

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE E ANTIOXIDANTE DE
ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) ORGÂNICA E
CONVENCIONAL E SEU EFEITO SOBRE O
COMPORTAMENTO DE RATOS WISTAR**

CÁTIA DOS SANTOS BRANCO

CAXIAS DO SUL

2012

CÁTIA DOS SANTOS BRANCO

**ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE E ANTIOXIDANTE DE
ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) ORGÂNICA E
CONVENCIONAL E SEU EFEITO SOBRE O
COMPORTAMENTO DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profª. Drª. Mirian Salvador

Co-orientadora: Profª. Drª. Adriana S. Coitinho

CAXIAS DO SUL

2012

CÁTIA DOS SANTOS BRANCO

ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE, ANTIOXIDANTE E
COMPORTAMENTAL DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.)
ORGÂNICA E CONVENCIONAL EM RATOS WISTAR

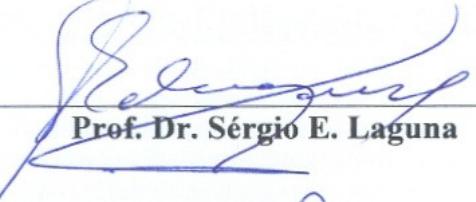
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

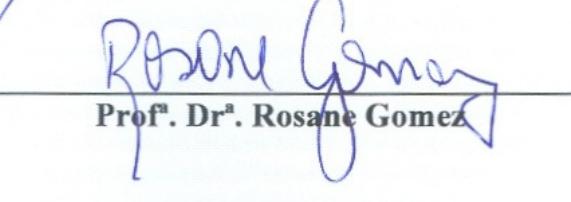
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 1º DE JUNHO DE 2012.

Mirian Salvador
Profª. Drª. Mirian Salvador
Orientadora

Adriana Coitinho
Profª. Drª. Adriana S. Coitinho
Co-orientadora


Prof. Dr. Leonardo Nora


Prof. Dr. Sérgio E. Laguna


Prof. Drª. Rosane Gomez

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

B816a Branco, Cádia dos Santos, 1985-
Atividade anticonvulsivante e antioxidante de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) orgânica e convencional e seu efeito sobre o comportamento de ratos wistar / Cádia dos Santos Branco. - 2012.
xii, 101 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2012.
“Orientação: Prof.ª Dr.ª Mirian Salvador, co-orientação: Prof.ª Dr.ª Adriana S. Coitinho”

1. Erva- mate – Atividade antioxidante. 2. Polifenóis. 3. Cultivo - Ervas - Epilepsia. 4. Biotecnologia. I. Título.
CDU 2.ed.: 633.77

Índice para o catálogo sistemático:

- | | |
|---------------------------------------|----------------|
| 1. Erva-mate – Atividade antioxidante | 633.77 |
| 2. Polifenóis | 547.56 |
| 3. Cultivo – Ervas – Epilepsia | 633.77:615.212 |
| 4. Biotecnologia | 57.08 |

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Mirian Salvador e à co-orientadora Dr^a Adriana Coitinho, pelos ensinamentos, atenção, amizade, confiança e dedicação a este trabalho.

Ao coordenador Prof. Dr. Aldo Dillon, professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela contribuição no meu crescimento profissional e pessoal, assim como ao Programa de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio e suporte financeiro.

Aos meus professores da banca de acompanhamento Prof. Dr. Sérgio E. Laguna e Prof^a Dr^a Joséli Schwambach, pelo auxílio, suporte, amizade e disponibilidade.

Aos colaboradores desta pesquisa, Msc Gustavo Scola, Dr^a Patrícia Spada, Dr^a Caroline Dani, Dr^a Verônica Césio e Dr. Horacio Heinze pela disponibilidade e auxílio prestados.

A toda a equipe do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, pela amizade e convivência produtiva, que, direta ou indiretamente, contribuíram para o sucesso deste trabalho.

Aos meus pais Lucieni e Joni, meu mano Cassiano e cunhada Joceni, pelo carinho, incentivo, ensinamentos e apoio sempre incondicional, assim como ao meu companheiro Cristian e meu amado filho Cauê, pelo amor, descontração, paciência, força e compreensão pela falta de tempo e atenção em tantos momentos...

Agradeço, enfim, a Deus pela vida e pela presença Divina em todos os momentos.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Radicais livres, espécies reativas e antioxidantes	3
2.2 Estresse Oxidativo	7
2.3 <i>Ilex paraguariensis</i>	9
2.3.1 Aspectos etnobotânicos	9
2.3.2 Fitoquímica e propriedades biológicas de <i>I. paraguariensis</i>	11
2.4 Epilepsia	14
2.5 Estresse Oxidativo e Epilepsia.....	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4 RESULTADOS	20
4.1 CAPÍTULO 1	21
4.2 CAPÍTULO 2	49
5 DISCUSSÃO GERAL.....	66
6 CONCLUSÕES	73
7 PERSPECTIVAS	74
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	84
Anexo I.....	85
Anexo II.....	86

Anexo III	87
Anexo IV	88
Anexo V	89
Depósito de Pedido de Patente de Invenção junto ao INPI	89
Anexo VI	93
<i>Curriculum Lattes</i> da aluna	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Núcleo fundamental e classificação dos flavonóides (Adaptado de Aron & Kennedy, 2008).....	6
Figura 2. A) Árvore de erva-mate; B) Flores, folhas e ramos de erva-mate (Adaptado de Heck & Mejia, 2007; Embrapa, 2010).....	10
Figura 3. Estrutura química da cafeína (Adaptado de Heck & Mejia, 2007).	12
Figura 4. Estrutura química do ácido clorogênico (A) e de seus isômeros (B-D) (Adaptado de Heck & Mejia, 2007).	13
Figura 5. Estrutura molecular do flavonol rutina (Adaptado de Heck <i>et al.</i> , 2008).	13

LISTA DE ABREVIATURAS

ER	Espécies reativas
RL	Radical livre
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutationa peroxidase
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
O ₂ •-	Radical superóxido
OH•	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
TBARS	Produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
DTNB	5,5'-dithiobis- ácido 2-nitrobenzóico
PTZ	Pentilenotetrazol
SNC	Sistema nervoso central
WHO	Organização Mundial da Saúde
CAE	Equivalentes de ácido clorogênico

RESUMO

A epilepsia é uma das mais comuns e sérias desordens neurológicas. Caracteriza-se pela ocorrência de crises convulsivas, as quais podem aumentar a geração de espécies reativas, desequilibrando o metabolismo redox dos pacientes epiléticos e aumentando a incidência de doenças associadas ao estresse oxidativo. Estudos têm mostrado que alguns polifenóis podem apresentar atividade anticonvulsivante em modelo animal de epilepsia. A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta rica em polifenóis, compostos com reconhecido potencial antioxidante. Atualmente, o cultivo da erva-mate pode ser feito a partir de dois métodos distintos, o orgânico, no qual o uso de fungicidas, inseticidas e/ou fertilizantes inorgânicos é proibido, e o convencional, onde a utilização destes insumos é permitida. Estudos têm mostrado que algumas plantas cultivadas sob manejo orgânico apresentam maiores teores polifenólicos do que àquelas produzidas pelo cultivo convencional. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial anticonvulsivante, antioxidante e possíveis alterações comportamentais de infusões de erva-mate, orgânica e convencional em ratos Wistar. Avaliou-se ainda, o perfil polifenólico de ambas as amostras de erva-mate. Ratos machos foram divididos em três grupos e tratados, via gavagem, com água destilada, infusão de erva-mate orgânica e infusão de erva-mate convencional, durante 15 dias. Ao término do tratamento, os animais foram avaliados comportamentalmente através do teste de campo aberto (*Open Field*). Subsequentemente, uma dose única da droga convulsivante pentilenotetrazol (PTZ) 60 mg/kg (i.p.), foi administrada e os animais foram observados durante 30 minutos em relação ao tempo de latência, tempo de crises tônico-clônicas, intensidade e freqüência de convulsões, duração total das crises e mortalidade induzida pelo PTZ. Após, os animais foram sacrificados e os tecidos do SNC (cerebelo, córtex cerebral e hipocampo), o fígado e o soro coletados para os ensaios de atividade antioxidante das infusões de erva-mate. Os resultados mostraram que ambas as infusões, tanto orgânica como

convencional, não alteraram os parâmetros comportamentais (locomoção, exploração e ansiedade) dos animais. Observou-se que os tratamentos, tanto com a erva-mate orgânica quanto com a convencional, foram capazes de diminuir a freqüência das crises convulsivas em relação ao PTZ. Em adição, o tratamento com a erva-mate orgânica reduziu significativamente o tempo de crises tônico-clônicas quando comparado ao grupo controle. Ambas as infusões estudadas mostraram uma tendência de diminuição da intensidade das crises convulsivas (animais que atingiram o nível 5 na escala de Racine) induzida pelo PTZ. Além disso, as infusões de erva-mate orgânica e convencional reduziram os níveis de danos oxidativos a lipídios e proteínas, e a concentração de óxido nítrico induzidos pelo PTZ nos ratos. Ambas as infusões estudadas preveniram, ainda, a depleção das defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase e catalase) e não-enzimáticas (conteúdo de proteína sulfidril) induzida pelo PTZ. Não foram observadas diferenças no conteúdo fenólico total entre as infusões de erva-mate orgânica e convencional. Os compostos fenólicos rutina, ácido clorogênico e acil derivados, e o alcalóide cafeína foram identificados em ambas as infusões de erva-mate estudadas.

