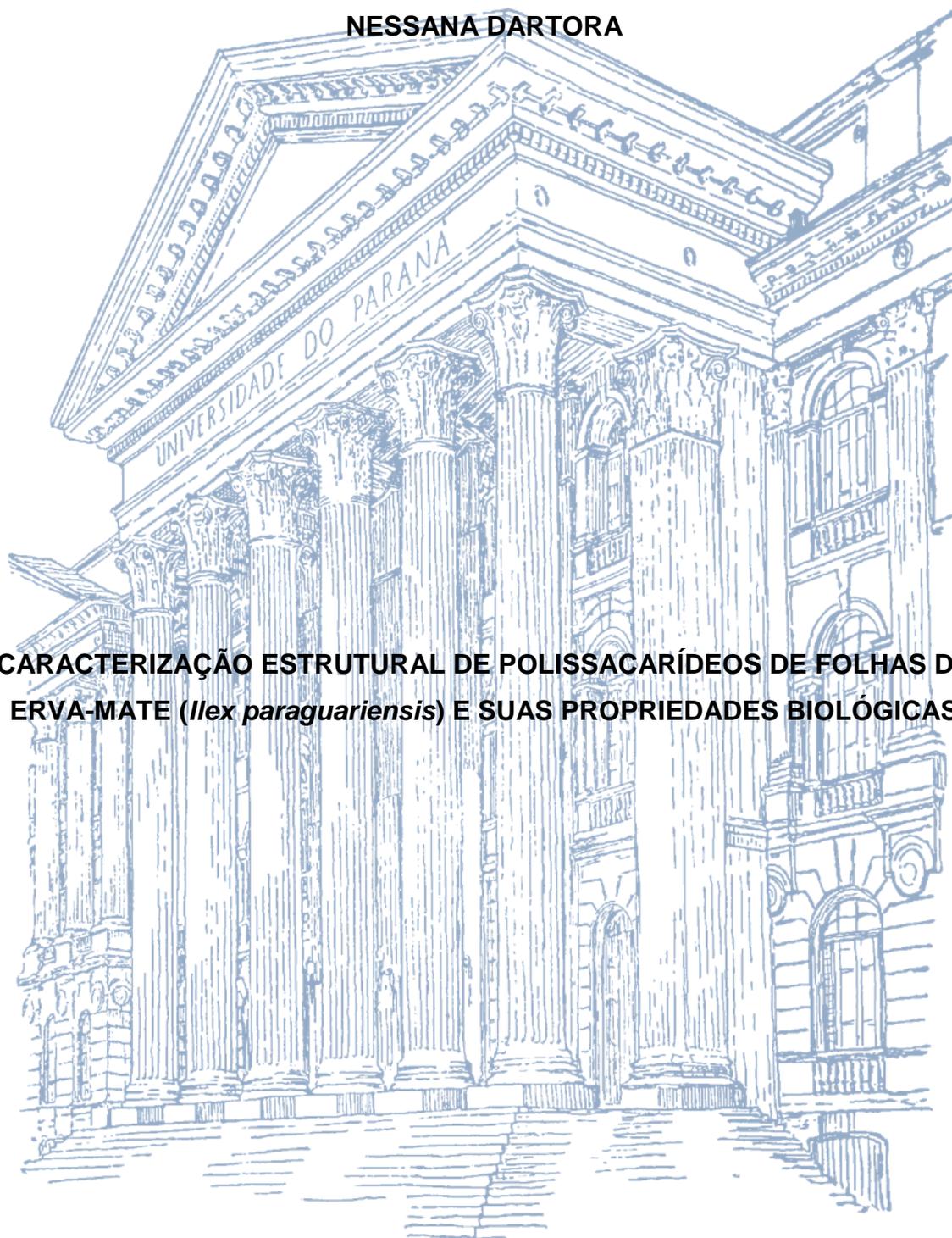


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**NESSANA DARTORA**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE  
ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**



**CURITIBA  
2014**

NESSANA DARTORA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE  
ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki

Co-orientadores: Dr. Lauro Mera de Souza  
Profa. Dra. Yanna Dantas Rattmann

CURITIBA  
2014

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki

Co-orientadores: Dr. Lauro Mera de Souza

Profa. Dra. Yanna Dantas Rattman

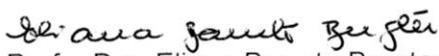
TERMO DE APROVAÇÃO

NESSANA DARTORA

**Caracterização estrutural de polissacarídeos de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e suas propriedades biológicas**

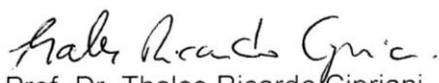
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

  
Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki (Orientador)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFPR)

  
Profa. Dra. Eliana Barreto Bergter  
Departamento de Microbiologia Geral (UFRJ)

  
Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos  
Departamento de Ciências Fisiológicas (UFSC)

  
Profa. Dra. Alexandra Acco  
Departamento de Farmacologia (UFPR)

  
Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFPR)

Curitiba, 28 de outubro de 2014.

***Dedico esse trabalho...***

***Ao meu pai Ricardo Dartora, sempre... “és parte ainda do que me faz forte”(Legião Urbana).***

***À minha mãe Lidia Zys Dartora, “de todos os amores e amigos, de você me lembro mais, de você não esqueço jamais”(Beatles), você é meu tudo, meu porto seguro, pra onde eu volto sempre!***

***A minha irmã querida Adriane Dartora, “você sempre foi a pessoa certa nas horas incertas” (Roberto Carlos), “eu continuo aqui, meu trabalho e meus amigos e me lembro de você... que acabou indo embora, cedo demais” (Legião Urbana). Sinto sua falta sempre!***

***Aos meus irmãos André Eduardo Dartora e Rafael Dartora, “na convivência crioula, o Rio Grande me mostrou toda beleza da vida, o sentido do que eu sou... lá encontrei muito amor, lá aprendi a amar (Porca Véia), sem vocês eu pouco seria.***

***Hoje eu sei, somos todos madeira firme de um mesmo barco que tem que navegar junto sempre. Amo vocês!***

## AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos, que de uma forma ou de outra estiveram envolvidos nessa tarefa difícil de construir a tese, é o mínimo que se pode fazer para demonstrar minha gratidão e expressar também o quanto essa ajuda contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional. No entanto a lista é muito grande e o espaço pequeno demais...

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, Autor e Orientador do projeto da minha vida. Te agradeço por tudo, Senhor, especialmente por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e por sempre abrir novas janelas em minha vida.

Ao Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki, com quem eu tive o prazer de compartilhar este trabalho e o qual sempre acreditou em mim. Obrigada pela orientação, confiança, liberdade que me foi concedida nesses quatro anos e por compreender os momentos em que precisei me ausentar do Laboratório.

Ao meu co-orientador, Dr. Lauro M. de Souza, pela competência científica e participação efetiva em meu trabalho. Por dividir comigo muito sobre seus conhecimentos na manipulação dos equipamentos do laboratório e sobre as técnicas de cromatografia e espectrometria de massas. Durante este período de trabalho, todo o seu empenho na orientação, deixou-me extremamente surpreendida e eternamente agradecida. Obrigada por tudo!

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Yanna D. Rattmann por me orientar nos experimentos biológicos e pela enorme paciência com quem entendia pouco sobre o assunto. Também agradeço por estar presente em minha vida como uma grande amiga. Obrigada pela compreensão, apoio, carinho, palavras valiosas e conselhos que me deu em todas as fases por que passei nesses últimos anos. Você está sempre no meu coração e nas minhas orações.

Ao Prof. Marcello Iacomini e ao Prof. Philip A. J. Gorin pelos ensinamentos, conselhos, sugestões e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Às professoras Dra. Cristiane Baggio e Dra. Maria Fernanda Werner e às alunas Luísa Mota da Silva e Daniele Maria Ferreira, pelo auxílio na realização dos ensaios biológicos.

Ao Instituto Nacional de Tecnologia e Agropecuária, da Argentina pelas amostras de *lex* cedidas.

Aos professores Diogo R. B. Ducatti e Thales R. Cipriani pela correção da tese na banca interna, além do acompanhamento nos projetos e seminários.

À minha mãe, pessoa maravilhosa, que compartilhou, vibrou e comemorou comigo todas as minhas vitórias. Obrigada, pelo seu apoio incondicional ao longo deste processo de mestrado e doutorado e de muitos outros. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava. Você é minha fortaleza, tenho certeza que mesmo distante nunca estarei sozinha. Te amo muito!

Ao meu pai, *in memoriam*, por sua presença constante e ensinamentos de vida. Certamente de onde estiver vai se orgulhar deste título de Doutora.

À minha irmã, Anne, *in memoriam*, por ser um pouquinho minha “mãe”, pelas conversas, conselhos, risadas e confidências. Tê-la como irmã, foi um privilégio. Graças à ti, pude aprender muitas coisas, a evoluir, amadurecer e ser uma pessoa “melhor”. Graças a você pude aprender o verdadeiro significado de irmandade. Hoje e sempre você está nas minhas memórias e no meu coração.

Aos meus irmãos Dé e Rafa e minhas cunhadas Lilian e Ana por todo incentivo e carinho. Sei que estão orgulhosos!

Ao meu sobrinho único e predileto Du, com quem divido muitos segredos e que conquistou minha admiração pela pessoa que se tornou. Também a sua namorada Juliana, que agora é a mais nova integrante da família.

A toda minha família pela torcida e ótimas reuniões, principalmente no Natal e Ano Novo. Não vou citar todos, pois a família é grande.

Às pessoas muito especiais que conheci na Bioquímica no início do Mestrado e que com certeza me ajudaram a não desistir, Tatiane W. M. Machado, Franciely G. Colodi e Elaine C. Kiatkoski. Tenham certeza que vocês foram e são muito importantes pra mim.

Às amigas Elizangela Rozanski e Maria C. Pellosi, por serem de certa forma minha grande família aqui em Curitiba nos dois primeiros anos do Doutorado, por dividirem comigo não somente as contas do apartamento, mas também momentos de muito carinho e alegrias. Levo vocês no meu coração, amigas!

Às minhas grandes amigas, Camila Scoparo, Carina Scoparo e Normanda S. Melo, que hoje também são parte da minha família em Curitiba. Obrigada amores, por me apoiarem, por dividirem suas vidas comigo e principalmente estarem comigo sempre, nos bons e maus momentos. Amo vocês!

Aos amigos especiais que conheci no Departamento, Adamara M. Nascimento, Ana H. Gracher, Anelis M. Marin, Arquimedes P. de Santana-Filho, Carlos D. Carneiro, Daniel S. Ritter, Diego A. Sabry, Fernanda Simas, Larry L. R. Paredes, Lauro M. de Souza, Maria A. Schmidt e Rosane M. G. Bagatin, e também os que conheci fora do Departamento, Anderson Barison e Francinete R. Campos. Vocês são pessoas incríveis e inigualáveis, cada um cheio de infinitas qualidades! Pretendo que nossa amizade permaneça em minha vida eternamente.

Aos colegas do laboratório E1, 247, 250 e 252, cada um com suas características que não serão esquecidas, pelos momentos de experimentos, conversas, risadas, cafezinhos e almoços no “RU”, Adamara, Adriana, Alex, Ana F., Ana H., Andrea, Arqui, Camila, Camila T, Carol, Dani, Elaine, Fer Simas, Fher, Geórgia, Helyn, Iglesias, Larry, Lauro, Liana, Márcia, Nadi, Nathi, Pedro, Popó, Roberta, Rosane, Thaísa, Thales, Vanessa, Vassoler, Yanna e Yoni.

À “turma do bar” (Agne, Ane, Ana, Arqui, Anderson, Fran, Gui, Lauro, Popó e Tuca), pelas risadas e momentos de descontração, os quais, tanto me faziam bem.

Aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação, Profa. Dra. Sílvia M. Cadena e Prof. Dr. Emanuel pelo empenho e dedicação prestados e ao crescimento e reconhecimento deste curso.

Ao Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki e ao Arquimedes P. de Santana-Filho, pela disponibilidade para a realização das análises de RMN.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, pela colaboração e amizade.

À CAPES, ao PRONEX-Carboidratos, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos animais de laboratório, minha gratidão e respeito.

A todos que, de uma forma ou de outra, foram importantes para a realização desta tese e para meu amadurecimento científico, o meu muito obrigada!

**“Se vi mais longe, foi porque estava nos  
ombros de gigantes”  
(Isaac Newton)**

## **NOTA EXPLICATIVA**

Esta tese é apresentada em formato alternativo, inserindo-se os artigos publicados no decorrer do doutorado, de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná. A tese consta de uma revisão bibliográfica, objetivos gerais e específicos do trabalho, justificativa, artigos científicos com os experimentos realizados, resultados e discussões, descrição dos trabalhos que encontram-se em andamento e conclusões.

## RESUMO

*Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate, é uma espécie nativa da América do Sul, da qual são obtidas diversas bebidas. Esta planta tem ganhado rápida introdução no mercado internacional, na obtenção de chás ou como ingrediente de alimentos e suplementos dietéticos, devido às suas várias propriedades (antioxidante, estimulante do sistema nervoso central, hepatoprotetora, etc). No presente trabalho, foram avaliadas as atividades anti-inflamatória e antiúlcera de polissacarídeos extraídos de folhas de erva-mate. Inicialmente foi obtido um polissacarídeo por meio da extração aquosa à quente de folhas processadas, conforme o processo de beneficiamento para o chimarrão (SPI). Análises de metilação e RMN-HSQC permitiram caracterizar SPI como uma ramnogalacturonana, com uma cadeia principal formada por unidades de  $\alpha$ -D-GalpA (1→4)-ligadas, intercaladas por unidades de  $\alpha$ -L-Rhap, e substituída por cadeias laterais de arabinogalactanas do tipo I. SPI foi testado quanto à sua ação farmacológica contra septicemia, utilizando o modelo de ligadura e perfuração de ceco em camundongos (CLP). O tratamento com SPI nas doses de 3, 7, e 10 mg/kg reduziu significativamente a letalidade dos camundongos, em vários pontos no decorrer do período de observação, especialmente entre o período de 24 a 108 horas. Ao final da curva de letalidade (168 h), os camundongos apresentaram taxa de sobrevivência de 20%, 40% e 60% com as respectivas doses, em comparação ao grupo tratado com o veículo. SPI também afetou a infiltração de neutrófilos, diminuindo seu acúmulo nos pulmões e o consequente dano causado por eles. Além disso, diminuiu significativamente os níveis teciduais de iNOS e COX-2, duas importantes enzimas relacionadas ao processo inflamatório. Sabe-se que as condições de crescimento dos vegetais (luz solar, estações, chuvas, etc), assim como o estágio de maturação das folhas podem promover alterações nos constituintes químicos das plantas. Processos realizados pós-colheita como o sapeco e torrefação realizados na erva-mate também levam a modificações estruturais destes constituintes. Assim, o potencial gastoprotetor de polissacarídeos isolados de folhas de erva-mate em diferentes estágios de crescimento, sob diferentes condições de luz solar e submetidas a diferentes processamentos também foi avaliado. Os polissacarídeos isolados por meio de extração aquosa à quente apresentaram como componentes monossacarídicos majoritários Ara, Gal, GalA, Rha e Glc e foram caracterizados como arabinogalactanas do tipo I, ligadas a ramnogalacturonas do tipo I. Análises de HSQC/PCA mostraram haver diferenças na intensidade de sinais nos espectros dos polissacarídeos, evidenciando que a porção neutra (arabinogalactana) é maior nos polissacarídeos obtidos das folhas submetidas aos processos oxidativos. Ao serem testados quanto sua atividade antiúlcera gástrica, todos os polissacarídeos inibiram significativamente lesões gástricas induzidas por etanol em ratas. No entanto, os polissacarídeos obtidos das folhas oxidadas mostraram-se mais eficientes, sendo SP12 (polissacarídeo extraído das folhas maduras cultivadas a sombra) o mais eficaz. O mecanismo de ação destes polissacarídeos ainda não foi elucidado, uma vez que estes não alteram a quantidade de muco gástrico e níveis de glutathione reduzida, dois importantes mecanismos citoprotetores contra lesões gástricas. Em paralelo aos estudos realizados com os polissacarídeos realizou-se uma análise comparativa de metabólitos secundários em diferentes espécies de *Ilex*.

Palavras-chaves: *Ilex paraguariensis*, polissacarídeos, ramnogalacturonanas, arabinogalactanas, sepsis, anti-inflamatória, efeito gastoprotetor.

## ABSTRACT

*Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae), popularly known as erva-mate, is a species native to South America, from which various beverages are obtained. This plant has gained rapid introduction in the international market, for tea manufacturing or as ingredient for foods and supplements, because it has many properties (e. g. antioxidant, stimulant of the central system, hepatoprotective, etc). In this study, were evaluated the anti-inflammatory and gastric protection activities of polysaccharides extracted from leaves of erva-mate. A polysaccharide was obtained by the hot aqueous extraction from *chimarrão*-type leaves (named SPI). Methylation analysis and NMR-HSQC allowed to characterize SPI, as a rhamnogalacturonana with a main chain of units  $\alpha$ -D-GalpA (1→4)-linked, intercalated by units  $\alpha$ -L-Rhap, branched by side chains of arabinogalactan type I. SPI was assayed for pharmacological action on septicemia in mice model, induced by cecal ligation and puncture (CLP). The treatment with SPI at doses of 3, 7, and 10 mg/kg significantly reduced the lethality of mice, at various points of curve during the observation period, particularly between from 24 to 108 hours. At the end of lethality curve (168 h), the mice survival rates was 20%, 40% or 60% accordingly to the doses of SPI, in comparison with the group treated with the vehicle. SPI also affected neutrophil infiltration, avoiding its accumulation in the lungs and the subsequent tissue damage. In addition, SPI significantly reduced the tissue levels of iNOS and COX-2, two important enzymes related to the inflammatory process. It is known that the cultivation conditions (i. e. sunlight, seasons, rain, etc), the maturation level of the leaves and post-harvest processes, such as blanching and roasting in mate can lead to structural modifications of the chemical constituents of plants. Thus, the potential gastroprotection of polysaccharides from *I. paraguariensis*, obtained from leaves at different stages of growth, under different conditions of sunlight or subjected to different manufacturing process was evaluated. The polysaccharides isolated by the hot aqueous extract showed as major components monossacarídicos Ara, Gal, GalA, Rha and Glc and were characterized as arabinogalactan type I linked to rhamnogalacturonan type I. Analysis by HSQC/PCA showed some differences in the intensity signals in the spectra of the polysaccharides, evidencing that neutral portion (arabinogalactan) is greater in the polysaccharides obtained from the leaves submitted the oxidative processes. When they were tested for their gastric antiulcer activity, all polysaccharides significantly inhibited ethanol-induced gastric lesions in rats. However polysaccharides obtained from the oxidized leaves were more efficient, and SP12 (polysaccharide extracted from cultured mature leaf shade) the more effective. The mechanism of action of these polysaccharides have not yet been elucidated, since they do not alter the amount of gastric mucus and levels of reduced glutathione, two cytoprotective mechanisms important against gastric lesions. In parallel to the studies of the polysaccharides was carried out a comparative analysis of different secondary metabolites *Ilex* species.

**Keywords:** *I. paraguariensis*, polysaccharides, rhamnogalacturonan, arabinogalactan, sepsis, anti-inflammatory, potential gastroprotection.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO LITERÁRIA

FIGURA 1 –	ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR PRIMÁRIA VEGETAL.....	31
FIGURA 2 –	ESTRUTURA BÁSICA DE RAMNOGALACTURONANA TIPO I (RGI), COM CADEIAS LATERAIS DE (1→4)-β-D-GALACTANA, (1→5)-α-L-ARABINANA E ARABINOGLACTANA TIPO I (AGI)..	32
FIGURA 3 –	<b>(A)</b> ÁREA DE DISTRIBUIÇÃO DA ERVA-MATE, <b>(1)</b> ARGENTINA; <b>(2)</b> BRASIL; <b>(3)</b> PARAGUAI E <b>(4)</b> URUGUAI. <b>(B)</b> <i>Ilex paraguariensis</i> (PLANTA).....	34
FIGURA 4 –	<b>(A)</b> PROCESSAMENTO DAS FOLHAS DE <i>Ilex paraguariensis</i> NO CHIMARRÃO E CHÁ MATE <b>(B)</b> PROCESSAMENTO DAS FOLHAS DE <i>Camellia sinensis</i> NO CHÁ PRETO E NO CHÁ VERDE.....	42
FIGURA 5 –	ESTRUTURA DAS XANTINAS: CAFEÍNA (1,3,7-TRIMETILXANTINA), TEOBROMINA (3,7-DIMETILXANTINA) E TEOFILINA (1,3-DIMETILXANTINA).....	43
FIGURA 6 –	ESTRUTURA DOS ISÔMEROS DE ÁCIDOS CAFEOLQUÍNICOS E DICAFFEOLQUÍNICOS.....	46
FIGURA 7 –	ESTRUTURA GENÉRICA DAS SAPONINAS COM A LOCALIZAÇÃO COMUM DOS GRUPOS R.....	47

### ARTIGO I

FIGURA 1 –	<sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C HSQC NMR SPECTRUM OF SPI, SOLVENT D <sub>2</sub> O AT 70°C; NUMERICAL VALUES ARE IN δ PPM.....	71
FIGURA 2 –	SUGGESTED STRUCTURE FOR SPI ISOLATED FROM <i>I. paraguariensis</i> .....	74
FIGURA 3 –	EFFECT OF POLYSACCHARIDE SPI ON SURVIVAL RATE <b>(A)</b> AND ON MPO ACTIVITY <b>(B)</b> IN SEPSIS.....	76
FIGURA 4 –	EFFECT OF POLYSACCHARIDE SPI ON INOS <b>(B)</b> AND COX-2 <b>(C)</b> EXPRESSION IN THE ILEUM TISSUE OF INFECTED MICE. THE LEVELS OF INOS AND COX-2 WERE DETERMINED BY WESTERN BLOT ANALYSIS <b>(A)</b> .....	77

## ARTIGO II

FIGURA 1 –	SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY PROFILE OF POLYSACCHARIDE FRACTIONS FROM <i>Ilex paraguariensis</i> : (A) YOUNG LEAVES OF THE SUN, (B) YOUNG LEAVES OF SHADE, (C) MATURE LEAVES OF SUN AND (D) MATURE LEAVES OF SHADOW.....	102
FIGURA 2 –	<sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C-HSQC NMR SPECTRA FROM POLYSACCHARIDE FRACTIONS (A) SP1, (B) SP5 AND (C) SP9.....	105
FIGURA 3 –	PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS. (A) A GRAPH OF THE SCORES FOR PC1 AND PC2 AND (B) THE LOADINGS PLOT, REFERENT TO CHEMICAL SHIFTS AND SIGNAL INTENSITY..	108
FIGURA 4 –	EFFECT OF POLYSACCHARIDES (SP1, SP5, SP9, SP10, SP11 AND SP12) ON ACUTE GASTRIC LESIONS INDUCED BY ETHANOL P.A. IN RATS.....	109
FIGURA 5 –	EFFECT OF POLYSACCHARIDES (SP1, SP9, SP10, SP11 AND SP12) ON MUCUS (A) AND GSH (B) LEVELS OF GASTRIC MUCOSA AFTER ACUTE GASTRIC LESIONS INDUCED BY ETHANOL P.A. IN RATS.....	109

## ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

FIGURA 5.1 –	ESPECTRO DE ESI-MS <i>OFFLINE</i> EM MODO NEGATIVO DOS SOBRENADANTES ETANÓLICOS OBTIDOS DAS DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Ilex</i> .....	120
FIGURA 5.2 –	ESPECTRO DE ESI-MS <i>OFFLINE</i> EM MODO POSITIVO DOS SOBRENADANTES ETANÓLICOS OBTIDOS DAS DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Ilex</i> .....	121
FIGURA 5.3 –	UPLC-PDA (325 nm) DAS ESPÉCIES DE <i>Ilex</i> (SETs).....	123
FIGURA 5.4 –	TLC DAS FRAÇÕES BUTANÓLICAS.....	125
FIGURA 5.5 –	ESI-MS <i>OFFLINE</i> EM MODO POSITIVO DAS FRAÇÕES BUTANÓLICAS OBTIDAS DAS DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Ilex</i> .....	127
FIGURA 5.6 –	POSSÍVEIS ISÔMEROS IDENTIFICADOS PARA O ÍON DE m/z 919 [M+LI] <sup>+</sup> , ISOLADO NA FRAÇÃO BUTANÓLICA DE <i>I. paraguariensis</i> , COM OS FRAGMENTOS CARACTERÍSTICOS OBTIDOS.....	128

FIGURA 5.7 – CROMATOGRAMAS DE RP-UHPLC-MS EM MODO TIC (TOTAL ÍON CURRENT) DAS SAPONINAS OBTIDAS PARA AS ESPÉCIES DE <i>Ilex</i> .....	129
FIGURA 5.8 – CROMATOGRAMA DE RP-UHPLC-MS EM MODO TIC DA FRAÇÃO BUTANÓLICA DE <i>I. argentina</i> (A). FILTRANDO AS SAPONINAS PELOS ÍONS: <i>m/z</i> 789 (B), <i>m/z</i> 803 (C), <i>m/z</i> 817 (D), <i>m/z</i> 730 (E), <i>m/z</i> 847 (F), <i>m/z</i> 863 (G) E <i>m/z</i> 881 (H). O APARECIMENTO DE DOIS OU MAIS PICOS INDICAM A PRESENÇA DE ISÔMEROS.....	130
FIGURA 5.9 – REAÇÃO DE GALACTOSE E GLUCOSE COM ÁCIDO <i>p</i> -TOLUENOSULFÔNICO, COM A FORMAÇÃO DE DERIVADOS DE ISOPROPILIDENO E CID-MS OBTIDO PARA 3,4-IPP-GALACTOSE E 4,6-IPP-GLUCOSE, EVIDENCIANDO A DIFERENÇA NO PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DE AMBOS OS DERIVADOS.....	132

#### LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – DEFINIÇÃO CLÍNICA DE SEPSE.....	51
--	----

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO LITERÁRIA

TABELA 1 –	COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM FOLHAS DE ERVA-MATE E ALGUMAS DE SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	48
------------	---	----

### ARTIGO I

TABELA 1 –	PROFILE OF PARTIALLY O-METHYLATED ALDITOL ACETATES AND MONOSACCHARIDE LINKAGES OF SPI.....	73
------------	--	----

### ARTIGO II

TABELA 1 –	LEAF TYPES AND EXTRACTIONS.....	96
TABELA 2 –	MONOSACCHARIDE COMPOSITION OF THE SP POLYSACCHARIDES.....	101
TABELA 3 –	<sup>13</sup> C AND <sup>1</sup> H NMR DATA OF SP POLYSACCHARIDES.....	103

### ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

TABELA 5.1 –	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS PARA AS DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Ilex</i> , ANTES E DEPOIS DO FRACIONAMENTO.....	124
TABELA 5.2 –	COMPOSIÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS E AGLICONAS ENCONTRADOS NAS FRAÇÕES BUTANÓLICAS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Ilex</i> .....	126
TABELA 5.3 –	ACETATOS DE ALDITOL PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS PARA AS FRAÇÕES BUTANÓLICAS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Ilex</i> .....	131

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E TERMOS\*

### Compostos químicos

Akt	- <i>Serine threonine kinase protein</i> (proteína serina treonina quinase)
Araf	- <i>Furanosidic arabinose</i> (arabinose piranosídica)
bFGF	- <i>Basic fibroblast growth factor</i> (fator de crescimento de fibroblastos básicos)
CASP	- <i>Colon ascendens stent peritonitis</i> (introdução de cateter no cólon ascendente)
CLP	- <i>Cecal ligation and puncture</i> (ligação e perfuração do ceco)
COX-2	- <i>Cyclooxygenase-2</i> (ciclooxigenase-2)
DMSO	- <i>Dimethyl sulfoxide</i> (dimetilsulfóxido)
EDHF	- <i>Endothelium-derived hyperpolarizing factor</i> (fator hiperpolarizante derivado do endotélio)
eNOS	- <i>Constitutive nitric oxide synthase</i> (óxido nítrico sintase constitutiva)
EGF	- <i>Endothelial growth factor</i> (fator de crescimento endotelial)
ET	- <i>Endothelin</i> (entotelina)
EtOH	- <i>Ethanol</i> (etanol)
Galp	- <i>Pyranosidic galactose</i> (galactose piranosídica)
GalpA	- <i>Pyranosidic galacturonic acid</i> (ácido galacurônico piranosídico)
GSH	- <i>Reduced glutathione</i> (glutathione reduzida)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- <i>Hydrogen peroxide</i> (peróxido de hidrogênio)
HCAEC	- <i>Human coronary artery endothelial cells</i> (células endoteliais de artéria coronária humana)
HGF	- <i>Hepatocyte growth factor</i> (fator de crescimento de hepatócitos)
IL-1 $\beta$	- <i>Interleukin - 1<math>\beta</math></i> (interleucina - 1 $\beta$ )

iNOS	- <i>Inducible nitric oxide synthase</i> (óxido nítrico sintase induzida)
LPS	- <i>Lipopolysaccharide</i> (lipopolissacarídeo)
LTA	- <i>Lipoteichoic acid</i> (ácido lipoteicóico)
MODS (SDMO)	- <i>Multiple organ dysfunction syndrome</i> (síndrome da disfunção de múltiplos órgãos)
MnTMPyP	- <i>Mn (III) tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) porphyrin</i> (Mn(III)tetraquis(1-metil-4-piridil)porfirina))
MPO	- <i>Myeloperoxidase</i> (mieloperoxidase)
MPO	- <i>Myeloperoxidase</i> (mieloperoxidase)
NF-κB	- <i>Nuclear factor-kappa B</i> (fator nuclear capa B)
NO	- <i>Nitric oxide</i> (óxido nítrico)
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- <i>Superoxide anion</i> (anion superóxido)
PGA	- <i>Polygalacturonic acid</i> (ácido poligalacturônico)
PGI <sub>2</sub>	- <i>Prostacyclin</i> (prostaciclina)
PGE-2	- <i>Prostaglandin E2</i> (prostaglandina E2)
PMAA	- <i>Partially O-methylated alditol acetate</i> (alditol acetato parcialmente O-metilado)
RGI	- <i>Type I Rhamnogalacturonan</i> (ramnogalacturonana tipo I)
RGII	- <i>Type II Rhamnogalacturonan</i> (ramnogalacturonana tipo II)
Rhap	- <i>Pyranosidic rhamnose</i> (ramnose piranosídica)
ROS	- <i>Reactive Oxygen Species</i> (espécies reativas de oxigênio)
SIRS (SRIS)	- <i>Systemic inflammatory response syndrome</i> (síndrome da resposta inflamatória sistêmica)
SOD	- <i>Superoxide dismutase</i> (superóxido dismutase)
Src	- <i>Tyrosine kinase protein</i> (proteína tirosina quinase)
TBS-T	- <i>Tris-buffered saline solution and 0.1% Tween 20</i> (solução salina tamponada com tris e 0,1% de Tween 20)
TFA	- <i>Trifluoroacetic acid</i> (ácido trifluoracético)

TGF- $\alpha$	- <i>Transforming growth factor - <math>\alpha</math></i> (fator de crescimento transformador - $\alpha$ )
TMSP-d <sub>4</sub>	- <i>2,2,3,3-tetradeuterium-3-trimethylsilylpropionate</i> (2,2,3,3-tetradeuterio-3-trimetilsililpropionato)
TNF- $\alpha$	- <i>Tumor necrosis factor - <math>\alpha</math></i> (fator de necrose tumoral – $\alpha$ )
VEGF	- <i>Vascular endothelial growth factor</i> (fator de crescimento endotelial vascular)

### **Amostras, extratos e Frações**

ARG	- <i>Ilex argentina</i>
BRA	- <i>Ilex brasiliensis</i>
BRE	- <i>Ilex brevicuspis</i>
DUM	- <i>Ilex dumosa</i>
INT	- <i>Ilex integerrima</i>
IPI	- <i>Insoluble fraction (after freeze-thawing)</i> (fração insolúvel após congelamento e descongelamento)
MIC	- <i>Ilex microdonte</i>
PAR	- <i>Ilex paraguariensis</i>
PI	- <i>Crude polysaccharide fraction</i> (fração polissacarídica bruta)
PSE	- <i>Ilex pseudobuxus</i>
SPI	- <i>Soluble fraction (after freeze-thawing)</i> (fração solúvel após congelamento e descongelamento)
SP1	- <i>Young leaves of sun in natura</i> (folhas jovens de sol <i>in natura</i> )
SP2	- <i>Young leaves of shade in natura</i> (folhas jovens de sombra <i>in natura</i> )
SP3	- <i>Mature leaves of sun in natura</i> (folhas maduras de sol <i>in natura</i> )
SP4	- <i>Mature leaves of shade in natura</i> (folhas maduras de sombra <i>in natura</i> )

SP5	- <i>Young leaves of sun processed</i> (folhas jovens de sol processadas)
SP6	- <i>Young leaves of shade processed</i> (folhas jovens de sombra processadas)
SP7	- <i>Mature leaves of sun processed</i> (folhas maduras de sol processadas)
SP8	- <i>Mature leaves of shade processed</i> (folhas maduras de sombra processadas)
SP9	- <i>Young leaves of sun oxidized</i> (folhas jovens de sol oxidadas)
SP10	- <i>Young leaves of shade oxidized</i> (folhas jovens de sombra oxidadas)
SP11	- <i>Mature leaves of sun oxidized</i> (folhas maduras de sol oxidadas)
SP12	- <i>Mature leaves of shade oxidized</i> (folhas maduras de sombra oxidadas)
TAU	- <i>Ilex taubertiana</i>
THE	- <i>Ilex theezans</i>

### **Técnicas e termos associados as técnicas de análise**

EI	- <i>Electron ionization</i> (ionização de elétron)
ESI-MS	- <i>Electrospray Ionization</i> (ionização por spray de elétrons)
GC-MS	- <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas)
HMBC	- <i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	- <i>High performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
HPSEC	- <i>High pressure size exclusion chromatography</i> - (cromatografia de exclusão estérica)
HSQC	- <i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
<i>m/z</i>	- <i>Mass to charge ration</i> (relação massa/carga)
MS	- <i>Mass spectrometry</i> (espectrometria de massas)

MS <sup>2</sup>	- Espectro de fragmentação de massa ( <i>tandem-MS</i> )
NMR	- <i>Nuclear magnetic resonance</i> (ressonância magnética nuclear)
<i>Offline</i>	- Análise por espectrometria de massas com infusão direta
<i>Online</i>	- Análise por espectrometria de massas combinada com a separação por cromatografia
PAGE	- <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (eletroforese com gel de poliacrilamida)
R <sub>t</sub>	- <i>Retention time</i> (tempo de retenção relativo)
SEC	- <i>Size exclusion chromatography</i> (cromatografia de exclusão estérica)
TIC	- <i>Total ions current</i> (análise de íons totais)
TLC	- <i>Thin layer chromatography</i> (cromatografia em camada delgada)
UHPLC	- <i>Ultra-high performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de ultra-alta eficiência)

### **Análises Estatísticas**

ANOVA	- <i>Analysis of variance</i> (análise de variância)
PC1	- <i>Principal component 1</i> (componente principal 1)
PC2	- <i>Principal component 2</i> (componente principal 2)
PC	- <i>Principal component analysis</i> (análise por componentes principais)

\*Para as nomenclaturas dos termos optou-se pelo uso da linguagem inglesa e portuguesa, visto que os mesmos aparecem descritos em ambas as formas no decorrer da tese.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>27</b>
2.1 FITOQUÍMICA E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	27
2.2 METABOLISMO VEGETAL .....	29
2.2.1 <i>Metabolismo primário</i> .....	29
2.2.1.1 Carboidratos nas plantas – parede celular e polissacarídeos .....	30
2.2.2 <i>Metabolismo secundário</i> .....	33
2.3 ERVA-MATE .....	34
2.3.1 <i>Descrição botânica</i> .....	34
2.3.2 <i>Formas de uso</i> .....	36
2.4 PROCESSAMENTO E PRODUTOS.....	37
2.4.1 <i>O chimarrão</i> .....	37
2.4.1.1 Sapeco .....	38
2.4.1.2 Secagem .....	39
2.4.1.3 Cancheamento .....	39
2.4.1.4 Beneficiamento.....	39
2.4.2 <i>Chá mate</i> .....	40
2.4.3 <i>Modalidades de processamento</i> .....	41
2.5 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA .....	42
2.5.1 <i>Xantinas</i> .....	43
2.5.2 <i>Polifenóis</i> .....	44
2.5.3 <i>Ácidos clorogênicos e ácidos cafeoilquínicos</i> .....	45
2.5.4 <i>Saponinas</i> .....	46
2.6 USOS E BENEFÍCIOS.....	48
2.7 ALTERAÇÃO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PLANTAS .....	49
2.8 CARACTERIZAÇÃO DAS PATOLOGIAS EM ESTUDO .....	50
2.8.1 <i>Sepse</i> .....	50
2.8.1.1 Modelos experimentais de sepse .....	52
2.8.1.2 Mediadores inflamatórios envolvidos na sepse .....	53
2.8.2 <i>Úlcera péptica</i> .....	54
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>57</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>

4.1 OBJETIVO GERAL .....	59
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	59
<b>ARTIGO I .....</b>	<b>60</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>62</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>62</b>
<b>2. Materials and methods .....</b>	<b>64</b>
2.1. Plant material .....	64
2.2. Polysaccharide extraction and fractionation .....	64
2.3. Monosaccharide analysis .....	65
2.4. Methylation analysis .....	66
2.5. NMR analysis .....	66
2.6. Animals .....	67
2.7. Sepsis induction by cecal ligation and puncture (CLP) .....	67
2.8. Lung MPO activity .....	68
2.9. Western blot analysis .....	68
2.10. Statistical analysis .....	69
<b>3. Results .....</b>	<b>69</b>
3.1. Isolation and chemical analysis of the polysaccharide .....	69
3.1.1. NMR data .....	70
3.1.2. Methylation analysis .....	72
3.2. Biological experiments .....	74
3.2.1 Protective effect of SPI on CLP-induced sepsis in mice .....	74
3.2.2. Inhibition of MPO activity .....	75
3.2.3. Inhibition of INOS and COX-2 expression .....	76
<b>4. Discussion .....</b>	<b>78</b>
<b>5. References .....</b>	<b>82</b>
<b>ARTIGO II .....</b>	<b>90</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>91</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>92</b>
<b>2. Materials and methods .....</b>	<b>94</b>
2.1. Plant Material .....	94
2.2. Processing of maté (“chimarrão” type) .....	94
2.3. Oxidation .....	94
2.4. Polysaccharides extraction and purification .....	95

2.5. Size exclusion chromatography (SEC) analysis .....	95
2.6. Monosaccharide analysis.....	97
2.7. Methylation analysis.....	97
2.8. NMR analysis.....	98
2.9. Animals .....	98
2.10. Induction of acute gastric lesion.....	98
2.11. Determination of gastric wall mucus .....	99
2.12. Determination of glutathione content .....	99
2.13. Statistical analysis.....	100
<b>3. Results .....</b>	<b>100</b>
3.1. Isolation and chemical analysis of the polysaccharides from <i>Ilex paraguariensis</i> .....	100
3.1.1. NMR data .....	103
3.1.2. Methylation analysis .....	105
3.1.3. PCA analysis .....	106
3.2. Effect of polysaccharides from <i>Ilex paraguariensis</i> on acute gastric lesions induced by ethanol.....	108
3.3. Effect of polysaccharides from <i>Ilex paraguariensis</i> on gastric wall mucus and GSH levels.....	110
<b>4. Discussion .....</b>	<b>111</b>
<b>References.....</b>	<b>114</b>
<b>5. ANÁLISES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....</b>	<b>118</b>
5.1 ANÁLISES ESTRUTURAL E COMPARATIVA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM DIFERENTES ESPECIES DE <i>ILEX</i> .....	118
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>133</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>134</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>145</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>147</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>151</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O emprego de plantas medicinais é uma prática milenar amplamente utilizada por grande parte da população mundial. Atualmente, com o desenvolvimento de inúmeros estudos das propriedades terapêuticas, toxicidade e composição química, os medicamentos fitoterápicos estão deixando de ser apenas um recurso da medicina popular e ganhando cada vez mais espaço na medicina tradicional.

