounds on Inflammatory and Oxidative Biomarkers in HIV / AIDS Individuals. **Nutrients**, v. 8, p. 132–146, 2016.
- PIMENTEL, G. D. et al. Yerba mate extract (Ilex paraguariensis) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 809–818, 2013.
- PRAIRIE, E. et al. The determinant role of IL-6 in the establishment of inflammation leading to spontaneous preterm birth. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 59, p. 118–130, 2021.
- PUANGPRAPHANT, S. et al. Yerba mate tea and mate saponins prevented azoxymethane-induced inflammation of rat colon through suppression of NF- κ B p65ser311 signaling via I κ B- α and GSK-3 β reduced phosphorylation. **BioFactors**, v. 39, p. 430–440, 2013.
- RAMALLO, L. A.; LOVERA, N. N.; SCHMALKO, M. E. Effect of the application of intermittent drying on Ilex paraguariensis quality and drying kinetics. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 188–193, 2010.
- REGINATTO, F. H. et al. Methylxanthines Accumulation in Ilex Species - Caffeine and Theobromine in Erva-Mate (Ilex paraguariensis) and Other Ilex Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, p. 443–446, 1999.
- ROCHA, D. S. et al. Effect of yerba mate (Ilex paraguariensis) extract on the metabolism of diabetic rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 105, p. 370–376, 2018.
- ROCHA, D. S. et al. Adipose tissue of female Wistar rats respond to Ilex paraguariensis treatment after ovariectomy surgery. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 11, p. 238–248, 2020.
- SANTOS, A. F. et al. Chemical, biological, and pharmacological evaluation of the aqueous extract of Ilex paraguariensis, St. Hill. (Aquifoliaceae). **Research, Society and Development**, v. 11, p. 1–18, 2022.
- SANTOS, L. P. DOS. **DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE Ilex paraguariensis**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.
- SANTOS, L. P. DOS et al. Antioxidant polymeric nanoparticles containing standardized extract of Ilex paraguariensis A. St.-Hil. for topical use. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 738–747, 2017.
- SANTOS, E. C. S. et al. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of Ilex paraguariensis extracts in mice. **Neuroscience**, v. 292, p. 13–21, 2015.
- SCHINELLA, G. et al. An aqueous extract of Ilex paraguariensis reduces carrageenan-induced edema and inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in animal models of inflammation. **Planta Medica**, v. 80, p. 961–968, 2014.
- SCIARRONE, D. et al. Quali-quantitative characterization of the volatile constituents in Cordia verbenacea D.C. essential oil exploiting advanced chromatographic approaches and nuclear magnetic resonance analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1524, p. 246–253, 2017.
- SEGHETO, L. et al. Antioxidant extracts of coffee leaves and its active ingredient 5-caffeoylquinic acid reduce chemically-induced inflammation in mice. **Industrial Crops and Products**, v. 126, p. 48–57,

2018.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: The beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1191-1197, 2005.

SIDDEEG, A. et al. Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources : An overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 1633–1644, 2021.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SOKENG, A. J. T. et al. Metabolite characterization of powdered fruits and leaves from *Adansonia digitata* L. (baobab): A multi-methodological approach. **Food Chemistry**, v. 272, p. 93–108, 2019.

STEPHENIE, S. et al. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. **Journal of Functional Foods**, v. 68, p. 1-10, 2020.

SUGIMOTO, M. A. et al. Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. **Trends in Immunology**, v. 40, p. 212-227, 2019.

TASNEEM, S. et al. Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research**, v. 139, p. 126–140, 2019.

WALTERS, R. H. et al. Next generation drying technologies for pharmaceutical applications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 2673–2695, 2014.

WANG, Z. et al. Antioxidant and antibacterial study of 10 flavonoids revealed rutin as a potential antibiofilm agent in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients. **Microbial Pathogenesis**, v. 159, p. 1-11, 2021.

XU, J. G.; HU, Q. P.; LIU, Y. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 11625–11630, 2012.

XU, M. et al. Collaborative effects of chlorogenic acid and caffeine on lipid metabolism via the AMPK α -LXR α /SREBP-1c pathway in high-fat diet-induced obese mice. **Food and Function**, v. 10, p. 7489–7497, 2019.

YARLEY, O. P. N. et al. Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant , antibacterial and anticancer activities of water-soluble plant polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 2262–2271, 2021.

ZAPATA, F. J. et al. Caffeine, but not other phytochemicals, in mate tea (*Ilex paraguariensis* St. Hilare) attenuates high-fat-high-sucrose-diet-driven lipogenesis and body fat accumulation. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 1-13, 2020.

ZHONG, S. et al. An update on lipid oxidation and in fl ammation in cardiovascular diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 144, p. 266–278, 2019.