Palavras-chave: epilepsia, *Ilex paraguariensis*, erva-mate, antioxidante, polifenóis

ABSTRACT

Epilepsy is one of the most common and serious neurological disorders. It is characterized by the occurrence of seizures, which may increase the generation of reactive species, unbalancing the redox metabolism of epileptic patients and increasing the incidence of diseases associated with oxidative stress. Studies have shown that some polyphenols may have anticonvulsant activity in animal models of epilepsy. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is a plant rich in polyphenols, compounds with known antioxidant potential. Currently, the cultivation of yerba mate can be made from two different methods, the organic, in which the use of fungicides, insecticides and/or inorganic fertilizers is prohibited, and conventional one, where the use of these inputs are allowed. Studies have shown that some plants grown under organic management have higher polyphenolic content than those produced by conventional cultivation. Thus, the objective of this study was to evaluate the potential anticonvulsant, antioxidant and possible behavioral changes of infusions of yerba mate, organic and conventional in Wistar rats. We also evaluated the polyphenolic profile of both yerba mate samples. Male rats were divided into three groups and treated by oral gavage with distilled water, infusion of organic yerba mate and infusion of conventional yerba mate for 15 days. At the end of treatment, the animals were behaviorally evaluated by the Open Field test. Subsequently, a single dose of the convulsant drug pentylenetetrazole (PTZ) 60 mg/kg (i.p.) was administered and animals were observed for 30 minutes in relation to the latency time, tonic-clonic seizures time, intensity and frequency of seizures, total duration of convulsions and mortality induced by PTZ. Then, the animals were sacrificed and the tissues of the CNS (cerebellum, cerebral cortex and hippocampus), the liver and serum were collected for the evaluation of antioxidant effects of yerba mate infusions. The results showed that both infusions, organic and conventional, did not alter the behavior (locomotor, exploration and anxiety) of the rats. It was observed that treatments with both organic and conventional yerba

mate were able to decrease the frequency of seizures in relation to the PTZ group. In addition, the treatment with organic yerba mate significantly decreased the time of tonic-clonic seizures when compared to the control group. Both infusions studied showed a tendency of decreasing intensity of seizures (animals that have reached level 5 on the scale of Racine) induced by PTZ. Moreover, infusions of organic and conventional yerba mate reduced the levels of oxidative damage to lipids and proteins, and the levels of nitric oxide raised by PTZ in rats. Both infusions studied prevented, also, the depletion of enzymatic (superoxide dismutase and catalase) and non-enzymatic (protein sulfhydryl content) antioxidant defenses induced by PTZ. There were no differences in total phenolic content between infusions of organic and conventional yerba mate. The phenolic compounds rutin, chlorogenic acid and acyl derivatives, and the alkaloid caffeine were identified in both infusions of yerba mate.

Keywords: epilepsy, *Ilex paraguariensis*, yerba mate, antioxidant, polyphenols

1 INTRODUÇÃO

Epilepsia é uma das desordens neurológicas mais comuns (Sathyanarayana & Subbalakshmi, 2010), afetando, mundialmente, mais de 50 milhões de pessoas (WHO, 2011). É caracterizada pela ocorrência de crises convulsivas espontâneas e recorrentes, com interrupções do desempenho normal do cérebro, afetando diversas funções sensoriais e comportamentais, e comprometendo a vida social do indivíduo que sofre deste distúrbio (Costello & Delanty, 2004). A maior excitabilidade cerebral aumenta a geração de espécies reativas (Hayashi, 2009; Sharma *et al.*, 2010), causando um desequilíbrio no metabolismo redox dos pacientes epiléticos (Kutluhan *et al.*, 2009), e aumentando a incidência de doenças associadas ao estresse oxidativo, tais como desordens neurodegenerativas, cirrose hepática, câncer, entre outras (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A epilepsia é tratada com fármacos anticonvulsivantes isoladamente (monoterapia) ou em combinação (politerapia). No entanto, cerca de 30-40% dos indivíduos não respondem satisfatoriamente ao tratamento (Sun *et al.*, 2010). Além disso, a administração destes fármacos está associada a uma série de efeitos colaterais, incluindo a geração de espécies reativas e/ou redução dos mecanismos de defesa antioxidantes séricos (Hamed *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2006) e a ocorrência de danos hepáticos (Ichai *et al.*, 2003). Em vista disso, acredita-se que os antioxidantes possam desempenhar um importante papel frente aos danos oxidativos neuronais e sistêmicos associados às crises epiléticas.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*, A. Saint Hilaire) pertence à família *Aquifoliaceae* e é nativa e cultivada no Brasil, na Argentina, no Uruguai e Paraguai (Prediger *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2008). Suas folhas são usadas para preparar diferentes bebidas, dentre as quais o chimarrão (infusão de folhas verdes e secas em água quente), o tererê (infusão de folhas verdes e secas em água fria) e o chá mate (infusão de folhas torradas em água quente). Nos

últimos anos, a erva-mate vem ganhando rápida inserção nos mercados mundiais, incluindo Estados Unidos e Europa, devido à sua ação hipocolesterolêmica, vasodilatadora, anti-inflamatória, antimutagênica e antioxidante (para revisão, ver Bracesco *et al.*, 2011). Estes efeitos têm sido atribuídos aos polifenóis presentes nesta planta, tais como os ácidos fenólicos (ácido clorogênico e derivados) e flavonóides, especialmente a rutina (Heck & Mejia, 2007; Miranda *et al.*, 2008).

O cultivo da erva-mate pode ser realizado através de duas formas distintas de manejo. O orgânico, caracterizado pelo emprego de insumos naturais, e o cultivo convencional, no qual é permitida a utilização de insumos sintetizados pelo homem, em regra com elevada concentração e/ou elevada pureza de ingredientes ativos. Em alguns cultivares (uvas, amoras, pêssegos e peras) observou-se que o manejo orgânico pode aumentar o conteúdo de compostos fenólicos na planta (Carbonaro *et al.*, 2002; Asami *et al.*, 2003; Dani *et al.*, 2007). No entanto, até o momento, não há nenhum estudo avaliando o teor de polifenóis em erva-mate proveniente de cultivo orgânico.

Em vista disso, o presente estudo teve como objetivo analisar o efeito anticonvulsivante e antioxidante de *Ilex paraguariensis*, orgânica e convencional, e seu efeito sobre o comportamento de ratos Wistar. Os resultados obtidos poderão colaborar na promoção de novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas com compostos naturais para indivíduos portadores de epilepsia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radicais livres, espécies reativas e antioxidantes

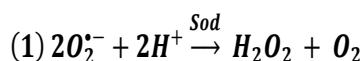
Um radical livre (RL) é uma espécie química (átomo ou molécula) que possui um ou mais elétrons não pareados no seu orbital de valência. Essa situação confere ao radical uma alta reatividade química, especialmente como agente oxidante, pela tendência em adquirir um segundo elétron para estabilizar-se. Os radicais livres são subprodutos normais do metabolismo aeróbico, produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. Nos organismos vivos são encontrados diversos RL, tais como o radical hidroxil (HO^\bullet), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o óxido nítrico (NO^\bullet) e o peroxinitrito (ONOO^\bullet). O ácido hipocloroso (HClO), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio *singlet* (1O_2), embora não sejam radicais livres, estão envolvidos em reações químicas que geram subprodutos reativos e são portanto, denominados de espécies reativas (ER) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

As ER podem ser produzidas por fontes exógenas ou endógenas. A exposição à radiação, fumo, estresse, a administração de alguns medicamentos e compostos xenobióticos são alguns exemplos de fontes exógenas. Por outro lado, as fontes endógenas incluem a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, a enzima NADPH oxidase nos fagócitos e a atividade combinada da xantina oxidase e xantina desidrogenase, as quais produzem $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , respectivamente (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Os efeitos biológicos das ER são minimizados *in vivo* pelos sistemas antioxidantes (Tomé *et al.*, 2010). Antioxidantes são compostos que reduzem a concentração de espécies reativas, reparando danos oxidativos e minimizando os efeitos biológicos nocivos às células, e podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos (Halliwell & Gutteridge, 2007).

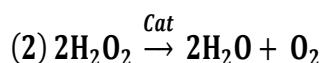
O sistema de defesa antioxidant enzimático é representado principalmente pelas

enzimas superóxido dismutase (Sod) e catalase (Cat), as quais constituem uma importante linha de proteção contra danos oxidativos, exercendo papel crucial na manutenção do equilíbrio redox celular. A Sod (EC 1.15.1.1) dismuta o radical superóxido (O_2^\cdot) formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (reação 1), que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, tais como a catalase ou a glutationa peroxidase (GPx) (Fridovich, 1998).



Em células eucariotas, há várias isoformas do tipo Sod, geralmente responsáveis por compartimentos celulares distintos. A Sod_1 ou $SodCuZn$ encontra-se quase que exclusivamente no espaço citoplasmático intracelular. A Sod_2 ou $SodMn$ pode ser encontrada na mitocôndria da maioria dos animais, enquanto que a Sod_3 ou $ECSod$ possui um peptídeo sinalizador que a direciona exclusivamente para o espaço extracelular (Fridovich, 1998; Zelko *et al.*, 2002). A atividade da enzima Sod é determinada espectrofotometricamente, através da formação de adrenocromo, resultante da auto-oxidação da adrenalina. Quanto mais adrenocromo, maior será a absorbância e consequentemente, menor será a atividade enzimática (Bannister & Calabrese, 1987).

A enzima catalase (EC 1.11.1.6), codificada por um gene presente no cromossomo 11, é uma ferrilhemoenzima cuja função principal é dismutar o peróxido de hidrogênio formando água e oxigênio molecular, de acordo com a reação 2 (Ursini *et al.*, 1997):



A Cat é um tetrâmero formado por unidades idênticas, sendo que cada monômero contém um grupo prostético heme no centro catalítico. Em animais, a catalase está presente, praticamente, em todos os órgãos do corpo (Inoue, 1994). A catalase é uma enzima altamente específica porque possui atividade apenas sobre o peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos de metila e etila (Halliwell & Gutteridge, 1999). A dosagem experimental da atividade da Cat

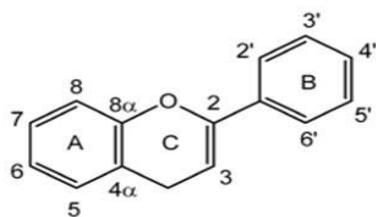
baseia-se na medida da velocidade de consumo do H₂O₂ na amostra estudada. Esta determinação é diretamente proporcional à atividade enzimática e obedece a uma cinética que mede a velocidade de decomposição de H₂O₂ em diferentes intervalos de tempo (Aebi, 1984).

Além dos antioxidantes endógenos do organismo, existe o sistema de defesa antioxidante não enzimático, que inclui compostos provenientes da dieta, como vitaminas, carotenóides e polifenóis. Dentre estes, os polifenóis são os antioxidantes exógenos mais estudados, apresentando numerosos mecanismos de ação *in vivo* (Filip and Ferraro, 2003; Deladino *et al.*, 2007; Bracesco *et al.*, 2011; Schaffer and Halliwell, 2012).