Este crescente desenvolvimento é resultado do surgimento de novas tecnologias e da necessidade de atender a legislação atual para o lançamento de produtos fitoterápicos no mercado. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recentemente lançou uma Consulta Pública (nº 38, de 22 de julho de 2009) para atender ao Projeto de Revisão de Monografias da Farmacopéia Brasileira, demonstrando que as agências públicas estão preocupadas com a qualidade destes produtos. Com a revisão da Farmacopéia Brasileira a ANVISA estabeleceu os requisitos mínimos para a fabricação e o controle da qualidade de insumos e especialidades farmacêuticas utilizados no país.

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (SIMÕES *et al.*, 2004). Fazendo parte desse arsenal vegetal, com potencial terapêutico, encontra-se a espécie *Ilex paraguariensis*, conhecida popularmente como erva-mate, a qual é objeto de estudo deste trabalho.

Diversos compostos químicos foram identificados na erva-mate e acredita-se que eles são os responsáveis pelas propriedades biológicas atribuídas à planta. Os principais compostos bioativos presentes são os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas. Nesta última classe de compostos encontram-se a cafeína, a teobromina e a teofilina (ALIKARIDIS, 1987), componentes de reconhecida ação sobre o sistema nervoso central, aos quais é atribuída a ação estimulante do mate. Dentre as classes de saponinas encontram-se os triterpenóides glicosilados, os ácidos ursólicos e oleanóico, os quais são responsáveis pelo amargor e espuma do mate, além de serem anti-inflamatórios e hipocolesterolêmicos (GNOATTO *et al.*, 2007). Entre os compostos fenólicos destaca-se o elevado conteúdo de derivados de ácidos cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico e seus isômeros, aos quais se atribui a ação adstringente e antioxidante do produto (CLIFFORD, 1990; CARDOZO-JÚNIOR *et al.*, 2007).

Atualmente, os metabólitos secundários de *I. paraguariensis* são o foco principal das investigações realizadas com a planta. No entanto, durante o preparo das infusões, também são extraídos produtos de metabolismo primário, incluindo os polissacarídeos.

Muitas plantas utilizadas na medicina popular já foram descritas contendo polissacarídeos biologicamente ativos, incluindo atividade imunomoduladora, antitumoral (JIANG *et al.*, 2010), hipocolesterolêmica (RONDANELLI *et al.*, 2009), antioxidante (NERGARD *et al.*, 2005), anti-inflamatória (CARBONERO *et al.*, 2008) antiúlcera gástrica (CIPRIANI *et al.*, 2006; CIPRIANI *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2013; MARIA-FERREIRA *et al.*, 2013; CANTU-JUNGLES *et al.*, 2014) e antiseptose (RUTHES *et al.*, 2012; SCOPARO *et al.*, 2013).

Para Campos (1996), o desenvolvimento tecnológico da erva-mate e derivados requer investimentos em pesquisa, modernização e otimização dos processos de produção, bem como a busca de uma maior qualidade e diversificação de produtos. Por se tratar de uma planta de composição química variada, além dos atributos já conhecidos, pode-se vislumbrar muitas aplicações potenciais, as quais poderiam vir a ampliar o consumo de erva-mate e, conseqüentemente, a prospecção de novos mercados, nacionais e internacionais (VALDUGA, 1994).

Neste contexto, este trabalho tem por objetivo caracterizar estruturalmente os polissacarídeos de erva-mate e verificar algumas de suas aplicações biológicas. E muito embora se conheçam algumas propriedades terapêuticas desta planta, considera-se importante avançar no conhecimento científico sobre esta espécie de âmbito nacional utilizada na fitoterapia popular, a qual pode ser uma potencial fonte de novos princípios de interesse medicinal. Dessa forma, novos estudos acerca dos componentes químicos presentes na erva-mate permitirão não somente elucidar a sua composição estrutural, mas também demonstrar novas atividades biológicas a ela relacionadas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FITOQUÍMICA E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais no tratamento de enfermidades é conhecido desde a mais remota antiguidade, sendo as obras mais antigas sobre medicina e plantas medicinais originárias da China e Egito (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1983). Diversas culturas se valeram das plantas medicinais, sendo esta a principal, ou mesmo a única matéria prima para elaboração de medicamentos (ODY, 1993). No início do século XX, a descoberta e o desenvolvimento de processos de síntese de compostos orgânicos, culminaram no desenvolvimento de diversos medicamentos. Entretanto, efeitos colaterais, causados por eles, somados aos altos valores dos medicamentos sintéticos promoveram a busca por novas drogas, e o interesse por compostos fitoterápicos, uma alternativa de tratamento (VOLAK; STODOLA, 1990).

O termo Farmacognosia foi primeiramente empregado em 1815, sendo usado para designar o estudo de drogas e medicamentos de origem natural, sendo a maioria proveniente de vegetais. Essa área da farmacologia, como ciência, passou a ser subdividida em áreas mais específicas, como por exemplo, a farmacoergasia que estuda as melhores formas de cultivo para cada planta e a farmacoquímica (fitoquímica) que estuda a origem, a síntese, as formas de extração dos compostos, além da composição química e estrutura dos compostos nas plantas.

O estudo fitoquímico de plantas medicinais envolve não somente a identificação de drogas vegetais por características morfológicas e anatômicas, mas também o estudo de sua origem e forma de produção, controle de qualidade, composição química, elucidação estrutural e conhecimento das propriedades físico-químicas das substâncias ativas, bem como o estudo de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas.

Desta forma, o estudo de plantas medicinais, é uma ciência complexa, dependendo de muitas áreas do conhecimento, e conseqüentemente, de profissionais especializados em diferentes áreas do saber (Di STASI, 1995). Um conhecimento cada vez mais aprofundado sobre essas plantas, desenvolvido através de estudos integrados das áreas da botânica, química, farmacologia, biologia molecular e outras ciências afins se faz necessário (SANTOS, 2002).

O uso de espécies medicinais pela população brasileira é relativamente amplo, e sua aplicação e conhecimento vem sendo transmitido de uma geração para outra. Entretanto, estudos científicos integrados em diferentes áreas do conhecimento, confirmando o emprego das plantas medicinais, só passaram a ser realizados a partir da década de 70. Uma base mais racional para o uso de espécies vegetais como medicamento foi lançada quando estas espécies começaram a ser estudadas de forma sistemática com objetivo de extrair, isolar e identificar as substâncias cujas propriedades farmacológicas são, em última análise, responsáveis pelas propriedades curativas atribuídas à planta como um todo. Esta metodologia serviu para fornecer subsídios científicos para o uso das plantas medicinais na terapêutica, e mais do que isso, serviu para enriquecer consideravelmente o arsenal terapêutico disponível, que ainda hoje é composto de inúmeros produtos de origem natural, sendo uma ampla quantidade deles desenvolvidos através de síntese orgânica tendo como protótipo uma substância de ocorrência natural (ELIZABETSKY, 1986).

Os produtos da flora brasileira têm despertado curiosidade e interesse econômico e científico desde a época da colonização do Novo Mundo. Esta riqueza nacional é revelada, principalmente na flora amazônica, onde são encontradas plantas com propriedades tintoriais, odoríferas, estimulantes, condimentosas, alucinogênicas, resinosas balsâmicas, e ainda plantas utilizadas pelos índios na caça e na pesca, enquanto outras fornecem madeiras úteis para vários fins, portanto, sujeitas à exploração (PACHÚ, 1994).

O Brasil é proprietário da maior biodiversidade do planeta, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do mundo. Este patrimônio genético tem valor econômico estratégico inestimável em várias atividades, mas é no desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (LAPA *et al.*, 2003; CALIXTO, 2003). A razão desta afirmação é facilmente comprovada quando se analisa o número de fármacos obtidos direta e indiretamente a partir de produtos naturais, sendo que um terço dos medicamentos mais vendidos no mundo foi desenvolvido a partir de plantas medicinais utilizadas na medicina popular para os mais diversos fins (CALIXTO, 2003; SKY, 2003).

Baseado nestes princípios e conhecendo-se também o valor cultural, científico e a vasta popularidade da *I. paraguariensis*, é que despertou-se o interesse

em realizar investigações mais detalhadas com relação à composição química desta planta e suas propriedades farmacológicas.

## 2.2 METABOLISMO VEGETAL

O metabolismo representa o conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula. A presença de enzimas específicas garante certa direção a essas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas. Os compostos químicos formados, degradados, ou simplesmente transformados, são chamados de metabólitos e as reações enzimáticas envolvidas são designadas, respectivamente, como anabólicas, catabólicas ou de biotransformação (SIMÕES *et al.*, 2004).

Todas as plantas produzem constituintes químicos, os quais fazem parte de suas atividades metabólicas normais. Os compostos produzidos por elas são agrupados em dois grandes grupos: os metabólitos primários, tais como carboidratos, proteínas e lipídeos; e os metabólitos secundários que são compostos elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários, tais como compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais, alcalóides, entre outros (BALADRIN *et al.*, 1985; Di STASI, 1995).

### 2.2.1 Metabolismo primário

Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos (BELL, 1981). Como descrito anteriormente, fazem parte dos compostos de metabolismo primário, os lipídeos, proteínas e carboidratos. Estes últimos têm sido foco de particular interesse em diversos trabalhos, já que inúmeras propriedades farmacológicas têm sido descritas e relacionadas à polissacarídeos encontrados em plantas, entre elas: antiviral, antitumoral, imunoestimulante, anti-inflamatória, anticomplemento, anticoagulante, hipoglicemiante, analgésico, antiseptico e, também, atividade antiúlcera (SRIVASTAVA; KULSHVESHTHA, 1989; CAPEK *et al.*, 2003; YAMADA, 1994; NERGARD *et al.*, 2005; CIPRIANI *et al.*, 2008; RUTHES *et al.*, 2012; NASCIMENTO

*et al.*, 2013; SCOPARO *et al.*, 2014; CANTU-JUNGLES *et al.*, 2014). Sendo assim, estes compostos serão o foco principal abordado neste trabalho.

#### 2.2.1.1 Carboidratos nas plantas – parede celular e polissacarídeos

Nas plantas, os carboidratos existem como monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados, tais como: glicosídeos cianogênicos e fenólicos, flavonóides glicosilados e glicoproteínas (AVIGAD; DEY, 1997). Depois da água, eles são os principais constituintes químicos da maioria dos tecidos e células das plantas, isto porque formam a parede celular, que é o suporte estrutural para as células vegetais, entre outras estruturas. Conseqüentemente, os carboidratos estruturais das plantas formam a mais abundante reserva de compostos naturais disponível no planeta e são certamente nosso mais importante recurso natural renovável (REID, 1997).

Com poucas exceções, as células das plantas são envolvidas pela parede celular (REID, 1997). Ela confere resistência e forma para a célula, rigidez para a planta toda, controla o crescimento celular, participa na comunicação célula-célula e protege a célula contra o ataque de patógenos e predadores (BRETT; WALDRON, 1990).

A parede celular vegetal é uma estrutura dinâmica, cuja forma, composição e propriedades são constantemente alteradas ao longo da vida celular em resposta ao crescimento, diferenciação, ambiente e atividades da célula. Nas células vivas, a parede celular influencia a taxa e a direção do crescimento celular, exercendo uma profunda influência no desenvolvimento e morfologia vegetal. Assim, determina a forma da célula, a textura do tecido e a forma final do órgão vegetal (CARPITA; McCANN, 2000; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

A parede celular das plantas é altamente organizada, apresentando muitos polissacarídeos diferentes, proteínas e substâncias aromáticas. Destes, os polissacarídeos são os principais componentes da parede celular e de suas armações estruturais, sendo divididos em pectinas, hemiceluloses e celulose (CARPITA; McCANN, 2000) (Figura 1). A composição da parede celular primária das dicotiledôneas é, tipicamente, 25-40% celulose, 15-25% hemicelulose, 15-40% material péctico e 5-10% proteínas e proporções muito pequenas de compostos fenólicos. Já a parede celular secundária, muito mais espessa que a parede

primária, consiste de 40-45% de celulose, 15-35% de hemicelulose, 15-30% de lignina e quantidade negligenciável de pectina (DEY; BROWNLEADER; HARBONE, 1997).

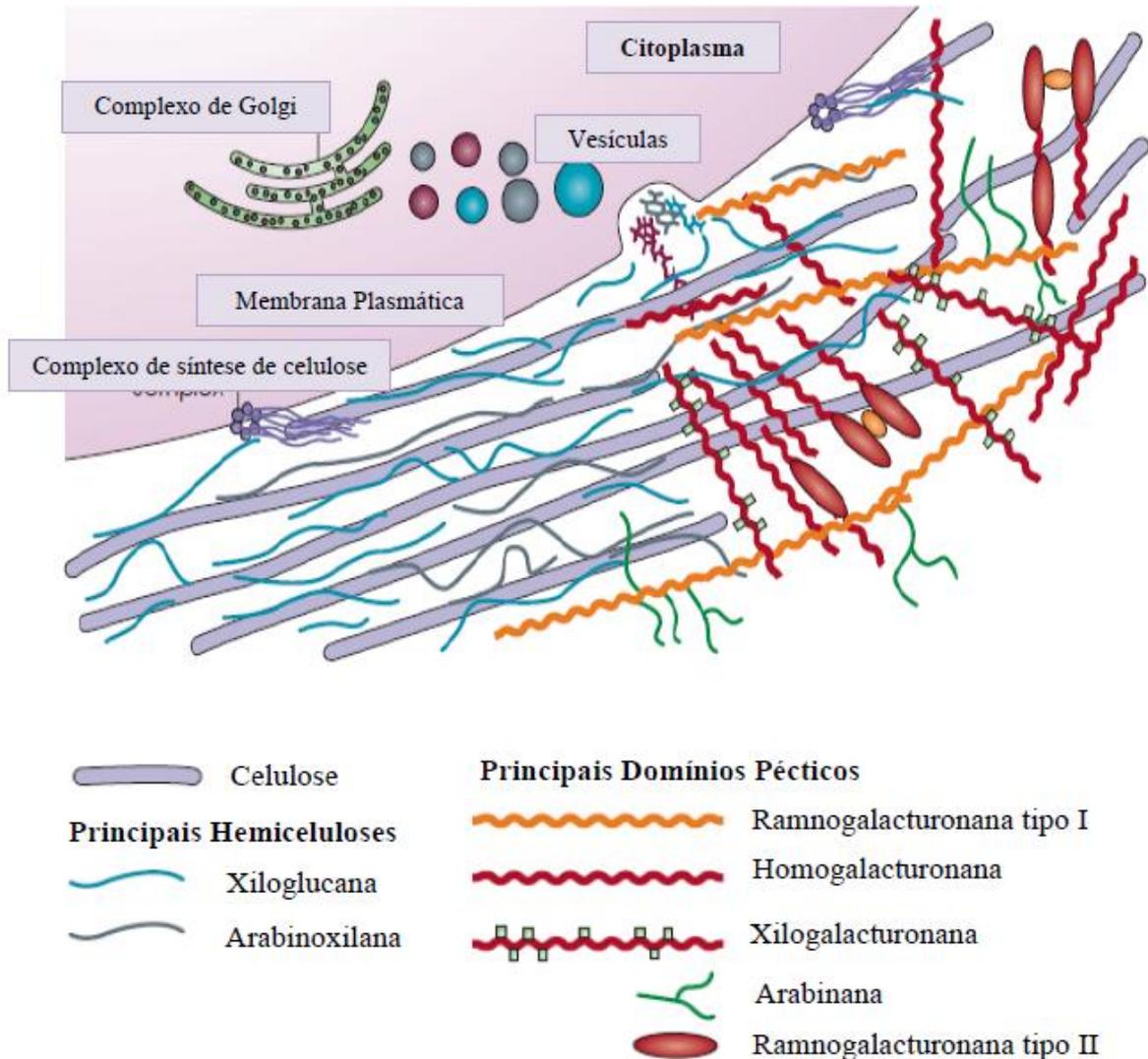


Figura 1 – Ilustração esquemática da estrutura da parede celular primária vegetal.  
FONTE: Adaptado de COSGROVE, 2005.

As pectinas são polissacarídeos ricos em ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. Os constituintes fundamentais das pectinas são o ácido poligalacturônico (PGA) e as ramnogalacturonanas do tipo I (RGI). As ramnogalacturonanas do tipo II constituem a terceira classe de polissacarídeos pécnicos ricos em ácido galacturônico. As arabinanas, galactanas e arabinogalactanas são frequentemente encontradas em frações pécnicas,

constituindo cadeias laterais das RGI (Figura 2) (ASPINALL, 1980; BRETT; WALDRON, 1990; CARPITA; GIBEAUT, 1993).

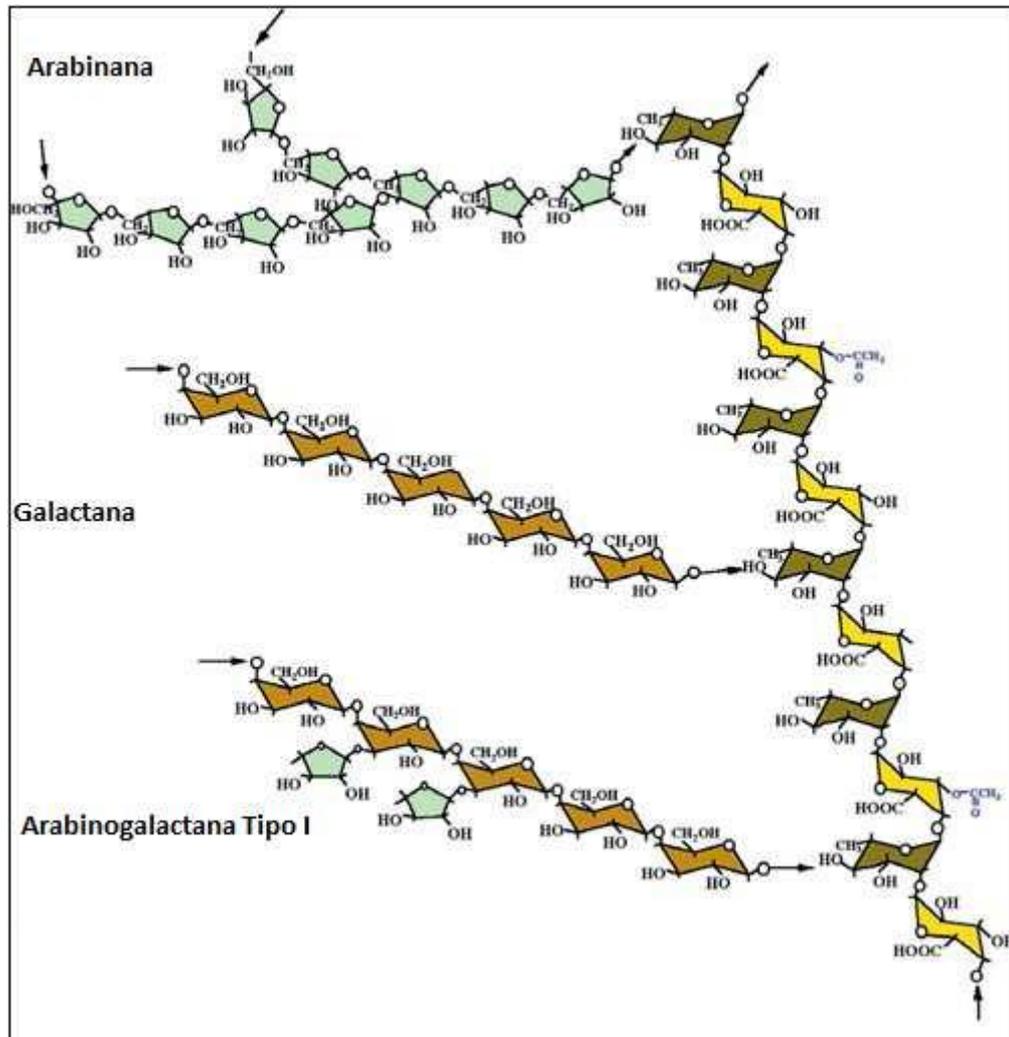


Figura 2 – Estrutura básica de ramnoglacturonana tipo I (RGI), com cadeias laterais de (1→4)-β-D-galactana, (1→5)-α-L-arabinana e arabinoglactana tipo I (AGI)  
 FONTE: Adaptado de CARPITA e MCCANN, 2000.

As hemiceluloses são polissacarídeos que ocorrem em íntima associação com a celulose, especialmente em tecidos lignificados (ASPINALL, 1959). São hemiceluloses: xilanas, glucomananas, mananas, galactomananas, glucuronomananas, xiloglucanas, calose (β-glucanas com ligações 1→3), β-glucanas 1→3, 1→4 ligadas e arabinoglactanas do tipo II (ASPINALL, 1980; BRETT; WALDRON, 1990). Este último tipo de polissacarídeo também pode estar presente em frações pécticas, associado a moléculas de RGI (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Ainda não existem na literatura estudos relacionados aos polissacarídeos encontrados em folhas de erva-mate. Dessa forma, torna-se interessante caracterizar estruturalmente esses polissacarídeos e verificar possíveis atividades farmacológicas a eles relacionadas.

### 2.2.2 Metabolismo secundário

Entende-se por metabolismo secundário de plantas, o conjunto de processos metabólicos que originam compostos que não possuem uma distribuição universal nos vegetais, por não serem necessários a todas as plantas (PERES *et al.*, 2008). Diferente do primário, o metabolismo secundário não é essencial para o desenvolvimento do vegetal, mas é imprescindível para a sobrevivência de uma espécie dentro de um ecossistema, viabilizando a adaptação do indivíduo no ambiente, respondendo pelas relações e interações entre planta ambiente (MONTANARI, 2002).

Esses metabólitos ainda não possuem suas funções fisiológicas completamente elucidadas, no entanto sua produção é associada à defesa da planta contra o ataque de patógenos, herbivoria e radiação solar (MONTANARI, 2002) ou ainda atuando na competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microorganismos simbiotes (PERES, 2008).

Estes compostos são os principais responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos, das plantas e a sua ação biológica pode acontecer com as substâncias químicas isoladas ou em associação, que podem estar armazenadas em diferentes locais e órgãos do vegetal. Estes constituintes químicos são extremamente diversos. Cada família, gênero e espécie produz uma categoria de compostos químicos característica ou uma mistura delas, e elas, por vezes, podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos na classificação das plantas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

Os metabólitos secundários podem ser classificados com base na sua estrutura química (p.ex. possuir anel aromático, com ou sem unidades de açúcar), composição (p.ex. conter ou não nitrogênio), a via pela qual são biossintetizados, origem da planta ou sua solubilidade em vários solventes (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003; WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008). Uma

classificação simples inclui três grupos principais: terpenóides, fenólicos e alcalóides. A caracterização de compostos pertencentes a estas três classes será abordada juntamente com a composição química da planta, objeto de estudo deste trabalho (Item 2.5).

## 2.3 ERVA-MATE

### 2.3.1 Descrição botânica

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) é uma árvore dióica, subtropical, perene, nativa da América do Sul, pertencente à família Aquifoliaceae (SANTOS, 2004). Sua área de ocorrência natural compreende o nordeste Argentino, Leste do Paraguai, centro do Uruguai e, principalmente, a região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Em menor quantidade, aparece no Mato Grosso do Sul e em reduzidos nichos de ocorrência de *Araucaria angustifolia* em Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (PASINATO, 2004). A Figura 3A mostra as principais regiões onde a erva é cultivada.

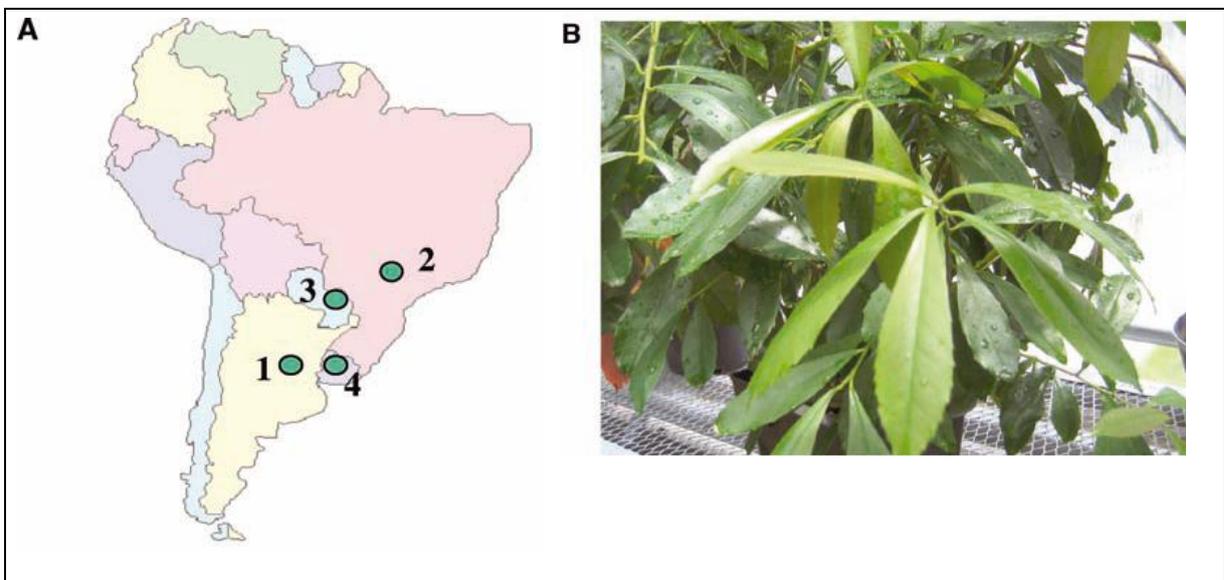


Figura 3 – (A) Área de distribuição da erva-mate, (1) Argentina; (2) Brasil; (3) Paraguai e (4) Uruguai. (B) *Ilex paraguariensis* (planta).  
FONTE: Adaptado de Heck e De Mejia (2007).

De altura variável, a erva-mate quando cultivada atinge cerca de 3-5 m, porém, na floresta pode alcançar 25 m de altura. As folhas apresentam limbo

obovado e, geralmente apresenta 5 cm a 10 cm de comprimento por 3 cm a 4 cm de largura (CARVALHO, 1994) (Figura 3B). A erva é uma espécie produtora de flores e frutos, florescendo no período de outubro a novembro e frutificando de março a junho. A planta requer um regime anual rigoroso de chuvas, mas é pouco sensível à temperatura, sendo capaz de resistir a temperaturas de -6 °C, assim como períodos de neve, os quais acontecem em algumas das regiões onde é cultivada (HECK; DEMEJIA, 2007).

O cultivo e colheita do mate não são procedimentos uniformes, sendo realizados por vários métodos, dependendo da região. As três maneiras principais para o cultivo e colheita são a exploração extrativista da floresta natural (ervais nativos), sistema misto, e plantações cultivadas (monocultivo). O consorciamento com outras espécies (sistema misto) e a exploração dos ervais nativos são bastante populares no Brasil, entretanto, pouco utilizados no Paraguai, enquanto que os monocultivos são o principal modo de produção na Argentina (HECK, SCHAMALK; DEMEJIA, 2008).

A exploração da erva-mate consiste em uma atividade agrícola importante e representa um auxílio no equilíbrio dos ecossistemas locais, pois aceita o sistema de consorciação com outras espécies e ajuda a conservar a diversidade biológica local (PASINATO, 2004). No entanto, estudos têm considerado que o microclima, em especial a luminosidade, é um fator determinante de alteração das características, como área foliar e fitomassa nos cultivos de erva-mate (VIEIRA *et al.*, 2003). Além disto, acredita-se que poderia influenciar no sabor das infusões provenientes desses cultivos, por haver diferenças na composição química de plantas cultivadas em diferentes ambientes.

As melhores condições de desenvolvimento, longevidade e produtividade da erva-mate estão intimamente ligadas à fertilidade do solo e sua exploração racional. Quanto à longevidade, calcula-se que a planta seja capaz de viver, em estado selvagem, algumas dezenas de anos, permitindo colheitas periódicas e sucessivas, desde que sua exploração seja realizada com cuidado, pois existem indicações acerca do aumento gradativo da produtividade estar diretamente relacionado com a idade da planta, sendo o limite, aproximadamente 30 anos (VALDUGA, 2002).

### 2.3.2 Formas de uso

A cultura da utilização da erva-mate é antiga no Sul do Brasil, tendo sido iniciada pelos índios nos primórdios de sua civilização e inicialmente utilizada por pajés e caciques, por atribuírem propriedades terapêuticas surpreendentes. Com o passar dos anos, passou a ser utilizada também pelos colonizadores, representando uma expressão cultural forte na região (BERKAI; BRAGA, 2000).

O consumo do produto está atrelado à tradição de se tomar chimarrão, chá ou derivados, sendo os estados do Paraná e Rio Grande do Sul os tradicionais consumidores de chimarrão, de forma que cerca de 80% do consumo de erva-mate é sob a forma dessa bebida. Já no Mato Grosso do Sul demanda-se e aprecia-se mais o chá mate e o tererê (PARANÁ, 2000).

O chimarrão constitui-se na principal infusão feita à base de erva-mate triturada, com ampla difusão na Argentina, Paraguai, Uruguai e Sul do Brasil. Para o consumo tradicional, utiliza-se um recipiente de volume variável, denominado cuia, em que são acondicionadas a erva-mate e a bomba, sendo esta um cilindro metálico que filtra a infusão no seu extremo inferior. Assim, “tomar chimarrão” constitui-se na sucção (pelo outro extremo da bomba) do extrato obtido pela sucessiva adição de água quente (70 °C a 90 °C) à erva-mate (SABBATELLA *et al.*, 2006).

Diferente do chimarrão e do chá mate, que são infusões à quente, o tererê é uma bebida fria preparada a partir de um produto diferenciado de folhas de erva-mate, as quais são trituradas de forma mais grosseira (ANDRADE *et al.*, 1999 *apud* PASINATO, 2004). As infusões quentes permitem a extração quase completa dos componentes solúveis em água, porém na infusão a frio (tererê) a extração dos compostos solúveis é razoavelmente inferior (PARANÁ, 2000).

A importância da cultura do chimarrão para o Rio Grande do Sul foi formalizada através da promulgação da Lei nº 11.929, de 20 de Junho de 2003, a qual institui o chimarrão como “bebida símbolo” do Estado do Rio Grande do Sul (RIO GRANDE DO SUL, 2003). Dentro deste contexto, convém citar a inégavel influência econômica da erva-mate no viés histórico da Revolução Farroupilha, importância tal que promoveu sua representação na bandeira do Rio Grande do Sul (LINHARES, 1969 *apud* PASINATO, 2004).

Atualmente, o setor ervateiro ainda depende quase que exclusivamente da comercialização da erva-mate na forma de chimarrão (RUCKER; MACARI; ROCHA,

2003), o que limita o mercado às regiões onde é produzida. Estudos têm sido conduzidos com o intuito de identificar rotas alternativas para aplicação da erva-mate, visando agregar valor a essa importante matéria prima regional (VALDUGA, 1994). Segundo o Anuário Brasileiro de Erva-mate (1999), há um cenário favorável para o crescimento do consumo da erva-mate, tanto no Brasil, como no exterior.

No âmbito do desenvolvimento de novos produtos a erva-mate apresenta-se como um potencial candidato, seja na utilização de seu extrato solúvel, como na linha de chás, em que seus benefícios nutricionais e terapêuticos proporcionariam suporte a esta finalidade. As pesquisas nesta linha deverão ser implementadas e intensificadas e as indústrias alertadas para a importância desta demanda, estimulando-as a trabalharem conjuntamente para potencializar o desenvolvimento e inovações nesta área.

## 2.4 PROCESSAMENTO E PRODUTOS

A erva-mate será classificada como chimarrão quando for cancheada (triturada e peneirada), padronizada, moída e preparada para o consumo com água quente e será classificada como chá mate quando for cancheada e tostada para o consumo como infusão (BRASIL, 1998).

### 2.4.1 O chimarrão

A indústria da erva-mate evoluiu consideravelmente nos últimos anos e, nos dias atuais, modernos soques ervateiros e máquinas movidas a energia elétrica são utilizados. Entretanto, ainda hoje são encontradas unidades que empregam tecnologia tradicional, com o predomínio de equipamentos manuais e o fogo continua sendo a única metodologia empregada nos processos de sapeco e secagem (BERKAI; BRAGA, 2000).

O processo agroindustrial da erva-mate no Brasil está estruturado sobre dois ciclos: cancheamento e beneficiamento. O ciclo do cancheamento se constitui por três etapas: sapeco (branqueamento), secagem e cancheamento (trituração), resultando na erva cancheada. Da mesma forma, o ciclo do beneficiamento se resume em três operações fundamentais: retificação da umidade (por secagem),

separação (folhas e palitos) e mistura (formação de tipos especiais de erva-mate para comercialização) (PARANÁ, 2000).

As condições para o processamento são variadas, dependendo do produtor e do objetivo final para o estilo de infusão desejado. Os processadores podem variar o período de tempo e a temperatura de sapeco e secagem. Nem todos os produtores envelhecem a erva, enquanto outros variam o tempo de envelhecimento (BASTOS *et al.*, 2006a).

#### 2.4.1.1 Sapeco

O sapeco consiste do contato rápido dos ramos e das folhas de erva-mate com chamas de fogo. Na sua forma rudimentar, é realizado manualmente, junto a chama e consiste na passagem rápida dos ramos com folhas sobre o calor de uma fogueira de lenha, específica para este fim. O sapeco mecânico é um tratamento térmico realizado dentro de um cilindro metálico rotativo, onde a temperatura média da erva na entrada do sapecador é de 400 °C e na saída é de 65 °C. O tempo de residência oscila em torno de 8 minutos (PARANÁ, 2000; MENDES, 2005).

O sapeco tem por finalidade reduzir a umidade e evitar o escurecimento das folhas da erva-mate. O escurecimento ocorre pela presença das enzimas polifenoloxidase e peroxidase que, foram identificadas por Senglet (1928) como as responsáveis pela oxidação dos compostos fenólicos quando as folhas frescas são tiradas do pé e deixadas ao ar (PANEK, 1955). Em virtude disso, esse processo deve ser realizado logo após a colheita, a fim de evitar a perda de qualidade dos ramos e folhas da erva-mate, se o produto desejado for a erva do tipo chimarrão. Um tratamento térmico ineficiente ou excessivo nessa etapa prejudicaria a qualidade do produto, pois por um lado permitiria a ação residual das enzimas (principalmente as peroxidases) e por outro produziria a queima do produto (XANDER *et al.*, 2000).

Este processo de sapeco está em contraste com a produção de chá preto (proveniente das folhas da *Camellia sinensis*). As folhas do chá preto são expostas a um envelhecimento e oxidação e não são sapecadas antes de secar. Nesta bebida, a oxidação pela polifenoloxidase é permitida para dar forma aos compostos provenientes da condensação dos constituintes químicos presentes na planta (HARA, 2001).

#### 2.4.1.2 Secagem

A operação de secagem de erva-mate é feita no carijó ou barbaquá ou ainda em secadores mecânicos. No carijó, processo primitivo, as chamas atuam diretamente sobre a erva, enquanto que no barbaquá, o material recebe o calor através de um canal subterrâneo, na entrada do qual é colocada uma fornalha (MENDES, 2005). Existem dois tipos de secadores mecânicos: rotativo e de esteira. O tempo de residência e a temperatura média da erva variam entre eles. No secador de esteira, o tempo médio é de 3 horas e a temperatura varia entre 90 e 110 °C. No secador rotativo, o produto permanece em contato direto por aproximadamente 30 minutos. No entanto, na entrada do secador, a temperatura média é de 350 °C e na saída de 110°C (VALDUGA; FINZER; MOSELE, 2003).

O material entra no secador com uma umidade média de 25% e sai com aproximadamente 5% de umidade (VALDUGA; FINZER; MOSELE, 2003). O excesso de água pode ocasionar deterioração microbológica e degradação enzimática dos constituintes nutricionais e químicos do produto (PARANÁ, 2000), além de acelerar outros processos de deterioração.

#### 2.4.1.3 Cancheamento

O cancheamento consiste na trituração da erva-mate após o processo de secagem. Este pode ser feito por meio de um triturador de madeira dura (pequena escala), ou um cancheador metálico (escala industrial). Em seguida, a erva é peneirada e o material coletado passa a denominar-se erva cancheada. Esse termo é utilizado devido à produção da erva-mate cancheada ser realizada em local assoalhado denominado de cancha, onde a massa foliar é submetida à trituração ou fragmentação (COSTA, 1989). Esta pode ser usada diretamente como matéria prima para chás ou como matéria prima para engenhos ou beneficiamento, especialmente para a preparação de produtos comerciais, como a erva-mate para o chimarrão.

#### 2.4.1.4 Beneficiamento

A erva-mate cancheada é peneirada e misturada em proporções de folhas e hastes de acordo com o produto desejado. A erva cancheada é armazenada em

sacos, tulhas, ou a granel, quando destinada ao mercado interno, tendo como tempo de armazenagem três a quinze dias. Se destinada a produção de erva-mate para o chimarrão, após a mistura, a erva é moída para reduzir a granulometria do material, utilizando moinho de facas ou soque (VALDUGA; FINZER; MOSELE, 2003).

#### 2.4.2 Chá mate

O chá mate é obtido da erva-mate cancheada e tostada e deve seguir o Regulamento Técnico para Fixação da Identidade e Qualidade de Chás – plantas destinadas à preparação de infusões ou decocções - da Secretaria da Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde (Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998), que define chás como produtos constituídos por partes de vegetais (inteiras, fragmentadas ou moídas) obtidos por processos tecnológicos adequados a cada espécie, utilizados exclusivamente na preparação de bebidas por infusão ou decocção em água potável (BRASIL, 1998).

Quanto à designação, o produto, quando simplesmente produzido a partir da *Ilex paraguariensis*, deve conter a expressão: “chá mate” seguida dos termos “verde”, “tostado” ou “queimado” (BRASIL, 1998).

A erva-mate, após sofrer o processo de cancheamento e torrefação, ao contrário de algumas outras plantas usadas na obtenção de chás, não passa por processo de oxidação, podendo ser chamada de erva-mate tostada. Somados aos fatores naturais que interferem diretamente nos componentes físico-químicos da erva-mate, estão os sistemas de processamento, que além de interferir na sua composição química, ainda determinam a qualidade da erva, bem como suas características sensoriais (DONADUZZI *et al.*, 2000).

O processo de torrefação leva a modificações importantes em produtos de origem vegetal, como a formação de melanoidinas, assim como a possível diminuição do teor de polifenóis. Essas mudanças refletem-se nas atividades biológicas desses produtos, entre elas a atividade antioxidante, conforme já relatado, por exemplo, para o café e o cacau (FLAMENT, 1991; CHYAU *et al.*, 2002; SAKANARA; TACHIBANA; OKADA, 2005).

Há um vasto potencial a ser explorado com a inclusão da erva-mate na linha de bebidas quentes, quando bem processada e padronizada, utilizando a tecnologia já disponível para o chá (VALDUGA; FINZER; MOSELE, 2003). Dessa forma, o uso

do processo oxidativo, similar ao que é realizado com a *Camellia sinensis*, pode tornar-se uma boa alternativa na obtenção de chás provenientes da erva-mate, sem que haja a influência da torrefação de suas folhas, em suas características físico-químicas.

#### 2.4.3 Modalidades de processamento

A principal diferença entre a produção do chimarrão e do chá verde é o método de secagem. O chá verde é seco rapidamente, em altas temperaturas, o que retém as características de folhas secas, fonte de desenvolvimento do sabor e aroma. A erva-mate é seca lentamente e frequentemente usando-se a fumaça da madeira. Isto resulta em características diferentes de sabor e contribui com as mudanças na composição química e na aparência física (HECK; DE MEJIA, 2007).

Outra importante diferença entre a erva-mate e o chá verde é a presença de hastes no produto final. No chá verde todas as hastes grandes são removidas antes de moer, enquanto que no mate pode haver um alto índice de hastes (HECK; MEJIA, 2007). A Figura 4 mostra as principais diferenças entre os processamentos da erva-mate para chimarrão e chá mate e dos chás verde e preto, no caso da *Camellia sinensis*.

O processo de sapeco não está presente na elaboração do chá preto, pois o objetivo é o escurecimento das folhas por ação das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas, as quais são inativadas durante o processo de sapeco. Por outro lado, por promover a oxidação de compostos fenólicos, as oxidases podem ser empregadas em processos biotecnológicos (CENI, 2005).

Molin (2011) padronizou o processo oxidativo em erva-mate, estudando suas características físico-químicas e relacionando-as com melhores condições de processamento (pH, temperatura e umidade) e tempo de oxidação, obtendo bons resultados com relação ao aroma e sabor da infusão proveniente das folhas oxidadas.