Os polifenóis, ou compostos fenólicos, são moléculas fitoquímicas complexas com estruturas químicas diferenciadas. Estes compostos estão presentes nos vegetais em sua forma livre, como também conjugados a açúcares (glicosídios) e proteínas, representando os mais abundantes antioxidantes da dieta humana (Berté *et al.*, 2011). Possuem pelo menos, um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila, e são classificados segundo o tipo de esqueleto principal, dividindo-se em flavonóides e não-flavonóides (Ferguson, 2001).

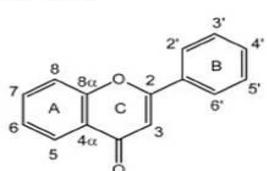
Os compostos não-flavonóides compreendem os ácidos fenólicos, benzóicos e cinâmicos, e outros derivados fenólicos como os estilbenos. Já os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes, sendo classificados em várias subclasses que se distinguem pelo grau de oxidação de seu núcleo pirano. São metabólitos secundários das plantas apresentando uma estrutura hidrocarbonada comum (Figura 1) do tipo C6-C3-C6 (difenilpropano), e são divididos em diversas classes (flavan-3-ol, flavona, flavonol, flavanona, flavononol, antocianidina, chalcona, aurona) (Riberéau-Gayon *et al.*, 2003) (Figura 1).

NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONÓIDES

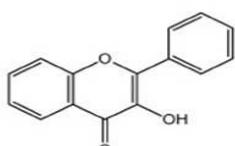


ESTRUTURA QUÍMICA DAS DIFERENTES CLASSES

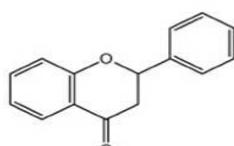
Flavona



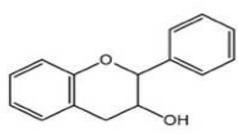
Flavonol



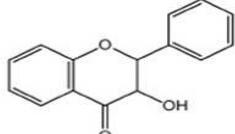
Flavanona



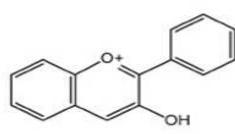
Flavan-3-ol



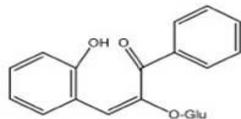
Flavanonol



Antocianidina



Chalcona



Aurona

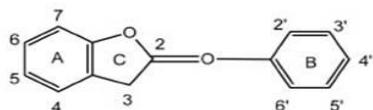


Figura 1. Núcleo fundamental e classificação dos flavonóides (Adaptado de Aron & Kennedy, 2008).

Os flavonóides têm sido descritos como importantes varredores de radicais livres e quelantes de íons metálicos, principalmente ferro e cobre, os quais são os de maior relevância para as reações iniciais de formação de radicais (Halliwell and Gutteridge, 2007). Além disso, os flavonóides podem inibir algumas enzimas envolvidas na geração de espécies reativas, dessa forma protegendo as células contra os danos oxidativos (Schaffer and Halliwell, 2012).

Os polifenóis, de forma geral, contribuem para minimizar a incidência de várias doenças

associadas ao estresse oxidativo, incluindo o câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Asensi *et al.*, 2011; Ferrari *et al.*, 2011; Lecour and Lamont, 2011; Albarracin *et al.*, 2012; Valls-Pedret *et al.*, 2012).

O conteúdo polifenólico total de um extrato/produto pode ser avaliado através de diferentes metodologias. Uma das mais utilizadas é a técnica espectrofotométrica de Folin Ciocalteau (Singleton *et al.*, 1999). Além da metodologia para quantificação de polifenóis totais, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é outra ferramenta bastante útil para acessar o perfil fitoquímico de amostras, permitindo a identificação de cada composto isoladamente. Nesta técnica, utiliza-se como fase móvel um líquido e como fase estacionária partículas sólidas empacotadas em uma coluna. A separação dos compostos resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel, devido às diferentes interações com a fase estacionária. Os compostos podem ser identificados através dos tempos de retenção na fase estacionária, comparados com os padrões (Falkenberg *et al.*, 2001).

2.2 Estresse Oxidativo

O desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante endógeno e/ou exógeno, e a geração de espécies reativas leva a uma condição fisiológica designada como estresse oxidativo. Embora os organismos vivos possuam um ambiente intracelular equilibrado entre as forma oxidada e reduzida das moléculas, perturbações neste equilíbrio redox podem provocar a produção de peróxidos e ER que danificam os componentes celulares, incluindo proteínas, lipídios e o DNA (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A lipoperoxidação (LPO) é uma consequência dos danos oxidativos a lipídios e está envolvida na diminuição da fluidez da membrana e no aumento da permeabilidade a íons, gerando uma cascata de eventos deletérios à célula. Entre os produtos finais da LPO estão compostos de baixo peso molecular, como hidrocarbonetos (etano e pentano) e aldeídos, por exemplo, o malondialdeído (MDA). *In vitro*, o MDA pode lesar proteínas, DNA, RNA e

outras biomoléculas. A dosagem dos níveis de LPO através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) é um importante indicativo dos níveis de estresse oxidativo (Wills, 1966).

Além dos danos a lipídios, a avaliação dos danos às proteínas constitui-se num importante parâmetro de lesões oxidativas a biomoléculas. A oxidação das proteínas por metais (cátions com ciclo redox como o $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) pode levar a introdução de grupos carbonila nos resíduos de aminoácidos. Esta modificação pode levar à inativação protéica. Reações dos grupos carbonilas com reagentes específicos, tais como dinitrofenilhidrazina (DNPH) podem ser utilizadas como métodos de quantificação de proteína oxidavelmente modificada (Levine *et al.*, 1990). Além disso, a avaliação do conteúdo de proteína sulfidril (SH), um marcador de defesa antioxidante endógeno não enzimático, pode ser também realizada através da reação com o reagente DTNB (5,5'-dithiobis- ácido2-nitrobenzóico) (Askenov & Markesberry, 2001).

O óxido nítrico (NO^{\cdot}) é um RL que reage rapidamente (tempo de meia vida de segundos) com outras espécies radicalares levando à geração de mais espécies reativas. Este radical pode reagir com o ânion superóxido resultando na formação de peroxinitrito, o qual tem a capacidade de oxidação de diversas classes de lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (Halliwell & Gutteridge, 2007). A avaliação dos níveis de óxido nítrico em amostras biológicas pode ser realizada através da reação com o reagente de Griess. No entanto, devido à sua difícil quantificação, a concentração de seus metabólitos nitrito (NO_2) e nitrato (NO_3), têm sido um parâmetro bastante utilizado como medida indireta da sua produção em sistemas biológicos (Green *et al.*, 1981; Ilhan *et al.*, 2005).

Níveis aumentados destes metabólitos oxidativos têm sido detectados em pacientes com uma variedade de doenças, incluindo desordens neurodegenerativas e neurológicas, cirrose hepática, doenças inflamatórias, aterosclerose, câncer, *diabetes mellitus*, catarata, além de

retinopatias e infarto do miocárdio (Simonian & Coyle, 1996; Lipinski, 2001; Costello & Delanty, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2007).

2.3 *Ilex paraguariensis*

2.3.1 Aspectos etnobotânicos

A espécie *Ilex paraguariensis* (A. St. Hil.), pertencente à família *Aquifoliaceae* é conhecida popularmente como erva-mate. Apresenta-se como árvore perene dióica (Figura 2 A), alcançando cerca de 15 metros de altura e 40 centímetros de diâmetro de tronco, possuindo folhas alternadas, simples e inteiras e pequenas flores brancas em inflorescência de até 5 flores (Figura 2 B).

O período de floração ocorre de setembro a dezembro e a frutificação entre os meses de dezembro a março (Silva, 2007).

(A)



(B)



Figura 2. A) Árvore de erva-mate; B) Flores, folhas e ramos de erva-mate (Adaptado de Heck & Mejia, 2007; Embrapa, 2010).

A erva-mate é naturalmente cultivada no Brasil, na Argentina, Uruguai e Paraguai (Prediger *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2008), totalizando, aproximadamente, 290.000 ha, com uma produção anual acima de 870.000 t (FAOSTAT, 2007). O Brasil é considerado o segundo maior produtor de erva-mate (Heck & Mejia, 2007), e conta com um setor ervateiro nacional que abrange cerca de 450 municípios, distribuídos nos estados de Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR) e Mato Grosso do Sul (MS) (Mosele, 2002; Valduga, 2002). Nos três estados da região Sul, a produção anual é superior a 540.000 t/ano, sendo que no RS, a atividade é fonte de renda em mais de 80.000 pequenas e médias propriedades, distribuídas em 163 municípios, totalizando uma produção *in natura* que alcança 185.000 t/ano e movimentando 360 indústrias gaúchas (Portal do Desenvolvimento Agrário, 2009).

Atualmente, a erva-mate produzida no Brasil é oriunda de duas formas distintas de manejo, uma denominada convencional, no qual é permitida a utilização de insumos sintetizados pelo homem, e outra denominada orgânica, no qual o uso de produtos químicos

e/ou engenharia genética é proibido. O cultivo orgânico da erva-mate ainda é pouco difundido no Brasil, abrangendo pequenas áreas e totalizando um pequeno percentual da produção total comercializada no país (Embrapa, 2010). A literatura mostra que a adição de fitodefensivos pode aumentar ou diminuir a produção de polifenóis, compostos responsáveis pelo sistema de defesa vegetal (Heck & Mejia, 2008; Soltoft *et al.*, 2010). Já foi relatado que ameixas produzidas de forma orgânica possuíam menores teores de polifenóis em relação àquelas cultivadas sob manejo convencional (Lombardi-Boccia *et al.*, 2004). Por outro lado, o cultivo orgânico aumentou a síntese de compostos fenólicos em uvas, amoras, pêssegos e peras (Carbonaro *et al.*, 2002; Asami *et al.*, 2003; Dani *et al.*, 2007). No entanto, até o momento, não há nenhum estudo avaliativo sobre o perfil polifenólico de erva-mate proveniente de manejo orgânico.

A erva-mate possui grande importância do ponto de vista econômico e cultural. É utilizada no preparo de bebidas, tais como o chimarrão (infusão de folhas verdes e secas em água quente), o tererê (infusão de folhas verdes e secas em água fria) e o chá mate (infusão de folhas enegrecidas em água quente) (Miranda *et al.*, 2008). Anualmente, estima-se que sejam consumidos aproximadamente 5 kg de erva-mate por pessoa na Argentina, enquanto que o Uruguai registra 6-8 kg/pessoa/ano. No Brasil, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, cerca de 70% dos homens e 50% das mulheres são consumidores diários de erva-mate, totalizando um consumo anual de aproximadamente 1,2 kg por pessoa (Bracesco *et al.*, 2011).

2.3.2 Fitoquímica e propriedades biológicas de *I. paraguariensis*

Até o momento, não existem dados na literatura sobre a composição fitoquímica de erva-mate de origem orgânica. Já a erva-mate cultivada de forma convencional apresenta em sua composição principalmente alcalóides (xantinas) e polifenóis (Berté, 2011).

As xantinas são bases nitrogenadas que apresentam uma estrutura comum, correspondente a 2,6-dioxipurina. Este grupo inclui vários compostos ligados a outros resíduos. Dentre eles, destaca-se a cafeína (1, 3,7-dimetilxantina) (Figura 3), considerada o alcalóide majoritário de *I. paraguariensis*, sendo responsável por inúmeras atividades farmacológicas, atuando como energizante, diurético, vasodilatador e antitumoral (Heck & Mejia, 2007).

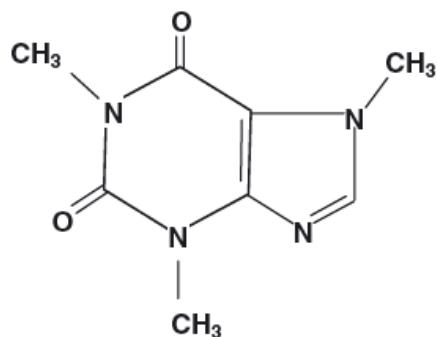
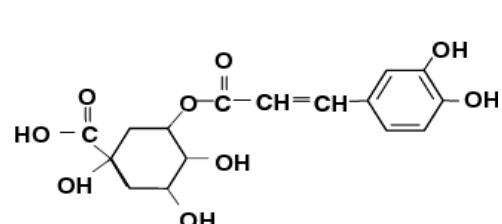
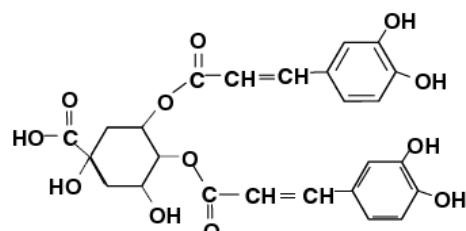


Figura 3. Estrutura química da cafeína (Adaptado de Heck & Mejia, 2007).

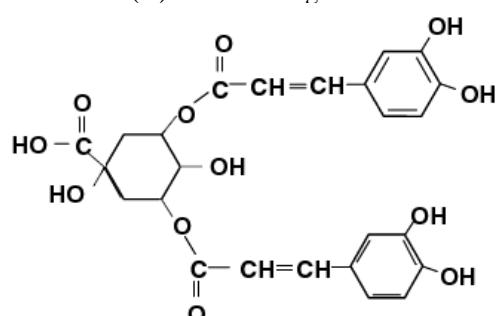
Estudos fitoquímicos destacam, no entanto, os compostos fenólicos como os constituintes majoritários da erva-mate. Dentre eles, o ácido clorogênico e seus derivados cafeoilquínicos (Figura 4) são os mais representativos (Filip *et al.*, 2001).



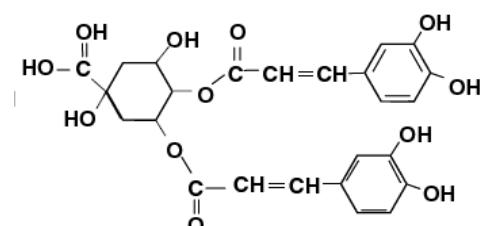
(A) Ácido clorogênico



(B) Ácido 3,4-dicafeoilquínico



(C) Ácido 3,5-dicafeoilquínico



(D) Ácido 4,5-dicafeoilquínico

Figura 4. Estrutura química do ácido clorogênico (A) e de seus isômeros (B-D) (Adaptado de Heck & Mejia, 2007).

Outro grupo de compostos fenólicos de interesse em *I. paraguariensis* é o dos flavonóides, comum em folhas e também nas flores dos vegetais. Os flavonóides descritos para a erva-mate são a rutina, a quercetina-3-glicosídeo e canferol-3-rutinosídeo, destacando-se o flavonol rutina (Figura 4) como o mais representativo (Valduga, 2002).

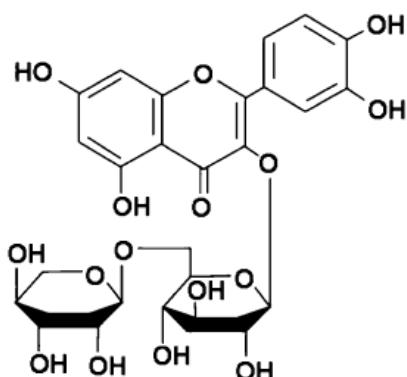


Figura 5. Estrutura molecular do flavonol rutina (Adaptado de Heck *et al.*, 2008).

Existe um número considerável de estudos que associam o consumo de alimentos ricos em polifenóis com a redução do risco de desenvolvimento de várias patologias crônicas, incluindo desordens neurodegenerativas e neurológicas, doenças cardiovasculares e câncer (Simonian & Coyle, 1996; Park *et al.*, 2004; Halliwell and Gutteridge, 2007; Aron & Kennedy, 2008; Spencer, 2010).

No caso da erva-mate, rica em polifenóis, já se observou que a infusão preparada a partir de suas folhas apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiobesidade, hipocolesterolêmica, neuroativa entre outras (para revisão, ver Bracesco *et al.*, 2011).

A atividade antioxidante da erva-mate é principalmente atribuída às altas concentrações de ácido clorogênico e rutina (Bracesco *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2008). Já foi relatado que a erva-mate apresenta maior potencial antioxidante do que o descrito para o vinho tinto (18.5 mM versus 0.74 mM equivalentes de Trolox, respectivamente) em testes *in vitro* (Filip *et al.*,

2000). A administração de doses crescentes de extrato aquoso de erva-mate (0.5; 1.0 e 2.0 g/kg) foi capaz de diminuir e reparar os danos ao DNA induzido por H₂O₂ em hepatócitos de ratos Swiss (Miranda *et al.*, 2008). A ingestão de chimarrão (500 mL em 1 hora) por voluntários saudáveis mostrou-se capaz de inibir a oxidação plasmática induzida por cobre (Gugliucci, 1996). A ingestão de chá mate instantâneo (5g em 500 mL, equivalente aos sólidos solúveis contidos no chimarrão), diariamente, durante uma semana, diminuiu os níveis de lipoperoxidação e aumentou a expressão das enzimas antioxidantes GPx, Sod e Cat em plasma (Matsumoto *et al.*, 2009).

A ação anti-inflamatória do extrato aquoso de chá mate foi observada em hepatócitos de ratos Swiss (Arçari *et al.*, 2011), e em ratos expostos à fumaça do cigarro (Lanzetti *et al.*, 2008).

Estudos mostraram que o extrato de erva-mate apresenta atividade antiobesidade, exercendo importante efeito modulatório na expressão de vários genes relacionados à obesidade em tecido adiposo *in vivo* (Arçari *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 2009). Além disso, já foi demonstrado que a administração do extrato hidroalcoólico de erva-mate melhorou a cognição de ratos Wistar, além de aprimorar a aprendizagem e a memória de curta e longa duração, em testes comportamentais (Prediger *et al.*, 2008).

2.4 Epilepsia

A epilepsia é uma das desordens neurológicas mais comuns (Sathyaranayana & Subbalakshmi, 2010), afetando mais de 50 milhões de pessoas mundialmente, e envolvendo um adicional de 500 milhões, como familiares e profissionais da saúde, que atendem esses pacientes (Radhakrishnan, 2009; WHO, 2011), o que representa um ônus significativo para os sistemas de saúde pública. No Brasil, dados da Associação Brasileira de Epilepsia (2011) apontam que quatro milhões de pessoas são portadores deste distúrbio, ou seja, aproximadamente 2% da população. Trata-se de uma desordem crônica, dinâmica e

neurológica, com dano neuronal contínuo, particularmente quando não controlada (Costello & Delanty, 2004). Tem sido mostrado que pacientes epiléticos apresentam um risco maior de morte prematura, em cerca de 2 a 3 vezes, em comparação com a população em geral. Adicionalmente, estes indivíduos estão sujeitos ao desenvolvimento de outras doenças, incluindo depressão e transtornos de ansiedade (WHO, 2011). Outra complicação secundária à epilepsia é a insuficiência fulminante do fígado, a qual, mesmo sendo rara, apresenta elevada taxa de mortalidade. O exato mecanismo pelo qual as convulsões induzem danos hepáticos está pouco esclarecido, entretanto sabe-se que o estresse e a alteração no metabolismo redox dos hepatócitos estão envolvidos neste processo (Akbas *et al.*, 2005).

A epilepsia é caracterizada pela manifestação de crises epiléticas espontâneas e recorrentes manifestadas por alterações estereotipadas de comportamento (Costello & Delanty, 2004; WHO, 2011). Crises generalizadas podem manifestar-se de diferentes maneiras, de acordo com o aumento das contrações musculares, sendo classificadas em tônica (quando as contrações duram poucos minutos), clônicas (quando ocorrem episódios de relaxamento e abalos sucessivos) e mioclônicas (quando acontecem contrações muito breves semelhantes a choques) (WHO, 2011). Cada crise convulsiva é acompanhada por interrupções do desempenho normal do cérebro, o que pode afetar as funções sensorial, motora e autônoma; consciência; estado emocional; memória; cognição e comportamento (Costello & Delanty, 2004).