Acredita-se que devido à composição abundante de polifenóis, assim como observado na *Camellia sinensis*, a erva-mate pode consistir em um recurso viável para a elaboração de novos produtos, por meio de processos oxidativos.

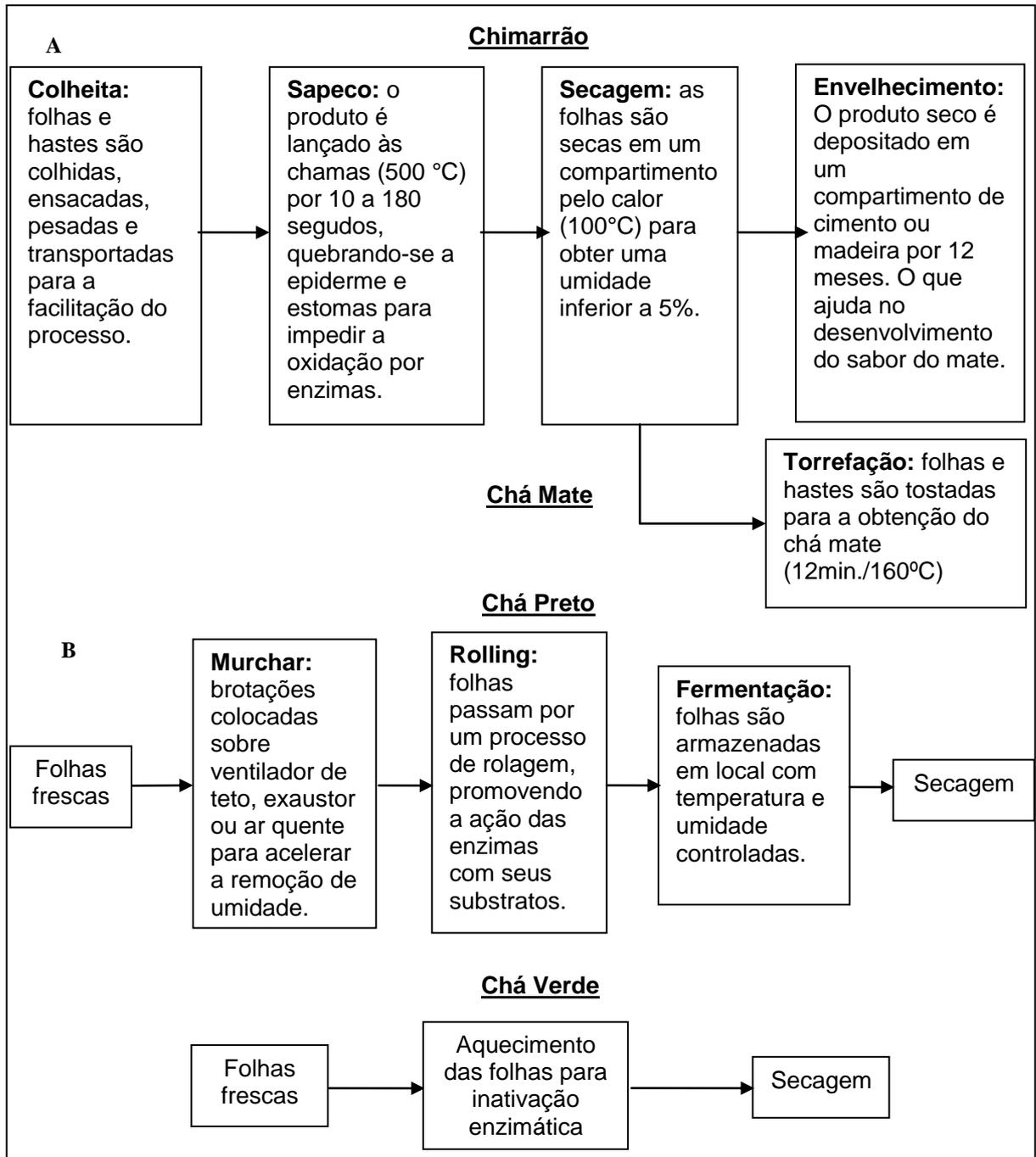


Figura 4 - **(A)** Processamento das folhas de *Ilex paraguariensis* no chimarrão e chá mate **(B)** Processamento das folhas de *Camellia sinensis* no chá preto e no chá verde.  
 FONTE: Adaptado de Schmalko e Alzamora (2001); Heck e De Mejia (2007).

## 2.5 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA

As investigações químicas relativas à erva-mate iniciaram-se com Trommsdorff em 1836, que constatou a presença de diversas substâncias resinosas, matéria corante amarela, ácido tânico e outros. A identificação do principal alcaloide,

a cafeína, ocorreu em 1843 por Stenhouse. Em 1848 Rochleder, estudando o mate do Paraguai, identificou o ácido do mate – o ácido cafeico, já conhecido das sementes de café (CENI, 2005).

Numerosos compostos químicos ativos foram identificados na erva-mate, os quais acredita-se serem benéficos à saúde. As classes de compostos mais abundantes são, os polifenóis (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico) e as xantinas (cafeína e teobromina), seguidos por flavonoides (quercetina, caempferol e rutina); aminoácidos, minerais (P, Fe e Ca) e vitaminas (C, B1 e B2) (POMILIO; TRAJTEMBERG; VITALE, 2002; ZAPOROZHETS *et al.*, 2004).

### 2.5.1 Xantinas

As xantinas são uma classe de alcaloides de purina encontradas em muitas plantas, incluindo o chá, o café e o cacau. As xantinas encontradas na erva-mate incluem a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) e teofilina (1,3-dimetilxantina) (ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, 2000). As fórmulas estruturais destes compostos estão apresentadas na Figura 5.

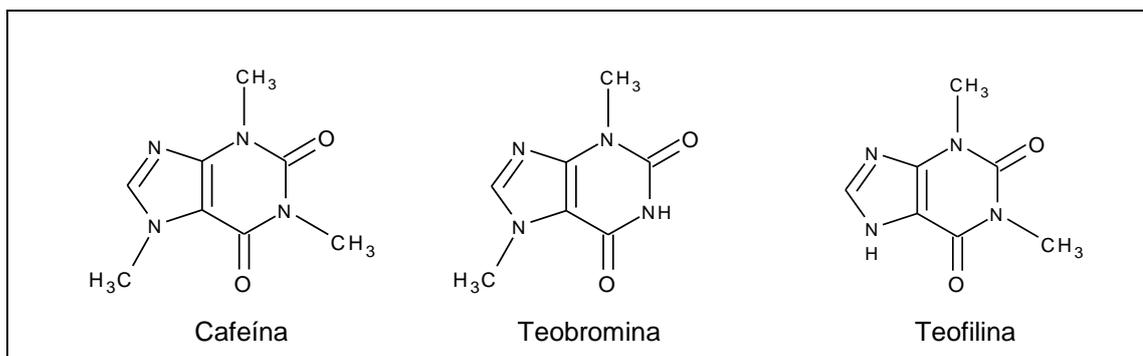


Figura 5 - Estrutura das xantinas: cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) e teofilina (1,3-dimetilxantina).  
 FONTE: Adaptado de Heck e De Mejia (2007).

Dos três compostos, a cafeína é encontrada em concentrações mais elevadas, 1 a 2% do peso seco da planta, seguida pela teobromina, 0,3 a 0,9% do peso seco (ITO; CROZIER; ASHIHARA, 1997).

Estes dois compostos são encontrados, primeiramente, nas folhas da planta e frequentemente em concentrações menores nas hastes presentes no chimarrão. Em contraste com a cafeína e a teobromina, a teofilina é encontrada em pequenas quantidades nas folhas da planta. Isto se deve ao fato da teofilina ser um intermediário no catabolismo da cafeína (ITO; CROZIER; ASHIHARA, 1997).

São atribuídas às metilxantinas várias propriedades farmacológicas, que incluem estimulação do sistema nervoso central, vasoconstrição periférica, relaxamento do músculo liso e estimulação do miocárdio (KIKATANI; WATANABE; SHIBUYA, 1993; LORISTI; TOPS, 2003).

O conteúdo de xantinas está associado a fatores genéticos e ambientais. Há evidências de que a época de colheita influencia a concentração das metilxantinas encontradas na espécie, variando entre 1 a 10 mg de metilxantinas totais por grama de folha, dependendo da época do ano (SCHUBERT *et al.*, 2006). Além disso, Dartora e colaboradores (2011) demonstraram que folhas obtidas de erva-mate cultivada em ambiente sombreado apresentam um conteúdo ligeiramente maior de xantinas quando comparadas a folhas obtidas de plantas crescidas ao sol.

O processo de secagem também pode afetar significativamente a concentração de cafeína, de modo que a sua concentração em folhas secas é mais baixa do que em folhas frescas (SCHMALKO; ALZAMORA, 2001; DARTORA *et al.*, 2011). Entretanto, quando preparadas infusões provenientes de folhas secas, em comparação com aquelas provenientes de folhas frescas, observa-se uma concentração mais elevada na infusão oriunda do produto seco. Isso pode ser explicado pelo rompimento das células durante o processo de secagem, o que possibilita a liberação de compostos antes armazenados no citoplasma (BASTOS *et al.*, 2006b).

### 2.5.2 Polifenóis

Os polifenóis são uma classe de compostos que contêm um anel de benzeno com um ou mais grupos de hidroxilas. A presença de ácidos fenólicos em folhas de erva-mate é conhecida desde 1935, quando Woodard e Cowland (*apud* ALIKARIDIS, 1987) relataram a presença de uma substância chamada *coffetannin* que, quando hidrolisada, resultava em ácido caféico.

Esses compostos foram analisados por diferentes métodos, incluindo HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (CARINI *et al.*, 1998; CHANDRA; DEMEJIA, 2004), demonstrando que suas concentrações na erva-mate variam de acordo com sua moagem, grau de pureza e também de acordo com o tipo de solvente orgânico usado para sua extração. Também foi observado que o conteúdo de compostos fenólicos em infusões de erva-mate varia de acordo com o tipo de cultivo da planta (em ambiente sombreado e luminoso) e também com relação ao tipo de processamento que é realizado nas folhas após a colheita (DARTORA *et al.*, 2011).

Há controvérsias em relação à função fisiológica dos fenólicos na planta. GREEN e CORCORAN (1975) suspeitavam que poderiam funcionar como reguladores de crescimento nas plantas. O aumento da ocorrência de fenólicos em células periféricas expostas à maior iluminação sugerem um mecanismo de proteção contra o estresse causado pela luz solar (SALATINO *et al.*, 1988). Segundo BEART *et al.* (1985), a natureza defensiva destas substâncias é explicada, pois ocorre um aumento em sua concentração como resultado de qualquer infecção ou lesão. Para STRACK (1997), os compostos fenólicos podem proteger as plantas contra predadores herbívoros que reagem sensivelmente ao conteúdo fenólico nas plantas.

Compostos polifenólicos encontrados nas infusões de erva-mate diferem significativamente dos encontrados no chá verde, porque no mate não foi observada a presença de catequinas, mas sim considerável concentração de ácido clorogênico.

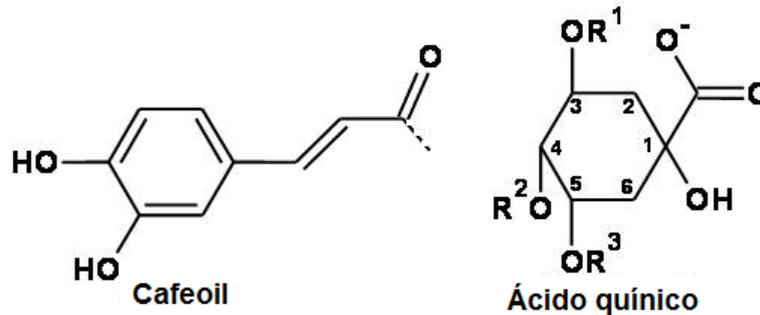
### 2.5.3 Ácidos clorogênicos e ácidos cafeoilquínicos

Os ácidos clorogênicos pertencem à família dos ácidos cinâmicos, que contém uma série de ácidos *trans*-fenil-3-propenóicos diferentes, em sua substituição do anel. Os mais comuns são os ácidos cafeico (3,4-dihidroxicinâmico), ferúlico (3-metoxi,4-hidroxi), sinápico (3,5-dimetoxi,4-hidroxi) e *p*-cumárico (4-hidroxi) (BASTOS *et al.*, 2007).

Os ácidos clorogênicos são ésteres formados entre estes ácidos *trans*-cinâmicos e o ácido quínico, e o mais comum é o ácido 5-*O*-cafeoilquínico. Segundo Clifford (2000) estes ésteres podem ser subdivididos pela identidade, número e posição dos resíduos acila. Mono- e di-ésteres de ácido caféico (ácidos

cafeoilquínicos), ácido *p*-cumárico, ácidos *p*-cumaroilquínicos e ácido ferúlico (feruloilquínicos) são os principais ácidos fenólicos em erva-mate.

Os derivados de cafeoil (ácidos cafeoilquínicos) encontrados na erva-mate incluem o ácido clorogênico (ácido 5-*O*-cafeoilquínico), ácido *neo*-clorogênico, ácido *cripto*-clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico (Figura 6) (FILIP *et al.*, 2000; DARTORA *et al.*, 2011).



#### Série de ácidos cafeoilquínicos

$R^1, R^2 = H; R^3 = \text{cafeoil}$  - ácido clorogênico

$R^1, R^3 = H; R^2 = \text{cafeoil}$  - ácido criptoclorogênico

$R^2, R^3 = H; R^1 = \text{cafeoil}$  - ácido neoclorogênico

#### Série de ácidos dicafeoilquínicos

$R^3 = H; R^1, R^2 = \text{cafeoil}$  - ácido 3,4-dicafeoilquínico

$R^2 = H; R^1, R^3 = \text{cafeoil}$  - ácido 3,5-dicafeoilquínico

$R^1 = H; R^2, R^3 = \text{cafeoil}$  - ácido 4,5-dicafeoilquínico

Figura 6 - Estrutura dos isômeros de ácidos cafeoilquínicos e dicafeoilquínicos.

FONTE: Dartora (2011).

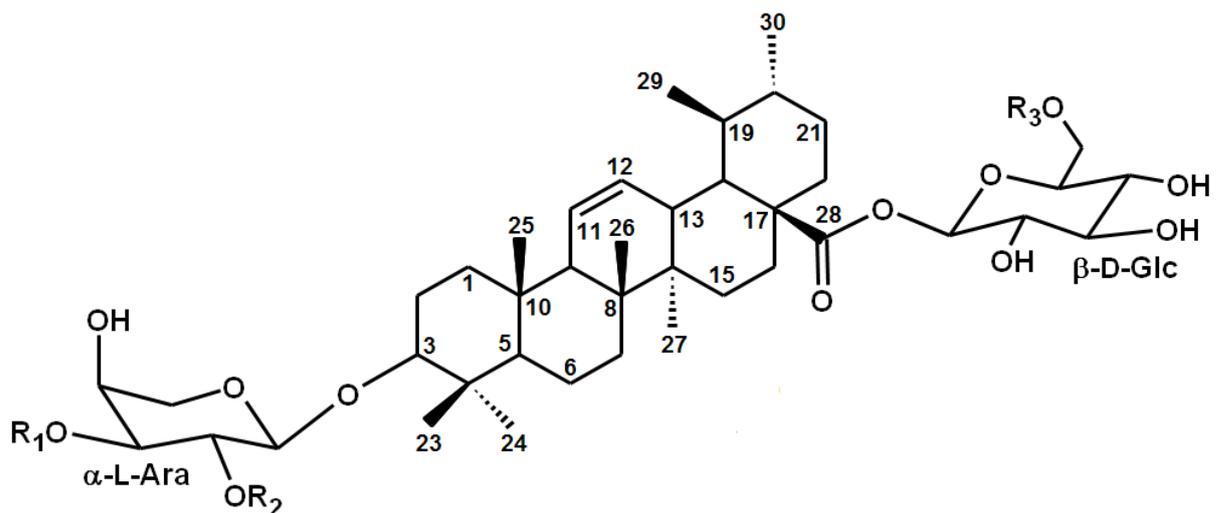
A concentração de polifenóis na erva-mate tem uma forte correlação com a capacidade antioxidante deste produto (CHANDRA; DEMEJIA; 2004; DARTORA *et al.*, 2011), sendo que as altas concentrações desses derivados encontrados na espécie *I. paraguariensis*, a diferencia das demais espécies de *Ilex* que podem ser usadas como adulterantes na composição da erva-mate (*I. brevicuspis*, *I. argentina* e *I. dumosa*), as quais possuem concentrações muito baixas desses compostos (FILIP *et al.*, 2001).

#### 2.5.4 Saponinas

As saponinas são estruturalmente constituídas por um núcleo triterpenoidal pentacíclico (aglicona), ao qual se encontram ligados mono e/ou oligossacarídeos,

os quais podem ser ácidos ou neutros. São compostos amargos, solúveis em água, encontrados em muitos tipos de plantas e acredita-se que são fatores distintos das infusões de erva-mate. Tem papel fundamental, não somente no sabor, mas também são atribuídas a elas, propriedades anti-inflamatórias e hipocolesterolêmicas (GNOATTO *et al.*, 2005).

Diversos desses compostos triterpenoides contendo ácido ursólico ou oleanólico foram isolados da erva-mate. As primeiras saponinas identificadas, contendo ácido ursólico e oleanólico foram chamadas de matesaponinas 1, 2, 3, 4 e 5 (GOSMANN *et al.*, 1995) (Figura 7). Recentemente, foram identificadas cerca de trinta novas saponinas ainda não relatadas anteriormente para a erva-mate (SOUZA *et al.*, 2011)



**Matesaponina 1 =  $R_1 = \beta\text{-D-Glc}$ ;  $R_2 = R_3 = \text{H}$**

**Matesaponina 2 =  $R_1 = \beta\text{-D-Glc}$ ;  $R_2 = \alpha\text{-L-Rha}$ ;  $R_3 = \text{H}$**

**Matesaponina 3 =  $R_1 = R_3 = \beta\text{-D-Glc}$ ;  $R_2 = \text{H}$**

**Matesaponina 4 =  $R_1 = R_3 = \beta\text{-D-Glc}$ ;  $R_2 = \alpha\text{-L-Rha}$**

**Matesaponina 5 =  $R_1 = \beta\text{-D-Glc}$ ;  $R_2 = \alpha\text{-L-Rha}$ ;  $R_3 = \beta\text{-D-Glc (1}\rightarrow\text{4) } \beta\text{-D-Glc}$**

Figura 7 – Estrutura genérica das saponinas com a localização comum dos grupos R.  
 FONTE: SOUZA *et al.*, 2011

Grande parte das saponinas encontradas em *Ilex paraguariensis* apresentam propriedades antiparasitárias, incluindo as matesaponinas 1,3 e 4. Também observa-se que os triterpenoides encontrados em *Ilex* são antitripanossomais (TAKETA, 2004).

## 2.6 USOS E BENEFÍCIOS

O mate é uma bebida estimulante, pois elimina a fadiga, estimula a atividade física e mental, atuando benéficamente sobre os nervos e músculos e favorecendo o trabalho intelectual. Por possuir vitaminas do complexo B, o mate participa do aproveitamento do açúcar nos músculos, nervos e atividade cerebral. Juntamente com as vitaminas C e E, age como defesa orgânica e apresenta benefícios sobre tecidos do organismo. A cafeína, que atua como vasodilatador, estimula o trabalho cardíaco, ajudando na circulação do sangue e diminuindo a pressão arterial (BASSANI; CAMPOS, 1997).

O mate favorece a diurese e atua também sobre o tubo digestivo, ativa os movimentos peristálticos, facilita a digestão, favorecendo a evacuação e a micção. Pesquisas do Instituto Pasteur de Paris atribuem também ao mate um papel importantíssimo no processo de regeneração celular (ANDRADE, 1999; VALDUGA, 1994). A Tabela 1 mostra uma lista de alguns compostos identificados em erva-mate, bem como suas atividades biológicas.

Tabela 1 – Compostos identificados em folhas de erva-mate e algumas de suas atividades biológicas.

<b>Compostos</b>	<b>Atividades biológicas</b>
Cafeína	Anticarcinogênica, antiobesidade, antioxidante, diurética.
Ácido clorogênico	Antioxidante, analgésico, antiaterosclerose, bactericida, antidiabético, antitumoral.
Clorofila	Bactericida, anticâncer.
Colina	Antidiabética, lipotrópica.
Ácido nicotínico	Hipocolesterolêmica.
Ácido pantotênico	Antialérgico.
Rutina	Antioxidante, antitumoral, antiúlcera, vasodilatadora e analgésica
Taninos	Antioxidante, antitumoral.
Teobromina	Diurética, estimulante, miorelaxante.
Teofilina	Diurética, estimulante.
Ácido ursólico	Analgésico, antioxidante, antitumoral, antialzaimer.

FONTE: Adaptado de Heck e De Mejia (2007).

Muitos dos efeitos positivos do mate em seres humanos estão relacionados com a presença de metilxantinas (caféina, teobromina e teofilina) e dos ácidos fenólicos (BRAVO; GOY; LECUMBERRI, 2007; CHANDRA; DEMEJIA, 2004; MARQUES; FARAH, 2009). De fato, vários estudos com plantas têm demonstrado uma relação entre o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade de sequestro de radicais livres, incluindo estudos com erva-mate (BIXBY, *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2008; DARTORA *et al.*, 2011).

Inúmeras propriedades farmacológicas são associadas às metilxantinas, que incluem a estimulação do sistema nervoso central, vasoconstrição periférica, o relaxamento do músculo liso e estimulação do miocárdio (KIKATANI, WATANABE; SHIBUYA, 1993; LORIST; TOPS, 2003).

A erva-mate também apresenta considerável conteúdo de saponinas, as quais são conhecidas por suas propriedades anti-inflamatórias, diuréticas e hipocolesterolêmicas (TAKETA, 2004).

## 2.7 ALTERAÇÃO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PLANTAS

A composição química das plantas é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem acarretar alterações significativas na produção de metabólitos. De fato, os metabólitos representam uma interface química entre as plantas e o ambiente.

Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Dentre estes fatores, podem-se ressaltar as interações planta/micro-organismos, planta/insetos e planta/planta; idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos, como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós-colheita. É válido ressaltar que estes fatores podem apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário (MORAES, 2009).

Nas espécies utilizadas na medicina popular ou no preparo de fitoterápicos, variações nos metabólitos podem determinar e/ou influenciar a eficácia do produto. Com relação à erva-mate, inúmeros fatores podem levar a modificações metabólicas e, conseqüentemente, influenciar suas propriedades terapêuticas. Entre estes fatores pode-se citar o local de cultivo, a época da colheita, a maturação das folhas,

além dos processos empregados após a colheita (sapeco, secagem e reações enzimáticas). Assim, estudos que visem a determinação dos metabólitos, bem como a avaliação de suas atividades biológicas, relacionando-os com a diferenciação supracitada são de extrema relevância.

## 2.8 CARACTERIZAÇÃO DAS PATOLOGIAS EM ESTUDO

### 2.8.1 Sepses

O termo sepse é definido como uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), decorrente de infecção, principalmente por bactérias, embora, também, possa ser consequência de infecção por fungos, helmintos e vírus (BENJAMIM, 2001). A microbiologia da sepse tem evoluído na última década, sendo as bactérias gram-negativas, antigamente a causa mais comum de sepse, suplantadas por organismos gram-positivos, que causam agora mais de 50% dos casos (BLOCH, 2007).

A definição de SRIS inclui tanto a sepse quanto doenças semelhantes, provenientes de causas não infecciosas, como trauma, isquemia, pancreatite e hemorragia. As principais características desta condição encontram-se dispostas no Quadro 1 (BENJAMIM, 2001; BLOCH, 2007).

Uma das sequelas da SRIS ou da sepse, que pode vir a surgir, é a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO), que acomete cerca de 30% dos pacientes com sepse, enquanto quase todos desenvolvem disfunção de um órgão. Já choque séptico é um agravamento do quadro de sepse, caracterizado por acentuadas alterações hemodinâmicas (Quadro 1) (BENJAMIM, 2001).

Apesar do arsenal terapêutico disponível na clínica, a sepse continua sendo a principal causa de mortalidade nas unidades de terapia intensiva em todo o mundo (COHEN, 2002). É a décima causa principal de morte nos EUA, com mais de 600.000 casos ocorrendo anualmente, e uma taxa global de letalidade próxima de 20%. As taxas de sepse continuam a se elevar, e intervenções como a disseminação do uso prolongado de cateteres intravasculares, o aumento da implantação de material protético, e a administração de fármacos imunossupressores e agentes quimioterápicos acabam contribuindo para aumentar o risco de infecção e, subsequente, de sepse (BLOCH, 2007).

<p>I. Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS)</p> <p>Dois ou mais dos seguintes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) Temperatura &gt; 38 °C ou &lt; 36 °C.</li> <li>(2) Frequência cardíaca &gt; 90 batimentos/min.</li> <li>(3) Frequência respiratória &gt; 20 respirações/min ou PaCO<sub>2</sub> &lt; 32 mmHg.</li> <li>(4) Contagem de leucócitos &gt; 12 x 10<sup>9</sup>/ℓ ou &lt; 4 x 10<sup>9</sup>/ℓ, ou &gt; 10% de formas imaturas (bastões).</li> </ul>
<p>II. Sepses</p> <p>SIRS mais evidência de infecção.</p>
<p>III Sepses graves</p> <p>Sepses mais disfunção orgânica, hipotensão ou má perfusão (inclusive acidose láctica, oligúria, alteração do estado mental).</p>
<p>IV. Choque séptico</p> <p>Hipotensão (apesar da reposição de fluidos) mais anormalidades por baixa perfusão.</p>

Quadro 1 - Definição clínica de sepses.  
 FONTE: adaptado de BLOCH (2007).

Em um quadro de sepses, devem ser avaliados e combatidos três processos distintos, porém interligados, que acontecem concomitantemente: o foco infeccioso, as alterações hemodinâmicas e a resposta inflamatória local e generalizada. Em geral o tratamento de pacientes com sepses ou choque séptico é feito por meio de antibióticos e drogas que interferem nas alterações cardiovasculares consequentes da sepses, não intervindo na resposta inflamatória, sendo que este cenário pode estar corroborando com a alta mortalidade de pacientes com choque séptico (BENJAMIN, 2001).

Neste contexto, inúmeros compostos químicos têm sido testados por modelos experimentais de sepses em camundongos, mostrando-se bastante promissores. Entre eles podemos citar, fucogalactanas isoladas dos fungos *Agaricus bisporus* e *Lactarius rufus* (RUTHES *et al.*, 2012), a fração metanólica de *Pterodon emarginatus*, contendo D-pinitol como componente majoritário (KIATKOSKI, 2011), a fração butanólica de *Eugenia uniflora*, a qual é rica em flavonóides (RATTMANN *et al.*, 2012), polissacarídeos isolados dos chás de *Camellia sinensis* (SCOPARO, *et al.*, 2013), entre outros.

### 2.8.1.1 Modelos experimentais de sepse

#### a) Administração endovenosa de bactéria viva ou de componentes microbianos

A administração endovenosa de LPS (endotoxemia) ou de bactérias como *Escherichia coli* (bacteremia) é amplamente utilizada para o estudo da sepse. É um modelo prático e reprodutível em muitas espécies animais, como ratos, camundongos, coelhos, cachorros e primatas. Entretanto, a incidência de sepse e choque séptico, na clínica, devido à entrada de uma grande quantidade de LPS ou bactéria na circulação (bolus) é muito pequena, levantando a questão se realmente esse modelo mimetiza a evolução de um quadro de sepse (DEITCH, 1998; BENJAMIM, 2001).

#### b) Administração intraperitoneal de bactéria viva ou de componentes microbianos

Esse modelo, também, é muito utilizado para o estudo da sepse, pois reproduz os sinais observados na doença, se aproximando mais do quadro de sepse observado na clínica, pois o processo se inicia a partir do foco infeccioso ou da disseminação de LPS administrados na cavidade peritoneal, e não diretamente na circulação. Mas, ainda assim, o início do processo ocorre de forma muito rápida, e não gradativa, como acontece na maioria dos casos clínicos (BENJAMIM, 2001).

#### c) Modelos de lesão do intestino com consecutiva liberação de flora microbiana

Os dois métodos melhor descritos são o de ligação e perfuração do ceco (*cecal ligation and puncture* - CLP) e o de introdução de cateter no cólon ascendente (*colon ascendens stent peritonitis* - CASP). Estes modelos de lesão com liberação da flora bacteriana são os que mais se assemelham ao quadro de sepse em humanos, decorrente de traumas com perfurações das alças intestinais, colite ou peritonite pós-operatória. Nesses modelos, após a perfuração da parede intestinal, ocorre a liberação gradativa do conteúdo cólico para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, a qual pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (DEITCH, 1998; BENJAMIM, 2001).

Apesar de estes modelos experimentais estarem próximos a um quadro clínico, a maioria dos estudos em sepse experimental baseia-se nos modelos anteriores (a e b), mas existem dados na literatura comprovando que a patogênese da sepse causada, por exemplo, pela administração de LPS ou bactérias intravenosamente, difere daquela induzida por um foco infeccioso, como acontece em uma peritonite (BENJAMIM, 2001). A diferença dos resultados obtidos entre esses modelos está diretamente relacionada à quantidade do estímulo, ao local e à forma de administração (em bolus ou em liberação gradativa), induzindo uma cinética distinta de liberação dos mediadores inflamatórios. Assim, estes modelos de peritonite apresentam maior relevância para a compreensão da evolução da doença (DEITCH, 1998; BENJAMIM, 2001). Dessa forma, o modelo CLP foi selecionado para ser usado no desenvolvimento deste trabalho.

#### 2.8.1.2 Mediadores inflamatórios envolvidos na sepse

As manifestações clínicas da sepse e do choque séptico, tais como febre, hipercoagulação e hipotensão periférica, derivam da liberação sistêmica de mediadores inflamatórios pelas células de defesa e células endoteliais. Os fatores desencadeadores da ativação celular e da cascata de eventos plasmáticos são componentes da parede celular destes organismos, como o ácido lipoteicoico (LTA) e peptidoglicanos, derivados de bactérias gram-positivas (exotoxinas), ou o lipopolissacarídeo (LPS), no caso de bactérias gram-negativas (endotoxinas) (BENJAMIM, 2001).

Um dos eventos que desencadeiam a sepse é o acesso das bactérias à corrente sanguínea e a consequente liberação de suas endotoxinas. Essas endotoxinas ativam células do sistema imune, especialmente os macrófagos, iniciando a resposta inflamatória através da liberação de mediadores como o óxido nítrico, os eicosanóides e as citocinas pró-inflamatórias, com destaque para as citocinas inicializadoras TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral –  $\alpha$ ) e a IL-1 $\beta$  (interleucina - 1 $\beta$ ). Esse evento resulta na ativação e migração de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) para vários tecidos do organismo, mesmo aqueles distantes da origem da infecção (WANG; OUYANG, 1999; OHLSSON *et al.*, 1990; NEVIERE *et al.*, 1999).

Os neutrófilos são, portanto, as primeiras células a chegarem ao sítio de infecção. No interior dos neutrófilos são produzidos grânulos azurófilos, os quais são liberados em resposta ao processo infeccioso. Nestes grânulos são estocadas enzimas proteolíticas como a mieloperoxidase (MPO), importante na produção de espécies reativas de oxigênio. Além desta enzima, os neutrófilos produzem e liberam espécies reativas de oxigênio (ROS) como o óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Todos estes mediadores favorecem a fagocitose dos patógenos (DOWNEY *et al.*, 1993). Entretanto também podem participar da lesão tecidual e intensificar os efeitos da sepse (JOYCE *et al.*, 2004).

Além disso, as endotoxinas liberadas pelos agentes patogênicos ativam outras duas importantes enzimas envolvidas em processos inflamatórios, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a ciclo-oxigenase-2 (COX-2). A iNOS é induzida em resposta a estímulos inflamatórios, tais como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-1, TNF- $\alpha$ ). Quando expressa, iNOS produz grandes quantidades de NO por períodos longos, o que também provoca danos celulares (TINKER; WALLACE, 2006). A COX-2 é outro produto importante da inflamação das células do sistema imune inato, catalisando a formação de prostanoídes inflamatórios, tais como prostaglandinas e tromboxanos, que podem mediar uma resposta inflamatória significativa (HAYASHI *et al.*, 2011). Todos estes fatores associados acabam por agravar o quadro de septicemia no hospedeiro, podendo levá-lo a morte.

### 2.8.2 Úlcera péptica

Nos últimos anos, distúrbios gastrointestinais como úlceras pépticas, refluxo gastroesofágico, síndrome de Zollinger-Ellison e gastrite têm assumido decididamente altas proporções nas populações, tornando-se um importante foco de investigação experimental e clínica.

A úlcera péptica é um dos distúrbios mais comuns que afetam o sistema gastrointestinal, sendo sua incidência durante a vida, superior a 10%, com um pico que ocorre entre 65 e 74 anos (JOSHUA, 2000), acometendo indivíduos de qualquer sexo ou idade, mas ocorrendo com maior frequência em mulheres (THORSEN *et al.*, 2011). A úlcera é entendida como uma lesão profunda da mucosa, na qual os componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais,

células do músculo liso, vasos e nervos podem estar destruídos (MILANI; CALABRO, 2001).

O termo úlcera péptica compreende tanto as úlceras gástricas (estomacais) como as duodenais. Em geral, as úlceras ocorrem mais comumente no duodeno, onde cerca de 90% estão localizadas a 3 cm da junção do piloro com a mucosa duodenal. No estômago as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo na pequena curvatura (25%) (OFMAM, 2000; ABITOL, 2005).

A úlcera gástrica é uma lesão que atinge a mucosa, submucosa e algumas vezes a camada muscular externa. Histologicamente consiste de duas grandes estruturas: a margem da úlcera, formada por tecido adjacente não necrosado da mucosa, denominado componente epitelial, e tecido de granulação na base da úlcera, denominado componente tecidual conectivo (TARNAWSKI, 2005).

A fisiopatologia das úlceras pépticas é considerada um processo multifatorial, que pode ser atribuído ao desequilíbrio entre fatores agressores (como o ácido clorídrico, a pepsina, infecção por *Helicobacter pylori* além do uso de anti-inflamatórios não esteroidais, fumo e álcool) e defesas locais da mucosa, como a secreção de bicarbonato, muco, prostaglandinas, fluxo sanguíneo e óxido nítrico. Embora o tratamento seja frequentemente conduzido para a redução dos fatores agressores, pode também ser dirigido para o fortalecimento das defesas da mucosa do estômago e duodeno (VENKATARANGANNA *et al.*, 1998; JAIN *et al.*, 2006).

A cicatrização da úlcera é um processo complexo, o qual envolve migração celular, proliferação, re-epitelização, angiogênese e deposição da matriz, (TARNAWSKI, 2005; WALLACE, 2001), sendo esses controlados por fatores de crescimento, fatores de transcrição e citocinas (TARNAWSKI, 2005). A cicatrização das úlceras requer angiogênese no tecido de granulação na base da úlcera, juntamente com a proliferação das células epiteliais na margem da úlcera e consequente restabelecimento da arquitetura glandular. O processo inicial de cicatrização das úlceras é acompanhada pelo aumento do fluxo sanguíneo na área ulcerada, dos níveis plasmáticos de gastrina e de citocinas próinflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mas que têm seus níveis reduzidos ao longo do processo de cicatrização. A hipergastrinemia observada no período inicial da cicatrização pode ser atribuída à extraordinária supressão ácida gástrica e expressão de fatores de crescimento como fator de crescimento endotelial (EGF), fator de crescimento

transformador  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF), que controlam a proliferação celular e são conhecidos por exibirem atividade antissecretora (BRZOZOWSKI, 2003).

Os principais fatores que estimulam a proliferação celular, divisão, migração e re-epitelização são os fatores de crescimento. Inicialmente uma quantidade desses fatores é produzida localmente devido à própria ulceração, ou seja, linhagens de células da mucosa começam a expressar genes que produzam esses fatores de crescimento - EGF, fator de crescimento de fibroblastos básicos (bFGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Esses fatores de crescimento, produzidos localmente, ativam a migração de células epiteliais e proliferação via ações autócrinas e/ou parácrinas (TARNAWSKI, 2005).

Todos esses processos ocorrem com o intuito de restabelecer a integridade física da mucosa gástrica, e a cicatrização pela consequente re-epitelização é um processo fundamental, visto que, o epitélio é uma barreira contínua do tecido de granulação que protege a mucosa contra agentes irritantes químicos e contra infecções.

Tem sido contínua e importante a investigação de novas drogas para o tratamento de doenças relacionadas ao trato gastrointestinal. A supressão da secreção ácida gástrica, que constitui o recurso terapêutico mais utilizado, mesmo que em doses recomendadas, às vezes pode conduzir a uma acloridria (ausência de ácido clorídrico) podendo desencadear infecções entéricas como a febre tifóide, cólera e disenteria (JAIN *et al.*, 2007).

Dessa forma, diversos compostos químicos, principalmente polissacarídeos de origem vegetal têm sido alvos de estudos no tratamento pré-clínico de lesões gástricas, tendo se mostrado bastante eficientes. Entre eles, podemos citar uma arabinogalactana obtida por infusão de folhas de *Maytenus ilicifolia*, conhecida popularmente como espinheira santa, uma ramnogalacturonana isolada de *Acmella oleracea* (jambu) (NASCIMENTO *et al.*, 2013), e também heteroxilanas obtidas por extrações alcalinas tanto de *M. ilicifolia* quanto de *Phyllanthus niruri*, conhecida popularmente como quebra-pedra (CIPRIANI *et al.*, 2006; CIPRIANI *et al.*, 2008).

### 3. JUSTIFICATIVA

O uso de produtos naturais como modelo para síntese de fármacos ou a simples utilização pela população é uma tendência crescente, sendo que muitas pesquisas acerca destes produtos têm sido realizadas. Com relação à *I. paraguariensis*, a maioria das pesquisas relatadas foi conduzida com a erva beneficiada para o chimarrão, visto que constitui-se na principal forma de consumo da erva-mate.

Dartora e colaboradores (2011) relataram a influência da maturação das folhas, local de crescimento e tratamentos pós-colheita sobre os compostos de metabolismo secundário extraídos de folhas de erva-mate. No entanto seus efeitos sobre os compostos de metabolismo primário ainda não foram investigados.

Tais fatores merecem ser investigados, uma vez que no preparo de produtos de erva-mate as partes utilizadas geralmente são as folhas, as quais demonstram claras diferenças morfológicas. Enquanto as folhas jovens possuem tamanho menor, cor mais clara e brilho mais intenso, as folhas adultas apresentam características opostas. A partir destes dados é importante avaliar as diferenças na composição fitoquímica de folhas em diferentes idades, uma vez que diferenças entre rotas biossintéticas de indivíduos adultos e jovens é bem estabelecida na literatura.

Além disso, existe uma diferenciação nos valores pagos na erva-mate, consoante ao sistema de cultivo utilizado, isto é, a pleno sol ou em ambiente sombreado. Esta situação decorre da alegação de que a fitomassa oriunda de cultivos em ambientes sombreados apresenta “sabor mais suave” em relação a erva-mate cultivada a pleno sol e, por isso, alcança maior preço no mercado (DA CROCE, 1996). Os fatores que contribuem para a diferenciação no sabor da erva-mate têm sido objeto de especulações, sendo os fatores promotores dessas diferenças, pouco conhecidos.

As técnicas utilizadas para coleta, secagem e armazenamento do material vegetal também podem levar a alterações nos teores dos compostos bioativos (MARTINS *et al.*, 1998; BÖTTCHER; GÜENTHER; KABELITZ, 2003). Com relação à erva-mate, tanto o processo de sapeco e secagem, quanto o de armazenamento podem promover rearranjos, oxidações e reduções das moléculas bioativas presentes nesta planta.

Assim, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a influência dos fatores mencionados acima, na composição de polissacarídeos de folhas de erva-mate.