A gênese da epilepsia pode ser genética ou esporádica, e ocorrer em consequência de inúmeras causas, tais como danos cerebrais, anomalias corticais congênitas, traumas, cisticercose, infecções, tumores ou doença vascular cerebral (López-Hernández *et al.*, 2005; Schomer *et al.*, 2008). Estudos sugerem que os principais mecanismos envolvidos na gênese da convulsão estão relacionados a um desequilíbrio ocasionado por um aumento da transmissão sináptica excitatória glutamatérgica e/ou diminuição da resposta inibitória

GABAérgica (Sudha *et al.*, 2001; Kutluhan *et al.*, 2009). O aminoácido L-glutamato é considerado o maior mediador de sinais excitatórios no SNC de mamíferos e está relacionado aos processos cognitivos de memória e aprendizagem (Headley & Grillner, 1990). Simultaneamente, o glutamato desempenha um importante papel no desenvolvimento do SNC, como indução sináptica, migração e diferenciação celular (Johnston, 1995; Vallano, 1998). A concentração deste neurotransmissor no fluído extracelular é o que determina a extensão da estimulação dos receptores (Danbolt, 2000). Os receptores glutamatérgicos estão localizados nas membranas pré e pós-sinápticas, bem como nas membranas das células gliais e estão implicados em processos fisiológicos fundamentais, tais como os fenômenos de plasticidade sináptica (Meldrum *et al.*, 1999). A ativação destes receptores provoca a despolarização da membrana sináptica e desencadeia uma resposta excitatória. Um excesso de glutamato na fenda sináptica poderá induzir uma excessiva ativação de receptores glutamatérgicos, causando excitotoxicidade, podendo provocar degenerescência neuronal (Olney, 1981). Desta forma, a descoberta de antagonistas glutamatérgicos tem efeitos benéficos em alguns modelos de desordens neurológicas, tais como a epilepsia (Raol *et al.*, 2001).

A neurotransmissão sináptica inibitória no SNC de mamíferos é mediada principalmente pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) (Mares, 2009). Este neurotransmissor é encontrado em altas concentrações no SNC de adultos (Paul, 1995) e desempenha um papel importante na regulação da excitabilidade neuronal ao longo de todo o sistema nervoso. Nos seres humanos, o GABA também é diretamente responsável pela regulação do tônus muscular (Watanabe *et al.*, 2002). Assim como o glutamato, o GABA é armazenado em vesículas sinápticas e liberado para o meio extracelular de maneira dependente de Ca^{2+} . Os receptores ionotrópicos do GABA são canais iônicos que permitem a entrada de Cl^- , provocando uma hiperpolarização localizada na membrana neuronal, o que dificulta o disparo do potencial de

ação necessário para a liberação de neurotransmissores (Paul, 1995). Dessa forma, a ação do GABA desencadeia a redução da excitabilidade neuronal. Os receptores GABAérgicos possuem sítios de ligação para os benzodiazepínicos, dentre outros, os quais atuam como agonistas da neurotransmissão inibitória do GABA, sendo fármacos comumente usados no tratamento de convulsões (Raol *et al.*, 2001).

Até o momento, não há cura e nem ao menos tratamento com anticonvulsivantes que seja totalmente eficaz para os diferentes tipos de epilepsia. Fármacos anticonvulsivantes, tais como fenitoína, fenobarbital, valproato e carbamazepina são comumente utilizados, entretanto, cerca de 30-40% dos pacientes não respondem satisfatoriamente ao tratamento convencional medicamentoso (Sun *et al.*, 2010), o que representa uma significativa limitação na sua utilização clínica. Estes medicamentos estão envolvidos ainda, em uma série de implicações fisiológicas, que incluem efeitos detrimetrais nos mecanismos de defesa antioxidante sanguíneos (Hamed *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2006), lipoperoxidação sérica (Hamed *et al.*, 2004), toxicidade hematopoiética (Kojima *et al.*, 2009) e hepatotoxicidade (Ichai *et al.*, 2003), indicando a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento desta doença.

2.5 Estresse Oxidativo e Epilepsia

O sistema nervoso central (SNC) é especialmente sensível ao estresse oxidativo. Uma das razões é o alto consumo de oxigênio, devido às vastas quantias de ATP que são necessárias para manter a homeostase intracelular neuronal (Fonfria *et al.*, 2005). Além disso, a grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) favorece a lipoperoxidação, uma vez que são alvos preferenciais do processo peroxidativo (Hayashi, 2009). O cérebro apresenta ainda, baixas concentrações de antioxidantes para prevenir o dano oxidativo contínuo, tornando os neurônios mais suscetíveis aos danos ER-induzidos (Halliwell, 2006).

Estudos bioquímicos mostram que reações de oxidação estão associadas a um desequilíbrio da regulação redox do SNC, sendo implicadas em diversas patologias cerebrais (Costello & Delanty, 2004). O estresse oxidativo tem sido associado com neurodegeneração e várias desordens neurológicas, tais como Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose e epilepsia (Simonian & Coyle, 1996). Acredita-se que a prolongada excitação neuronal é capaz de induzir a geração de uma grande quantidade de ER, levando a alterações celulares e metabólicas que comprometem a funcionalidade do SNC, aumentando a suscetibilidade a deficiências comportamentais e cognitivas (Sutula *et al.*, 2003; Freitas, 2009).

Existem evidências consideráveis mostrando que em modelos animais de epileptogênese, a terapia antioxidant apresenta efeito anticonvulsivante e reduz os danos oxidativos, relacionados com as crises epiléticas (Costello & Delanty, 2004). Em vista disso, neste trabalho estudaram-se os possíveis efeitos anticonvulsivante e antioxidant de *Ilex paraguariensis* em modelo animal de epilepsia, induzida por pentilenotetrazol (PTZ).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar possível atividade anticonvulsivante e antioxidante de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) orgânica e convencional, e seu efeito sobre o comportamento dos ratos Wistar.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analisar os parâmetros comportamentais dos ratos Wistar (teste *Open Field*), tratados com as infusões de erva-mate orgânica e convencional.
- ✓ Avaliar a possível atividade anticonvulsivante de erva-mate, orgânica e convencional, em ratos Wistar tratados com pentilenotetrazol.
- ✓ Determinar os níveis de danos oxidativos a lipídios e proteínas, concentração de óxido nítrico, atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase e catalase e conteúdo de proteína sulfidril, em sistema nervoso central (côrtez cerebral, cerebelo e hipocampo), fígado e soro de ratos Wistar, tratados com erva-mate na presença ou ausência de pentilenotetrazol.
- ✓ Quantificar os polifenóis totais e identificar os compostos majoritários das infusões de erva-mate orgânica e convencional.

4 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de dois artigos científicos. O primeiro deles, intitulado **Anticonvulsant, Neuroprotective and Behavioral Effects of Organic and Conventional Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on Pentylenetetrazol-induced Seizures in Wistar Rats**, submetido à revista *Brain Research Bulletin*. O segundo, **Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) ameliorates PTZ-induced oxidative damages in liver and serum of Wistar rats** foi submetido à revista *Epilepsy Research*.

4.1 CAPÍTULO 1

Anticonvulsant, Neuroprotective and Behavioral Effects of Organic and Conventional Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on Pentylenetetrazol-induced Seizures in Wistar Rats

Cátia dos Santos Branco^a, Gustavo Scola^a, Adriana Dalpicolli Rodrigues^a, Verónica Cesio^b,
Mariajose Laprovitera^b, Horacio Heinzen^b,
Maitê Telles dos Santos^c, Bruna Fank^c, Suzana Cesa Vieira de Freitas^c, Adriana Simon
Coitinho^d and Mirian Salvador^{a*}

^a Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

^b Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, DQO, Facultad de Química, Universidad
de La República, Gral. Flores 2124, 11800, Montevideo, Uruguay.

^c Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, RS.

^d Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, ICBS, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

***Corresponding author:**

Mirian Salvador, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco
Getúlio Vargas 1130, Caxias do Sul, RS, Brazil, 95070-560. (Fax: 55 54 3218 2664, e-mail:
msalvado@ucs.br)

ABSTRACT

Epilepsy, which is one of the most common neurological disorders, involves the occurrence of spontaneous and recurrent seizures that alter the performance of the brain and affect several sensory and behavioral functions. Oxidative damage has been associated with post-seizure neuronal injury, thereby increasing an individual's susceptibility to the occurrence of neurodegenerative disorders. The present study investigated the possible anticonvulsive and neuroprotective effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis*), a plant rich in polyphenols, on pentylenetetrazol (PTZ)-induced seizures in Wistar rats. The behavioral and polyphenolic profiles of the yerba mate samples were also evaluated. Infusions of yerba mate (50 mg/kg) or distilled water were given to rats for fifteen days by oral gavage. On the 15th day the animals were subjected to open field test, and exploratory behavior was assessed. Subsequently, 60 mg/kg PTZ (i.p.) was administered, and animals were observed for the appearance of convulsions for 30 min. Latency for the first seizure, tonic-clonic and generalized seizures time, frequency of seizures and mortality induced by PTZ were recorded. The animals were then sacrificed, and the cerebellum, cerebral cortex and hippocampus were quickly removed and frozen to study the neuroprotective effects of yerba mate. The oxidative damage in lipids and proteins, nitric oxide levels, the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (Sod) and catalase (Cat) and non-enzymatic cellular defense (sulphydryl protein) were quantified in all the tissues. The results showed that organic and conventional yerba mate infusions were able to reduce the frequency of seizures when compared to the PTZ group. Besides, organic yerba mate infusion decreases the tonic-clonic seizures time in relation to the PTZ group. It was also shown that organic and conventional yerba mate infusions reduced the oxidative damage in lipids and proteins and nitric oxide levels and prevented the decrease in Sod and Cat activities and sulphydryl protein content when compared to the PTZ group in all the CNS tissues assayed. Organic and conventional yerba

mate commercial samples did not change the behavior (locomotion, exploration or anxiety) of the treated animals. In both organic and conventional infusions, the presence of the polyphenols rutin, chlorogenic acid and their acyl derivatives were detected, which could be associated with the biological effects observed. These data indicate that yerba mate may provide new perspectives for the development of therapeutic approaches with natural compounds in the pharmaceutical area, both to reduce the convulsions' frequency and to minimize the neuronal damage associated with recurrent seizures.