Os polissacarídeos de origem vegetal, tem sido alvos de diversos estudos, e muitas propriedades terapêuticas tem sido descritas e relacionadas a estes compostos, como atividade anti-úlceras atribuída à arabinogalactanas obtidas por infusão de folhas de *Maytenus ilicifolia* (conhecida popularmente como espinheira santa) e à heteroxilanas obtidas por extrações alcalinas tanto de *M. ilicifolia* quanto de *Phyllanthus niruri*, conhecida popularmente como quebra-pedra (CIPRIANI *et al.*, 2006; CIPRIANI *et al.*, 2008). Uma arabinogalactana ácida, obtida de folhas de *P. niruri*, apresentou atividade imunoestimulante, observada pela ativação de macrófagos peritoniais de camundongos (MELLINGER *et al.*, 2005). Outros trabalhos também têm mostrado a importância terapêutica de diversos polissacarídeos obtidos de plantas, incluindo atividade antiviral, antitumoral, imunoestimulante, anti-inflamatória, analgésica, anticomplementar, anticoagulante, e também hipoglicemiante (YAMADA, 1994; CAPEK *et al.*, 2003; NERGARD *et al.*, 2005).

Visto que não existem dados na literatura relacionados à estrutura de polissacarídeos isolados de *I. paraguariensis*, nem sobre atividades biológicas que possam estar a eles relacionadas, além da estrutura química, serão avaliados o efeito gastroprotetor e anti-inflamatório destas moléculas.

Esta tese, então, atende a importantes etapas para o desenvolvimento de produtos fitoterápicos uma vez que (i) visa a investigação abrangente da constituição química de uma planta de interesse nacional e (ii) atende à portaria nº 971, de 3 de maio de 2006, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde e à portaria da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Portaria n. 19/92 de 30.1.92. Diário Oficial da União, 197, 1995) que determina que a autorização oficial do uso de fitomedicamentos e seus derivados necessita de evidências experimentais, a serem fornecidas por testes. Vale ressaltar, ainda, que este projeto se destaca pela integração de diferentes áreas da ciência, sobretudo a Bioquímica, a Química e a Farmacologia, ressaltando a importância da interdisciplinariedade nos diversos ramos da ciência.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Diante do exposto anteriormente, este trabalho tem por objetivo geral extrair e caracterizar estruturalmente polissacarídeos de folhas de *I. paraguariensis*, avaliando suas propriedades biológicas e desenvolver metodologias para a elucidação estrutural e separação cromatográfica de saponinas encontradas em diferente espécies de *Ilex*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o cumprimento do objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Extrair e caracterizar estruturalmente polissacarídeos presentes nas folhas de erva-mate de diferentes idades e locais de cultivo e submetidas a diferentes tipos de tratamento;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório de polissacarídeos pelo modelo de septicemia induzida pela cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP, *cecal ligation and puncture*) e verificar a taxa de sobrevivência dos camundongos tratados com os polissacarídeos; bem como a ação destes sobre importantes parâmetros inflamatórios como atividade da mieloperoxidase e expressão da COX-2 e da iNOS.
- Avaliar o efeito gastroprotetor dos polissacarídeos contra lesões agudas induzidas por etanol em ratas;
- Caracterizar estruturalmente e comparar compostos fenólicos e saponinas encontrados nas folhas de diferentes espécies de *Ilex*.
- Desenvolver metodologias de separação cromatográfica e derivatizações químicas para diferenciação de saponinas isoméricas.

**ARTIGO I**

---

(Publicado na Carbohydrate Polymers, v. 92, p. 1776-1782, 2013)

**Rhamnogalacturonan from *Ilex paraguariensis*: a potential adjuvant in sepsis treatment**

Nessana Dartora<sup>a</sup>, Lauro M. de Souza<sup>a</sup>, Simone M. M. Paiva<sup>a</sup>, Camila T. Scoparo<sup>a</sup>,  
Marcello Iacomini<sup>a</sup>, Philip A. J. Gorin<sup>a</sup>, Yanna D. Rattmann<sup>a,b\*</sup> and Guilherme L.  
Sasaki<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CP 19046, CEP 81531-980, Curitiba-PR, Brazil.

<sup>b</sup>*Departamento de Saúde Comunitária, Universidade Federal do Paraná, Rua Padre Camargo, 280, CEP: 80060-240, Alto da Glória, Curitiba, PR, Brazil*

\*To whom correspondence should be addressed:

sasaki@ufpr.br (biomolecules and biochemical analysis)

yannadr@yahoo.com.br (pharmacological assays)

Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná,  
CP 19046, CEP 81531-980, Curitiba-PR, Brazil.

Tel: +55-41-3361-1577; fax: +55-41-3266-2042.

**Abbreviations:** **AcOH**, acetic acid; **Ac<sub>2</sub>O**, acetic anhydride; **CLP**, cecal ligation and puncture; **COX-2**, cyclooxygenase-2; **EtOH**, ethanol; **HPSEC**, high-performance size-exclusion chromatography; **IPI**, insoluble fraction (after freeze-thawing); **MPO**, myeloperoxidase; **PI**, crude polysaccharide fraction; **SPI**, soluble fraction (after freeze-thawing) **TMSP-d<sub>4</sub>**, 2,2,3,3- tetradeuterium-3-trimethylsilylpropionate.

## Abstract

The present study evaluated the anti-inflammatory activity of a polysaccharide from maté, using a clinically relevant model of sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP). A polysaccharide from maté (SPI) was obtained from aqueous extraction followed by fractionation, being identified as a rhamnogalacturonan with a main chain of  $\rightarrow 4$ )-6-OMe- $\alpha$ -D-GalpA-(1 $\rightarrow$  groups, interrupted by  $\alpha$ -L-Rhap units, substituted by a type I arabinogalactan. SPI was tested against induced-polymicrobial sepsis, at doses of 3, 7 and 10 mg/kg. Via oral administration, SPI prevented the late mortality of infected mice by a rate of 60% at 10 mg/kg, in comparison with untreated mice. Dexamethasone, used as positive control, was slightly less effective, with an overall survival rate of 16.7% of mice at the end of the observation period. SPI also affected neutrophil influx, avoiding its accumulation in lungs, and significantly decreased tissue expression of iNOS and COX-2. In this context, maté is a potential nutraceutical, and its polysaccharide a promising adjuvant for sepsis treatment, being consumed as tea-like beverages with no related adverse effects.

## Keywords:

Anti-inflammatory; *Ilex paraguariensis*; rhamnogalacturonan; sepsis

## 1. Introduction

*Ilex paraguariensis* (known as maté, erva-mate or yerba-mate) is a native plant from Argentina, Paraguay, Uruguay and southern Brazil, where it has considerable socioeconomic relevance. Leaves and branches from *I. paraguariensis*

are used to prepare commercial tea-like beverages or then sold after being processed and packed. The processing usually consists of blanching (*sapeco*) and milling, and these leaves are prepared as infusions that are appreciated as a hot beverage called *chimarrão* (Filip et al., 2001).

The consumption of maté has increased due to its health benefits, attributed to the presence of secondary metabolites, such as methylxanthines, polyphenols and saponins, readily extracted from leaf tissue during infusion preparations. In fact, an increasing number of biological applications have been claimed for maté infusion-components, such as hepatoprotective, choleric, diuretic, hypocholesterolemic, antirheumatic, anti-thrombotic, anti-inflammatory, anti-obesity and anti-ageing (Johnston, & Paganini-Stein, 1998; Filip et al., 2000; Filip, et al., 2001; Anderson & Fogh, 2001; Gorzalczany et al., 2001; Gugliucci & Menini, 2002; Pittler & Ernst, 2004; Dartora et al., 2011; Mucillo-Baisch, Souza et al., 2011).

Currently, the secondary metabolites from *I. paraguayensis* are the main focus of investigations, lacking information about its primary metabolites. However, with the infusions not only secondary but also primary metabolites, including polysaccharides, are ingested. It is known that many herbs used in folk medicine contain polysaccharides with a recognized variety of biological activities, including antiviral, antitumor, immunostimulation, anti-inflammatory, anticomplementary, anticoagulant, hypoglycemic, and anti-ulcer effects (Srivastava & Kulshveshtha, 1989; Yamada, 1994; Capek et al., 2003; Nergard et al., 2005; Cipriani et al., 2006).

Nevertheless, there are very few reports dealing with the ability of polysaccharides in reducing mortality caused by sepsis. This is a considerable health hazard and a main cause of morbidity and mortality in many intensive care units. It represents a state of overproduction of proinflammatory mediators which frequently

occurs after various noxious injuries, especially bacterial infection, as a consequence of abdominal surgery, appendicitis, perforated ulcers, or an ischemic bowel, and so on (Angus et al., 2001).

Considering the above, we now report the isolation and structural analysis of a polysaccharide via hot aqueous extraction of *I. paraguariensis* (*chimarrão*) and its pharmacological action against murine sepsis, by evaluating the effects on lethality, neutrophil migration and levels of expression of proinflammatory enzymes.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Plant material**

Leaves from *I. paraguariensis* were collected randomly from a homogeneous group of cultivars, with geographical coordinates 27°37'15" south, 52° 22' 47" west at a 765 m altitude (Barão de Cotegipe, State of Rio Grande do Sul). Harvesting was carried out during the winter, July 2009.

In order to simulate the commercial maté, the leaves were dried in an oven with air circulation at 30 °C for 24 hours. Thereafter, they were exposed to flames (*sapeco*) at 180 °C for 5 min, yielding a product with residual moisture of ~15 %, then dried at 65 °C for 90 min (moisture ~5 %) and ground, providing *chimarrão*.

### **2.2. Polysaccharide extraction and fractionation**

The ground leaves (100 g) were submitted to aqueous extraction (100 °C, 500 mL, x3). The extracts were combined and evaporated to a small volume. High-molecular weight components (mainly polysaccharides) were precipitated by addition of cold EtOH (3 vol.), and separated by centrifugation (8.000 rpm at 4 °C, 20 min).

The sediment was dissolved in H<sub>2</sub>O, dialyzed against tap water for 48 h to remove the remaining low-molecular weight compounds, giving rise to a crude polysaccharide fraction (PI). This was frozen and then allowed to thaw at room temperature (Gorin & Iacomini, 1984), resulting in soluble (SPI) and insoluble fractions (IPI) which were separated by centrifugation as described above. The insoluble fraction (IPI) was not analyzed in this study due to its low yield and difficult solubilization.

### 2.3. Monosaccharide analysis

SPI (2 mg) was hydrolyzed with 2 M TFA at 100 °C for 8 h, the solution then evaporated, and the residue dissolved in water (1 mL). The resulting monosaccharide mixture was examined by thin layer chromatography (TLC) silica-gel 60 (Merck), developed with ethyl acetate:acetic acid:*n*-propanol:water (4:2:2:1, v/v), then stained with orcinol-sulfuric acid (Skipski, 1975; Sasaki et al., 2008). The monosaccharides were then reduced with 2 mg NaBH<sub>4</sub> yielding alditols which were acetylated in Ac<sub>2</sub>O-pyridine (1:1 v/v, 0.5 mL) at room temperature for 12 h (Wolfrom & Thompson, 1963a; 1963b). The resulting alditol acetates were extracted with CHCl<sub>3</sub>, and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS - Varian, Saturn 2000R, Ion-Trap detector), using a DB-225-MS column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) programmed from 50 to 220 °C at 40 °C/min, with He as carrier gas. Components were identified by their typical retention times and electron ionization (EI - 70 eV) spectra. The uronic acid content of SPI was determined using the colorimetric *m*-hydroxybiphenyl method (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991).

Carboxy-reduction of SPI (10 mg) was carried out by the carbodiimide method (Taylor & Conrad, 1972), using  $\text{NaBH}_4$  as the reducing agent, giving a product (SPI-CR), having its uronic acid carboxyl groups reduced to primary alcohols.

#### 2.4. Methylation analysis

SPI and SPI-CR (10 mg) were per-*O*-methylated in alkaline DMSO solution by addition of iodomethane as described by Ciucanu and Kerek (1984). The alkylated polysaccharides were hydrolyzed in 72% v/v aq.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.5 mL v/v, 1 h, 0 °C), followed by dilution to 8% (v/v). The solution was kept at 100 °C for 17 h, then neutralized with  $\text{BaCO}_3$ , filtered and evaporated to dryness (Saeman et al., 1954). The hydrolyzate was reduced with  $\text{NaB}_2\text{H}_4$  and then acetylated, giving rise to partially *O*-methylated alditol acetates (PMAAs) and analyzed by GC-MS, as the above, but with final temperature of 215 °C. Their identification was based on their retention times and EI-MS spectra (70 eV) by comparison with standards and an EI-MS library (Sasaki et al., 2005).

#### 2.5. NMR analysis

1D and 2D NMR experiments ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC and HMBC) were carried out using a Bruker Avance III 400 MHz spectrometer. The samples (40-50 mg) were dissolved in  $\text{D}_2\text{O}$  and the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts were expressed in ppm ( $\delta$ ) relative to TMS- $d_4$  (2,2,3,3-tetradeuterium-3-trimethylsilylpropionate;  $\delta = 0$  for  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ ) at 70 °C.

## 2.6. Animals

Male albino Swiss mice (3 months old, weighing 30 g) were used in biological tests. They were maintained under standard conditions, with a constant 12 h light/dark cycle and controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), Standard pellet food (Nuvital<sup>®</sup>, Curitiba/PR, Brazil) and water were available *ad libitum*. All experimental procedures were previously approved by the Institutional Ethics Committee of the University (authorization number 430).

## 2.7. Sepsis induction by cecal ligation and puncture (CLP)

Mice were randomly grouped into five clusters of 10 mice: sham-operation, CLP plus vehicle (water p.o.), CLP plus SPI 3 mg/kg, p.o.; CLP plus SPI 7 mg/kg, p.o.; CLP plus SPI 10 mg/kg, p.o. The mice average weight was 30 g, thus, 25  $\mu\text{l}$  of each SPI solution was found appropriate to be administered by oral way for avoiding regurgitation. Ketamine (80 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) were injected intraperitoneally to anesthetize the mice before surgical procedures. Polymicrobial sepsis was induced by CLP as previously described (Rittirsch et al., 2009). A midline incision of ~1.5 cm was carried out on the abdomen. The cecum was carefully exposed and 50% of the distal moiety was ligated. The cecum was then punctured thrice with a sterile 16-gauge needle and squeezed to extrude the fecal material from the wounds. The cecum was replaced and the abdomen was stitched surgically. Sham-control animals were treated identically, but no cecal ligation or puncture was carried out. Each mouse received subcutaneous sterile saline injection (1 mL) for fluid resuscitation after surgery. The mice were then kept on a heating pad until they recovered from the anaesthesia. Food and water, *ad libitum*, were provided throughout the experiment. The survival rate was monitored for 7 days, each 12 h.

During this period, water (vehicle) and drugs were orally administered daily. Dexamethasone was commercially purchased and subcutaneously administered at doses of 0.5 mg/kg (Silva et al., 2011; Longhi-Balbinot et al., 2012; Rocha Lapa et al., 2012).

In another experimental set (1 h before surgery), mice were orally treated with vehicle, SPI (3, 7 or 10 mg/kg, p.o.) or dexamethasone (0.5 mg/kg s.c.). After 6 h post-operation, mice were sacrificed. Their lung and ileum tissues were collected and frozen for further use to determine the myeloperoxidase (MPO) activity and tissue expression of iNOS and cyclooxygenase-2 (COX-2), respectively.

## 2.8. Lung MPO activity

The MPO activity was measure in order to determine the neutrophil influx, according to established protocols (Bradley et al., 1982). Briefly, the lung tissue was homogenized in 0.5 mL of 50 mM potassium buffer pH 6.0 with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide, sonicated on ice, and then centrifuged at 14.000 rpm for 15 min at 4°C. Supernatants were then assayed at a 1:20 dilution in a reaction buffer (9.6 mM 3,3,5,5-tetramethylbenzine, 150 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50 mM potassium phosphate buffer), and read at 620 nm. Results are expressed as change in optical density per milligram of protein (measured by Bradford assay).

## 2.9. Western blot analysis

The samples of ileum were washed twice with PBS and then homogenized and lyzed in extraction buffer (composition in mM: Tris/HCl 20 (pH 7.5; QBiogene), NaCl 150, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, sodium pyrophosphate 10, NaF 20, okadaic acid 0.01(Sigma), a tablet of protease inhibitor (Roche) and 1% Triton X-100 (QBiogen)). Total proteins

(20  $\mu$ g) were separated on 8% SDS-PAGE (Sigma) at 80 V for 2 h. Separated proteins were transferred electrophoretically onto polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad) at 100 V for 120 min. Membranes were blocked with blocking buffer containing 3% low fat milk powder, Tris-buffered saline solution (Bio-Rad) and 0.1% Tween 20 (Sigma) (TBS-T) for 1 h. Membranes were then incubated with primary antibodies of both iNOS and COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, dilution of 1:1000) overnight at 4 °C. After washing, membranes were incubated with the secondary antibody (peroxidase-labeled anti-mouse IgG – Santa Cruz Biotechnology, dilution of 1:5000) at room temperature, for 60 min. The detection of COX-1 (constitutive isoform) proteins was used for normalization and quantification of iNOS and COX-2 respectively. Prestained markers (Invitrogen) were used for molecular mass determinations. Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence enhancement (Bio-Rad).

#### 2.10. Statistical analysis

Data were expressed as means  $\pm$  SEM of five or ten mice examined in each group. Statistical error was determined by one-way ANOVA; the post hoc test was Bonferroni's. Calculations performed with Graphpad Prism 5.0. p values < 0.05 were considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. Isolation and chemical analysis of the polysaccharide

In order to obtain polysaccharides similar to those of commercial products, the leaves from *I. paraguariensis* were submitted to a process of blanching and milling,

then extracted with water at 100 °C. The polysaccharides were precipitated with excess ethanol, obtained as sediments on centrifugation, which were dialyzed against tap water and freeze-dried to give a crude polysaccharide fraction (PI - 3.3 g).

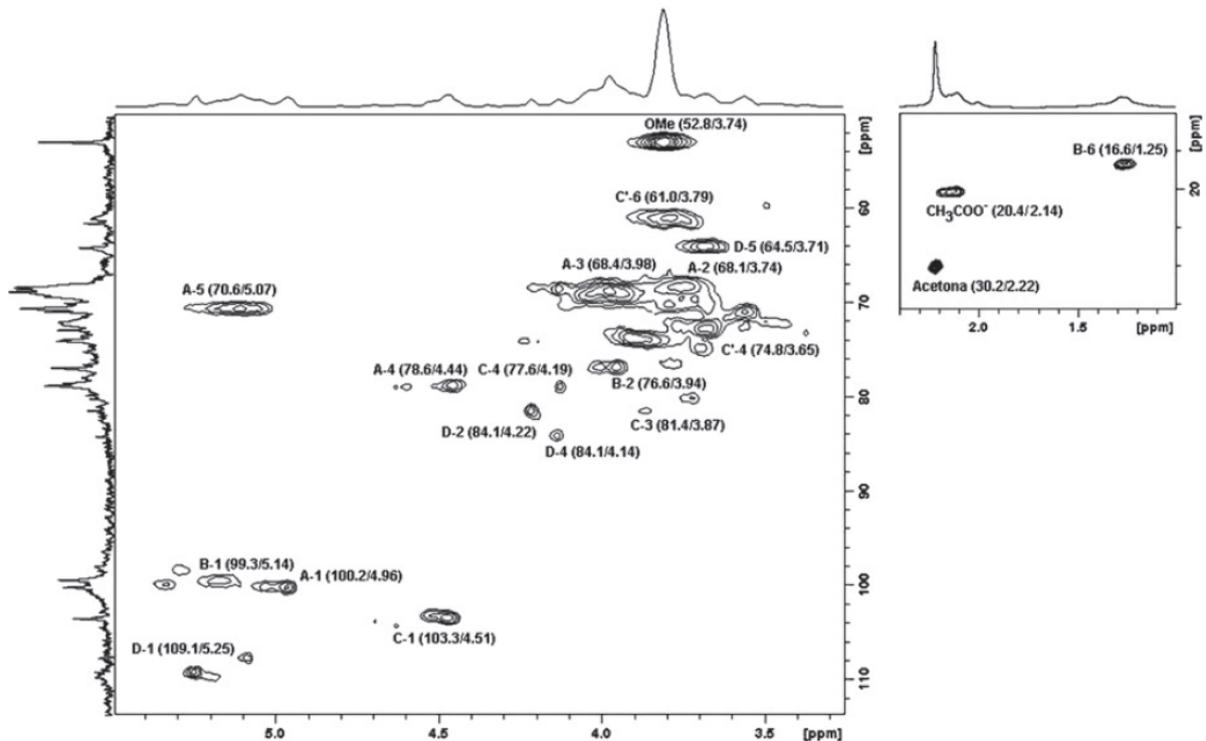
Fractionation of PI was carried out by a freeze-thawing procedure, resulting in cold water-soluble (SPI, 3.2 g) and a discarded insoluble fraction. The monosaccharide composition of SPI was arabinose, uronic acid, galactose, rhamnose, and glucose in a 4:3:2:0.5:0.4 molar ratio. TLC analysis of the SPI hydrolyzate indicated that galacturonic acid was also present.

### 3.1.1. NMR data

The  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HSQC spectrum of SPI (Fig. 1) suggests the presence of units of  $\alpha$ -D-galactopyranosyluronic acid with signals at  $\delta$  100.2/4.96 attributed to C-1/H-1. The presence of pectins was confirmed by detection of the sequence of (1 $\rightarrow$ 4)-linked  $\alpha$ -galacturonic acid residues, which gives a fingerprint cross peak at  $\delta$  78.6/4.44 (C-4/H-4), indicating this type of linkage. The latter was confirmed by the presence of other signals of GalpA units at  $\delta$  68.1/3.74 (C-2/H-2), 68.4/3.98 (C-3/H-3), 70.6/5.07 (C-5/H-5), and 170.6 (C-6), consistent with (1 $\rightarrow$ 4)-linked  $\alpha$ -D-GalpA units (Cipriani et al., 2004; Ovodova et al., 2009; Popov, et al., 2011).

Methyl esters of galacturonic acid are commonly found in type I ramnogalacturonans, and the HSQC signal at  $\delta$  52.8/3.74 suggested the presence of  $-\text{CO}_2\text{CH}_3$  units. The ester signal was confirmed by HMBC experiment, which gave a cross peak at  $\delta$  171.0/3.74, indicating the methyl protons have long range correlation with the carboxyl group ( $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ). However, signals at  $\delta$  71.7/4.67 (C-5/H-5) also suggest also the presence of non-esterified GalpA units (Renard et al.,

1998; Popov et al., 2011) and the overall NMR data indicate that most of the GalpA units of SPI are esterified (Fig. 1).



**Fig.1.**  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HSQC NMR spectrum of SPI, solvent  $\text{D}_2\text{O}$  at  $70\text{ }^\circ\text{C}$ ; numerical values are in  $\delta$  ppm. (A) (6-OMe- $\alpha$ -D-GalpA), (B) ( $\alpha$ -L-Rhap), (C) ( $\beta$ -D-Galp) and (D) ( $\alpha$ -L-Araf). The letters are followed by the carbon number of the monosaccharide unit.

Type I and II rhamnogalacturonans are commonly found as constituents of pectins, the major components of primary cell walls of dicotyledonous plants. These polysaccharides are formed by long sequences of (1 $\rightarrow$ 4)-linked  $\alpha$ -D-polygalacturonic acid, interrupted by units of  $\alpha$ -L-Rhap (Carpita & Gibeatu, 1993). The  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HSQC signals at  $\delta$  99.3/5.14 (C-1/H-1), 16.8/1.25 (C-6/H-6) and 76.6/3.94 (C-2/H-2) were consistent with (1 $\rightarrow$ 2)-linked  $\alpha$ -L-Rhap units of a rhamnogalacturonan (Renard et al., 1998).

Acetyl groups can also be present in rhamnogalacturonans, frequently as substituents at O-2 or O-3 of GalpA units (Lerouge et al., 1993; Popov et al., 2011).

When this substitution occurs, the chemical shifts of C-2/H-2 and C-3/H-3 from 6-OMe-GalpA- units would appear at a downfield region, superimposed on the signal of C-5/H-5 ( $\delta$  70.6/5.07) (Popov et al., 2011). However, a signal at  $\delta$  20.4/2.14 (Fig. 1), typical from acetyl groups, was present in our  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HSQC spectrum, so that they are attached to SPI-polysaccharide, but, its actual position could not be determined.

The main chain of rhamnogalacturonans is often substituted by side chains of arabinans, galactans, or arabinogalactans. Type I and type II arabinogalactans are classified according to their main chain, the former consisting of a main chain of  $\beta$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 4)-linked, while the latter has a (1 $\rightarrow$ 3)-linked  $\beta$ -D-Galp main chain, substituted at O-6 by  $\beta$ -D-Galp side chains (Carpita et al., 1993). The  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HSQC spectrum of SPI (Fig. 1) contained signals at  $\delta$  103.3/4.51 (C-1/H-1) and  $\delta$  77.6/4.19 (C-4/H-4) consistent with (1 $\rightarrow$ 4)-linked  $\beta$ -D-Galp units. The edited-HSQC experiment gave a negative signal  $\delta$  67.3/3.97, consistent with a substituted HO-6 of  $\beta$ -D-Galp. In this case, the C-4/H-4 signals of these units are shifted to  $\delta$  74.8/3.65 (Carpita et al., 1993).

Arabinose is frequently found as a component linked to C-6  $\beta$ -D-Galp, appearing as terminal units or forming 3 or 5-O-linked chains (Carpita et al., 1993). The HSQC spectrum of SPI had typical signals of (1 $\rightarrow$ 5)-linked  $\alpha$ -L-Araf units, at  $\delta$  109.1/5.25 (C-1/H-1) and  $\delta$  64.5/3.71 (C-5/H-5) (Delgobo et al., 1998).

### 3.1.2. Methylation analysis

Methylation analysis (Table 1) showed that SPI is a highly branched polysaccharide, containing nonreducing end-units of Araf (17.5%), and Galp (3.1%). The arabinofuranosyl units are substituted at O-5 (12.2%), O-3 (11.0%) and O-3,5-disubstituted (5.2%). Galp units are, mainly, 4-O- (10.7%) and 4,6-di-O-substituted

(3.7%). The presence of 6-*O*- and 3,6-di-*O*-substituted galactopyranosyl units was observed in low amounts as well 2,4-*O*-substituted rhamnopyranosyl units (3.3%).

The structure of the uronic acid found in SPI, as well as its linkage types, was determined by carboxy reduction, followed by methylation analysis. The neutral product (SPI-CR) showed an increase in 2,3,6-Me<sub>3</sub>-galactitol acetate, indicating that (1→4)-linked galacturonic acid residues were present.

**Table 1**

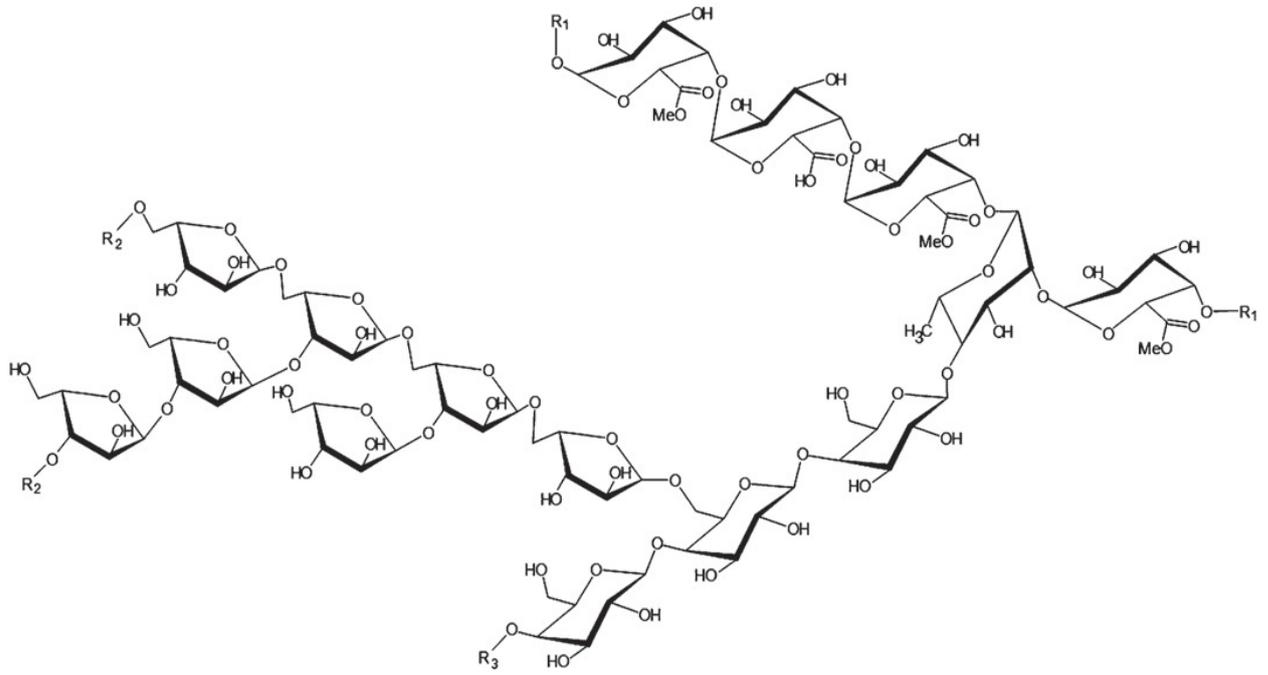
Profile of partially *O*-methylated alditol acetates and monosaccharide linkages of SPI.

OMe-Alditol acetate	Structure	<i>t<sub>R</sub></i> <sup>a</sup>	mol % <sup>b</sup>
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	Araf-(1→	0.805	17.5
2,5-Me <sub>2</sub> -Ara	→3)-Araf-(1→	0.965	11.0
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	Glc <i>p</i> -(1→	1.000	1.0
2,3-Me <sub>2</sub> -Ara	→5)-Araf-(1→	1.030	12.2
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	Gal <i>p</i> -(1→	1.051	3.1
3-Me-Rha	→2,4)-Rhap-(1→	1.207	3.3
2-Me-Ara	→3,5)-Araf-(1→	1.289	5.2
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	→4)-Gal <i>p</i> -(1→	1.362	10.7
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Gal	→6)-Gal <i>p</i> -(1→	1.487	1.1
2,3-Me <sub>2</sub> -Gal	→4,6)-Gal <i>p</i> -(1→	1.623	3.7
2,4-Me <sub>2</sub> -Gal	→6)-Gal <i>p</i> -(1→	1.824	1.2

<sup>a</sup> *t<sub>R</sub>* = relative retention time to 2,3,4,6-tetra-*O*-methylglucitol acetate;

<sup>b</sup> The galacturonic acid content of SPI was 30.0%, according to the spectrophotometric method of Filisetti-Cozzi & Carpita (1991).

The NMR data and methylation analysis of SPI suggest a polysaccharide composed by an arabinogalactan type I, linked to a type I rhamnogalacturonan, (Fig. 2).



**Fig. 2.** Suggested structure for SPI isolated from *I. paraguariensis*, where R<sub>1</sub> are 6-OMe- $\alpha$ -D-GalpA units, R<sub>2</sub> are  $\beta$ -D-Galp units and R<sub>3</sub> are  $\alpha$ -L-Araf units.

### 3.2. Biological experiments

#### 3.2.1 Protective effect of SPI on CLP-induced sepsis in mice

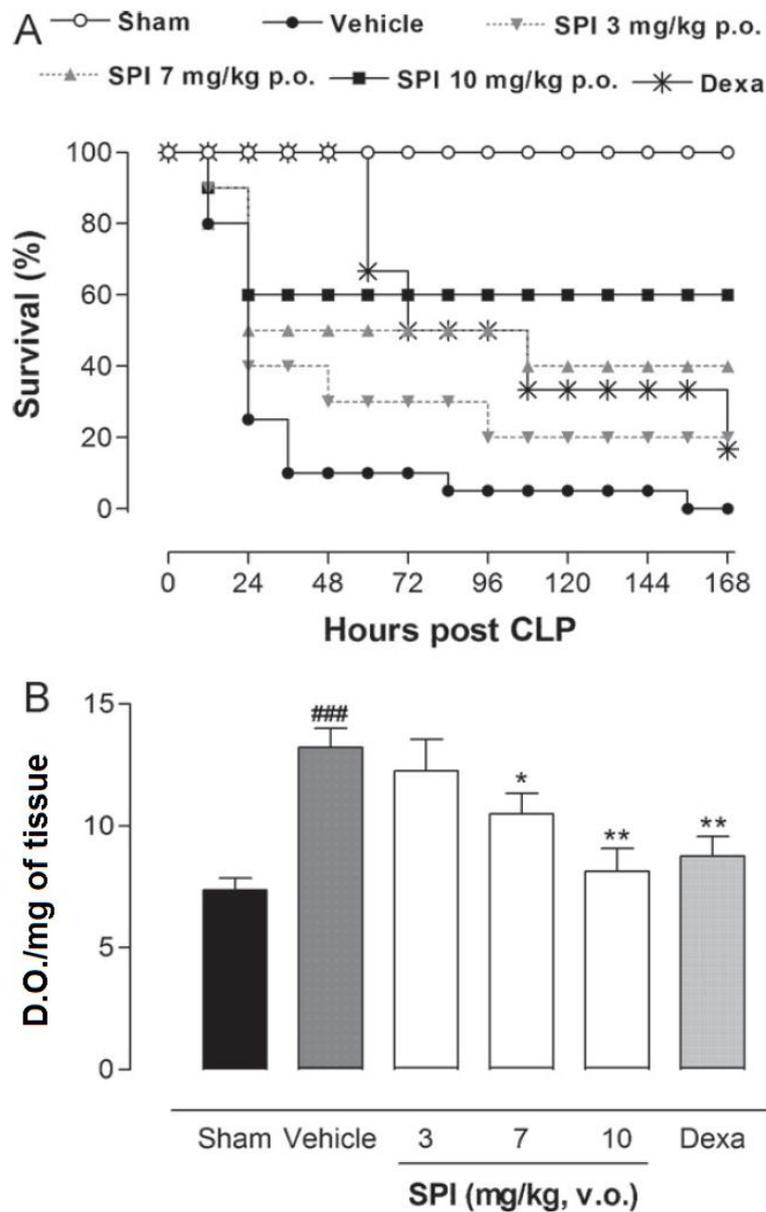
In order to investigate the effects of SPI isolated from *I. paraguariensis*, an induction of polymicrobial sepsis was carried out in mice, by cecal ligation and puncture (CLP). This model mimics sepsis in humans, caused by pathogens derived from the intestinal tract, and is considered to closely simulate a clinical situation (Otero-Anton et al., 2001). SPI was tested at doses of 3, 7 and 10 mg/kg, and their effect on the survival rate of infected mice was determined.

Mice treated with vehicle started to die between 12 h and 24 h after CLP, with a death rate reaching 75% and 95% at 24 h and 84 h post-CLP, respectively. The

overall mortality at the end of the observation period was 100%, and the area under the curve was 2.700 (arbitrary units). The lethality was markedly delayed in mice treated, orally, with SPI and their areas under the curve were increased to 5.640, 8.400 and 10.680 after administrating 3, 7 and 10 mg/kg, respectively. At the end of the period, the overall survival in these SPI groups was 20%, 40% and 60%. No death was observed in the sham-operated mice and its corresponding area under the lethality curve was 16.800 (arbitrary units). Dexamethasone, used as positive control, showed a significant improvement in survival (area under curve 10.100), with an overall survival rate of 16.7% at the end of the observation period (Fig. 3A).

### 3.2.2. Inhibition of MPO activity

Since MPO is a lysosomal enzyme of polymorphonuclear leukocytes that acts as a catalyst in the production of hypochlorous acid (powerful oxidant), the effects of SPI on MPO activity were also investigated. CLP surgery markedly increased the MPO levels in the lung tissues in comparison with the Sham group (55.8%) (Fig. 3B). This rise in tissue MPO was significantly prevented by SPI at 3, 7 and 10 mg/kg, with an inhibition of 7.4%, 20.7% and 38.4%, respectively, vs. vehicle group (Fig. 3B). In order to evaluate the percentual of inhibition, the results were also normalized relative to Sham group, using a ratio factor based on basal response (Sham): CLP response with a numerical value of 0.558. This normalization gave the follow inhibitions: 13.3%, 37.1% and 68.8%, respectively. Dexamethasone, the anti-inflammatory control, strongly inhibited the MPO activity in lungs at 33.7% (60.4 normalized), being statistically close to SPI at a dose of 10 mg/kg. SPI could prevent the increase of MPO activity, indirectly indicating a reduction in neutrophil recruitment to lung, and consequently avoiding tissue damage by oxidative processes (Fig. 3B).

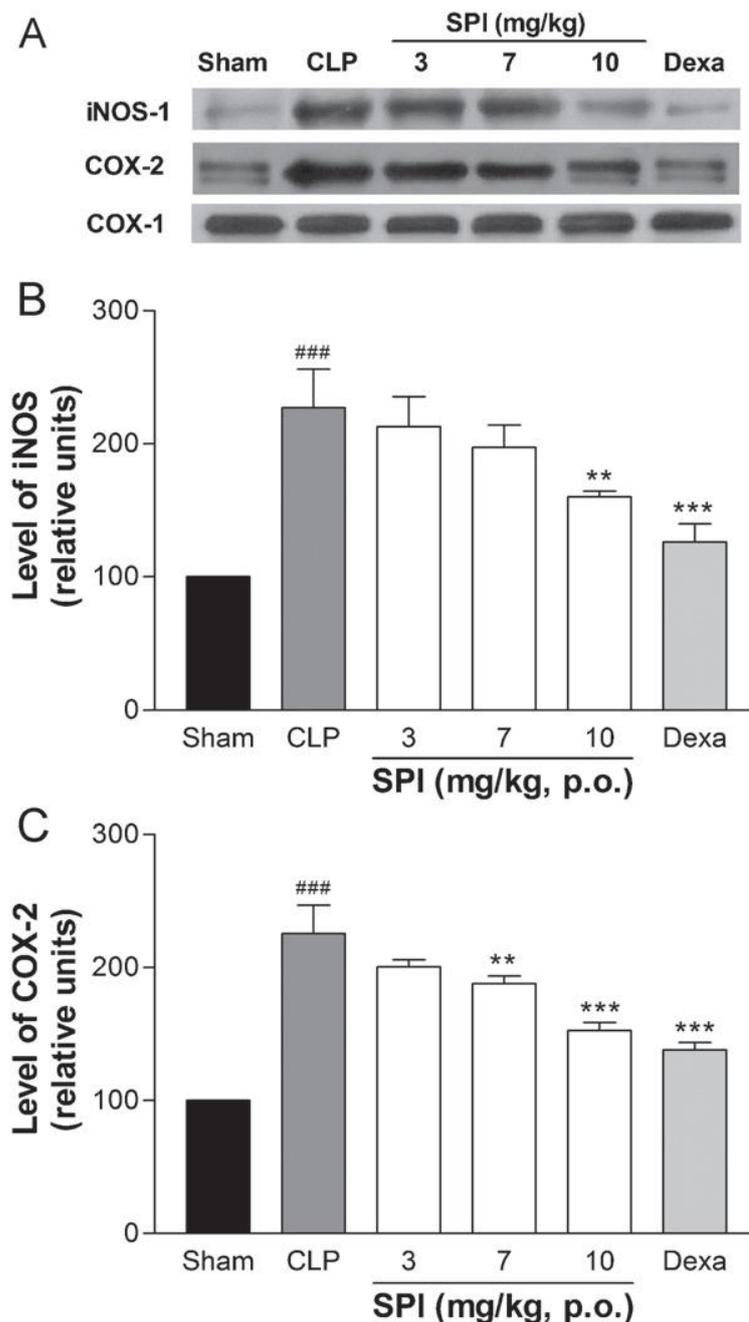


**Fig. 3.** Effect of polysaccharide SPI on survival rate (A) and on MPO activity (B) in sepsis. SPI protects against sepsis-induced lethality and inhibits MPO activity. Mice (10 animals/group) were orally administered various doses of SPI (3, 7 or 10 mg/kg), vehicle (water) and dexamethasone (0.5 mg/kg s.c.). Values represent means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , indicated value versus CLP plus vehicle group; ### $p < 0.001$ , CLP plus vehicle versus sham. ANOVA followed by Bonferroni's test.

### 3.2.3. Inhibition of iNOS and COX-2 expression

To better investigate the expression of proinflammatory enzymes in the ileum, the levels of iNOS and COX-2 were determined by immunoblotting after different treatments (Fig. 4A). CLP increased the levels of iNOS in comparison with the Sham

group in 55.7%, and SPI at 10 mg/kg decreased the levels of iNOS by 29.5% (or 53.0% normalized by Sham group) (Fig. 4B). The COX-2 expression in the ileum was reduced by 16.8% and 32.3% (or 30.0% and 57.8% - normalized by 0.559 ratio factor) after treating with SPI at 7 and 10 mg/kg respectively (Fig. 4B).



**Fig. 4.** Effect of polysaccharide SPI on iNOS (B) and COX-2 (C) expression in the ileum tissue of infected mice. Mice were treated with SPI 3, 7 or 10 mg/kg, p.o., or dexamethasone. The levels of iNOS and COX-2 were determined by Western blot analysis. (A) Representative immunoblots. Results are shown as the means  $\pm$  SEM of 3–4 different experiments. <sup>###</sup> $p < 0.001$ , CLP plus vehicle versus sham. <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$  and <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$ , SPI versus vehicle.

Dexamethasone significantly affected both iNOS and COX-2 expression, reducing by 43.2% and 38.7% (77.6% and 69.2 normalized by Sham group), respectively (Fig. 4B and C). In contrast, the level of COX-1 (constitutive isoform) remained the same under these conditions (Fig. 4A).

#### 4. Discussion

*Ilex paraguariensis* is a popular plant cultivated in southern Brazil and neighboring countries, and its leaves are used in the preparation of several types of beverages. On drinking such beverages, not only secondary metabolites, but also a great variety of primary metabolites, including polysaccharides, are ingested. We have now determined the chemical structure of a soluble polysaccharide from hot aqueous extraction of the commercial product (*chimarrão*) prepared from *I. paraguariensis*.

On the basis of chemical data, the polysaccharide SPI consists of a rhamnogalacturonan formed by a long sequence of  $\rightarrow 4$ )-6-OMe- $\alpha$ -D-GalpA-(1 $\rightarrow$  units, interspersed by some  $\alpha$ -L-Rhap residues, substituted by side chains of type I arabinogalactans.

Many polysaccharides isolated from plants have shown immune responses *in vivo* and *in vitro*. There are also many reports of polysaccharide-induced nonspecific resistance against diverse microbial pathogens (Ruthes et al., 2012; Caillot et al., 2012). Additionally, polysaccharides isolated from *Agaricus bisporus*, *Lactarius rufus* (Ruthes et al. 2012), *Panax ginseng* (Lim et al. 2002) and *Bacteroides fragilis* (Tzianabos et al 1995), had its anti-septicaemic effect determined. However, these compounds were tested subcutaneously.

Here, we clearly demonstrated that SPI polysaccharide prevents lethality caused by polymicrobial sepsis in mice, which was more effective than dexamethasone, a steroidal anti-inflammatory, used as positive control in this work. Furthermore, SPI was administered by oral way, which represents a therapeutic advantage. This beneficial effect seems to be, at least in part, due to a reduction in neutrophil migration, as observed using the MPO assay, where the enzyme inhibition was up to 68%. Neutrophil infiltration is an important pathophysiological alteration associated with sepsis. These cells directly damage tissue by releasing proinflammatory mediators, such as cytokines, reactive oxygen species and lysosomal enzymes, such as MPO, which amplify the systemic inflammatory response and cause multiple organ failure (Landry & Oliver, 2001).

Furthermore, SPI decreased the levels of the both proinflammatory enzymes, iNOS and COX-2, whose role in the pathophysiology of inflammatory states such as sepsis is being increasingly recognized.

iNOS is induced in response to inflammatory stimuli such as bacterial lipopolysaccharide (LPS) and proinflammatory cytokines (for example, IL-1, TNF- $\alpha$ ). When expressed, iNOS produces high amounts of NO over long periods, which causes cellular damage (Tinker & Wallace, 2006).

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is another important product of inflammation from cells of the innate immune system, catalyzing the formation of inflammatory prostanoids such as prostaglandins and thromboxane, which can mediate a significant inflammatory response (Hayashi et al., 2011). Systemic COX-2 is increasingly recognized as an important player in sepsis-induced inflammation. It was previously shown that COX-2-knockout mice are naturally protected from inflammation by sepsis-induced and consequently from death (Ejima et al., 2003).

Puangpraphant and Mejia (2009) investigated the anti-inflammatory properties of different constituents of maté and evaluated potential interactions between them. They found that the chlorogenic acids tested alone had no effects on the decrease the proinflammatory markers. Otherwise, the saponins present in the maté inhibited the iNOS/NO system, preferably in the system COX-2/PGE-2 and quercetin, COX-2/PGE-2, preferably at iNOS/NO. They also noted that the mixture of saponins plus quercetin maté was able to inhibit the expression of proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$ , nuclear translocation of subunit 65 of NF- $\kappa$ B, as well as the reduction of NO and PGE-2, suggesting synergy. Consequently our present results suggest that in addition to the compounds of secondary metabolism, a polysaccharide from *I. paraguariensis* also acts on these enzymes, reducing inflammatory lesion and suggesting that, at least in part, the anti-inflammatory activity of maté can be attributable to its polysaccharides.

The activation of nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) signaling pathway has been reported in multiple inflammatory diseases, because its stimulation results in increased gene expression and biosynthesis of proinflammatory mediators (Brown et al., 2004). The role of NF- $\kappa$ B pathway in sepsis outcome is well defined (Cohen et al., 2006; Brown et al., 2004). Since SPI decreased tissue expression of pro-inflammatory proteins (iNOS and COX-2), we propose that SPI can downregulating the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway. It has been confirmed for various sources of natural products (Tian et al., 2012; Zhang et al., 2011), but demands a further investigation using SPI.

In previous studies, pectins from sweet pepper (Popov et al., 2011) and celery (Ovodova et al., 2009) were evaluated in sepsis model, acting against release of proinflammatory cytokines and decreasing the mortality of LPS-induced septic mice.

In such studies, the authors observed that some characteristics, such as molecular weight, amounts of acidic monosaccharides among other structural details, were keys for activity. This was confirmed following partial acid hydrolysis, when the isolated galacturonan backbone was more efficient than the entire polysaccharide. Thus, considering that the SPI backbone is composed of an RGI, these can be the main factor for its anti-sepsis activity.

Furthermore, pectin with different degrees of methyl-esterification was able to inhibit iNOS and COX-2 expressions, but with different potencies, in which the greater the degree of esterification, the greater the effect on these enzymes pro-inflammatory (Chen et al., 2006). Thus, the antiseptic effect of SP can also be related to the presence of methyl ester groups in its structure.

It is noteworthy that isolated SPI is more effective in combating sepsis than the aqueous extract of *I. paraguariensis*, or with other compounds isolated from same plant such as the saponins and quercetin (Puanfpraphant et al., 2009). Thus, the present results enhance the nutraceutical role of *I. paraguariensis* and their primary chemical components. Furthermore, it could also suggest a new option as an antiseptic adjuvant and drug development from edible plant products.

### **Acknowledgments**

The authors thank the Brazilian funding agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and PRONEX-Carboidratos/Fundação Araucária for financial support.

The authors have declared no conflict of interest.

## 5. References

- Anderson, T., Fogh, J. (2001). Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 14, 243-250.
- Angus, D. C., Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., Pinski, M. S. (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*, 29, 1303-1310.
- Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*, 78, 206-209.
- Brown, M. A., Jones, W. K. (2004) NF-kappaB action in sepsis: the innate immune system and the heart. *Frontiers in Bioscience*, 9, 1201-1217.
- Caillot, S., Rat, S., Marie-Laurie, M., Michaud, P., Kovenski, J., Wadouachi, A., Clément, C., Baillieul, F., Petit, E. (2009). Native and sulfated oligoglucuronans as elicitors of defence-related responses inducing protection against *Botrytis cinerea* of *Vitis vinifera*. *Carbohydrate Polymers*, 53, 1036-1043.
- Capek, P., Hribalová, V., Svandová, E., Ebringerová, A., Sasinková, V., Masarová, J. (2003). Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 33, 113-119.
- Carpita, N. C., Gibeatu, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3, 1-30.

Chen, C. H., Sheu, M. T., Chen, T. F., Wang, Y. C., Hou, W. C., Liu, D. Z., Chung, T. C., Liang, Y. C. (2006). Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways. *Biochemical Pharmacology*, 72, 1001-1009.

Cipriani, T. R., Mellinger, C. G., Gorin, P. A. J., Iacomini, M. (2004). An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Natural Products*, 67, 703-706.

Cipriani, T. R., Mellinger, C. G., Souza, L. M., Baggio, C. H., Freitas, C. S., Marques, M. C. A., Gorin, P. A. J., Sasaki, G. L., Iacomini, M. (2006). Polysaccharide from a tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. *Journal of Natural Products*, 69, 1018-1021.

Ciucanu, I., Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131, 209-217.

Dartora, N., Souza, L. M., Santana-Filho, A. P., Iacomini, M., Valduga, A. T., Gorin, P. A. J., Sasaki, G. L. (2011). UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. *Food Chemistry*, 129, 1453-1461.

Delgobo, C. L., Gorin, P. A. J., Jones, C., Iacomini, M. (1998). Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. *Phytochemistry*, 47, 1207-1214.

Ejima, K., Layne, M. D., Carvajal, I. M., Kritek, P. A., Baron, R. M., Chen, Y. H., Vom Saal, J., Levy, B. D., Yet, S. F., Perrella, M. A. (2003). Cyclooxygenase-2 deficient

mice are resistant to endotoxin-induced inflammation and death. *The FASEB Journal*, 17, 1325-1327.

Filip, R., Lopez, P., Giberti, G., Coussio, J. Ferraro G. (2001). Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*, 72, 774-778.

Filip, R., Lotito, S. B., Ferraro, G., Fraga, C. G. (2000). Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*, 20, 1437-1446.

Filisetti-Cozzi, T. M. C. C., Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Annual Review of Biochemistry*, 197, 157-162.

Gorin, P. A. J., Iacomini, M. (1984). Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. *Carbohydrate Research*, 128, 119-131.

Gorzalczany, S., Filip, R., Alonso, M. R., Miño, J. Ferraro, G. E., Acevedo, C. (2001). Choleric effect and intestinal propulsión of "mate" (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 291-294.

Gugliucci, A., Menini, T. (2002). The botanical extracts of *Achyrocline sauteroides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. *Life Sciences*, 72, 279-292.

Hayashi, S., Sumi, Y., Ueno, N., Murase, A., Takada, J. (2011). Discovery of a novel COX-2 inhibitor as an orally potent anti-pyretic and anti-inflammatory drug: Design, synthesis, and structure-activity relationship. *Biochemical Pharmacology*, 82, 755-768.

- Landry, D. W., Oliver, J. A. (2001). The pathogenesis of vasodilatory shock. *The New England Journal of Medicine*, 345, 588-595.
- Lerouge, P., O'Neill, M. A., Darvill, A. G., Albersheim, P. (1993). Structural characterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Research*, 243, 359-371.
- Lim, D. S., Bae, K. G., Jung, I. S., Kim, C. H., Yun, Y. S., Song, J. Y. (2002). Anti-Septicaemic Effect of Polysaccharide from *Panax ginseng* by Macrophage Activation. *Journal of Infection*, 45, 32-38.
- Longhi-Balbinot, D. T., Lanznaster, D., Baggio, C. H., Silva, M. D., Cabrera, C. H., Facundo, V. A., Santos, A. R. (2012). Anti-inflammatory effect of triterpene 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 26, 59-64
- Mucillo-Baisch, A. L., Johnston, K. B., Paganini-Stein, F. L. (1998). Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 60, 133-139.
- Nergard, C. S., Diallo, D., Inngjerdigen, K., Michaelsen, T. E., Matsumoto, T., Kiyohara, H., Yamada, H., Paulsen, B. S. (2005). Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: anti-ulcer, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 255-269.
- Otero-Anton, E., Gonzalez-Quintela, A., Lopez-Soto, A., Lopez-Bem, S., Llovo, J., Pérez, L. F. (2001). Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat:

Influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *European Surgical Research*, 33, 77-79.

Ovodova, R. G., Golovchenko, V. V., Popov, S. V., Popova, G. Y., Paderin, N. M., Shashkov, A. S., Alexandre, S., Ovodov, Y. S. (2009). Chemical composition and anti-inflammatory activity of pectic polysaccharide isolated from celery stalks. *Food Chemistry*, 114, 610-615.

Pittler, M. H., Ernst, E. (2004). Dietary supplements for body weight reduction: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 529-536.

Popov, S. V., Ovodova, R. G., Golovchenko, V. V., Popova, F. Y., Viatyasev, F. V., Shashkov, A. S., Ovodov, Y. S. (2011). Chemical composition and anti-inflammatory activity of a pectic polysaccharide isolate from sweet pepper using a simulated gastric medium. *Food Chemistry*, 124, 309-315.

Puanfpraphant, S., Mejia, E. G. (2009). Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NFkappaB pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14, 8873-8883.

Renard, C. M. G. C., Lahaye, M., Mutter, M., Voragen, F. G. J., Thibault, J. F. (1998). Isolation and structural characterization of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. *Carbohydrate Research*, 305, 271-280.

Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A., Ward, P. A. (2009). Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Natural Products*, 4, 31-36.

Rocha Lapa, F., Silva, M. D., Almeida Cabrini, D., Santos, A. R. (2012). Anti-inflammatory effects of purine nucleosides, adenosine and inosine, in a mouse model of pleurisy: evidence for the role of adenosine A(2) receptors. *Purinergic Signal*, 8, 693-704.

Ruthes, A. C., Rattmann, Y. D., Carbonero, E. R., Gorin, A. J., Iacomini, M. (2012). Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1620-1627.

Saeman, J. F., Moore, W. E., Mitchell, R. L., Millet, M. A. (1954). Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, 37, 336-343.

Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., Souza, L. M., Czelusniak, P. A., Iacomini, M. (2005). Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. *Carbohydrate Research*, 340, 731-739.

Sasaki, G. L., Souza, L. M., Cipriani, T. R., Iacomini, M. (2008). TLC of Carbohydrates. In M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska. (Eds.), *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry* (pp. 255-276). Boca Raton, USA, CRC Press.

Silva, M. D., Guginski, G., Werner, M. F. P., Baggio, C. H., Marcon, R., Santos, A. R. (2012). Involvement of Interleukin-10 in the Anti-Inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse Model of Peritonitis. *Evidence-Based and Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 217946.

Skipski, V. P. (1975). Thin layer chromatography of neutral glycolipids. *Methods in Enzymology*, 35, 396-425.

Souza, L. M., Dartora, N., Scoparo, C. T., Cipriani, T. R., Gorin, P. A. J., Iacomini M., et al. (2011). Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: Development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 7307-7315.

Srivastava, R., Kulshveshtha, D. K. (1989). Bioactive polysaccharides from plants. *Phytochemistry*, 28, 2877-2883.

Taylor, R. L., Conrad, H. E. (1972). Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry*, 11, 1383-1388.

Tian, F., Fan, T., Zhang, Y., Jiang, Y., Zhang, X. (2012). Curcumin potentiates the antitumor effects of 5-FU in treatment of esophageal squamous carcinoma cells through downregulating the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway in vitro and in vivo. *Acta Biochimica Biophysica Sinica* (Shanghai), 44, 847-55.

Tinker, A. C., Wallace, A. V. (2006). Selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase: potential agents for the treatment of inflammatory diseases? *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 6, 77-92.

Tzianabos, A. O., Kasper, D. L., Cisneiros, R. L., Smith, R. S., Onderdonk, A. B. (1995). Polysaccharide-mediated protection against abscess formation in experimental intra-abdominal sepsis. *The Journal of Clinical Investigation*, 96, 2727-2731.

Wolfson, M. L., Thompson, A. (1963). Acetylation. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 2, 211-215.

Wolfson, M. L., Thompson, A. (1963). Reduction with sodium borohydride. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 2, 65-67.

Yamada, H. (1994). Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. *Carbohydrate Polymers*, 25, 269-276.

Zhang, H.M., Tang, D.L., Tong, L., Sun, M.J., Sui, Y., Zhu, H.Y., Cao, H.X. (2011). Gualou xiebai banxia decoction inhibits NF-kappa B- dependent inflammation in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 31, 338-43.

**ARTIGO II**

---

(Publicado na International Journal of Biological Macromolecules, v. 59, p. 125-133, 2013)

**Chemical and biological characterization of polysaccharides from isolated *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.**

Daniele Maria-Ferreira<sup>a1</sup>, Nessana Dartora<sup>b1</sup>, Luisa Mota da Silva<sup>a</sup>, Isabela Tiemy Pereira<sup>a</sup>, Lauro Mera de Souza<sup>b</sup>, Daniel Suss Ritter<sup>b</sup>, Marcello Iacomini<sup>b</sup>, Maria Fernanda de Paula Werner<sup>a</sup>, Guilherme Lanzi Sasaki<sup>b\*\*</sup>, Cristiane Hatsuko Baggio<sup>a\*\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Sector of Biological Sciences, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Sector of Biological Sciences, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil

<sup>1</sup> These authors contributed equally with the work

\*\* Corresponding authors,

*Chemical analysis:* sassaki@ufpr.br (G.L. Sasaki)

Department of Biochemistry and Molecular Biology

*Pharmacological analysis:* crisbaggio@gmail.com (C.H. Baggio)

Department of Pharmacology, Sector of Biological Sciences,

Federal University of Parana, PO Box 19031, Curitiba, PR, 81531-980, Brazil.

Tel.: +55 41 3361 1721; fax: +55 41 3266 2042

**Abstract**

The potential gastroprotection of polysaccharides (SP) isolated from maté (*Ilex paraguariensis*) leaves of different growth stages, under different sunlight conditions

and of processing methods were evaluated. The SP consist of type I arabinogalactan (AG1) containing a (1→4)-linked -Galp chain, with substituents of arabinosyl units at O-6. This arabinogalactan seems to be attached to rhamnosyl units from a RG1, via 1→4 linkage. Oral administration of SP1, SP9, SP10, SP11 and SP12 inhibited the gastric lesions induced by ethanol in rats. Altogether, the present data indicate the therapeutic role of maté polysaccharides against gastric lesion and propose its use or of its crude plant extract as a phytotherapeutic medicine.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*, Maté, Polysaccharides, Arabinogalactan, Gastroprotective, Gastric lesions.

## 1. Introduction

Erva-mate, maté or yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) is a subtropical plant found in South America, mainly in south Brazil, Argentina, Paraguay and Uruguay [1]. Traditionally, maté is used for the preparation of hot and cold beverages in South America, which are appreciated for their peculiar bitter taste and stimulant properties [2-3].

In folk medicine, maté infusion has been used for the treatment of hepatic and digestive disorders, arthritis, rheumatism and other inflammatory diseases, hypertension, and hypercholesterolemia [2]. Indeed, it has been demonstrated that extracts and compounds isolated from *I. paraguariensis* have beneficial effects in lipid disorders, obesity, oxidative stress, inflammation and mutagenesis (for review see Bracesco et al. [4]). Many of these biological activities are attributed to main chemical components, which include polyphenols (chlorogenic acids),

methylxanthines (caffeine, theobromine), flavonoids (quercetin, kaempferol, and rutin) and saponins [1, 5].

Currently, the products from secondary metabolism of *I. paraguariensis* are the main focus of the investigations, in which a comprehensive chemical profile has been carried out [6-7]. Thence, information on products from primary metabolism, such as polysaccharides, is skipped. However, together with the infusions, considerable amounts of polysaccharides are ingested, and recent studies have demonstrated important pharmacological properties of polysaccharides, as antitumoral, anti-inflammatory, antinociceptive, immunomodulatory and gastroprotective [8-12]. The gastroprotective effects have been attributed to type I arabinogalactans from *Cereus peruvianus* [13] and soybean meal [14], type II arabinogalactans from *Cochlospermum tinctorium* [11] and *Maytenus ilicifolia* [12], pectic polysaccharides from *Panax ginseng* [15] and *Bupleurum falcatum* [9], acidic heteroxylans from *M. ilicifolia* and *Phyllanthus niruri* [16]. Nevertheless, the ability of polysaccharides from *I. paraguariensis* in reducing the gastric lesions has not yet been reported.

It is known that the overall conditions of the plant growth, such as sunlight, season, rainfall, and so on, can alter their chemical constituents. After harvesting, the leaves can be processed by oxidation such as in black tea (*Camellia sinensis*) or blanching/drying such as in "chimarrão". These processes lead to chemical alterations, promoting rearrangements, oxidation or reduction of bioactive molecules [17-19]. For this reason, we decided to identify and characterize the polysaccharides isolated from leaves of *I. paraguariensis* of different growth stages (young and mature), under two different sunlight conditions (sun and shade) and of processing methods (*in natura*, processed and oxidized). Parallel to that, we investigate whether

the alteration of these factors could also modify the gastroprotective activity of polysaccharides in an experimental model of gastric lesions induced by ethanol.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Plant Material**

Young (1 month) and mature (6 months) leaves from *I. paraguariensis* were collected randomly from two areas: from a disturbed forest enriched with maté plants, and from a homogeneous group of cultivars, exposed to sunlight (monoculture), with geographical coordinates 27°27'15" south, 52°22'47" west at 765 m altitude (Barão de Cotegipe, State of Rio Grande do Sul, Brazil). Harvesting was in the winter month, July 2009.

The leaves were grouped in four clusters: mature sun-exposed and shade-submitted leaves, young sun-exposed and shade-submitted leaves. These were kept without processing (*in natura*), or subjected to blanching/drying (as with "chimarrão") or oxidation (as with black tea), yielding 12 samples (Table 1).

### **2.2. Processing of maté ("chimarrão" type)**

Freshly harvested leaves were dried in an oven with air circulation at 30 °C for 24 h. Thereafter, they were exposed to flame ("sapeco") at 180 °C for 5 min (residual moisture ~15%) and, then, dried at 65 °C for 90 min (moisture 5%).

### **2.3. Oxidation**

The leaves were submitted to dehydration for 2 h using an oven with air circulation at 30 °C, and manually rolled at room temperature (25 °C) for 10 min. The

leaves were then transferred to aluminum trays and submitted to experimental conditions (26 °C and 80% relative humidity) for 3 h. Thereafter, they were dried at 70 °C for 120 min.

#### 2.4. Polysaccharides extraction and purification

The leaves were ground, and a portion (100 g) was submitted to aqueous extraction (100 °C, 500 ml, thrice). The extracts were combined and evaporated to a small volume. High molecular weight components (mainly polysaccharides) were precipitated by addition to cold EtOH (3 vol.) and separated by centrifugation (8000 rpm at 4 °C, 20 min). The sediments were then dissolved in H<sub>2</sub>O, dialyzed against tap water for 48 h to remove the remaining low-molecular weight compounds, giving rise to crude polysaccharides fractions. These were thrice frozen and thawed under room temperature [20], resulting in soluble polysaccharides (called SP followed by the number of the sample) and insoluble fractions, which were separated by centrifugation as described above, yielding 12 fractions (Table 1). The insoluble fractions were not analyzed due to their lower yield and difficult solubilization.

#### 2.5. Size exclusion chromatography (SEC) analysis

SEC analysis of the fractions SP were developed using an HPLC LC10A (Shimadzu) coupled to refractive index detector. Online, four gel permeation columns were used (Ultrahydrogel, Waters), with exclusion sizes of  $7 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$ , and  $5 \times 10^3$  Da. The eluent was 0.1 M aq. NaNO<sub>2</sub> containing 200 ppm NaN<sub>3</sub> at a flow rate of 0.6 ml/min. The samples (1 mg/ml) were previously filtered through a 0.22 μm cutoff membrane, and then injected (100 μl).

**Table 1**

Leaf types and extractions.

Sample (treatments)	Abbreviations	Aqueous extraction (g <sup>a</sup> )	Precipitated by EtOH		Frozen and thawed	
			Supernatant <sup>c</sup> (g <sup>a</sup> )	<sup>b</sup> Precipitated (g <sup>a</sup> )	Soluble	Insoluble (SP)
Young leaves of sun <i>in natura</i> <sup>d</sup>	<b>SP1</b>	11.47	9.63	1.84	0.11	1.73
Young leaves of shade <i>in natura</i> <sup>d</sup>	<b>SP2</b>	13.44	11.91	1.53	0.15	1.38
Mature leaves of sun <i>in natura</i> <sup>d</sup>	<b>SP3</b>	15.87	13.70	2.17	0.19	1.98
Mature leaves of shade <i>in natura</i> <sup>d</sup>	<b>SP4</b>	15.36	13.56	1.80	0.12	1.68
Young leaves of sun processed	<b>SP5</b>	23.44	20.22	3.22	0.24	2.98
Young leaves of shade processed	<b>SP6</b>	19.22	17.53	1.69	0.16	1.53
Mature leaves of sun processed	<b>SP7</b>	25.10	23.13	1.97	0.21	1.76
Mature leaves of shade processed	<b>SP8</b>	24.25	20.94	3.31	0,25	3.06
Young leaves of sun oxidized	<b>SP9</b>	26.21	22.25	3.96	0.28	3.68
Young leaves of shade oxidized	<b>SP10</b>	19.77	16.40	3.37	0.22	3.15
Mature leaves of sun oxidized	<b>SP11</b>	25.62	22.69	2.93	0.21	2.72
Mature leaves of shade oxidized	<b>SP12</b>	26.72	24.13	2.59	0.24	2.35

<sup>a</sup> Yield from 100 g of leaves.<sup>b</sup> The precipitated fractions were thrice frozen and thawed under room temperature obtaining the SP fractions.<sup>c</sup> Data already published (Dartora et al., 2011).<sup>d</sup> *In natura* leaves contain 53.00% ± 1.97 moisture.

## 2.6. Monosaccharide analysis

Each polysaccharide fraction (2 mg) was hydrolyzed with 2 M TFA at 100 °C for 8 h, the solutions then evaporated, and the residue dissolved in water (1 ml). The resulting monosaccharide mixture was examined by silica-gel 60 thin layer chromatography (TLC; Merck), developed with ethyl acetate:acetic acid:*n*-propanol:water (4:2:2:1, v/v) and stained with orcinol-sulfuric acid [21]. The monosaccharides were then reduced with 2 mg NaBH<sub>4</sub> yielding alditols which were acetylated in Ac<sub>2</sub>O-pyridine (1:1 v/v, 0.5 ml) at room temperature for 12 h [22-23]. The resulting alditol acetates were extracted with CHCl<sub>3</sub>, and analyzed by GC-MS Varian, Saturn 2000R - 3800 gas chromatograph coupled to a Varian Ion-Trap 2000R mass spectrometer), using a DB-225-MS column (30 m x 0.25 µm i.d.) programmed from 50 to 220 °C at 40 °C/min, with He as carrier gas. Components were identified by their relative retention times and electron ionization (EI-70 eV) spectra. Uronic acid contents of SP fractions were determined using the colorimetric *m*-hydroxybiphenyl method [24].

For the carboxy-reduction, 10 mg of a SP fraction were submitted to the carbodiimide method [25], using NaBH<sub>4</sub> as the reducing agent, yielding a neutral monosaccharide equivalent.

## 2.7. Methylation analysis

10 mg of a SP fraction were per-*O*-methylated in DMSO and powdered NaOH, with iodomethane, following Ciucanu & Kerek [26]. The alkylated polysaccharides were hydrolyzed in 72% v/v aq. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 ml v/v, 1 h, 0 °C), followed by a dilution to 8% (v/v), by addition of 4.0 ml of distilled H<sub>2</sub>O. The solution was kept at 100 °C for 17 h, then neutralized with BaCO<sub>3</sub>, filtered and evaporated to dryness [27]. The hydrolyzate were reduced and acetylated to partially *O*-methylated alditol acetates

(PMAA) as described above, but using NaBD<sub>4</sub>, and analyzed by GC-MS, similarly to the above described, with exception the final temperature, 210 °C. The identification of the PMAAs was based on their *m/z* spectra (EI-70 eV), and by comparison with standards and library [28].

## 2.8. NMR analysis

1D and 2D NMR experiments (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC and HMBC) were carried out using a Bruker Avance III 400 MHz spectrometer. The samples (40-50 mg) were dissolved in D<sub>2</sub>O (400 µL) and the chemical shifts were expressed in ppm (δ) relative to TMSP-*d*<sub>4</sub> (2,2,3,3-tetradeuterium-3-trimethylsilylpropionate; δ = 0 for <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H) at 70 °C.

## 2.9. Animals

Experiments were carried out using female Wistar rats (180-200g), provided by the Federal University of Parana colony. Animals were maintained under standard laboratory conditions (12 h light/dark cycles, temperature 22 ± 2 °C) with food and water provided *ad libitum*. The animals were deprived of food (15-18h) prior to the experiment. The study was conducted in agreement with the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH Publication 85-23, revised 1985), and approved by the local Ethics Committee (CEUA/BIO-UFPR; approval number 473).

## 2.10. Induction of acute gastric lesion

Acute gastric ulcers were induced with ethanol P.A. as described previously by Robert et al. [29] with minor modifications. Rats were fasted during the night, 18 h prior to the experiment, with free access to water. All animals were pretreated orally (gavage) with vehicle (water 1 ml/kg, control group), omeprazole (40 mg/kg, positive

control) or six different polysaccharide fractions from *Ilex paraguariensis*, (SP1, SP5, SP9, SP10, SP11, SP12), at a dose of 10 mg/kg, 1 h before oral administration of ethanol P.A. (0.5 ml). The animals were sacrificed 1 h after ethanol administration, the stomach was removed and the gastric lesionated area (mm<sup>2</sup>) was measured using the program Image Tool 3.0<sup>®</sup> as previously described [30].

#### 2.11. Determination of gastric wall mucus

The gastric mucus was determined according to the modified method of Corne et al. [31]. After induction of gastric lesions by ethanol P.A., the glandular segment of gastric mucosa was weighed and incubated in a 0.1% Alcian Blue solution for 2 h at room temperature. The excess of Alcian blue dye was removed by two successive rinses with 0.25 M sucrose, first for 15 min and then for 45 min. After that, the Alcian blue dye complexed with the gastric wall mucus was extracted with 0.5 M magnesium chloride solution and the segments were shaken for 1 min at 30 min intervals for 2 h. The extract was then mixed with equal volume of diethyl ether and centrifuged at 3600 rpm by 10 min to separate the aqueous phase for determination of Alcian blue absorbance at 598 nm. The mucus levels were quantified using standard curve of Alcian Blue (6.25-100 µg) and the result was expressed in µg of Alcian Blue/g of tissue.

#### 2.12. Determination of glutathione content

Glutathione levels in gastric mucosa were determined by the method of Sedlak and Lindsay [32]. After induction of gastric lesions by ethanol P.A., the glandular segment of gastric mucosa were weighed and homogenized with 200 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) on ice using a homogenizer. To the homogenates added was 12.5% trichloroacetic acid, the suspension was vigorously shaken and

centrifuged for 15 min at 3000 rpm. The supernatant aliquots were mixed with 0.4 M buffer Tris-HCl (pH 8.9) and 0.01 M DTNB [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)] in a 96-well plates. Absorbance was measured using a spectrophotometer at 415 nm with a microplate reader. The procedures were performed at 4 °C, and the individual values interpolated into a standard curve of GSH (0.375–3 µg) and expressed as µg of GSH/g of tissue.

### 2.13. Statistical analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) with 6-10 animals per group. Statistical significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test using Graph-Pad software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ .

The SP fractions were statistically analyzed by principal component analysis (PCA) using their NMR spectra and the program AMIX-Viewer™, version 3.8 (BRUKER). For analysis was used the spectral region between  $\delta$  1.0 to 7.6 ppm ( $^1\text{H}$ ) and 50.0 to 120.0 ppm ( $^{13}\text{C}$ ) with intervals (buckets) of 0.01 x 0.01 ppm, thus slashing the spectrum in two-dimensional square of 0.0001 ppm<sup>2</sup>. The integration method used was the "special method of integration", developed by the software manufacturer, which minimized the variances caused by S/N (signal-noise) and the baseline of the spectra in case of 1D experiments (Amix Manual, 2008).

## 3. Results

### 3.1. Isolation and chemical analysis of the polysaccharides from *Ilex paraguariensis*

Heteropolysaccharides from *I. paraguariensis* were isolated by aqueous extraction at 100 °C, precipitated with excess ethanol and obtained as sediments on

ultracentrifugation. They were then, dialyzed against tap water and the solution freeze-dried, to give crude polysaccharides fractions.

Fractionation and semi-purification of SP fractions were carried out by a freeze-thawing procedure, resulting in their respective cold-water soluble (SP fractions) and discarded insoluble fractions. Table 1 summarizes the results from fractionation.

The polysaccharide fractions (SP) were analyzed for their monosaccharide composition. The monosaccharides of different leaf samples were qualitatively similar, however some differences in the relative abundance of each monosaccharide component were observed, mainly regarding the process to which leaves were submitted. *In natura* and oxidized leaves presented mainly arabinose, galactose and galacturonic acid whereas polysaccharides extracted from the leaves subjected to blanching/drying presented mainly galacturonic acid, arabinose and galactose. The total monosaccharide composition is given in Table 2.

**Table 2**

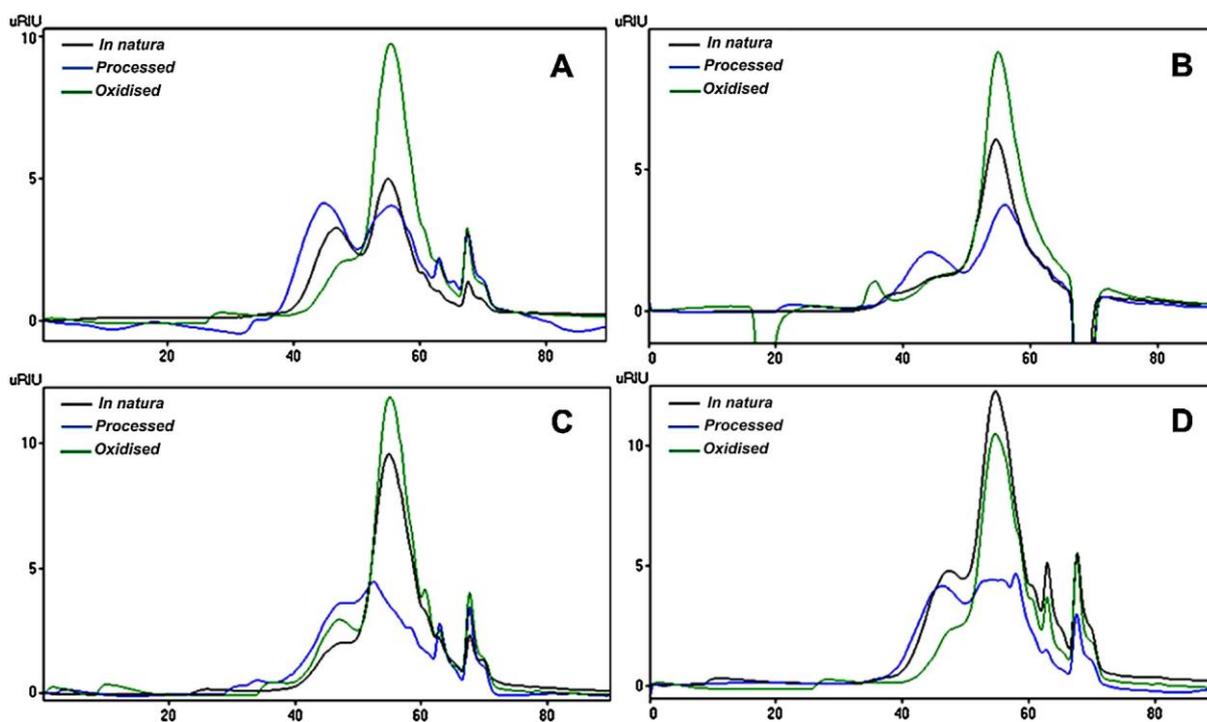
Monosaccharide composition of the SP polysaccharides.

Sample (treatments)	Monosaccharides (%)					
	Galacturonic acid <sup>a</sup>	Galactose <sup>b</sup>	Arabinose <sup>b</sup>	Glucose <sup>b</sup>	Rhamnose <sup>b</sup>	Manose <sup>b</sup>
<b>SP1</b>	20.0	13.0	26.8	31.4	6.5	2.3
<b>SP2</b>	16.0	25.5	16.5	31.2	8.3	2.5
<b>SP3</b>	15.0	33.6	34.4	12.7	4.3	-
<b>SP4</b>	19.0	36.1	18.0	14.7	7.5	4.7
<b>SP5</b>	36.0	11.7	27.6	12.7	9.7	0.9
<b>SP6</b>	45.0	12.4	18.2	15.5	8.1	0.8
<b>SP7</b>	49.0	9.7	21.5	12.2	6.8	0.8
<b>SP8</b>	43.0	18.2	16.5	11.7	8.7	1.9
<b>SP9</b>	21.0	31.7	35.8	6.9	4.6	-
<b>SP10</b>	17.0	21.8	36.6	9.3	8.8	6.5
<b>SP11</b>	18.0	31.3	37.7	7.7	5.3	-
<b>SP12</b>	17.0	29.0	35.0	9.0	4.0	4.1

<sup>a</sup> determined using the colorimetric *m*-hydroxybiphenyl method (Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991).

<sup>b</sup> determined by GC-MS

The SP fractions were also analyzed by SEC, providing a molecular weight distribution of polymers present in the samples (Fig. 1). Differences were observed with respect to the type of treatment that leaves out, submitted after harvest (*in natura*, “chimarrão” and oxidized). There were also differences related to the location of growth of plants, where the young leaves of the sun (A) are different from young leaves of shade (B) as well as the leaves mature of sun (C) are different from those of shadow (D). Differences regarding the age of the leaves were also observed. Young leaves (A and B) are different from mature leaves (C and D). Nevertheless, in all treatments there was a heterogeneous elution profile, indicating the existence of polymers differing in molecular weight along the fractions.



**Fig. 1.** Size exclusion chromatography profile of polysaccharide fractions from *Ilex paraguariensis*: (A) young leaves of the sun, (B) young leaves of shade, (C) mature leaves of sun and (D) mature leaves of shadow.

### 3.1.1. NMR data

The chemical shifts from  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HSQC spectra of SP polysaccharides (Table 3 and Fig. 2) were similar, suggesting that the polysaccharide chains contain regions composed of (1→4)-linked  $\alpha$ -D-galactopyranosyluronic acid residues. A downfield shift of the C-4 signal in the galacturonic acid residues ( $\delta$  78.9 ppm) in comparison with the corresponding signal in a spectrum of free  $\alpha$ -GalpA ( $\delta$  72.0 ppm) confirmed the presence of an  $\alpha$ -(1→4)-linkage between the GalpA residues [33-35].

The galacturonic acid units of pectin are frequently methyl-esterified and the chemical shifts at  $\delta$  52.8/3.74 indicate this. The confirmation was done with HMBC experiment (data not show), which gave a cross peak at  $\delta$  171.0/3.74, indicating the methyl protons have long range correlation with the carboxyl group ( $-\text{CO}_2\text{-CH}_3$ ). However, some chemical shifts at  $\delta$  71.7/4.67 (C-5/H-5) also suggest also the presence of non-esterified GalpA units [33, 36] and the overall NMR data indicate that most of the GalpA units of SP fractions are esterified (Fig. 2).

**Table 3**

$^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR data of SP polysaccharides

Residue	Chemical shifts $^{13}\text{C}$ and $^1\text{H}^a$					
	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5	C-6/H-6
→4)- $\alpha$ -GalpA-(1→	100.2/4.96	68.1/3.74	68.4/3.98	78.6/4.44	70.6/5.07	171.0/3.74 <sup>b</sup>
→2,4)- $\alpha$ -Rhap-(1→	100.9/5.14	76.6/3.94	n.d.	82.6/3.85	69.8/3.60	16.8/1.25
→4)- $\beta$ -Galp-(1→	103.3/4.51	71.9/3.66	n.d.	77.6/4.19	74.4/3.67	67.3/3.97
→5)- $\alpha$ -Araf-(1→	109.1/5.25	n.d.	77.4/3.95	n.d.	64.5/3.71	-
→4,6)- $\alpha$ -GlcP-(1→ <sup>c</sup>	100.4/5.27	n.d.	n.d.	75.4/3.74	n.d.	69.7/3.96

n.d.: not detect

<sup>a</sup>TMS- $d_4$ ,  $\delta = 0$  for  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  at 70 °C.