Keywords: epilepsy, anticonvulsant, neuroprotection, yerba mate

1. Introduction

Epilepsy is a prevalent and serious neurological disorder. Worldwide, this disease directly affects more than 50 million people (WHO, 2011). Clinically, epilepsy is defined as a chronic and dynamic neurological condition associated with ongoing neuronal damage, particularly when uncontrolled (Costello and Delanty, 2004). Anticonvulsant therapies are limited and unable to control seizures in all patients. Currently, 30-40% of these individuals do not respond satisfactorily to the customary pharmacological treatment (Sun *et al.*, 2010). Moreover, the antiepileptic drugs involved have a variety of side effects, including the development of chronic toxicity, neuropsychological and psychiatric disorders, detrimental effects on the blood antioxidant defenses and shortened life expectancy (Hamed *et al.*, 2004; López-Hernandez *et al.*, 2005). The pathophysiology of epilepsy at a cellular level is still uncertain. However, some studies suggest that the mechanisms of epileptogenesis include neuronal plasticity, neurotransmitter system dysfunction and ion exchange dysfunction (Johnston, 1997; Bievert *et al.*, 1998). Disturbances in the naturally existing balance between the concentrations of inhibitory (GABAergic) and excitatory (glutamatergic) neurotransmitters in the central nervous system (CNS) is the commonly accepted mechanism for the genesis of epilepsy (Engelborghs *et al.*, 2000). Thus, a deficiency in the γ -

aminobutyric acid (GABA) concentration may result in many pathological changes in the CNS that can be further implicated in convulsive episodes (Silva *et al.*, 2009). In this context, pentylenetetrazol (PTZ), a selective blocker of the chloride channel coupled to the GABAergic receptor complex, is the most commonly used chemoconvulsant in animal models to screen drugs for their potential anticonvulsant properties (Huang *et al.*, 2001; Patsoukis *et al.*, 2004). In addition, PTZ can induce oxidative stress in rodent models of epilepsy (Ilhan *et al.*, 2005; Obay *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009).

Oxidative stress is defined as the overproduction of reactive oxygen species (ROS) and occurs through the activation of glutamatergic excitatory amino acid receptors in the CNS (Ilhan *et al.*, 2005). This increase in the ROS levels can lead to neuronal death (Sharma *et al.*, 2010), which increases an individual's susceptibility to the occurrence of neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's and Parkinson's diseases (Turner and Schapira, 2001).

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*, Saint Hilaire) is a plant widely consumed in South America. It is naturally grown and cultivated in Brazil, Argentina and Paraguay. The leaves are used to prepare different beverages, including "chimarrão" (infusion of fresh or dried leaves with hot water), "tererê" (infusion of fresh or dry leaves in cold water) and mate tea (infusion of roasted leaves with hot water) (Miranda *et al.*, 2008). Yerba mate infusions exhibit hypocholesterolemic, hepatoprotective, antirheumatic, vasodilatory and anti-inflammatory properties (for review, see Bracesco *et al.*, 2011). These effects have been attributed to the phenolic compounds present in this plant, such as phenolic acids (chlorogenic acid and derivatives) and flavonoids, especially rutin (Heck and Mejia, 2007).

Yerba mate can now be cultivated according to organic or conventional methods. In organic farming, the use of agrochemicals or phytodefensives is not allowed, whereas in conventional cultivation, these chemical supplies can be included. Some studies have reported higher amounts of phenolic compounds with organic farming (Carbonaro *et al.*, 2002; Asami

et al. 2003; Dani *et al.*, 2007); however, these data are still controversial (Hakkinen and Torronen, 2000; Lombardi-Boccia *et al.*, 2004; Juroszec *et al.*, 2009; Soltoft *et al.*, 2010).

Therefore, the purpose of this work was to evaluate the possible anticonvulsant, behavioral and neuroprotective effects of organic and conventional yerba mate in Wistar rats. In addition, the polyphenolic profiles of both yerba mate samples were studied.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

The reagents pentylenetetrazol (PTZ), thiobarbituric acid, 2,4-dinitrophenylhydrazine, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), (-)-epinephrine, chlorogenic acid, and guanidine hydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). The water used in this study was distilled from glass (distiller QUIMIS®, Quimis Aparelhos Científicos LTDA, Diadema-SP, Ind. Brasileira). The chemical standards used for the HPLC assay were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), and the HPLC-grade solvents were obtained from Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, USA). All the other reagents (Merck and Hexapur) and solvents (Nuclear) were of analytical grade.

2.2 Yerba mate samples

Two samples of yerba mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) were used: one was organically cultivated and properly certified by the Instituto Biodinâmico in agreement with international norms, and a conventional sample, both acquired from the local market. Yerba mate infusions were obtained using 20g of yerba/100 mL of distilled water at 90°C for 90 seconds, simulating the traditional use by the general population. After cooling to 25°C, the samples were filtered using Millipore equipment (pore size, 0.45 µm; catalog number SFGS 047LS, Millipore Corp., São Paulo, Brazil). The obtained liquid extract was freeze-dried (Liobras, model L101 freeze dryer, Brazil) at 40°C, 10⁻¹ bar and was stored at -20°C. Lyophilized organic and conventional yerba mate samples were solubilized in distilled water

immediately before use. Both organic and conventional yerba mate infusions did not present organophosphorus and carbamate pesticides residues.

2.3 Determination of total phenolic content and identification of selected phenolics by HPLC

The total phenolic content of both infusions was determined by the Folin-Ciocalteu assay modified by Singleton *et al.* (1999). Briefly, a 200 µL aliquot of yerba mate infusion was assayed with 1000 µL of Folin-Ciocalteu reagent and 800 µL of sodium carbonate (7.5% w/v). After 30 minutes of reaction time, the absorption was measured at 765 nm (model UV-1700 spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). The total phenolic content was expressed as chlorogenic acid equivalents (CAE) mg/100 g of dry weight of yerba mate.

The HPLC analyses were performed in an Agilent HP 1050 equipped with a MetaPhor column (150 x 4.6 mm 5µ ODS-3) with a DAD detector. Rutin was successfully separated using the following chromatographic conditions: solvent A was composed of water/glacial acetic acid (97.5:2.5 v/v), and solvent B was composed of methanol/glacial acetic acid (97.5:2.5 v/v). The solvents were delivered at a total flow rate of 1.2 mL/min. The gradient profile was 20% B isocratic for 4 min, followed by 20% B to 60% B applied linearly for 31 min, and a return to 20% B by linear application for 4 minutes. The injection volume was 20 µL, and the chromatograms were registered at 355 nm. The UV spectra and retention times were used for identification purposes and were compared to those of the pure standards. The solutions of yerba mate were prepared by dissolving the dry extract in solvent A/solvent B (80:20 v/v). The final concentrations were 4008 mg/mL for the conventional yerba mate and 3976 mg/mL for the organic sample. The rutin standard solution was prepared with HPLC grade methanol.

For the identification of chlorogenic acids and their acyl derivatives, another gradient was used: solvent A was water/glacial acetic acid (99:1 v/v), and solvent B was methanol.

The solvents were delivered at a total flow rate of 1.0 mL/min. The gradient profile was 10% B applied isocratically for 5 min, followed by 30% B to 50% B applied linearly for 10 min, 50% B to 70% applied linearly for 10 min, 70% B to 90% applied for 5 minutes and a return to 30% B by linear application for 13 minutes. The injection volume was 20 µL, and the chromatograms were registered at 325 nm. The UV spectra and retention times were used for identification purposes and were compared to those of the pure standards. The solutions of yerba mate were prepared by dissolving the dry extract in solvent A/solvent B (90:10 v/v). The chlorogenic acid standard solution was prepared at 100 mg/g.

All the solutions for the HPLC analyses were filtered by a 0.45 µm polyamide membrane filter, and all the phytochemical assessments were analyzed in triplicate.

2.4 Animals and treatment

Forty-two male Wistar rats (seven rats in each group) weighing 250–300 g were used. They were maintained at a temperature of 22–24°C, on a 12-h light/12-h dark cycle, with free access to food and water. The number of animals was determined by the statistical F-test MANOVA ($F=3.21$, $\alpha=0.05$, power=90%). The experiments were performed in accordance with the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHEW, publication no. (NIH) 85-23, 1985” and approved by the local ethical committee at Centro Universitário Metodista IPA. The animals were randomly allocated to one of the three experimental groups ($n=14$ per group): group 1 served as a control and received distilled water; groups 2 and 3 were given, by oral gavage, organic and conventional yerba mate (50 mg/kg of body weight), respectively, once a day for 15 days. On the 15th day, half of the rats in each group ($n=7$) received a single, intraperitoneal (i.p.) dose of PTZ (60 mg/kg of body weight) dissolved in sterile isotonic saline. The other half of the rats (negative control) received a saline solution (i.p.).

2.5 Behavioral assays

Before the experiments to evaluate the PTZ-induced seizures, the influence of yerba mate infusions on the behavior of the rats was examined in the open field test (Pellow *et al.*, 1985). This assay is one of the methods used experimentally to assess the locomotor activity, hyperactivity and exploratory behavior of animals and constitutes a reliable parameter for anxiety levels. The open field apparatus was a 40×60 cm linoleum floor surrounded on three sides by a 60 cm-high plywood wall and in the front by a 60 cm-high glass wall. The floor was subdivided into 12 equal rectangles by black lines. Crossings of the lines (locomotion and exploration), rearing responses (orienting-investigatory responses), grooming and fecal bolus (anxiety manifestation) were analyzed for each rat. After each test, the floor was cleaned with water and ethanol to avoid a potential excitatory effect on locomotion produced by the presence of urine residues. Measures of behavioral changes in the open field apparatus were analyzed for each rat for 5 minutes before the PTZ administration.

2.6 PTZ-induced seizures

Immediately after the injection of PTZ, the animals were individually placed in plastic boxes, and convulsive behavior was recorded for 30 minutes according to Racine's scale (RS). RS categorizes five stages of intensity, based on the behavioral repertoire of the animals during a seizure, including “mouth and facial movements” (intensity stage 1), “head nodding” (stage 2), “forelimb clonus” (stage 3), tonic-clonic seizures (stage 4) and generalized tonic-clonic seizures characterized by rearing and falling (stage 5) (Racine, 1972). Over an observation period of 30 minutes, the latency time for the first seizure, tonic-clonic seizures total time, total seizures time, stage 5 on Racine's scale (most intense level of seizure), frequency of seizures and mortality were registered simultaneously. All the effects were reported by two trained observers blind to the animals' treatment status.

2.7 Neuroprotection assays

After the anticonvulsant evaluation described previously, the animals were sacrificed by decapitation without anesthesia, and the brain was rapidly excised on a Petri dish placed on ice. The cerebellum, cerebral cortex and hippocampus were dissected, washed to remove excess blood, and stored at -80°C. Before each assay, the tissues were homogenized in phosphate-buffered saline (pH 7.4) using a ground glass-type Potter-Elvehjem homogenizer and centrifuged for five minutes. The supernatant was used in the assays, and all the processes were performed under cold conditions.