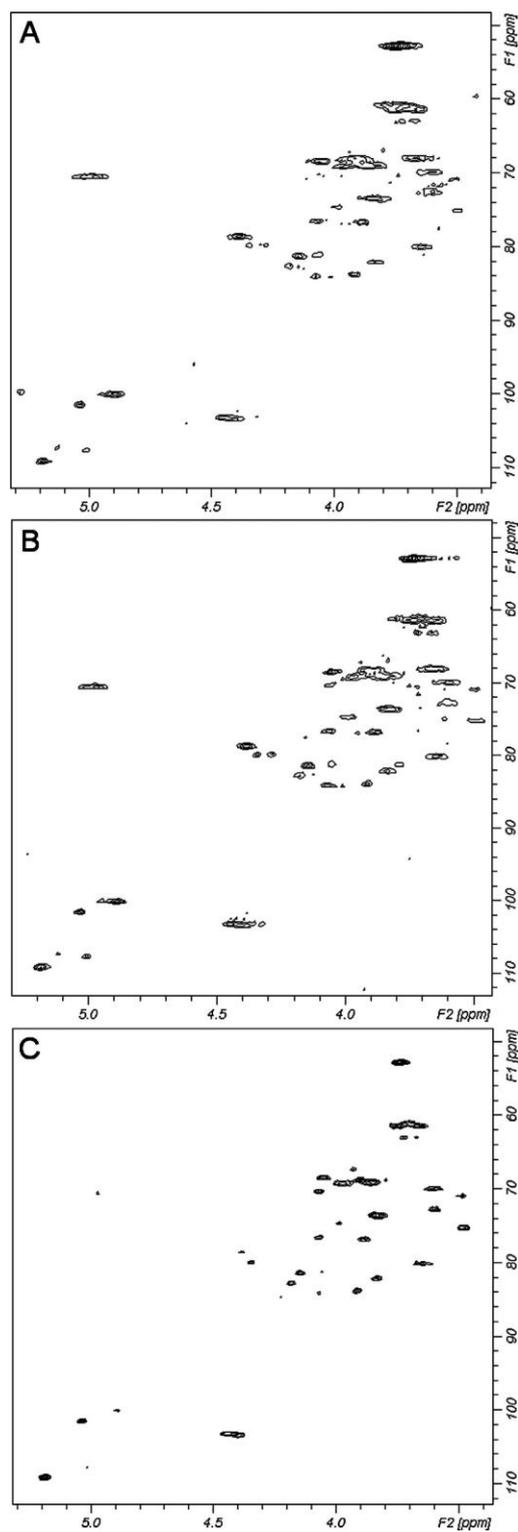
<sup>b</sup>OMe at  $\delta_{\text{C}}$  52.8 and  $\delta_{\text{H}}$  3.74.

<sup>c</sup>Observed only in samples of *in natura* leaves (SP1, SP2, SP3 and SP4).

Rhamnogalacturonans of type I and II are commonly found as constituents of pectins, the major components of primary cell walls of dicotyledonous. These polysaccharides are formed by long sequences of (1→4)- $\alpha$ -D-polygalacturonic acid, interrupted by units of  $\alpha$ -L-Rhap [37]. In the HSQC spectra, five signals of the rhamnopyranose residues were attributed to the presence of 2,4-disubstituted Rhap residues, at  $\delta$  100.9/5.14 (C-1/H-1), 76.6/3.94 (C-2/H-2), 82.6/3.85 (C-4/H-4), 69.8/3.60 (C-5/H-5) and 16.8/1.25 (C-6/H-6) (Table 3 and Fig. 2). Arabinans, galactans or arabinogalactans are often found attached to the rhamnogalacturonans. Type I and type II arabinogalactans are classified according to their linkage partners, the former consisting of a main chain of  $\alpha$ -D-Galp (1→4)-linked, while the latter has a (1→3)-linked  $\beta$ -D-Galp chain, substituted at O-6 by  $\beta$ -D-Galp branches [37]. Here, the presence of type I arabinogalactans were confirmed in accordance with the signals at  $\delta$ 103.3/4.51 (C-1/H-1) and  $\delta$  77.6/4.19 (C-4/H-4) consistent with (1→4)-linked  $\beta$ -D-Galp units (Table 3 and Fig. 2) [13, 35].

Arabinose is frequently found as a component linked to C-6 of the  $\beta$ -D-Galp from the branches, appearing as terminal units or forming 3 or 5-O-linked chains [37]. The HSQC spectra of SP polysaccharides had typical signals of (1→5)-linked  $\alpha$ -L-Araf units, at  $\delta$  109.1/5.25 (C-1/H-1) and  $\delta$  64.5/3.71 (C-5/H-5) (Table 3 and Fig. 2) [38-39].

Starch is the main carbohydrate reserve of plants, and after the cellulose is the most abundant substance the polysaccharides. Some chemical shifts consistent to the presence of starch were also observed in the HSQC spectra, but only in samples from *in natura* leaves (SP1, SP2, SP3 and SP4) (Fig. 2A). These appeared at  $\delta$  100.4/5.27 (C-1/H1)  $\delta$  75.4/3.64 (C-4/H-4, main chain linkage),  $\delta$  69.7/3.96 (C-6/H-6, from C-6-substituted units of amylopectin) [40].



**Fig. 2.**  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC NMR spectra from polysaccharide fractions (A) SP1, (B) SP5 and (C) SP9.

### 3.1.2. Methylation analysis

Due the similarity of results obtained in the NMR analysis of SP fractions, was carried out the methylation of only one of the polysaccharides (SP9). Methylation

analysis showed that SP are highly branched polysaccharides, containing nonreducing-end units of Araf and Galp, due to the formation of alditol acetates of 2,3,5-Me<sub>3</sub>-Ara (20%) and 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal (5.5%), respectively. The arabinofuranosyl units are substituted at O-5, O-3 and O-3,5-disubstituted in accord with formation of alditol acetates of 2,3-Me<sub>2</sub>-Ara (14%), 2,5-Me<sub>2</sub>-Ara (13%) and 2-Me-Ara (6%), respectively.

Galp units are, mainly, 4-O- and 4,6-di-O-substituted in accordance with 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Gal (12%) and 2,3-Me<sub>2</sub>-Gal (4.5%) alditol acetate derivatives. The presence of 2,4-O-substituted rhamnopyranosyl units was observed in low amounts in accordance with 3-Me-Rha (4%) alditol acetate derivative. The percentages quoted above are related to 79% of neutral monosaccharides in SP9 (21% of galacturonic acid).

The structure of the uronic acid found in SP fractions, as well as its linkage types, was determined by carboxy reduction, followed by methylation analysis. The neutral product showed an increase in 2,3,6-Me<sub>3</sub>-galactitol acetate, indicating that (1→4)-linked galacturonic acid residues were present.

The NMR data and methylation analysis suggest that SP polysaccharides are arabinogalactans containing a (1→4)-linked β-Galp chain, with substituents of arabinosyl units at O-6. These are substituted at O-3, O-5, and O-3,5. This arabinogalactans are probably linked to the type I rhamnogalacturonan via O-4 rhamnosyl units.

### 3.1.3. PCA analysis

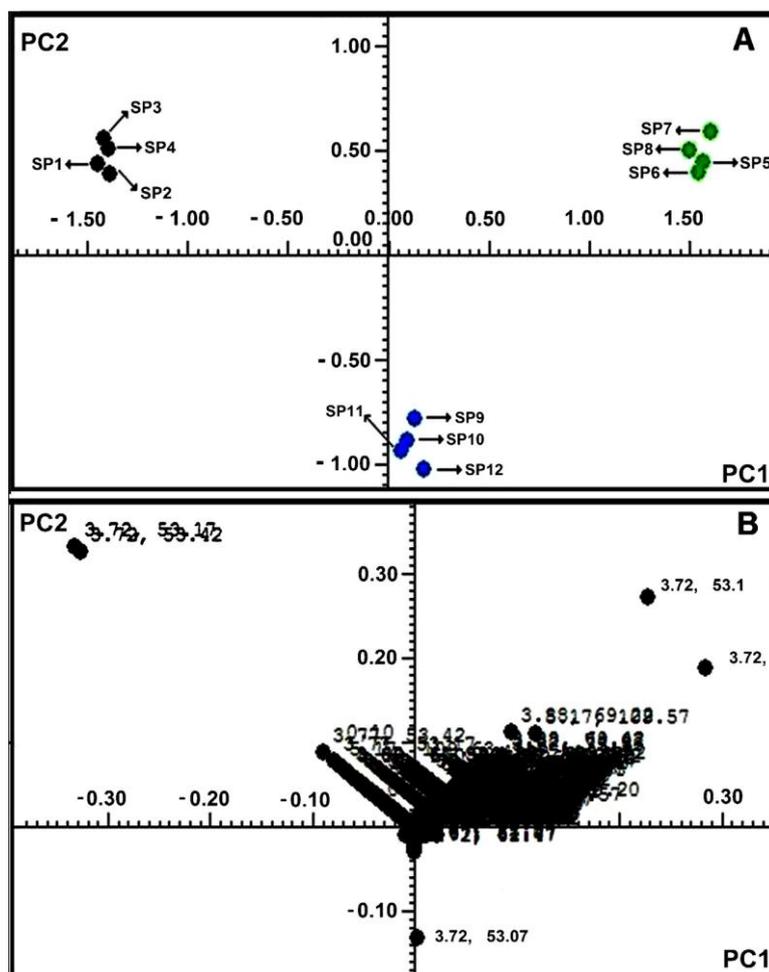
Due to the complexity to identify differences in so many samples, PCA were performed in order to simplify the data set, evidencing differences among the similar HSQC spectra of the samples. With the PCA was possible to reduce the size of the

original data [many variables (12 treatments) x intensity signals] to 2 (2 PCs), where PC1 and PC2 explained 78.26 and 22.73% (total of 99.99%) of the variance of the data (Fig. 3).

In Fig. 3A, a graph of the scores for PC1 and PC2, provides information about the samples (each of 12 treatments). PC1 has grouped the samples according to the after harvesting processes, yielding three clusters: the first is formed by the in natura leaves (black balls) - SP1, SP2, SP3 and SP4; the second by the processed leaves (blue balls) - SP5, SP6, SP7 and SP8; and the third, represented by green balls, the oxidized leaves - SP9, SP10, SP11 and SP12. In the Y axis, PC2, which also influences the data, separated the clusters according to the growing site (sun or shade), where it is possible to observe that the oxidized leaves (green balls) differentiate from other ones. The age of the leaves alone does not influence the chemical shifts and signal intensities of the NMR spectra.

The loadings plot (Fig. 3B) provides information about the variables (chemical shifts and signal intensity). The graphs of scores and loadings are analyzed together. Thus, plants subjected to different post-harvest treatments and from different locations differ to each other, mainly in relation to the signal of coupling at  $\delta$  53.4/3.74, corresponding to the  $-\text{COOCH}_3$  group of  $\alpha$ -D-GalpA units. It was found that the oxidized leaves (SP10, SP11, SP12 and SP13) have the lowest intensity of this signal, which is directly related to the reduction of methyl-esterification of polysaccharides in these leaves.

It is also observed differences in signal  $\delta$  100.4/5.27 corresponding to  $\alpha$ -D-Glcp units where occurs disappearance of this signal in the oxidized leaves (SP10, SP11, SP12 and SP13) (Fig. 3B).



**Fig. 3.** Principal component analysis. (A) A graph of the scores for PC1 and PC2 and (B) the loadings plot, referent to chemical shifts and signal intensity.

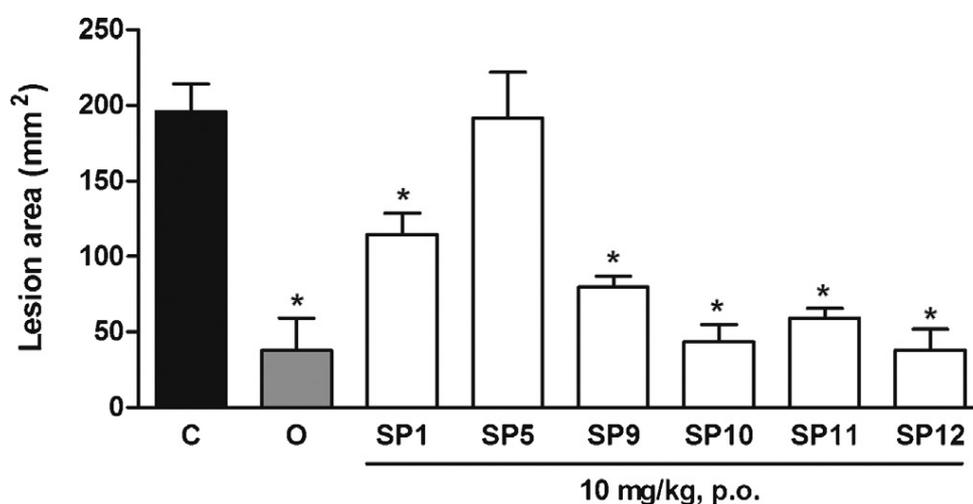
Thus, the NMR data, associated with the monosaccharide composition data indicate that the oxidized leaves have the neutral arabinogalactan greater than the leaves *in natura* and processed.

### 3.2. Effect of polysaccharides from *Ilex paraguariensis* on acute gastric lesions induced by ethanol

Since the major differences in the structure of the polysaccharides are related to post-harvest processes (*in natura*, processed and oxidized), we decided to investigate whether these different types of processing have also altered the gastroprotective activity attributed to their polysaccharides. For this, a sample of each

process (SP1, SP5 and SP9) was orally administered to animals at dose of 10 mg/kg. Pretreatment of animals with SP1 and SP9, 1 h prior the induction of gastric lesions with ethanol P.A., significantly reduced the gastric lesion area in 41 and 59%, respectively, when compared to lesionated group (control group:  $195.8 \pm 18.2 \text{ mm}^2$ , Fig. 4). However, the administration of SP5 was not able to protect the gastric mucosa against ethanol- induced lesion.

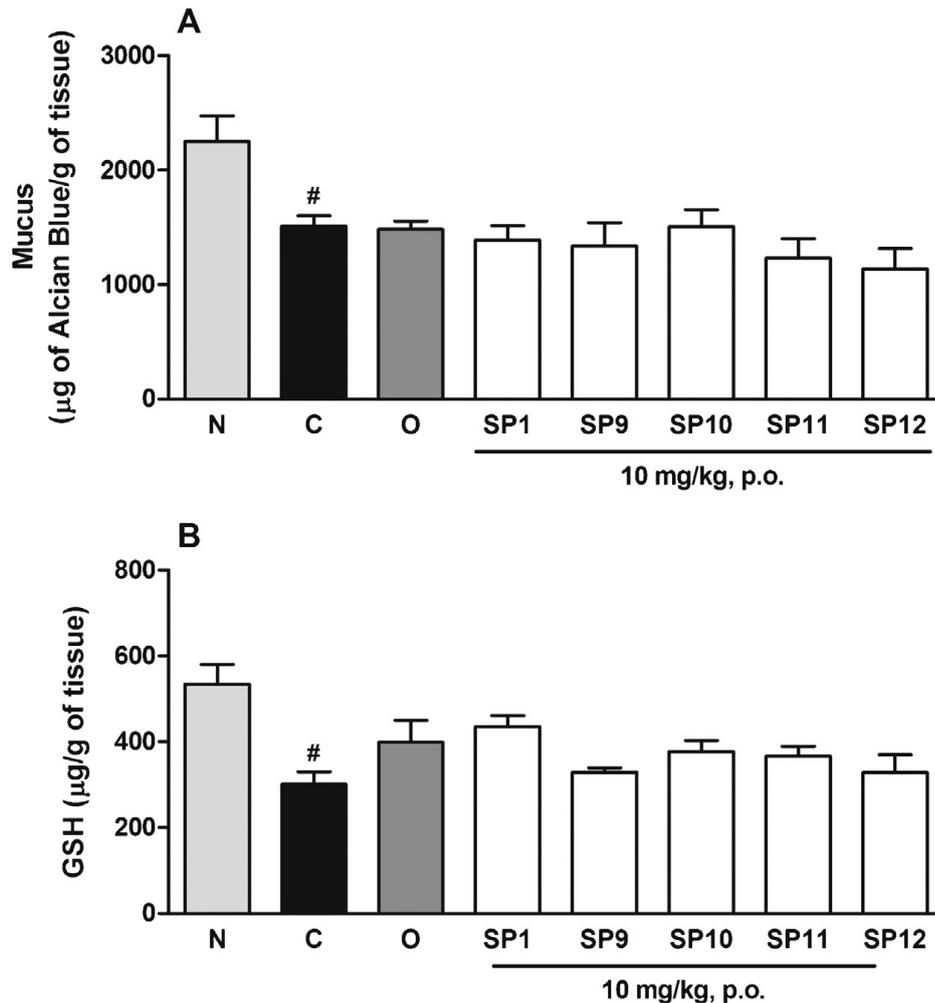
As observed, SP9 (extracted from young leaves of sun and oxidized) showed the most effective activity against ethanol-induced gastric lesions. For this reason, other polysaccharides from oxidized leaves (SP10, SP11 and SP12) were also tested at same dose (10 mg/kg, p.o.). The administration of SP10, SP11 and SP12 inhibited the gastric lesions induced by ethanol in 78, 70 and 89%, respectively, when compared to control group (Fig. 4). Omeprazole (40 mg/kg, p.o.), positive control of the test, inhibited the gastric lesions formation induced by ethanol in 81%.



**Fig. 4.** Effect of polysaccharides (SP1, SP5, SP9, SP10, SP11 and SP12) on acute gastric lesions induced by ethanol P.A. in rats. The animals orally received vehicle (C: water, 1 ml/kg), omeprazole (O: 40 mg/kg) or polysaccharides (SP1–12: 10 mg/kg) 60 min before oral administration of ethanol P.A. (0.5 ml/200 g). Results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 8) and statistical comparison was performed using one-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni's test. \*P < 0.05 compared to the control group.

### 3.3. Effect of polysaccharides from *Ilex paraguariensis* on gastric wall mucus and GSH levels

Since the polysaccharides from oxidized leaves were more effective in reducing gastric lesions we decided to evaluate their effects on gastric wall mucus and GSH levels.



**Fig. 5.** Effect of polysaccharides (SP1, SP9, SP10, SP11 and SP12) on mucus (A) and GSH (B) levels of gastric mucosa after acute gastric lesions induced by ethanol P.A. in rats. The animals orally received vehicle (C: water, 1 ml/kg), omeprazole (O: 40 mg/kg) or polysaccharides (SP1–12: 10 mg/kg) 60 min before oral administration of ethanol P.A. (0.5 ml/200 g). Results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 8) and statistical comparison was performed using one-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni's test. #P < 0.05 compared to the naive group.

Oral administration of ethanol P.A. decreased the gastric mucus and GSH levels by approximately to 33 and 44%, respectively, when compared to naive group (N: 2251.0  $\pm$  225.0  $\mu$ g of Alcian Blue/g of tissue and 534.6  $\pm$  46.0  $\mu$ g of GSH/g of

tissue) (Fig. 5A and B). However, the treatment of animals with SP9, SP10, SP11 and SP12 (10 mg/kg, p.o.) and omeprazole (40 mg/kg, p.o.) did not alter the amount of mucus or GSH in gastric mucosa when compared to the control group (C:  $1511.0 \pm 94.0$   $\mu\text{g}$  of Alcian Blue/g of tissue and  $300.8 \pm 29.4$   $\mu\text{g}$  of GSH/g of tissue (Fig. 5A and B).

#### 4. Discussion

In this study, the gastroprotective effect of polysaccharides isolated from *I. paraguariensis* was investigated using ethanol-induced gastric lesions model in rats.

It has been known that the maté infusions are used in popular medicine to treat digestive disorders, however, no studies about this activity were performed with its extract or isolated compounds, as polysaccharides. Then, for the first time, it was observed that polysaccharides isolated from maté leaves cultivated in different growth stages (young and mature), under two different sunlight conditions (sun and shade) and submitted to different processing methods (in natura, processed and oxidized) present changes in the efficacy grade.

The polysaccharides isolated from *I. paraguariensis* belong to type I arabinogalactan (AG1) containing a (1 $\rightarrow$ 4)-linked  $\beta$ -Galp chain, with substituents of arabinosyl units at O-6. This arabinogalactan is probably linked to an RG1 through O-4 of some of the rhamnosyl units. Interestingly, previous studies investigating arabinogalactans and acidic polysaccharides have shown gastroprotective properties of these polymers [9, 11-15].

To evaluate the potential gastroprotective activity of polysaccharides isolated from different samples of maté, we performed the model of gastric lesions induced by ethanol, which is a well established experimental test that allows identifying extracts and molecules with this property. Ethanol is a necrotizing agent that readily

penetrates in the gastric mucosa, promoting membrane damage, erosion and ulcer formation through reduction of the protective factors of the mucosa such as mucus barrier, secretion of bicarbonate and non-proteic sulphhydrylic groups (NP-SH) [41]. Firstly, we tested three polysaccharides (SP1, SP5 and SP9) isolated from young leaves cultivated in the sun, differing only by processing type, namely *in natura*, processing and oxidation, respectively. Our results demonstrated that SP1 and SP9 protected the gastric mucosa of rats against lesions induced by ethanol, while SP5 did not present gastroprotective properties. Comparing the structure of these three polysaccharides, SP1 and SP9 had lesser galacturonic acid content than SP5, thus, SP1 and SP9 have the neutral arabinogalactan greater than SP5. Our results are in accordance with previous studies demonstrated by Cipriani et al. [12, 14], where arabinogalactans showed more efficacy than pectins (inhibition of 45 and 32% at dose of 10 mg/kg, respectively) in inhibiting the gastric lesion induced by ethanol, both isolated from *M. ilicifolia*.

Nevertheless, the polysaccharide from the oxidized leaves (SP9) was better than those from fresh leaves (SP1). For this reason, we decided to investigate if the other polysaccharides isolated from oxidized leaves also have gastroprotective effects. SP10, SP11 and SP12 were more effective than SP9, reducing the area of lesions in up to 89% (SP12). The polysaccharides extracted from oxidized leaves are different from others, especially because it contains small amounts of glucose and galacturonic acid in their monosaccharide composition. But, their HSQC spectra also showed a decrease of the signal concerning the methyl groups attached to C-6 of GalpA units. Furthermore, this decrease in signal intensity is different for each polysaccharide from oxidized leaves, where, SP12 HSQC spectrum has the lowest signal.

In this study we also investigated if the maintenance of the gastric mucosal integrity is obtained by endogenous defense mechanisms. Among these protective mechanisms of gastric mucosa include the mucus barrier, which constitutes the first line of mucosal protection [42]. The function of the adherent mucus gel is to create a stable layer to support and neutralization of acid and proceed as a defensive physical barrier against luminal pepsin [43]. Another important cytoprotective mechanisms against lesion formation is the reduced glutathione, the major non-proteic sulphhydrylic groups (NP-SH) of gastric mucosa, which provides cellular protection against oxidative damage by oxidation of a thiol group of cysteine residue with formation of a disulphide bond [44]. However, our results showed that oral treatment with all tested polysaccharides did not alter both protective factors, excluding the participation of these in gastroprotection.

So, curiously, the high protective effect of *I. paraguariensis* polysaccharides against acute gastric lesions may be due mainly to the presence of arabinogalactans, but also of pectin in their structure. Thus, the present results enhance the nutraceutical role of maté and their primary chemical components suggesting its potential use or of its crude plant extract as a phytotherapeutic medicine. However, further studies must be carried out to determine the mechanisms involved in their gastroprotective effects.

### **Acknowledgements**

The authors wish to thank the Brazilian funding agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária, and PRONEX-Carboídratos for financial support. C.H. Baggio is recipient of post-doctoral scholarship from the CNPq.

## References

- [1] C.I. Heck, E.G. de Mejia, *J. Food. Sci.* 72 (2007) R138-151.
- [2] F. de Andrade, C.A. de Albuquerque, M. Maraschin, E.L. da Silva, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 328-334.
- [3] G.M. Hussein, H. Matsuda, S. Nakamura, M. Hamao, T. Akiyama, K. Tamura, M. Yoshikawa, *Biol. Pharm. Bull.* 34 (2011) 1849-1855.
- [4] N. Bracesco, A.G. Sanchez, V. Contreras, T. Menini, A. Gugliucci, *J. Ethnopharmacol.* 136 (2011) 378-384.
- [5] M.P. Peixoto, S. Kaiser, S.G. Verza, P.E. de Resende, J. Treter, C. Pavei, G.L. Borre, G.G. Ortega, *Phytochem. Anal.* 23 (2012) 415-420.
- [6] N. Dartora, L.M. de Souza, A.P. Santana, M. Iacomini, A.T. Valduga, P.A.J. Gorin, G.L. Sasaki, *Food Chem.* 129 (2011) 1453-1461.
- [7] L.M. de Souza, N. Dartora, C.T. Scoparo, T.R. Cipriani, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, G.L. Sasaki, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7307-7315.
- [8] R. Srivastava, D.K. Kulshreshtha, *Phytochemistry* 28 (1989) 2877-2883.
- [9] H. Yamada, *Carbohydr. Polym.* 25 (1994) 269-276.
- [10] F.R. Smiderle, E.R. Carbonero, G.L. Sasaki, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, *Food Chem.* 108 (2008) 329-333.
- [11] C.S. Nergard, D. Diallo, K. Inngjerdigen, T.E. Michaelsen, T. Matsumoto, H. Kiyohara, H. Yamada, B.S. Paulsen, *J. Ethnopharmacol.* 96 (2005) 255-269.
- [12] T.R. Cipriani, C.G. Mellinger, L.M. de Souza, C.H. Baggio, C.S. Freitas, M.C. Marques, P.A. Gorin, G.L. Sasaki, M. Iacomini, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 1018-1021.

- [13] L.Y. Tanaka, A.J.B. de Oliveira, J.E. Goncalves, T.R. Cipriani, L.M. de Souza, M.C.A. Marques, M.F.P. Werner, C.H. Baggio, P.A.J. Gorin, G.L. Sasaki, M. Iacomini, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 714-721.
- [14] T.R. Cipriani, C.G. Mellinger, M.L.C. Bertolini, C.H. Baggio, C.S. Freitas, M.C.A. Marques, P.A.J. Gorin, G.L. Sasaki, M. Iacomini, *Food Chem.* 115 (2009) 687-690.
- [15] X.B. Sun, T. Matsumoto, H. Yamada, *Planta Med.* 58 (1992) 432-435.
- [16] T.R. Cipriani, C.G. Mellinger, L.M. de Souza, C.H. Baggio, C.S. Freitas, M.C.A. Marques, P.A.J. Gorin, G.L. Sasaki, M. Iacomini, *Carbohydr. Polym.* 74 (2008) 274-278.
- [17] J.B. Calixto, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33 (2000) 179-189.
- [18] S. Isolabella, L. Cogoi, P. Lopez, C. Anesini, G. Ferraro, R. Filip, *Food Chem.* 122 (2010) 695-699.
- [19] L.C. Ming, *Hortic. Bras.* 12 (1994) 3-9.
- [20] P.A.J. Gorin, M. Iacomini, *Carbohydr. Res.* 128 (1984) 119-132. [21] G.L. Sasaki, L.M. Souza, T.R. Cipriani, M. Iacomini, *TLC of Carbohydrates*, in: M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska (Eds.) *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, CRC Press, Boca Raton, 2008, pp. 255-276.
- [22] M.L. Wolfrom, A. Thompson, *Methods Carbohydr. Chem.* 2 (1963) 211-215.
- [23] M.L. Wolfrom, A. Thompson, *Methods Carbohydr. Chem.* 2 (1963) 65-67.
- [24] T.M. Filisetti-Cozzi, N.C. Carpita, *Anal. Biochem.* 197 (1991) 157-162.
- [25] R.L. Taylor, H.E. Conrad, *Biochemistry* 11 (1972) 1383-1388.
- [26] I. Ciucanu, F. Kerek, *Carbohydr. Res.* 131 (1984) 209-217.
- [27] J.F. Saeman, W.E. Moore, R.L. Mitchell, M.A. Millet, *TAPPI* 37 (1954) 336-343.

- [28] G.L. Sasaki, P.A. Gorin, L.M. Souza, P.A. Czelusniak, M. Iacomini, *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 731-739.
- [29] A. Robert, J.E. Nezamis, C. Lancaster, A.J. Hanchar, *Gastroenterology* 77 (1979) 433-443.
- [30] F.B. Potrich, A. Allemand, L.M. da Silva, A.C. Dos Santos, C.H. Baggio, C.S. Freitas, D.A. Mendes, E. Andre, M.F. Werner, M.C. Marques, *J. Ethnopharmacol.* 130 (2010) 85-92.
- [31] S.J. Corne, S.M. Morrissey, R.J. Woods, *J. Physiol.* 242 (1974) 116P-117P.
- [32] J. Sedlak, R.H. Lindsay, *Anal. Biochem.* 25 (1968) 192-205.
- [33] S.V. Popov, R.G. Ovodova, V.V. Golovchenko, F.Y. Popova, F.V. Viatyasev, A.S. Shashkov, Y.S. Ovodov, *Food Chem.* 124 (2011) 309-315.
- [34] R.G. Ovodova, V.V. Golovchenko, S.V. Popov, G.Y. Popova, N.M. Paderin, A.S. Shashkov, S. Alexandre, Y.S. Ovodov, *Food Chem.* 114 (2009) 610-615.
- [35] T.R. Cipriani, C.G. Mellinger, P.A. Gorin, M. Iacomini, *J. Nat. Prod.* 67 (2004) 703-706.
- [36] C.M. Renard, M. Lahaye, M. Mutter, F.G. Voragen, J.F. Thibault, *Carbohydr. Res.* 305 (1997) 271-280.
- [37] N.C. Carpita, D.M. Gibeaut, *Plant J.* 3 (1993) 1-30.
- [38] C.L. Delgobo, P.A. Gorin, C. Jones, M. Iacomini, *Phytochemistry* 47 (1998) 1207-1214.
- [39] M. Matulova, P. Capek, S. Kaneko, L. Navarini, F.S. Liverani, *Carbohydr. Res.* 346 (2011) 1029-1036.
- [40] H. Falk, M. Stanek, *Monatsh. Chem.* 128 (1997) 777-784.
- [41] S. Szabo, J.S. Trier, A. Brown, J. Schnoor, *Gastroenterology* 88 (1985) 228-236.

[42] L. Laine, K. Takeuchi, A. Tarnawski, *Gastroenterology* 135 (2008) 41-60.

[43] A. Allen, G. Flemstrom, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288 (2005) C1-19.

[44] N.H. Cnubben, I.M. Rietjens, H. Wortelboer, J. van Zanden, P.J. van Bladeren, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10 (2001) 141-152.

## 5. ANÁLISES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

### 5.1 ANÁLISES ESTRUTURAL E COMPARATIVA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Ilex*

Embora atualmente a produção da erva-mate para o chimarrão seja um processo industrializado, a sua adulteração por quantidades variadas de folhas de outras espécies sul-americanas do gênero *Ilex*, ainda é frequente. A adição das demais espécies pode levar a modificações nas propriedades biológicas associadas aos produtos de mate, uma vez que estas são qualitativamente e quantitativamente distintas da *I. paraguariensis* em relação aos seus metabólitos secundários (FILIP *et al.*, 1998; REGINATTO *et al.*, 1999).

Sabe-se que *I. paraguariensis* contém grandes quantidades de xantinas em sua composição (ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, 2000; DARTORA *et al.*, 2011), enquanto que, ao serem testadas seis espécies de *Ilex* comumente encontradas como adulterantes (*I. dumosa*, *I. pseudobuxus*, *I. brevicuspis*, *I. theezans*, *I. microdonta* e *I. argentina*) quanto ao seu conteúdo foliar de teobromina, teofilina, e cafeína, estas mostraram haver pouca ou nenhuma quantidade dos compostos acima mencionados (FILIP *et al.*, 1998; REGINATTO *et al.*, 1999). Além disso, estes adulterantes podem ser problemáticos para a qualidade dos produtos obtidos com erva-mate devido, principalmente, à sua composição e concentração diferenciada de saponinas. Infusões preparadas com *I. paraguariensis*, mostraram-se ser menos amargas do que aquelas preparadas com as demais espécies. Assim, é possível que a adição de adulterantes possa ter um efeito significativo sobre o amargor das bebidas de mate e, conseqüentemente, sobre a aprovação do produto pelo consumidor (HECK; DEMEJIA, 2007).

Algumas espécies (*I. buxifolia*, *I. crenata*, *I. affinis*, *I. rotunda*, *I. brevicuspis*, *I. argentina* e *I. integra*) foram analisadas quanto à sua composição de saponinas e a análise mostrou que a maioria contém agliconas não encontradas em *I. paraguariensis*. Estas possuem derivados do ácido hidroxiursólico, ao invés de ácido ursólico e oleanólico (AMIMOTO *et al.*, 1993a; YANO *et al.*, 1993;. SCHENKEL *et al.*, 1995; PIRES *et al.*, 1997;. TAKETA *et al.*, 2002;. HECK; DEMEJIA, 2007). Assim, devido à especificidade de certas saponinas, pode ser possível identificar adulteradores nos produtos obtidos de erva-mate, com base na composição e

concentração de saponinas. Então, o desenvolvimento de novos métodos para a identificação precisa de adulterantes pode se tornar um método plausível para o controle de qualidade destes produtos.

Neste contexto, um dos trabalhos desenvolvidos durante o Doutorado visa a comparação da composição química de diferentes espécies de *Ilex* comumente usadas como adulterantes no preparo do produto comercial oriundo da erva-mate. Para tanto nove espécies de *Ilex* (*I. argentina*, *I. brasiliensis*, *I. brevicuspis*, *I. dumosa*, *I. integerrima*, *I. microdonte*, *I. pseudobuxus*, *I. taubertiana* e *I. theezans*) foram gentilmente cedidas pelo INTA – Instituto Nacional de Tecnologia e Agropecuária, da Argentina.

Inicialmente, as folhas das diferentes espécies foram processadas de acordo com o processamento a que as folhas são submetidas para o preparo do chimarrão (sapeco). Assim, folhas secas e trituradas (10 g) foram submetidas a extração com água (100 mL) a 100 °C sob refluxo, por um período de 3 horas, repetidos por 3 vezes. Os extratos brutos aquosos obtidos foram filtrados, concentrados em evaporador rotativo até pequeno volume e tratados com 3 volumes etanol (v/v) para promover a precipitação dos polissacarídeos, que foram separados por centrifugação, concentrados e liofilizados. As frações solúveis em etanol (sobrenadante etanólico) foram concentradas em evaporador rotativo e, então, liofilizadas.

Os sobrenadantes hidroalcoólicos foram submetidos a análises por ESI-MS em um espectrômetro de massas Quattro LC, triplo quadrupólo (Waters), no intuito de se identificar compostos presentes em cada espécie e compará-los entre si.

Extratos provenientes das diferentes espécies de *Ilex* mostraram algumas semelhanças qualitativas, como pode ser observado na análise de ESI-MS em modo negativo *offline* (Figura 5.1). Os principais compostos identificados como íons desprotonados  $[M-H]^-$  foram: ácido quínico de  $m/z$  191, cafeoil glucose (ou ácido dicafêico) de  $m/z$  341, ácidos cafeoilquínicos (clorogênicos) de  $m/z$  353 ( $MS^2$  - 191,179 e 173), ácidos dicafeoilquínicos de  $m/z$  515 ( $MS^2$  - 353,191,179 e 173), e rutina de  $m/z$  609 ( $MS^2$  - 301 e 463). As análises *offline* por ESI-MS não foram suficientes para determinar se isômeros de ácidos cafeoilquínicos (ácido neoclorogênico, ácido clorogênico ou ácido criptoclorogênico, ver estruturas na Figura 4, pag. 44) e de ácidos dicafeoilquínicos (ácido 3,4-O-dicafeoilquínico, ácido

4,5-O-dicafeoilquínico ou ácido 3,5-O-dicafeoilquínico, ver estruturas na Figura 4, pag. 44) estavam presentes nas amostras.

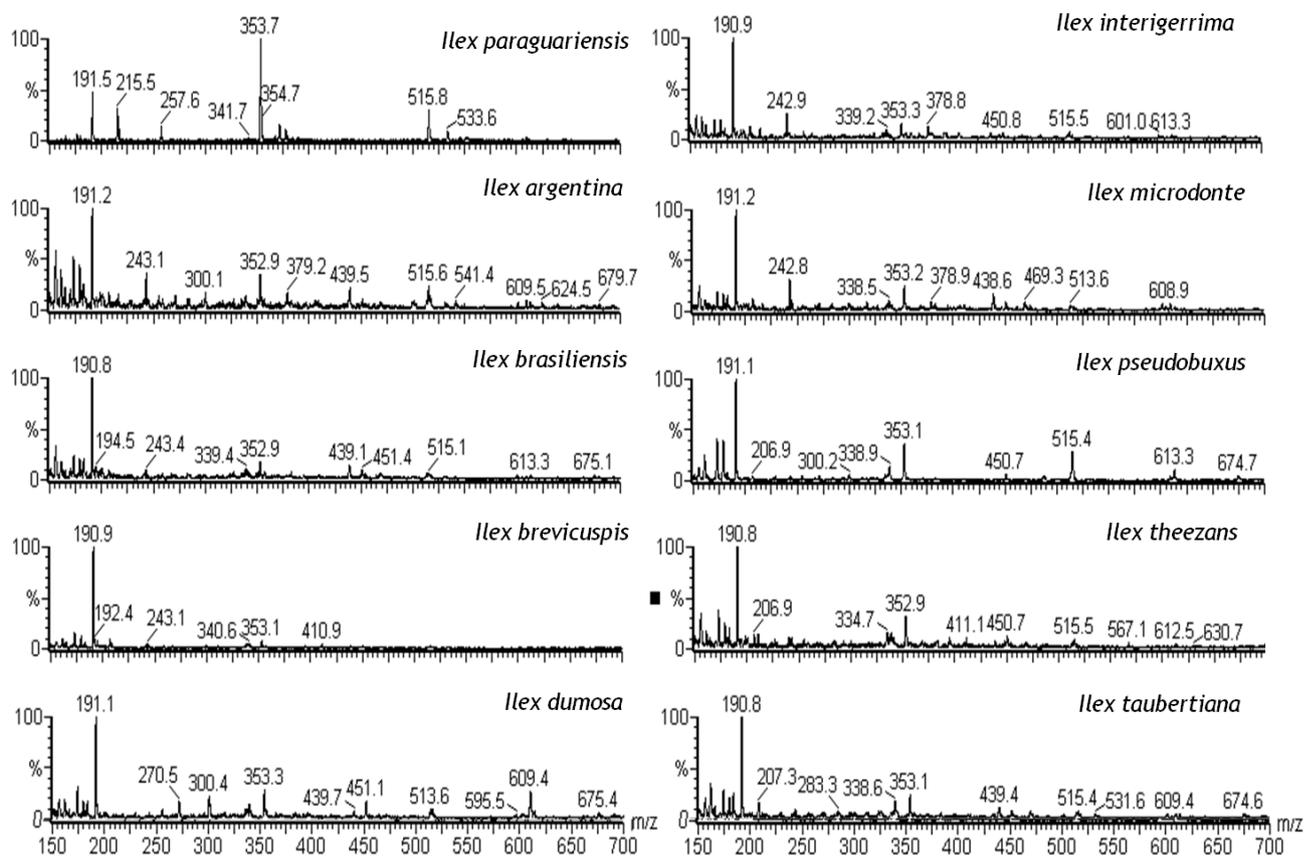


FIGURA 5.1 - Espectro de ESI-MS *offline* em modo negativo dos sobrenadantes etanólicos obtidos das diferentes espécies de *Ilex*.

ESI-MS em modo positivo foi desenvolvido como adutos de lítio  $[M+Li]^+$  (Figura 5.2), e as amostras também apresentaram-se semelhantes, sendo que alguns compostos puderam ser identificados como, glucose/frutose ( $m/z$  187) e sacarose ( $m/z$  349), cuja presença foi confirmada por cromatografia em camada delgada (TLC – *thin layer chromatography*), com auxílio de padrões. Um íon de baixa abundância de  $m/z$  201 foi compatível com a razão massa/carga da cafeína  $[M+Li]^+$ , mas a teobromina (outra xantina comum encontrada em menor concentração na erva-mate), não pôde ser identificada por ESI-MS, considerando que apresenta a mesma massa molecular das hexoses (massa nominal de 180 Da) e, portando, poderia gerar íon de mesmo valor de  $m/z$ . A rutina ( $m/z$  617) também foi observada em algumas espécies.