Neuroprotection assays were performed through the quantification of lipid and protein oxidative damage, nitric oxide levels and the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase. The protein sulphydryl content was assessed as a measure of non-enzymatic cellular defense. The oxidative damage in lipids was determined by a method based on the reaction with thiobarbituric acid reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction, which is widely used as a sensitive method for measuring lipid peroxidation, as previously described (Wills, 1966). The results are expressed as nmol of TBARS/mg of protein. Oxidative damage in proteins was measured by determining the carbonyl grouping based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), according to Levine *et al.* (1990). DNPH reacts with protein carbonyls to form hydrazones that can be measured spectrophotometrically. The results are expressed as nmol of DNPH/mg of protein.

Because NO measurements are very difficult to assess in biological specimens, tissue nitrite (NO^-_2) and nitrate (NO^-_3) were estimated as an index of NO production (Ilhan *et al.*, 2005). The method for brain nitrite and nitrate levels was based on the Griess reaction, according to Green (1981). The results were expressed as nmol of nitrite/mg protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined according to the method of Bannister and Calabrese (1987), and the results were expressed as USOD/mg of protein. One

unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation in 50%. Catalase (CAT) activity was determined by the hydrogen peroxide (H_2O_2) decomposition rate, according to Aebi (1984). The values are expressed as mmol of H_2O_2 /minute/mg of protein. The determination of protein sulfhydryl content was based on the reaction with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), according to the method of Askenov and Markesberry (2001), and the results are expressed as nmol of DTNB/mg of protein. The protein content was measured by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (1 mg/ml) as a standard. All the assays were performed in triplicate.

2.8 Statistical analysis

All the values are presented as the mean and the standard error of the mean (S.E.M). The data from the behavioral, anticonvulsant and neuroprotective evaluations were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test. Qui-square test was used to compare the frequency of animals seizing between groups. For the analysis of the polyphenol content of organic and conventional yerba mate infusions, a statistical *T* test was performed for independent samples. The results were considered significant at $p \leq 0.05$. The data were evaluated using the SPSS 18.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results

3.1 Total phenolic content and identification of selected phenolics by HPLC

Two different samples of *Ilex paraguariensis* from Brazil were studied, one claimed to be "ecological", cultivated without the use of agrochemical applications, and the other sample was conventionally cultivated, in which the use of agrochemicals and fungicides is allowed. Both yerba mate infusions presented similar total polyphenolic content (322.0 ± 4.24 CAE mg/100g of dry weight for the organic sample and 319.0 ± 7.07 CAE mg/100g of dry weight for the conventional sample). The presence of rutin (Figure 1), chlorogenic acid and their acyl derivatives (Figure 1 and 2) were found in both infusions of yerba mate. Besides the

polyphenols, it was possible to identify, as described by Vasquez and Moyna (1986), the presence of the alkaloid caffeine in both yerba mate infusions (Figure 2).

3.2 Behavioral and anticonvulsant effects of yerba mate

The behavioral effects of administration of the organic and conventional yerba mate are shown in Figure 3 (A, B, C, D and E). No significant differences were found in the behavioral parameters (latency to start locomotion, total crossings, rearings, grooming and fecal bolus) between the animals treated with yerba mate and the control group (distilled water). These findings show that yerba mate infusions have no excitatory or inhibitory profile in the CNS of Wistar rats.

Figure 4 (A, B, C and D) shows the effects of administration of organic and conventional yerba mate to the rats treated with PTZ. Pentylenetetrazol induced the first seizure at 90.00 ± 4.17 seconds, and all the animals studied showed generalized convulsions with intense status epilepticus. The administration of PTZ induced 50% mortality in rats. Both organic and conventional yerba mate infusions were able to reduce the frequency of seizures when compared to the PTZ group (qui-square test; $p=0.020$ and $p=0.045$, respectively). No changes in the latency time for the first seizure (Figure 4 A) and in the total seizure time (Figure 4 C) were observed for both organic and conventional yerba mate treatments. However, organic and conventional yerba mate infusions were able to decrease the tonic-clonic seizures total time in relation to the PTZ group (Figure 4 B), but only the data for organic yerba mate showed a statistically significant difference. In addition, both yerba mate infusions showed a decrease in the intensity of seizures, although without a significant difference (level 5 on the Racine Scale; Figure 4 D).

3.3 Neuroprotective effects of yerba mate

The effects of treatments with organic and conventional yerba mate infusions in the cerebellum, cerebral cortex and hippocampus of the rats during seizures induced by PTZ are

presented in Tables 1, 2 and 3, respectively. In all the brain structures, PTZ administration induced a significant increase in lipid peroxidation, protein oxidative damage and nitric oxide levels with respect to the control group. In addition, the sulphydryl protein content and the SOD and CAT activities significantly decreased in the PTZ group, showing depletion in the antioxidant systems.

Neither the organic nor conventional yerba mate alone was able to induce oxidative damage to lipids and proteins or to increase the nitric oxide levels. Furthermore, the treatments with both yerba mate infusions were able to maintain or increase the SOD and CAT activities and the sulphydryl protein content in all the CNS tissues when compared with the control group (Tables 1, 2 and 3).

The organic and conventional yerba mate treatments were able to prevent lipid and protein oxidative damage and the increase in nitric oxide levels induced by PTZ in all the brain structures. In addition, these infusions did not decrease the SOD and CAT activities or the sulphydryl protein content induced by PTZ in the brain tissues assayed (Tables 1, 2 and 3).

4. Discussion

In recent years, the benefits of the consumption of yerba mate, a plant widely consumed in South America, have been extensively studied (Schinella *et al.*, 2000; Filip and Ferraro, 2003; Deladino *et al.*, 2007). Nevertheless, this is the first study investigating the anticonvulsant, behavioral and neuroprotective effects of organic and conventional yerba mate. The polyphenolic content of both types of yerba mate was also evaluated.

Although some studies showed that organic farming could increase the synthesis of phenolic compounds in grapes (Dani *et al.*, 2007), marionberries (Asami *et al.*, 2003), peaches and pears (Carbonaro *et al.*, 2002), our data show that organic and conventional yerba mate infusions did not display significant differences in their total polyphenolic content. Similar results have been found for organic and conventional cultivars of strawberries (Hakkinen and

Torronen, 2000), tomatoes (Juroszec *et al.*, 2009), carrots, onions and potatoes (Soltoft *et al.*, 2010). In fact, it has already been shown that more than the use of fertilizers and/or fungicides, other factors, such as the harvest season and the age of the plants, are even more important than the cultivation system in regulating the biosynthesis of phenolic compounds (Juroszec *et al.*, 2009). For yerba mate, the industrial technology used to obtain the commercial product is of paramount importance with respect to the final quality of the product. The temperature used to inactivate enzymes, the leaf and the final particle size could greatly influence the content of secondary metabolites, particularly the polyphenols.

In addition to the polyphenols rutin, chlorogenic acid and their acyl derivatives, both infusions contained the alkaloid caffeine, which is a dose-dependent psychomotor stimulant agent (Garrett and Holtzman, 1994; Bedingfield *et al.*, 1998). In our study, the yerba mate infusions did not alter the behavioral parameters of the treated rats (Figure 3 A-E) and did not induce convulsions. Considering that yerba mate contains around 1% caffeine (Heck and Mejia, 2007) and that a typical infusion obtained under the conditions when mate is drunk has 0.56% caffeine (Vasquez and Moyna, 1986), the concentrations of this xanthine administered to the rats in each treatment is around 2 mg/kg. It has already been shown that caffeine concentrations below 10 mg/kg do not alter rat locomotor activity in a variety of behavior test paradigms (Cohen *et al.*, 1991; Antoniou *et al.*, 1998; Liu and Jernigan, 2011).

To study the possible anticonvulsant effects of yerba mate infusions, a PTZ model was chosen. This drug is able to induce myoclonic and/or tonic-clonic seizures, the most intense kind of convulsions (Löscher and Fiedler, 1996; Smith *et al.*, 2007). In this study, a concentration of 60 mg/kg (i.p.) of PTZ was used, which is between 50% of the effective dose (33 mg/kg) and the median of the effective lethal dose (75 mg/kg) (Löscher and Fiedler, 1996). Both organic and conventional yerba mate pretreatment was able to significantly reduce the frequency of seizure when compared to the PTZ group. It was observed, also, that

organic yerba mate infusion markedly decreases the tonic-clonic seizures total time compared to the PTZ group (Figure 4 B). Moreover, although this effect was not statistically significant, organic and conventional yerba mate infusions showed a decrease in the intensity of seizures (Figure 4 D). It has already been shown that some polyphenols are able to bind inhibitory GABA sites, increase GABAergic activity and show an anticonvulsant effect in animal models of epilepsy (Nassiri-Asl *et al.*, 2008).

Nassiri-Asl *et al.* (2010) investigated the effect of rutin on the development of PTZ-induced kindling in rats and showed that pretreatment with 50 and 100 mg/kg rutin attenuated seizure severity from the beginning of the kindling procedure by lowering the mean seizure stage. Moreover, it appears that the effects of rutin at higher doses are more significant. Because we used a yerba mate infusion that yielded lower concentrations of rutin, it is possible that the necessary dose was not achieved to observe a significant reduction in all the seizure parameters evaluated (Figure 4 A, C and D). In addition, it is important to take into consideration that other compounds present in yerba mate infusions may have influenced the results obtained in this study. Moreover, the exact mechanism of the anticonvulsive action of antioxidants is not fully elucidated. Some antioxidants (Nassiri *et al.*, 2010; Arzi *et al.*, 2011; Golechha *et al.*, 2011) showed a dose-response effect in animal models of epilepsy. On the other hand, ascorbic acid presented a biphasic effect in reducing the convulsions induced by PTZ in rats, with no relation between the dose and the anticonvulsive effects observed (Schneider Oliveira *et al.*, 2004).

Epilepsy is a chronic disorder characterized by recurrent and spontaneous seizures that can increase the content of ROS in the brain (Sudha *et al.*, 2001), which can have deleterious effects on the CNS. The brain is especially susceptible to oxidative damage due to the presence of high levels of polyunsaturated fatty acids, the high rate of oxidative metabolism and lower levels of antioxidant defenses (Hayashi, 2009). This imbalance between the oxidant

and antioxidant defenses may increase the risk of brain oxidative damage (Costello and Delanty, 2004). Currently, despite the existence of a large number of antiepileptic drugs, there is no cure and treatment options are limited (López-Hernández *et al.*, 2005). In addition, it has already been shown that patients receiving antiepileptic drugs have an increase in ROS and a reduced activity of serum antioxidant enzymes (Hamed *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2006).