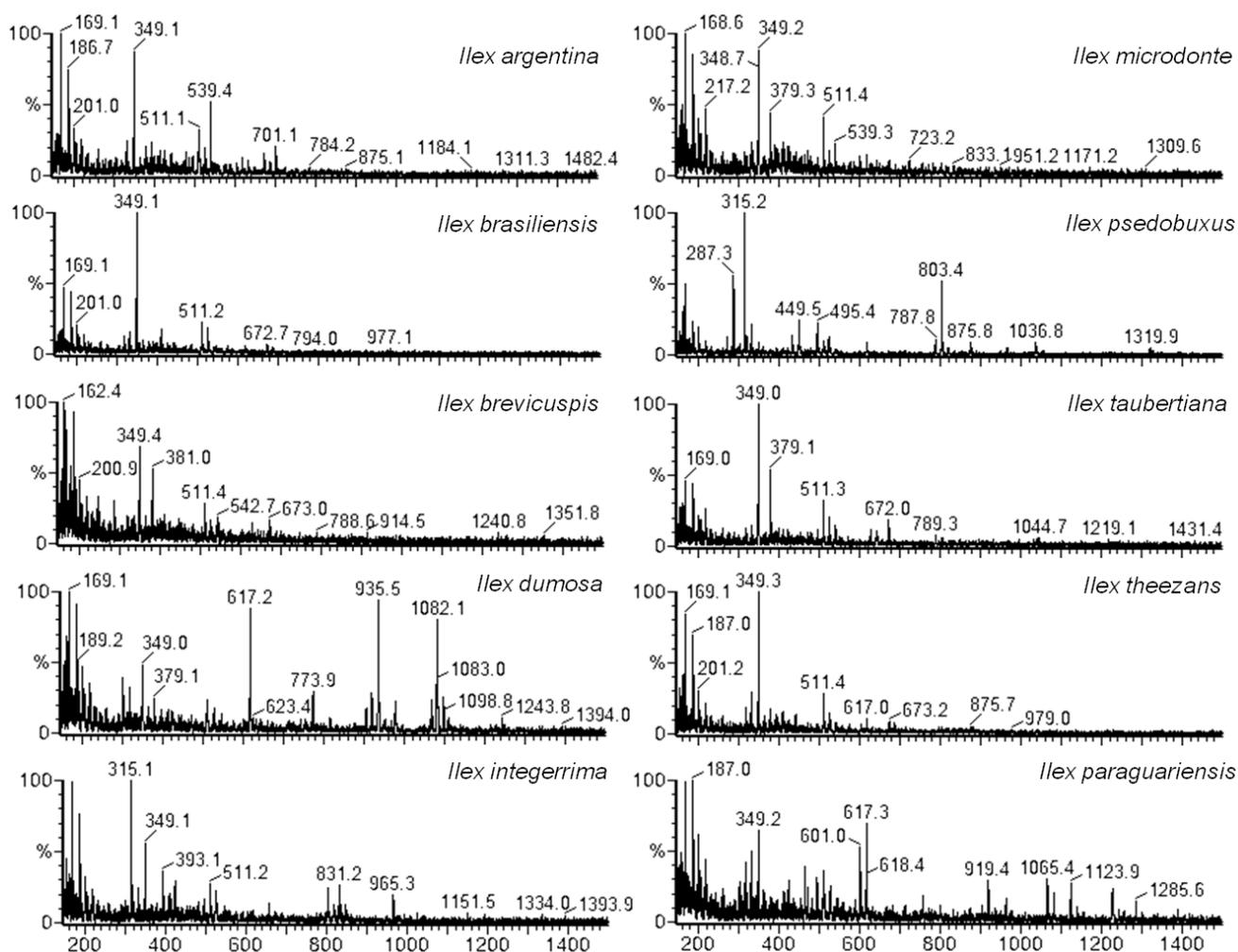


Figura 5.2 - Espectro de ESI-MS *offline* em modo positivo ( $[M+Li]^+$ ) dos sobrenadantes etanólicos obtidos das diferentes espécies de *Ilex*.

Como é descrito, muitas saponinas são relatadas em *I. paraguariensis* (GOSMANN; GUILAUME, 1995; SOUZA *et al.*, 2011) e algumas puderam ser observadas no espectro de ESI-MS em modo positivo: matesaponina 1 com  $m/z$  919, matesaponina 2 com  $m/z$  1065, matesaponina 3 com  $m/z$  1081, matesaponina 4 com  $m/z$  1228, matesaponina 5 com  $m/z$  1390, além de outras (Figura 5.2). Também observa-se a presença de inúmeros íons com valores de  $m/z$  compatíveis com saponinas nas demais espécies de *Ilex*, porém poucas similares à *I. paraguariensis*, necessitando de uma maior investigação para a identificação e caracterização destes compostos.

Como mencionado, as análises *offline* por ESI-MS não foram suficientes para determinar quais isômeros de ácidos cafeoilquínicos e dicafeoilquínicos estavam presentes nas amostras. Assim, foram conduzidas análises de cromatografia líquida

de ultra-alta eficiência (UHPLC), as quais permitiram identificar e separar tais compostos.

As análises foram realizadas por cromatografia de fase reversa (coluna C18), com H<sub>2</sub>O (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos contendo HOAc 1% (v/v). O seguinte gradiente foi desenvolvido: aumento da concentração do solvente B, de 0 a 40% em 8 min, mantido por mais 2 min e retornando para a condição inicial (100% A) em 10,2 min, com um fluxo de 300 µL/min. A coluna foi reequilibrada por 3 min antes de cada injeção.

Novamente, observa-se que os cromatogramas obtidos para as diferentes amostras mostraram-se qualitativamente similares (Figura 5.3), tendo seus compostos identificados, por meio do espectro de absorção no ultravioleta (UV), uso de padrões e com base na literatura (DARTORA *et al.*, 2011). Assim o pico 1 ( $t_R$  1,35) foi atribuído ao ácido neoclorogênico, pico 2 ( $t_R$  1,97) ao ácido clorogênico, pico 3 ( $t_R$  2,10) ao ácido criptoclorogênico, pico 4 ( $t_R$  4,36) à rutina, pico 5 ( $t_R$  4,68) ao ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico, pico 6 ( $t_R$  4,78) ao ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico, e pico 7 ( $t_R$  5,48) ao ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico.

Embora as amostras tenham se mostrado similares, algumas diferenças na concentração dos compostos podem ser observadas, além de que algumas espécies possuem compostos que não são observados para a *I. paraguariensis* (Figura 5.3). Assim, a identificação e quantificação destes compostos vêm sendo conduzida.

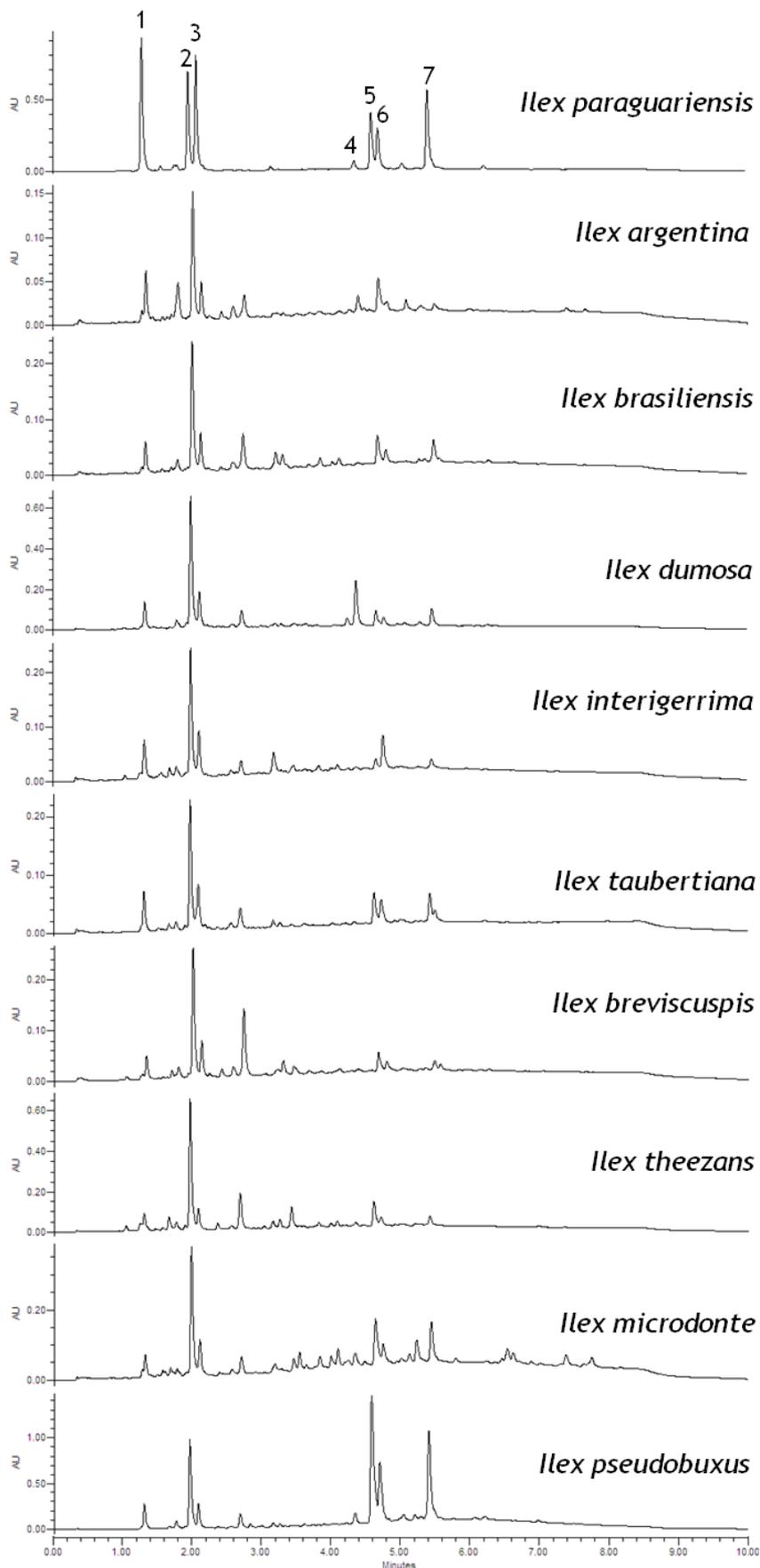


FIGURA 5.3 - UHPLC-PDA (325 nm) das espécies de *Ilex* (SETs). (1) Ácido neoclorogênico, (2) ácido clorogênico, (3) ácido criptoclorogênico, (4) rutina, (5) ácido 3,4-dicafeoilquínico, (6) ácido 3,5-dicafeoilquínico e (7) ácido 4,5-dicafeoilquínico.

No intuito de se investigar a composição de saponinas das diferentes espécies de *Ilex*, os extratos hidroalcoólicos obtidos foram solubilizados em água e então submetidos a um fracionamento líquido-líquido com butanol, uma vez que, sabe-se que as saponinas ficam concentradas na fase butanólica (SOUZA *et al.*, 2011). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo, liofilizadas e então armazenadas a -20 °C, para análises posteriores. Na Tabela 5.1 encontram-se os rendimentos obtidos para cada uma das frações.

Tabela 5.1 – Rendimento das frações obtidas para as diferentes espécies de *Ilex*, antes e depois do fracionamento.

Espécies	Extração Aquosa (10 g)	Tratamento com Etanol		Partição com BuOH (0,5 g)*	
		Sobrenadante	Precipitado	BuOH	Aquosa
<i>I. argentina</i>	1,492	1,372	0,120	0,074	0,426
<i>I. brasiliensis</i>	1,074	0,930	0,144	0,051	0,449
<i>I. brevicuspis</i>	1,762	1,618	0,144	0,063	0,437
<i>I. dumosa</i>	1,159	1,015	0,144	0,095	0,405
<i>I. integerrima</i>	1,271	1,129	0,142	0,063	0,437
<i>I. microdonte</i>	1,754	1,617	0,137	0,060	0,430
<i>I. paraguariensis</i>	1,802	1,529	0,273	0,079	0,421
<i>I. pseudobuxus</i>	1,823	1,739	0,084	0,144	0,356
<i>I. taubertiana</i>	1,513	1,379	0,134	0,028	0,472
<i>I. theezans</i>	1,162	1,063	0,099	0,058	0,442

\* Partição do sobrenadante obtido do tratamento com etanol (3 volumes)

Após o fracionamento as frações butanólicas obtidas para as diferentes espécies de *Ilex* foram analisadas por TLC, UHPLC, ESI-MS, e também quanto a sua composição monossacarídica e de agliconas. Na Figura 5.4 encontra-se a TLC obtida para as frações butanólicas das diferentes espécies, onde observa-se grande quantidade de compostos glicosilados compatíveis com saponinas, conforme previamente descrito para *I. paraguariensis* (SOUZA *et al.*, 2011).

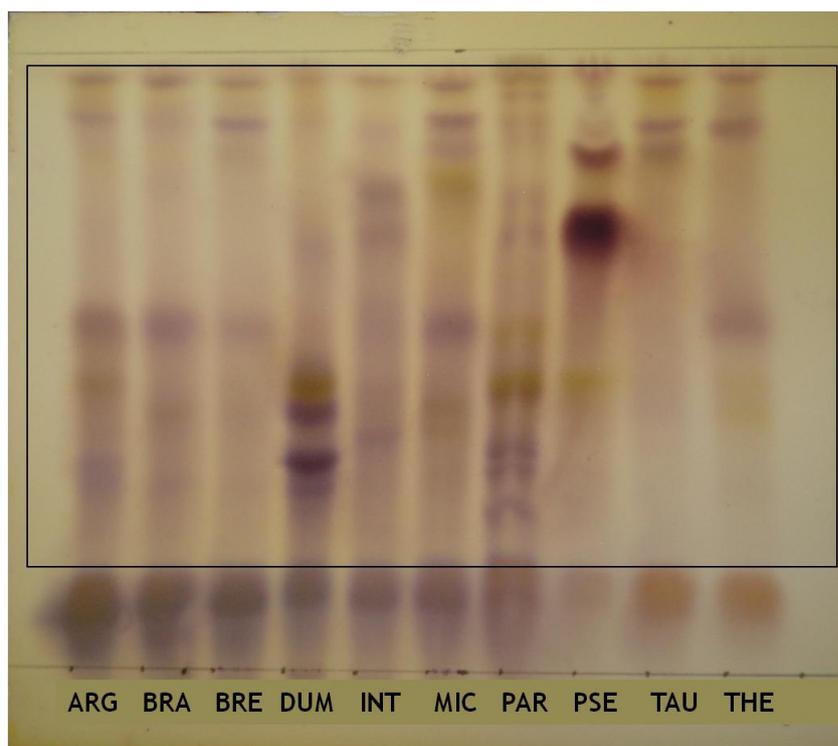


Figura 5.4 - TLC das frações butanólicas: **(ARG)** *Ilex argentina*, **(BRA)** *Ilex brasiliensis*, **(BRE)** *Ilex brevicuspis*, **(DUM)** *Ilex dumosa*, **(INT)** *Ilex integerrima*, **(MIC)** *Ilex microdonte*, **(PAR)** *Ilex paraguariensis*, **(PSE)** *Ilex pseudobuxus*, **(TAU)** *Ilex taubertiana* and **(THE)** *Ilex theezans*. Fase móvel: EtOAc:H<sub>2</sub>O:HOAc:HCOOH (9:2,3:1:1, v/v), revelador: orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 100 °C (SOUZA et al., 2011)

As frações butanólicas foram então submetidas à hidrólise com TFA 1 M por 8 horas a 100 °C. Após a hidrólise, as amostras foram secas, solubilizadas em água e realizou-se um fracionamento líquido-líquido com butanol. A fase aquosa continha os monossacarídeos, que foram reduzidos com NaBH<sub>4</sub> e acetilados com uma mistura de piridina e anidrido acético, para a análise da composição monossacarídica (WOLFROM; THOMPSON, 1963a,b). A fase butanólica, contendo as agliconas foi analisada por ESI-MS em espectrômetro LTQ-XL Orbitrap (Thermo-Scientific).

A Tabela 5.2 mostra a composição monossacarídica e de agliconas para cada uma das frações butanólicas obtidas das diferentes espécies de *Ilex*.

Tabela 5.2 - Composição de monossacarídeos e agliconas encontrados nas frações butanólicas de diferentes espécies de *Ilex*, após hidrólise ácida.

Agliconas <sup>a</sup>	Espécies									
	ARG	BRA	BRE	DUM	INT	MIC	PAR	PSE	TAU	THE
Ác. ursólico [455 (M-H)]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ác. hidroursólico [471 (M-H)]	X		X	X	X	X		X		X
Ác. dihidroursólico [487 (M-H)]	X	X	X		X			X	X	X
Ác. trihidroursólico [503 (M-H)]	X	X		X	X			X	X	X
Ác. tetrahidroursólico [519 (M-H)]	X		X					X		X
Ác. rotundióico [501 (M-H)]	X	X	X		X	X				X
Ác. rotundióico+CH <sub>3</sub> [515 (M-H)]	X	X	X	X		X		X	X	X
Ác. rotundióico+OH [517 (M-H)]	X					X		X	X	X

Monossacarídeos <sup>b</sup>	Abundância relativa (%)									
	ARG	BRA	BRE	DUM	INT	MIC	PAR	PSE	TAU	THE
Arabinose	18,7	15,2	8,4	35,9	Tr	10,0	25,0	3,6	33,7	9,9
Galactose	4,7	5,1	-	3,1	-	-	-	2,2	5,4	-
Glucose	68,4	79,8	84,6	48,2	72,7	83,7	65,0	52,6	56,1	90,1
Ramnose	8,2	Tr	7,0	12,9	27,3	6,3	10,0	41,6	4,8	Tr
Xilose	-	Tr	Tr	-	-	Tr	Tr	-	-	-

<sup>a</sup> Analisadas por ESI-MS, após a hidrólise.

<sup>b</sup> Analisada em GC-MS após hidrólise, redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

Tr - Traços

**(ARG)** *Ilex argentina*, **(BRA)** *Ilex brasiliensis*, **(BRE)** *Ilex brevicuspis*, **(DUM)** *Ilex dumosa*, **(INT)** *Ilex integerrima*, **(MIC)** *Ilex microdonte*, **(PAR)** *Ilex paraguariensis*, **(PSE)** *Ilex pseudobuxus*, **(TAU)** *Ilex taubertiana* and **(THE)** *Ilex theezans*.

Dando continuidade à elucidação das estruturas das saponinas presentes em cada uma das espécies, as frações butanólicas obtidas foram analisadas por ESI-MS em modo *offline* positivo, como adutos de lítio [M+Li]<sup>+</sup> (Figura 5.5). Observa-se que o perfil de saponinas foi bastante singular para cada uma das espécies analisadas, onde poucas apresentam íons iguais aos que aparecem para *I. paraguariensis*, evidenciando assim, que a composição de saponinas é característica para cada espécie, distinguindo-a das demais analisadas (Figura 5.5).

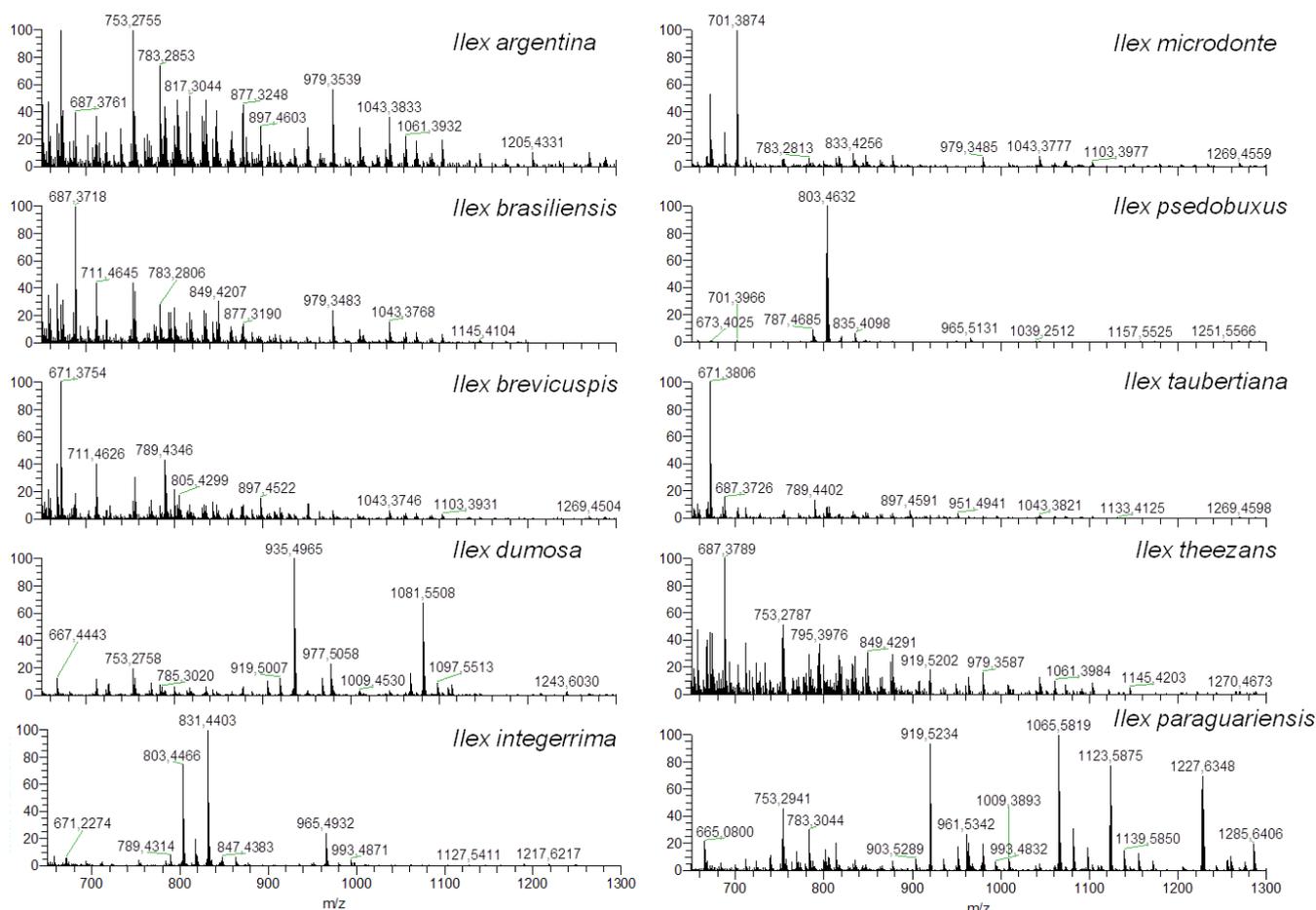


Figura 5.5 - ESI-MS *offline* em modo positivo ( $[M+Li]^+$ ) das frações butanólicas obtidas das diferentes espécies de *Ilex*.

Os principais íons encontrados em cada espectro das frações butanólicas foram fragmentados em espectrômetro de massas híbrido de alta resolução LTQ-XL Orbitrap, que como primeiro estágio apresenta um analisador tipo *Linear Ion Trap* permitindo análises de baixa resolução, mas com possibilidade de múltiplos ciclos de fragmentação, conhecido como  $MS^n$  ( $n = 10$ ), auxiliando assim, na elucidação estrutural das saponinas. Por meio da fragmentação foi possível obter diversas informações sobre a estrutura das moléculas e diversos isômeros puderam ser propostos. Pode-se citar como exemplo o íon de  $m/z$  919  $[M+Li]^+$  encontrado na *I. paraguariensis*, o qual pode ser característico de mais de uma saponina diferente, como mostra a Figura 5.6 (SOUZA *et al.*, 2011).

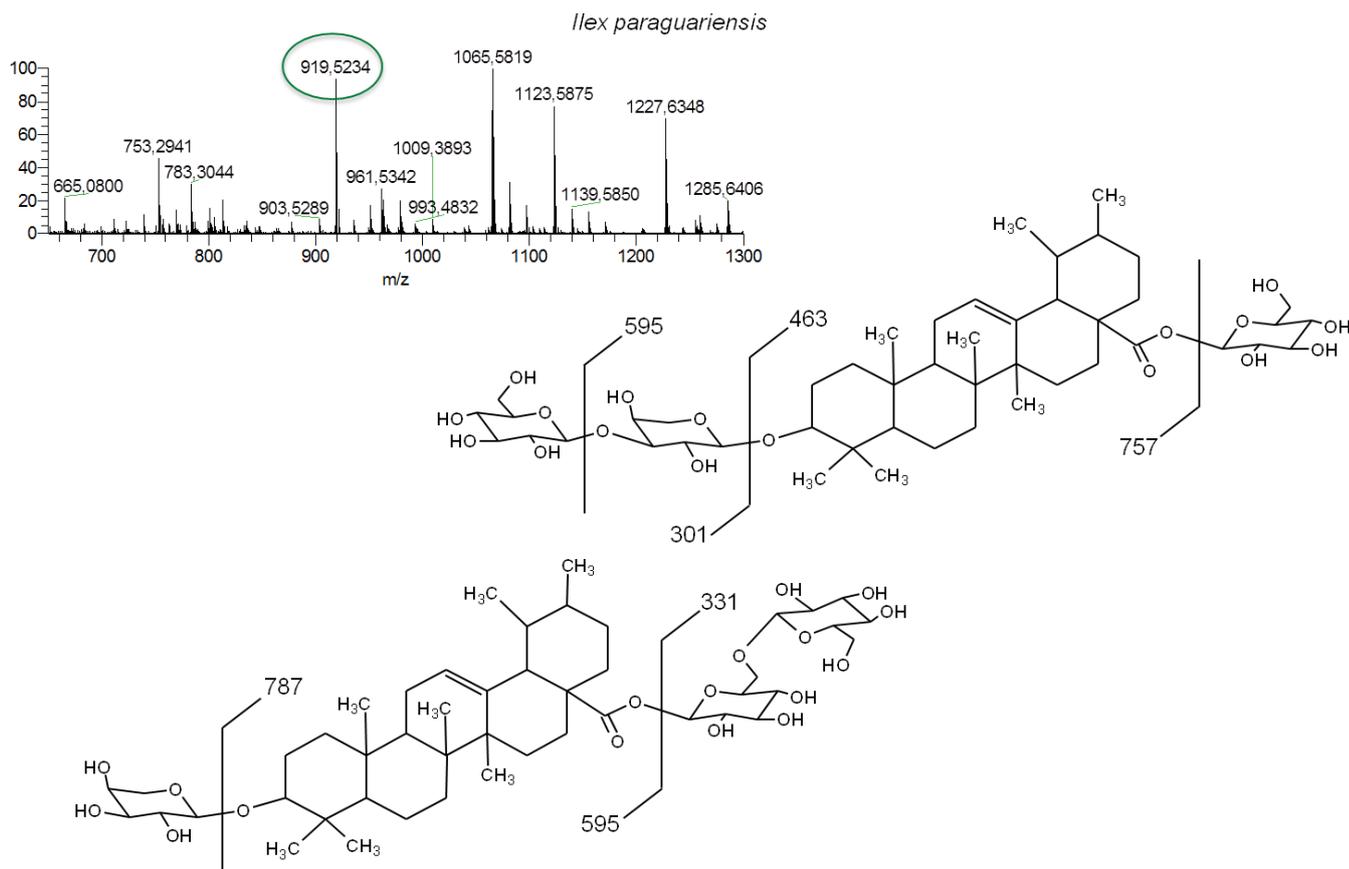


Figura 5.6 - Possíveis isômeros identificados para o íon de  $m/z$  919  $[M+Li]^+$ , isolado na fração butanólica de *I. paraguariensis*, com os fragmentos característicos obtidos.

Com o intuito de verificar a existência de saponinas isoméricas, as frações butanólicas foram submetidas a análises *online*, utilizando UHPLC-MS. A separação foi desenvolvida com um gradiente utilizando  $H_2O$  (solvente A) e metanol (solvente B), ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico, em um fluxo de  $500 \mu L/min$  a  $50^\circ C$ . O aumento linear do solvente B foi de 5 a 60% em 8 min, seguido pelo aumento de B de 60 a 100% em 15 min, mantido por 2 min e voltando a condição inicial (95% de A e 5% de B) em 17 min. A Figura 5.7 mostra os cromatogramas obtidos para cada uma das frações butanólicas das diferentes espécies de *Ilex*.

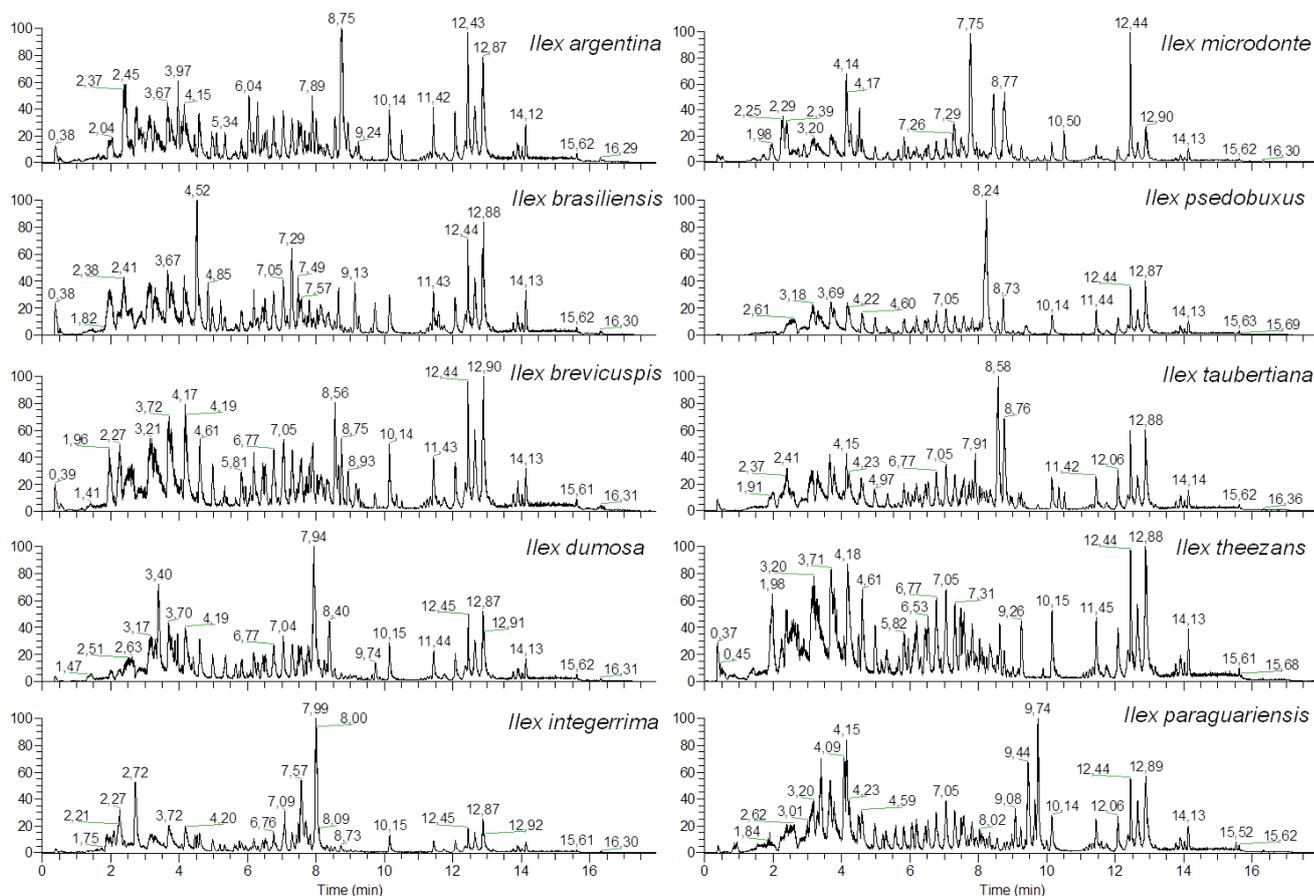


Figura 5.7 - Cromatogramas de RP-UHPLC-MS em modo TIC (*total íon current*) das saponinas obtidas para as espécies de *Ilex*.

Uma boa separação dos isômeros foi conseguida utilizando as condições descritas acima, como podemos observar na Figura 5.8, que mostra os cromatogramas obtidos pela seleção dos íons de  $m/z$  789,  $m/z$  803,  $m/z$  817,  $m/z$  730,  $m/z$  847,  $m/z$  863 e  $m/z$  881, pertencentes à fração butanólica de *I. argentina*. Uma vez que mais de um pico apareceu nestes cromatogramas, foi confirmada a existência de saponinas isoméricas. O mesmo foi observado para as demais espécies analisadas.

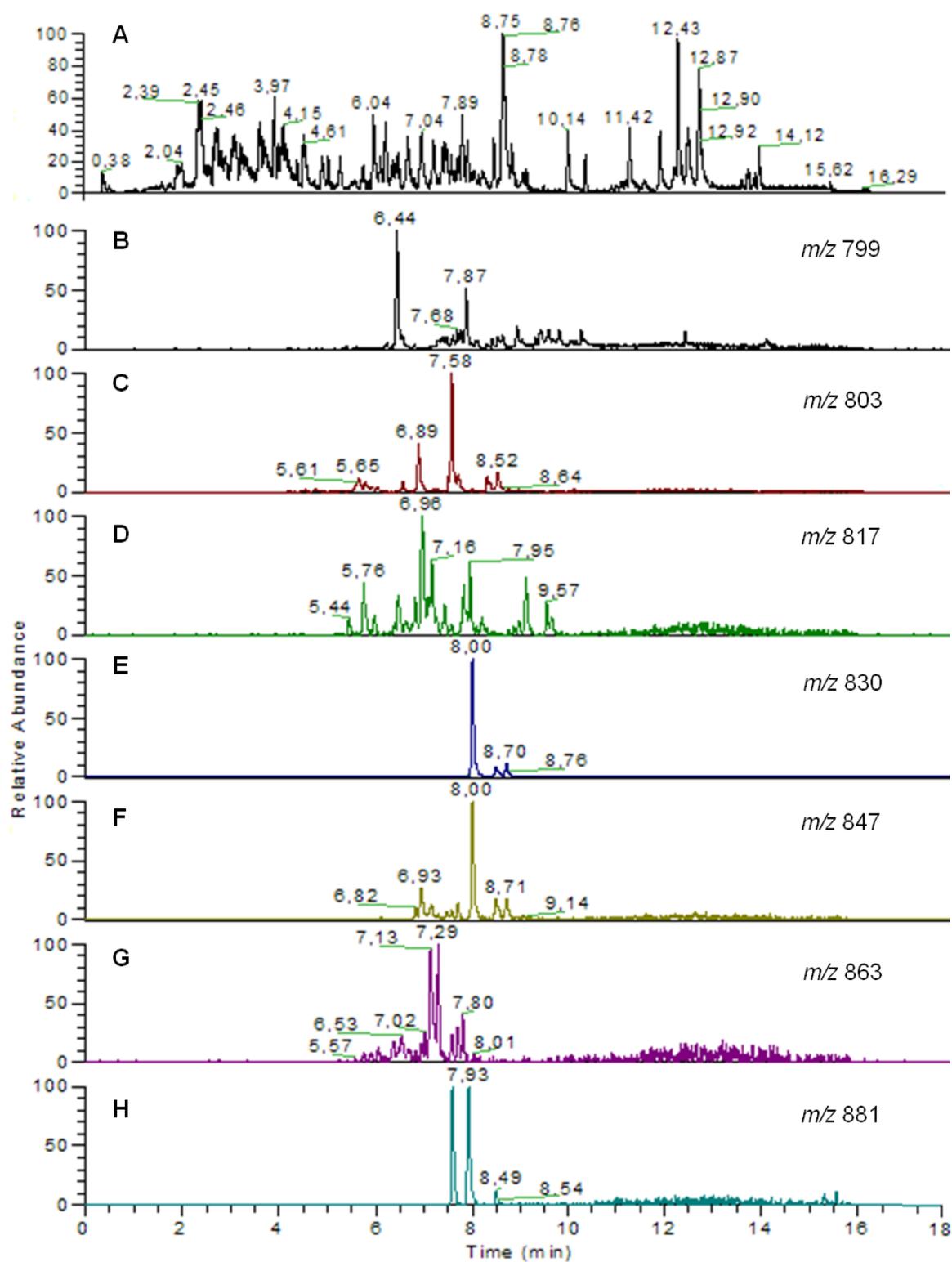


Figura 5.8 - Cromatograma de RP-UHPLC-MS em modo TIC da fração butanólica de *I. argentina* (A). Filtrando as saponinas pelos íons:  $m/z$  789 (B),  $m/z$  803 (C),  $m/z$  817 (D),  $m/z$  730 (E),  $m/z$  847 (F),  $m/z$  863 (G) e  $m/z$  881 (H). O aparecimento de dois ou mais picos indica a presença de isômeros.

A análise da composição monossacarídica e de agliconas, juntamente com a análise de ESI-MS, fragmentação e UHPLC-MS possibilitaram obter informações importantes para a elucidação estrutural das saponinas, no entanto, não fornecem informações sobre os tipos de ligações interglicosídicas. Para tanto, as frações butanólicas de cada uma das espécies foram submetidas à metilação utilizando CH<sub>3</sub>I (CIUCANU, KEREK, 1984; SOUZA *et al.*, 2011) e as saponinas per-O-metiladas foram hidrolisadas com TFA 1M, reduzidas com NaBH<sub>4</sub>, acetiladas com uma mistura de piridina e anidrido acético e analisadas por GC-MS. Na Tabela 5.3 estão apresentados os derivados metilados obtidos para cada uma das amostras.

Tabela 5.3 - Acetatos de alditol parcialmente metilados obtidos para as frações butanólicas de diferentes espécies de *Ilex*.

Derivados <sup>a</sup>	Tipo de ligação	Espécies de <i>Ilex</i>									
		ARG	BRA	BRE	DUM	INT	MIC	PAR	PSE	TAU	THE
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	Terminal	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	→)2-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	→)4-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	Terminal	X	X	X	-	-	-	-	X	X	-
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Rha	Terminal	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Xil	Terminal	-	X	X	-	-	X	-	-	X	-
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Ara	Terminal	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3,4-Me <sub>2</sub> -Ara	→)2-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4-Me <sub>2</sub> -Ara	→)3-	-	X	X	-	-	-	-	X	-	X
4-Me-Ara	→)2,3-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Analisadas em GC-MS após metilação, hidrólise, redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

(ARG) *Ilex argentina*, (BRA) *Ilex brasiliensis*, (BRE) *Ilex brevicuspis*, (DUM) *Ilex dumosa*, (INT) *Ilex integerrima*, (MIC) *Ilex microdonte*, (PAR) *Ilex paraguariensis*, (PSE) *Ilex pseudobuxus*, (TAU) *Ilex taubertiana* and (THE) *Ilex theezans*.

Algumas espécies, como no caso a *I. brasiliensis*, apresentaram duas hexoses como terminais não redutores (galactose e glucose) e duas pentoses também como terminais não redutores (arabinose e xilose). Para diferenciar os monossacarídeos isoméricos nas saponinas, as frações butanólicas das espécies que os apresentaram, foram submetidas a um processo de acetonação, dando origem a derivados de isopropilideno (SOUZA *et al.*, 2011). O sítio de ligação e formação do acetal é diferente para cada uma das hexoses, enquanto a ligação ocorre nas hidroxilas 3 e 4 da galactose, na glucose a ligação ocorrerá nas hidroxilas 4 e 6. Ao fragmentar estes derivados, ambos gerarão fragmentos característicos e diferentes entre si, possibilitando identificar sua presença nas frações (Figura 5.9).

## Espectrometria de Massas

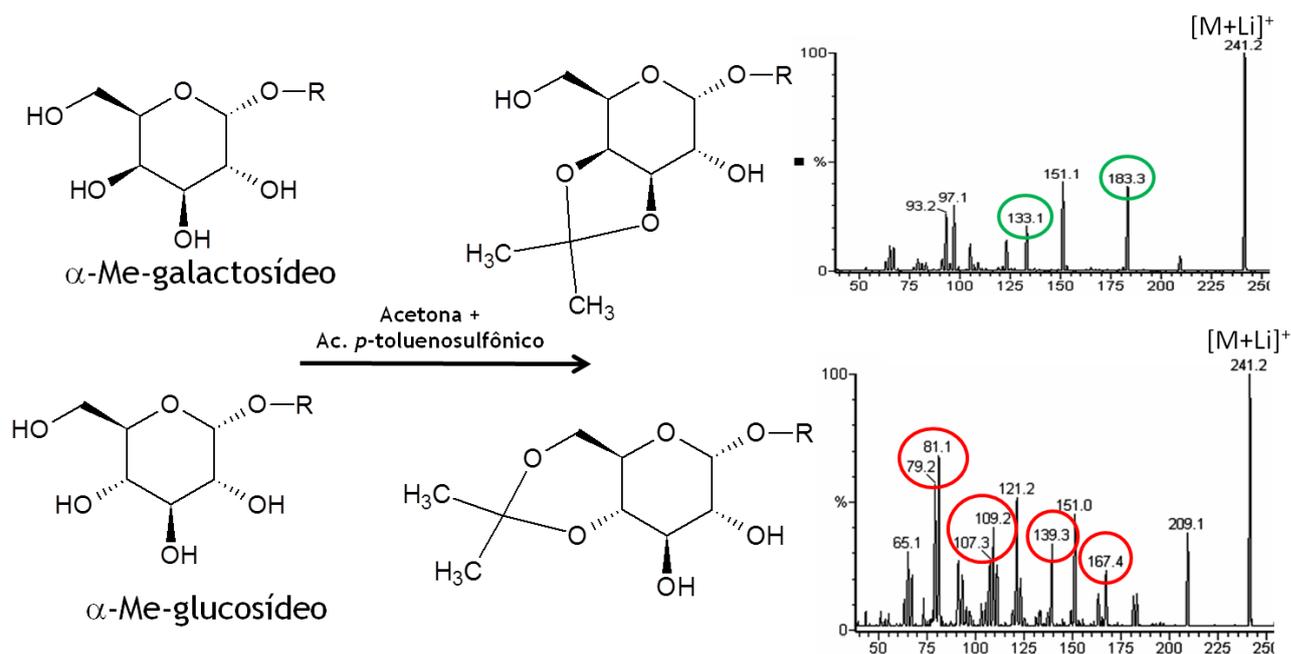


Figura 5.9 – Sítios de reação da galactose ( $\alpha$ -D-Me-galactosídeo) e da glucose ( $\alpha$ -D-Me-galactosídeo) com acetona, catalisada pelo ácido *p*-toluenosulfônico, com a formação de derivados de isopropilideno e seus espectros de CID-MS para os derivados 1-O-Me-3,4-IPP-galactosídeo e 1-O-Me-4,6-IPP-glucosídeo, evidenciando a diferença no perfil de fragmentação de ambos os derivados.

R = CH<sub>3</sub>

Já no caso das duas pentoses, a xilose piranosídica não reage durante o processo de acetonação, enquanto a arabinose reage e dá origem ao íon com 40 unidades de massa a mais quando analisado por ESI-MS, correspondente ao derivado de isopropilideno formado. Estes experimentos já foram realizados e a análise dos resultados vem sendo concluída.

Ainda assim, para distinguir os carboidratos ligados ao carbono 3, daqueles ligados ao carbono 28 da aglicona, foi realizada uma degradação alcalina das frações butanólicas com 1 M de NaOH por 2 horas a 100 °C. A ligação éster existente no carbono 28 é sensível a álcali (ver Figura 5, p. 45), possibilitando a degradação dos açúcares ligados nesta parte da molécula e gerando informações complementares sobre a estruturação da saponinas (SOUZA *et al.*, 2011). Estas análises também encontram-se em andamento.

O conjunto das análises que vem sendo conduzidas permitirá a identificação das saponinas existentes em cada uma das espécies de *Ilex* estudadas e possibilitará verificar sua presença como adulterantes em produtos de erva-mate (*I. paraguariensis*).

## 6. CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- O produto comercial (tipo chimarrão) de *I. paraguariensis* apresenta um polissacarídeo (*SPI*) caracterizado como uma ramnogalacturonana do tipo I, ligada a uma arabinogalactana do tipo I. Este polissacarídeo, diminuiu a letalidade causada por sepse polimicrobiana em camundongos (até 60%), sendo mais eficaz do que a dexametasona, um esteróide anti-inflamatório, utilizado como controle positivo. Além disso, *SPI* foi administrado via oral, representando uma vantagem terapêutica. Este efeito benéfico parece ser, pelo menos em parte, devido a uma redução na migração de neutrófilos, como pode ser observado pelo resultado no ensaio da MPO, em que a inibição da enzima foi de até 38%. Ainda, *SPI* diminuiu os níveis de ambas as enzimas pró-inflamatórias, iNOS e COX-2, cujo papel na fisiopatologia de estados inflamatórios, tais como sepse, está cada vez mais claro.

- Análises químicas permitiram caracterizar os polissacarídeos oriundos de diferentes amostras de erva-mate como sendo arabinogalactanas do tipo I, ligadas a ramnogalacturonanas do tipo I. No entanto, observa-se que a composição de monossacarídeos obtidos das folhas oxidadas contém menor quantidade de glicose e de ácido galacturônico. Estas variações promoveram eficácias distintas contra úlcera gástrica induzida por etanol, sugerindo que a ação antiúlcera é influenciada pela estrutura dos polissacarídeos. Destes, os oriundos de folhas submetidas a processos oxidativos mostraram-se mais eficientes, sendo SP12 o mais eficaz, com uma diminuição na formação de lesões gástricas de 89%.

- As diferentes espécies usadas como adulterantes de *Ilex paraguariensis*, são quimicamente distintas, tanto com relação a compostos fenólicos presentes em sua composição, mas principalmente em relação a suas saponinas. Além disso, estas espécies contêm uma grande variedade de saponinas, com diversos isômeros. Assim, observa-se que os métodos de elucidação estrutural e separação cromatográfica usados na elaboração deste trabalho, podem ser usados como ferramenta na identificação de adulterantes e para o controle de qualidade de produtos de erva-mate.

Assim, os resultados apresentados fornecem uma orientação para a obtenção de folhas de *Ilex paraguariensis* enriquecidas em princípios biologicamente ativos, que poderiam ser aplicados nos alimentos, na farmacêutica e na cosmética.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABITOL, R. A. **Doença ulcerosa péptica**. In: Medstudents: Rotinas de Clínica Médica. Disponível em <http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed/dup.htm>. Acesso em 05 dezembro de 2011.
- ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal Ethnopharmacology**, v. 20, p. 121-144, 1987.
- ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, B. **As plantas que curam**. 2.ed. São Paulo: Editora Três, 1983. 140p.
- AMIMOTO, K.; YOSHIKAWA, K.; ARIHARA, S. Triterpenes and triterpene glycosides from the leaves of *Ilex rotunda*. **Phytochemistry**, v. 33, p.1475-1480, 1993.
- ANDRADE, F. M., **Diagnóstico da Cadeia Produtiva da *Ilex paraguariensis* St. Hill Erva-Mate**. São Mateus do Sul-PR, 1999. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nipe/rbma/ervmenub.htm>> Acesso em: 05 abr. 2008.
- ANUÁRIO Brasileiro da erva-mate**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Grupo de comunicações, 1999.
- ASPINALL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1980. v. 3, p. 473-500.
- ASPINALL, G.O. Structural chemistry of the hemicelluloses. **Advances in Carbohydrate Chemistry**. New York, 1959. p. 429-430.
- ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* St-Hil. **Phytochemistry**, v. 55, p. 853-857, 2000.
- AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p.143.
- BALADRIN, M. F.; KLOKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLINGE, W. H. Natural plant chemicals: Source of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, p.1054-1060, 1985.
- BASSANI, V. L.; CAMPOS, A. M. Desenvolvimento de extratos secos e nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hill; aquifoliácea (erva-mate) visando à exploração do potencial vegetal como fonte de produtos. In: 1º CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA-MATE, 1997, Curitiba. **Anais**. Curitiba-PR, 1997. p. 69-83.
- BASTOS, D. H. M.; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y. S.; TORRES, E. A. F. S. Bioactive compounds content of Chimarrao infusions related to the moisture of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 49, p. 399-404, 2006a.

BASTOS, D. H. M.; ISSHIMOTO, E.; MARQUES, M. O. M.; FERNANDO, F. A.; TORRES, E. A. F. S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 538-543, 2006b.

BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, p. 423-432, 2007.

BEART, J. E.; TILLEY, T. H.; HASLAM, E. Plant. Polyphenols secondary metabolism and chemical defense: some observations. **Phytochemistry**, v. 24, p. 33-38, 1985.

BENJAMIM, C. F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. In: **Simpósio: medicina intensiva – 3ª PARTE** (Capítulo II). 34, 2001. p. 18-26.

BERKAI, D.; BRAGA, C. A. **500 anos de história da erva-mate**. 2. ed. Editora Cone Sul, 2000.

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

BLOCH, K. C. Doenças infecciosas. In: McPHEE, S. J.; GANONG, W. F. **Fisiopatologia da Doença – Uma introdução à Medicina Clínica**. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. p. 50-74.

BÖTTCHER, H.; GÜENTHER, I.; KABELITZ, L. Physiological postharvest responses of common Saint-John's wort herbs (*Hypericum perforatum* L.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 29, p. 342-350, 2003.

BRASIL. **Ministério da Saúde** – Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998, publicada no Diário Oficial da União de 29 de junho de 1998.

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.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: **Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003.

BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Unwin Hyman, 1990. 194 p.

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and câncer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – polish achievements. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 54, p. 99-126, 2003.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como Fonte de Medicamentos. **Ciência e Cultura Temas e tendências SBPC**, v. 55, p. 37-39, 2003.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phototherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMPOS, A. M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate)**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

CANTU-JUNGLES, T. M.; MARIA-FERREIRA, D.; da SILVA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P.; IACOMINI M.; CIPRIANI, T. R.; CORDEIRO, L. M. C. Polysaccharides from prunes: Gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins. **Food Chemistry**, v. 146, p. 492-499, 2014.

CAPEK, P.; HRIBALOVÁ, V.; SVANDOVÁ, E.; EBRINGEROVÁ, A.; SASINKOVÁ, V., MASAROVÁ, J. Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, p. 113-119, 2003.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; KOMURA, D. L.; MARCON, R.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; SANTOS, A. R. S.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. *Lentinus edodes* heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chemistry**, v. 111, p. 531-537, 2008.

CARDOSO-JÚNIOR, E. L.; FERRARESE-FILHO, O.; CARDOSO-FILHO, L.; FERRARESE, M. L. L.; DONADUZZI, C. M.; STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds contents in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 1-10, 2007.

CARINI, M.; FACINO, R. M.; ALDINI, G.; CALLONI, M.; COLOMBO, L. Characterization of phenolic antioxidants from Mate (*Ilex paraguayensis*) by liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 12, p. 1813-1919, 1998.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. USA: Courier, 2000. p. 52-108.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Curitiba: EMPRAPA/CNP Florestas, 1994.

CENI, G. C. **Oxidases de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill): extração, estabilidade térmica e influência da exposição ao microondas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, Rio Grande do Sul, 2005.

CHANDRA, S.; DEMEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extracts of *ardisia compressa* in

comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3590, 2004.

CHYAU, C. C.; TSAI, S. Y.; KO, P. T.; MAU, J. L. Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. **Phytomedicine**, v. 9, p. 3-8, 2002.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 70-73, 2008.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A polysaccharide from a tea (Infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1018-1021, 2006.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p.1033-1043, 2000.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents on mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, p. 13-21, 1990.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.

COSTA, S. G. **A erva-mate**. UFPR, 1989.

DACROCE, D. M. **Cadeia Produtiva da erva-mate em Santa Catarina**. Chapecó: EPAGRI/CPMP, 1996. 35 p.

DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; SANTANA-FILHO, A. P.; IACOMINI, M.; VALDUGA, A. T.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. 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.

DEITCH, E. A. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. **Shock**, vol. 9, p. 1-11, 1998.

DEY, P. M.; BROWNLEADER, M. D.; HARBORNE, J. B. The plant, the cell and its molecular components. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 6-9.

Di STASI, L. C. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência**. UNESP. 1995. 230p.

DONADUZZI, C. M.; COELHO, S. R. M.; CARDOSO, E. L.; GALLO, A. G.; HUPPES, G. K.; KUHN, I. M. V.; SCHICHEL, C. Teores de cafeína, polifenóis totais e taninos de amostras de erva-mate comercializadas na região de Toledo, Paraná. In: II CONGRESSO SUL AMERICANO DE ERVA-MATE. **Anais**. 2000. p. 158-161.

DOWNEY, G. P.; WORTHEN, G. S.; HENSON, P. M.; HYDE D. M. Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation. Capillary localization and migration across the interalveolar septum. **American Review of Respiratory Disease**, v. 19, p. 168-76, 1993.

ELIZABETSKY, E. New directions in ethnopharmacology. **Journal of Ethnobiology**, v. 6, p. 121, 1986.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 93, p. 515-524, 1988.

FERREIRA, D. M.; DARTORA, N.; SILVA, L. M.; PEREIRA, I. T.; SOUZA, L.M.; RITTER, D. S.; IACOMINI, M.; WERNER, M. F.; SASSAKI, G. L.; BAGGIO, C. H. Chemical and biological characterization of polysaccharides isolated from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 125-133, 2013.

FILIP, R.; LOPEZ, P.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Mate substitutes or adulterants: study of xanthine content. **Phytotherapy Research**, v.12, p.129-31, 1998.

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

FILIP, R.; LÓTITO, S. B.; FERRARO, G.; FRAGA, C. G.; Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, p. 1437-1446, 2000.

FLAMENT, I. Coffe, cocoa and tea. In: MAARSE, H. **Volatile Compounds in Food and Beverages**. Nova York: Marcel Dekker, 1991. p. 617-669.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circulation Research**, v. 53, p. 557-73, 1983.

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.

GNOATTO, S. C.; DAWSONVILLE-KLIMPT, A.; DO NASCIMENTO, A.; GALÉRA, P.; BOUMEDIENE, K.; GOSMANN, G.; SONNET, P.; MOSLEMI, S. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivates on aromatase inhibitor. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1865-1867, 2007.

GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A. T.; SCHENKEL, E. P. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 438-441, 1995.

GREEN, F. B.; CORCORAN, M. R. Inhibitory action de cinco tannins on growthinduced by several gibberellins. **Plant Physiology**, v. 56, p. 801-806, 1975.

HARA, Y. **Green tea: health benefits and applications**. New York: Marcel Dekker Inc, 2001. p. 16-20.

HAYASHI, S.; SUMI, Y.; UENO, N.; MURASE, A.; TAKADA, J. Discovery of a novel COX-2 inhibitor as an orally potent anti-pyretic and anti-inflammatory drug: Design, synthesis, and structure-activity relationship. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, p. 755-768, 2011.

HECK, C. I.; DEMEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 138-151, 2007.

HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; DEMEJIA, E. G. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8394-8403, 2008.

HUTCHISON, S. Smoking as a risk factor for endothelial dysfunction. **Canadian Journal of Cardiology**, v.14, p. 20D-22D, 1998.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circulation Research**, v. 61, p. 866-79. 1987.

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

JAIN, K. S.; SHAH, A. K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S. M.; KALE, A. P.; JAGTAP, J. R.; BHOSALE, A. V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1181-1205, 2007.

JIANG, M. H.; ZHU, L. A.; JIANG, J. G. Immunoregulatory actions of polysaccharides from chinese herbal medicine. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 14, p. 1367-1402, 2010.

KIATKOSKI, E. **Estudo fitoquímico dos frutos e sementes de *Pterodon emarginatus* (Vogel) e *Pterodon polygalaeflorus* (Benth)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2011.

KIKATANI, T.; WATANABE, Y.; SHIBUYA, T. Different effects of methylxanthines on central serotonergic postsynaptic neurons in a mouse behavioral model. **Pharmacology Biochemistry**, 44, p. 457-461, 1993.

LAPA, A. J.; CADEN, S.; LANDMAN, M. T. R. L.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais**. v. 1, 2003. 5p.

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

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370-1376, 2009.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1998.

MENDES, R. M. **O Caracterização e avaliação da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), beneficiada no estado de Santa Catarina.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2005.

MILANI, S.; CALABRÒ, A. Role of growth factors and their receptors in gastric healing. **Microscopy Research and Technique**, v. 53, p. 3060-371, 2001.

MILLER, V. M. E VANHOUTTE P. M. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. **American Journal of Physiology**, v. 248, p. H432-H437, 1985.

MING, L. C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. **Horticultura Brasileira**, v. 12, p. 3-9, 1994.

MOLIN, R. F.; VALDUGA, A. T.; Di LUCCIO, M.; DARTORA, N.; CICHOSKI, A. J.; PISTORE, M.; RIGO, E. Assessment of oxidation of leaves of *Ilex paraguariensis* (St. Hil). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 337-345, 2011.

MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v. 263, p. 663-665, 1976.

MONTANARI Jr., I. **Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas.** 2002. Disponível em <<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/index.html>>. Acesso em 28 de setembro de 2011.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 4050-4063, 2009.

NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P.; MARIA-FERREIRA, D.; DA SILVA, L. M.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, p. 137-142, 2013.

NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, K.; MICHAELSEN, T. E.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: anti-ulcer, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 255-269, 2005.

NEVIERE, R. R.; CEPINSKAS, G.; MADORIN, W. S.; HOQUE, N.; KARMAZYN, M.; SIBBALD, W. J.; KVIETYS, P. R. LPS pretreatment ameliorates peritonitis-induced myocardial inflammation and dysfunction: role of myocytes. **American Journal of Physiology**, v. 277, p. 885-892, 1999.

ODY, P. **The complete medicinal herbal.** Nova Iorque: Dorling Kindersley. 1993. 192p.

OFMAN, J. J.; ETCHASON, J.; ALEXANDER, W.; STEVENS, B. R.; HERRIN, J.; CANGIALOSE, C.; BALLARD, D. J.; BRATZLER, D.; ELWARD, K. S.; FITZGERALD, D.; CULPEPPER-MORGAN, J.; MARSHALL, B. The quality of care for medicare

patients with peptic ulcer disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, 2000.

OHLSSON, K.; BJÖRK, P.; BERGENFELDT, M.; HAGEMAN, R.; THOMPSON, R. C. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. **Nature**, v. 348, p. 550-562, 1990.

PACHÚ, C. O. **Novas Lignanias isoladas da *Ocotea duckei* Vattimo e atividade Psicodressora da *langambina***. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos), Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba 1994.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

PANEK, A. Dosagem da peroxidase nas folhas de mate. **Boletim do Instituto de Química Agrícola**, n. 39, p. 7-12, 1955.

PARANÁ. Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Erva-mate. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva de erva-mate**. Curitiba, 2000. Série PADCT III, n. 1.

PASINATO, R. **Aspectos etnoentomológicos, socioeconômicos e ecológicos relacionados à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), no município de Lontra, Paraná, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas), Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2004.

PERES, I. E. P. **Metabolismo Secundário**. Disponível em <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp>>. Acesso em 15 de janeiro de 2012.

PIRES, V. S.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Saponins from *Ilex dumosa*, na Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) adulterating plant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1027-1031, 1997.

POMILIO, A. B.; TRAJTEMBERG, S.; VITALE, A. A. High-performance capillary electrophoresis analysis of Mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electro kinetic capillary chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 235-241, 2002.

RATTMANN, Y. D.; SOUZA, L. M.; MALQUEVICZ, S. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A flavonoid-rich fraction of *Eugenia uniflora* exerts protective effect against polymicrobial sepsis in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 61-71.

REGINATTO, F. H.; ATHAYDE, M. L.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species – Caffeine and theobromine in erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, p. 443-446, 1999.

REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 205-236.

RIO GRANDE DO SUL. Lei nº 11.929, de 20 de junho de 2003. Lei do churrasco e chimarrão. Institui o churrasco como “prato típico” e o chimarrão como “bebida símbolo” do estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, RS, 23 de jun.2003.

RONDANELLI, M.; OPIZZI, A.; MONTEFERRARIO, F. The biological activity of beta-glucans. **Minerva Medica**, v. 100, p. 237-245, 2009.

RUCKER, N. G. A; MACARI, Jr.; ROCHA Jr., W. F. **Agronegócio da erva-mate no estado do Paraná**: diagnóstico e perspectivas para 2003. In: Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná. Disponível em: <[www.pr.gov.br/colepar/seab](http://www.pr.gov.br/colepar/seab)>. Acesso em: 10 de maio de 2009.

RUTHES, A. C.; RATTMANN, Y. D.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1620-1627, 2012.

SABBATELA, P. O.; BRUMOVSKI, L. A.; ACUNA, G. SMORZSEWSKI, M. Variación de sólidos solubles de la yerba mate durante el desarrollo de una mateada. In: CONGRESSO SULAMERICANO DE ERVA-MATE, 2006, Posadas, Argentina. **Anais**: Posadas, Argentina, 2006.

SAKANARA, S.; TACHIBANA, Y.; OKADA, Y. Preparations and antioxidants properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). **Food Chemistry**, v. 89, p. 569-575, 2005.

SALATINO, A.; MONTEIRO, W. R.; BOMTEMPI, N. Histochemical-localization of phenolic deposits in shoot apices of common species of asteraceae. **Annals of Botany**, v. 61, p. 557-559, 1988.

SANTOS, K. A. **Estabilidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) em embalagens plásticas**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2004.

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

SCHUBERT, A.; ZANIN, F. F.; PEREIRA, D. F.; ATHAYDE, M. L. Annual variations of methylxanthines in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) samples in Ijuí and Santa Maria, State of Rio Grande Do Sul. **Química Nova**, v. 29, p. 1233-1236, 2006.

SCOPARO, C. T.; SOUZA, L. M.; RATTMANN, Y. D.; DARTORA, N.; PAIVA, S. M. M.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides from green and black teas and their protective effect against murine sepsis. **Food Research International**, v. 53, p. 780-785, 2013.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/UFSC, 2004.

SKY, E. E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura Temas e tendências SBPC**, v. 55, p. 35-36, 2003.

SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SCOPARO, C. T.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L. 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.

SRIVASTAVA, R.; KULSHVESHTHA, D. K. Bioactive polysaccharides from plants. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2877-2883, 1989.

STRACK, D.; Phenolic metabolism. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Plant of biochemistry**. Ed. Academic Press, London, 1997.

TAKETA, A. T.; SCHMITTMANN-SCHLAGER, T.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Triterpenoid glycosides and a triterpene from *Ilex brevicuspis*. **Phytochemistry**, v. 53 p. 901-904, 2000.

TAKETA, A.T. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Mate). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 205-211, 2004.

TARNAWSKI, A. Cellular and molecular mechanism of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, p. 24-33, 2005.

THORSEN, K; SOREIDE, J. A.; KVALOY, J. T.; GLOMSAKER, T.; SOREIDE, K. Epidemiology of perforated peptic ulcer: age and gender adjusted analysis of incidence and mortality. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, p. 347-354, 2013.

TINKER, A. C.; WALLACE, A. V. Selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase: potential agents for the treatment of inflammatory diseases? **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 77-92, 2006.

VALDUGA, A. T. **Uso sustentado e processamento de *Ilex paraguariensis* St Hill (Erva-mate)**. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2002.

VALDUGA, A. T.; FINZER, J. R. D.; MOSELE, S. H. **Processamento de erva-mate**. Erechim: Edifapes, 2003. 182p.

VALDUGA, E., **Caracterização química e anatômica da folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e de espécies utilizadas na adulteração do mate**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 1994.

VANHOUTTE, P. M.; KATUSIC Z. S. Endothelium-derived contracting factor: endothelin and/or superoxide anion? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 9, p. 229-230, 1988.

VELTMAR, A.; GOHLKE P.; UNGER, T. From tissue angiotensin converting enzyme inhibition to antihypertensive effect. **American Journal of Hypertension**, v. 4, p. 263S-269S, 1991.

VENKATARANGANNA, M. V.; GOPUMADHAVAN, S.; SUNDARAM, S. K.; MITRA. Evaluation of possible mechanism of anti-ulcerogenic activity of UL 409, a herbal preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 63, p. 187-192, 1998.

VIEIRA, A. R. R.; SUERTEGARAY, C. E. O.; HELDWEIN, A. B.; MARACHIN, M.; SILVA, A. L. Influência do microclima de um sistema agroflorestal na cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v.11, p. 91-97, 2003.

VIEIRA, M. A.; ROVARIS, A. A.; MARASCHIN, M.; SIMAS, K. N.; PAGLIOSA, C. M.; PODESTÁ, R.; AMBONI, R. D. M. C.; BARRETO, P. L. M.; AMANTE, E. R. Chemical characterization of candy made of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4637-4642, 2008.

VOLAK, J.; STODOLA, J. **Plantas Mediciniais**. Ed. Inquérito. 1990. 319p.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phitochemistry**. v. 99. Chromatographic Science Series, 2008.

WALLACE, J. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **American Journal of Medicine**, v. 110, p. 19S–23S, 2001.

WANG, Y.; OUYANG F. Bead-to-bead transfer of Vero cells in microcarrier culture. **Cytotechnology**, v. 31, p. 221-224, 1999.

WOLFROM, M. L., THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-67, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

XANDER, C. G.; ACOSTA, L. M.; SCIPIONI, G. P.; ARGÜELO, B.; DEL, V. Inativación térmica de peroxidases em *Ilex Paraguariensis* St Hill y *dumosa*. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA-MATE, 2., Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: Organizadores, 2000.

YAMADA, H. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p. 269-276, 1994.

YANAGISAWA, M. H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, p. 411-415. 1988.

ZAPOROZHETS, O. A.; KRUSHYNSKA, O. A.; LIPKOVSKA, N. A.; BARVINCHENK, V. N. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 21-25, 2004.

## ANEXO I

- Artigos publicados como autora e co-autora durante o período de doutorado:

SCOPARO, C. T.; BORATO, D. G.; SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SILVA, L. M.; FERREIRA, D. M.; SASSAKI, G. L.; BAGGIO, C. H.; IACOMINI, M. Gastroprotective bio-guiding fractionation of hydro-alcoholic extracts from green- and black-teas (*Camellia sinensis*). **Food Research International**, v. 64, p.577-586, 2014.

SILVA, L. M.; ALLEMAND, A.; MENDES, D. A. G. B.; dos SANTOS, A. C.; ANDRÉ, E.; SOUZA, L. M. ; DARTORA, N.; CIPRIANI, T. R.; MARQUES, M. C. A.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. Ethanolic extract of roots from *Arctium lappa* L. accelerates the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the antioxidant system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 179-187, 2013.

DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; PAIVA, S. M. M.; SCOPARO, C. T.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; RATTMANN, Y. D.; SASSAKI, G. L. Rhamnogalacturonan from *Ilex paraguariensis*: A potential adjuvant in sepsis treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1776-1782, 2013.

BORGES, A. C. P.; DARTORA, N.; RIL, F. T.; GONCALVES, I. L.; VALDUGA, A. T. Evaluación del contenido de cafeína en la oxidación en hojas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Revista de Ciencia y Tecnología**, v. 20, p. 38-43, 2013.

FERREIRA, D. M.\*; DARTORA, N.\*; SILVA, L. M.; PEREIRA, I. T.; SOUZA, L.M.; RITTER, D. S.; IACOMINI, M.; WERNER, M. F.; SASSAKI, G. L.; BAGGIO, C. H. Chemical and biological characterization of polysaccharides isolated from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.59, p. 125-133, 2013

SCOPARO, C. T.; SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Analysis of *Camellia sinensis* green and black teas via ultra high performance liquid chromatography assisted by liquid liquid partition and two-dimensional liquid chromatography (size exclusion reversed phase). **Journal of Chromatography** (Print), v. 1222, p. 29-37, 2012.

RATTMANN, Y. D.; SOUZA, L. M.; MALQUEVICZ-PAIVA, S. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Analysis of Flavonoids from *Eugenia uniflora* Leaves and Its Protective Effect against Murine Sepsis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

SCOPARO, C. T.; SOUZA, L. M.; RATTMANN, Y. D.; DARTORA, N.; MALQUEVICZ-PAIVA, S. M.; SASSAKI, SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides from green and black teas and their protective effect against murine sepsis. **Food Research International**, v. 53, p. 780-785, 2012.

MOLIN, R. F.; VALDUGA, A. T.; Di LUCCIO, M.; DARTORA, N.; CICHOSKI, A. J.; PISTORE, M.; RIGO, E. Assessment of oxidation of leaves of *Ilex paraguariensis* (St. Hil). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 337-345, 2011.

SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SCOPARO, C. T.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L. 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.

RATTMANN, Y. D.; MENDÉZ-SÁNCHEZ, S. C.; FURIAN, A. F.; PALUDO, K. S.; SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, E. S.; MIGUEL, O. G.; SASSAKI, G. L., IACOMINI, M.; MELLO, C. F.; FRANCO, C. R.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; CADENA, S. M.; MARQUES, M. C.; SANTOS, A. R. Standardized extract of *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook (Dicksoniaceae) decreases oxidative damage in cultured endothelial cells and in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 999-1007, 2011.

DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; SANTANA-FILHO, A. P.; IACOMINI, M.; VALDUGA, A. T.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. 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.

## ANEXO II



## Polissacarídeo presente na erva-mate pode, no futuro, tornar-se um adjuvante na terapia contra a sepse

A erva-mate, *Ilex paraguariensis*, é uma planta nativa da América do Sul que exerce grande importância socioeconômica nas regiões onde é cultivada. Mas um estudo desenvolvido por Nessana Dartora durante seu doutorado em Ciências/Bioquímica na Universidade Federal do Paraná (UFPR) revelou que esta planta possui outras aplicações importantes, por exemplo, a capacidade de combater a sepse induzida em camundongos. A pesquisa intitulada "Estudo fitoquímico e farmacológico de plantas consumidas como chás no Brasil" foi desenvolvida por Nessana no Laboratório de Química de Carboidratos do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, sob orientação do Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki e co-orientação da Profa. Dra. Yanna Dantas Rattmann e do Dr. Lauro Mera de Souza.



Em entrevista à Agência Notisa, a autora Nessana explicou que há tempos o Laboratório de Química de Carboidratos da UFPR vem desenvolvendo diferentes estudos com polissacarídeos e outros compostos glicosilados, buscando ampliar o conhecimento sobre metabólitos com propriedades farmacológicas que podem abrir novos campos na indústria farmacêutica. A utilização de produtos naturais pode, segundo a especialista, evitar diversos efeitos colaterais comuns aos medicamentos sintéticos.

Nesse contexto, a erva-mate vem ganhando cada vez mais destaque devido a novas aplicações biológicas que vêm sendo descobertas. Essas, segundo Nessana, são atribuídas, principalmente, à presença de metabólitos secundários, tais como metilxantinas, saponinas e compostos fenólicos, extraídos facilmente de suas folhas durante a preparação de infusões. "No entanto, durante o consumo da infusão, são ingeridos, além dos metabólitos secundários, os polissacarídeos", lembrou a autora.

Os polissacarídeos, por sua vez, também vêm chamando atenção, pois muitos já são associados a diferentes atividades biológicas, como a atividade antiviral, antitumoral, imunoestimulante, anticomplementar, anticoagulante, hipoglicemiante, antiúlcera e anti-inflamatória.

Dessa forma, ao isolar e caracterizar o polissacarídeo proveniente da extração aquosa a quente (infusão) de *Ilex paraguariensis*, Nessana e colegas observaram que este metabólito atua sobre a sepse murina. Ela contou que o grupo analisou ainda importantes parâmetros característicos de um quadro de



septicemia, como a migração de neutrófilos e os níveis de expressão de enzimas pró-inflamatórias, parâmetros estes também comuns a várias doenças inflamatórias.

A pesquisa resultou no artigo "*Rhamnogalacturonan from Ilex paraguariensis: a potential adjuvant in sepsis treatment*", que foi publicado este ano na *Carbohydrate Polymers*, 92(2013):1776– 1782.

A equipe contou no artigo que o polissacarídeo extraído na erva-mate foi identificado como rhamnogalacturonano. Os autores testaram seu efeito sobre a sepse induzida em camundongos em três doses distintas: 3; 7 e 10mg/kg. Os resultados revelaram que a administração oral do polissacarídeo na dose de 10mg/kg preveniu a mortalidade tardia dos animais através de uma taxa de 60% em comparação aos animais não tratados. Os pesquisadores usaram ainda um grupo-controle positivo, no qual os animais com sepse induzida foram tratados com dexametasona. Esta se mostrou ligeiramente menos eficiente, com uma taxa de sobrevivência geral de 16,7% ao final do período de observação. Segundo o estudo, o polissacarídeo da erva-mate também afetou o influxo de neutrófilos, evitando sua acumulação nos pulmões, e diminuiu significativamente a expressão nos tecidos de iNOS e COX-2.

A co-orientadora do estudo, Yanna Rattmann, professora adjunta do departamento de Saúde Comunitária da UFPR e também pesquisadora do Laboratório de Química de Carboidratos do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, explicou que, na curva de letalidade, a dexametasona foi mais eficaz nos primeiros dias de tratamento, mas, no final dos sete dias de observação, seu efeito sobre a inibição da mortalidade declinou. Com o polissacarídeo do mate, a equipe observou o inverso, ou seja, ele não protegeu tanto quanto a dexametasona no início da curva, mas o seu benefício foi mais evidente a partir do segundo dia e se manteve até o final do período de observação. "Portanto, ambos agiram positivamente em momentos diferentes no curso da sepse, de acordo com este resultado. Desta forma, observamos que as informações que se podem extrair vão além da comparação direta entre os efeitos da dexametasona e do polissacarídeo do mate, os quais poderiam variar em outras doses. Sobretudo, podem indicar, por exemplo, que a união dessas duas substâncias no tratamento desses animais proporcionaria maiores benefícios na redução da letalidade, uma vez que seus efeitos podem se complementar", defendeu em entrevista à Agência Notisa.

A pesquisadora explicou que como o polissacarídeo do chá-mate e a dexametasona pertencem a classes quimicamente distintas, com doses e vias de administração diferentes, solubilidade e outros parâmetros que interferem na ação final destas substâncias no organismo, seria arriscada uma comparação justa entre elas nas condições do experimento realizado. "Sem tirar o mérito do polissacarídeo, acreditamos que o motivo pelo qual o polissacarídeo do mate mostrou-se mais eficaz em relação à dexametasona no final do curso do tratamento reside no fato de que este anti-inflamatório,



assim como os seus congêneres esteroidais consagrados na terapêutica, quando em uso prolongado, são capazes de provocar imunodepressão, o que pode complicar a resolução da sepse ou de outras patologias inflamatórias. Na sepse, em especial, é necessário manter um limiar de alerta imune que seja inferior à exacerbação inerente a essa patologia, mas que não chegue a uma imunodepressão, igualmente comprometedora.

Lamentavelmente, esse estágio parece exigir uma regulação fina, difícil de ser atingida na clínica, apesar de todo arsenal terapêutico disponível até o momento, o que faz com que muitos pacientes sucumbam, mas que impulsiona a busca por novos fármacos”, afirmou a professora.

Embora o polissacarídeo da erva-mate tenha-se mostrado promissor no combate à sepse neste estudo pré-clínico com camundongos, Yanna lembrou que, para ser introduzido na prática clínica, este ainda precisará passar por estudos de toxicologia pré-clínica e, posteriormente, por estudos clínicos que comprovem sua segurança e eficácia em humanos.

“Na investigação clínica, incluem-se, entre outras etapas, avaliações farmacocinéticas que fornecem dados sobre a absorção, metabolismo, melhor via de administração, dose, posologia, forma farmacêutica apropriada e tempo de tratamento necessários para se obter a melhor performance do fármaco e a reprodutibilidade do seu efeito. Neste contexto, seria precoce extrapolar os resultados obtidos neste estudo em animais diretamente para humanos sem antes realizar os testes mencionados”, disse a pesquisadora.

Mas, para Yanna, o estudo em questão abre a perspectiva de uma nova molécula, um carboidrato, que tem uma atividade farmacológica no componente inflamatório da sepse, uma patologia de relevância epidemiológica mundial. “Até pouco tempo, os carboidratos eram vistos essencialmente como constituintes alimentares, com pouco ou nenhum potencial farmacológico. Esse raciocínio tem sido contrariado por muitos artigos científicos disponíveis na literatura especializada originados no nosso grupo de pesquisa e em vários outros grupos pelo mundo, os quais mostram atividades de novos polissacarídeos ou descobrem novos benefícios de polissacarídeos já consagrados na terapêutica, a exemplo da heparina, um polissacarídeo sulfatado, clinicamente usado como anticoagulante, que tem sido relacionado com frequência a outras atividades protetoras no sistema cardiovascular, como inibição de eventos relacionados à aterosclerose, por exemplo”, afirmou.

Sobre a segurança, ela explicou que o organismo humano é perfeitamente adaptado à ingestão e ao metabolismo dos polissacarídeos, visto que é o constituinte mais abundante da dieta, o que pode sugerir de antemão um menor risco do seu uso. “Em relação aos polissacarídeos do mate consumido no chimarrão, supomos que tenha valor profilático e que os apreciadores regulares desta bebida ingerem, entre outras substâncias, o polissacarídeo avaliado neste estudo, beneficiando-se assim das suas propriedades, incluindo



a ação contra a inflamação investigada neste estudo. Na carência de estudos mais aprofundados com o polissacarídeo isolado, o consumo deste por meio do chá-mate é seguro e certamente não apresenta desvantagem nem contraindicação”, defendeu.

Fonte: Agência Notisa



## ANEXO III

29/10/2014

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink®

Home

Account  
Info

Help



**Title:** Chemical and biological characterization of polysaccharides isolated from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.

**Author:** Daniele Maria-Ferreira, Nessana Dartora, Luisa Mota da Silva, Isabela Tiemy Pereira, Lauro Mera de Souza, Daniel Suss Ritter, Marcello Iacomini, Maria Fernanda de Paula Werner, Guilherme Lanzi Sasaki, Cristiane Hatsuko Baggio

**Publication:** International Journal of Biological Macromolecules

**Publisher:** Elsevier

**Date:** August 2013

Copyright © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Logged in as:  
Nessana Dartora  
Account #:  
3000823854

LOGOUT

## Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Nessana Dartora ("You") and Elsevier ("Elsevier"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	3498310150218
License date	Oct 29, 2014
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	International Journal of Biological Macromolecules
Licensed content title	Chemical and biological characterization of polysaccharides isolated from <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.
Licensed content author	Daniele Maria-Ferreira, Nessana Dartora, Luisa Mota da Silva, Isabela Tiemy Pereira, Lauro Mera de Souza, Daniel Suss Ritter, Marcello Iacomini, Maria Fernanda de Paula Werner, Guilherme Lanzi Sasaki, Cristiane Hatsuko Baggio
Licensed content date	August 2013
Licensed content volume number	59
Licensed content issue number	n/a
Number of pages	9
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	Caracterização estrutural de polissacarídeos de folhas de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) e suas propriedades biológicas
Expected completion date	Oct 2014
Estimated size (number of pages)	152
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.00 USD / 0.00 GBP
Total	0.00 USD

29/10/2014

Rightslink® by Copyright Clearance Center

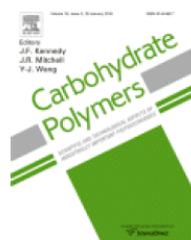


RightsLink®

Home

Account  
Info

Help



**Title:** Rhamnogalacturonan from *Ilex paraguariensis*: A potential adjuvant in sepsis treatment

**Author:** Nessana Dartora, Lauro M. de Souza, Simone M.M. Paiva, Camila T. Scoparo, Marcello Iacomini, Philip A.J. Gorin, Yanna D. Rattmann, Guilherme L. Sassaki

**Publication:** Carbohydrate Polymers

**Publisher:** Elsevier

**Date:** 15 February 2013

Copyright © 2012 Elsevier Ltd.

Logged in as:  
Nessana Dartora  
Account #:  
3000823854

LOGOUT

### Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Nessana Dartora ("You") and Elsevier ("Elsevier"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	3498311027097
License date	Oct 29, 2014
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Carbohydrate Polymers
Licensed content title	Rhamnogalacturonan from <i>Ilex paraguariensis</i> : A potential adjuvant in sepsis treatment
Licensed content author	Nessana Dartora, Lauro M. de Souza, Simone M.M. Paiva, Camila T. Scoparo, Marcello Iacomini, Philip A.J. Gorin, Yanna D. Rattmann, Guilherme L. Sassaki
Licensed content date	15 February 2013
Licensed content volume number	92
Licensed content issue number	2
Number of pages	7
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	Caracterização estrutural de polissacarídeos de folhas de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) e suas propriedades biológicas
Expected completion date	Oct 2014
Estimated size (number of pages)	152
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.00 USD / 0.00 GBP
Total	0.00 USD