In this study, it was observed that pretreatment with both organic and conventional yerba mate infusions is able to reduce the protein and lipid oxidative damage induced by PTZ in brain structures (cerebellum, cerebral cortex and hippocampus; Tables 1, 2 and 3, respectively). Oxidative damage to proteins is involved in several events, such as a loss in specific protein function, abnormal protein clearance, depletion of the cellular redox-balance and interference with the cell cycle, and ultimately, neuronal death (Castegna *et al.*, 2002). PTZ treatment also produces an increase in the concentration of nitric oxide (Naziroglu *et al.*, 2009) and its metabolites, nitrite and nitrate (Santos *et al.*, 2009), with the consequent generation of lipid oxidative damage (Militão *et al.*, 2010; Tomé *et al.*, 2010). The current study showed that both yerba mate infusions were able to avoid the increase in the nitric oxide levels induced by PTZ in all the CNS tissues assayed (Tables 1, 2 and 3). An excess of NO may become neurotoxic (Bolanos *et al.*, 1997) and can cause dysfunction of cellular energetics or compromise the integrity of the blood-brain barrier, events that initiate or promote the progress of various neurological diseases (Ibragic *et al.*, 2011).

Antioxidant enzymes, such as SOD and CAT can counteract ROS and represent the first line of defense against oxidative injury. SOD catalyzes the dismutation of the superoxide radical, producing H₂O₂, which can be eliminated by the action of the CAT enzyme. Both the organic and conventional yerba mate infusions were able to avoid the enzymatic and non-enzymatic decreases in antioxidant defenses induced by PTZ in all the CNS tissues studied (Tables 1, 2 and 3). Antioxidant enzymes and non-enzymatic defenses (sulphydryl protein

content) play important roles in the brain's cellular defense against oxidative damage and are able to lower the risk of some neurological disorders (Halliwell and Gutteridge, 2007). Furthermore, it has been reported that *Ilex paraguariensis* may cause a vasodilatory effect (Görgen *et al.*, 2007), increasing the blood flow and consequently contributing for the prevention of the damage induced by PTZ in brain.

Yerba mate is rich in polyphenols (Figures 1 and 2), which are important natural antioxidants. Phenolic compounds can prevent the generation of ROS by chelating trace elements involved in radical production, scavenging reactive species and regulating or protecting antioxidant defenses (Halliwell and Gutteridge, 2007). Polyphenols have been proposed to be useful in reducing oxidative neuronal death (Gottlieb *et al.*, 2006) and preventing neurodegenerative diseases in animal models (Mandel and Youdim, 2004; Spencer, 2010). However, it is known that polyphenols uptake into the brain animals are limited. Data from studies indicated that these compounds are usually accumulated at levels below 1 nmol/g tissue in CNS. Based on this knowledge, other possible explanations for polyphenols effects could be their ability to act on the neurotransmitter re-uptake mechanisms and on cellular signaling pathways (for review, see Schaffer and Halliwell, 2012).

The present study demonstrates a neuroprotective role for yerba mate infusion in preventing the oxidative damage induced by PTZ in all the brain tissues assayed, which is important because the cerebral cortex and the hippocampus are regions associated with cognition and feedback stress control, whereas the cerebellum is concerned with motor function (Merrill *et al.*, 2001). These brain regions may be particularly vulnerable to oxidative stress, and this damage could be implicated in a variety of neurological pathologies, including neurodegenerative diseases (Turner and Schapira, 2001).

In conclusion, this study showed, for the first time, that organic and conventional yerba mate treatments were able to reduce the frequency of PTZ-induced seizures in Wistar rats.

Besides, organic yerba mate infusion showed a decrease in the tonic-clonic convulsions time. Both organic and conventional yerba mate treatments are able to protect the cerebellum, cerebral cortex and hippocampus from the oxidative damage induced by PTZ. In addition, our findings demonstrate that the administration of yerba mate infusions did not have stimulatory or depressive effects on the CNS of the animals. These results indicate that yerba mate will provide further insights for natural neuroprotective compounds and may lead to the development of therapeutic approaches in the pharmaceutical area for patients with epilepsy. Furthermore, considering the possible differences among yerba mate originating from different regions, it would be interesting to study products from different localities. Finally, studies examining isolated compounds of yerba mate could help to elucidate the main bioactive compounds.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Fundação de Amparo à Pesquisa no Rio Grande do Sul (FAPERGS) for their financial support. The authors would like to thank José Inácio Gonzalez Solari for his contributions to the treatment of the animals.

REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol. 105, 121-126.
- Antoniou, K., Kafetzopoulos, E., Papadopoulou-Daifoti, Z., Hyphantis, T., Marselos, M., 1998. D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. Neurosci. Biobehav. Res. 23, 189-196.
- Arzi, A., Ahamehe, M., Sarahroodi, S., 2011. Effect of hydroalcoholic extract of *Lavandula officinalis* on nicotine-induced convulsion in mice. Pak. J. Biol. Sci. 11, 634-40.
- Asami, D.K., Hong, Y., Barret, D.M., Mitchell, A.E., 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. J. Agric.

- Food Chem. 51, 1237-1241.
- Askenov, M.Y., Markesberry, W.R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. Neurosci. Lett. 302, 141-145.
- Bannister, J.V., Calabrese, L., 1987. Assays for Sod. Methods Biochem. Anal. 32, 279-312.
- Bedingfield, J.B., King, D.A., Holloway, F.A., 1998. Cocaine and caffeine: conditioned place preference, locomotor activity, and additivity. Pharmacol. Biochem. Behav. 61, 291-296.
- Biervert, C., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Berkovic, S.F., Propping, P., Jentsch, T.J., Steinlein, O.K., 1998. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. Science. 279, 403–406.
- Bolanos, J.P., Almeida, A., Stewart, V., Peuchen, S., Land, J.M., Clark, J.B., Heales, S.J.R., 1997. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. J. Neurochem. 68 (6): 2227-2240.
- Brancesco, N., Sanchez, A.G., Contreras, V., Menini, T., Gucliucci, A., 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. J. Ethnopharmacol. 136, 378-384.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-54.
- Carbonaro, M., Mattera, M., Nicoli, S., Bergamo, P., Capelloni, M. 2002. Modulation of antioxidant compounds in organic vs conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and pear, *Pyrus communis* L.). Food Chem. 19, 5458-62.
- Castegna, A., Aksenov, M., Thongboonkerd, V., Klein, J. B., Pierce, W.M., Booze, R., Markesberry, W.R., Butterfield, D.A., 2002. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, a-enolase and heat shock cognate 7. J. Neurochem. 82, 1524-1532.
- Cohen, C., Welzl, H., Batting, K., 1991. Effects of nicotine, caffeine, and their combination on locomotor activity in rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 40, 121-123.
- Costello, D.J., Delanty, N., 2004. Oxidative injury in epilepsy: potential for antioxidant therapy? Exp. Ver. Neurother. 3, 541-553.
- Dani, C., Oliboni, L.S., Vanderline, R., Bonatto, D., Salvador, M., Henriques, J.A., 2007. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally- produced grapes. Food Chem. Toxicol. 45, 2574–2580.
- Deladino, L., Anbinder, P.S., Navarro, A.S., Martino, M.N., 2007. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. Carbohyd. Polym. 71, 126-134.
- Engelborghs, S., D'Hooge, R., De Deyn, P.P., 2000. Pathophysiology of epilepsy. Acta Neurol.

Belg. 100, 201-213.

- Filip, R., Ferraro, G.E., 2003. Researching on new species of "Mate": *Ilex brevicuspis*: phytochemical and pharmacology study. Eur. J. Nutr. 42, 50-54.
- Garrett, B.E., Holtzman, S.G., 1994. D₁ and D₂ dopamine receptor antagonists block caffeine-induced simulation of locomotor activity in rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 47, 89-94.
- Golechha, M., Chaudhry, U., Bhatia, J., Saluja, D., Arya, D. S., 2011. Naringin protects against kainic acid-induced status epilepticus in rats. Evidence for an antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective intervention. Biol. Pharm. Bull. 3, 360-365.
- Görgen, M., Turatti, K., Medeiros, A.R., Buffon, A., Bonan, C.D., Sarkis, J.J., Pereira, G.S., 2005. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* decreases nucleotide hydrolysis in rat blood serum. J. Ethnopharmacol. 10, 73-7.
- Gottlieb, M., Leal-Campanario, R., Campos-Esparza, M.R., Sánchez-Gómez, M.V., Alberdi, E., Arranz, A., Delgado-García, J.M., Gruart, A., Matute, C., 2006. Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. Neurobiol. Dis. 23, 374-386.
- Green, L.C. Tannenbaum, S.R. Goldman, P., 1981. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. Science. 212, 56-58.
- Hakkinen, S.H., Torronen, A.R., 2000. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and Vaccinium species: influence of cultivar, cultivation site and technique. Food Res. Int. 33, 517-524.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. Free Radicals in Biology and Medicine, third ed. Oxford, New York.
- Hamed, S.A., Abdellah, M.M., El-Melegy, N., 2004. Blood levels of trace elements, electrolytes, and oxidative stress/antioxidant systems in epileptic patients. J. Pharmacol. Sci. 96, 465-473.
- Hayashi, M., 2009. Oxidative stress in developmental brain disorders. Neuropathology. 29, 1-8.
- Heck, C., Mejia, D.E., 2007. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. J. Food Sci. 7, 138-151.
- Huang, R.Q., Bell-Horner, C.L., Dibas, M.L., Covey, D.F., Drewe, J.A., Dillon, G.H., 2001. Pentylenetetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A))receptors: mechanism and site of action. J. Pharmacol. Exp. Ther. 298, 986-995.
- Ibragic, S., Sofic, E., Suljic, E., Avdagic, N., Bajraktarevic, A., Tahirovic, I., 2011. Serum

- nitric oxide concentrations in patients with multiple sclerosis and patients with epilepsy. J. Neural Transm. July, 21 [Epub ahead of print].
- Ilhan, A., Aladag, M. A., Kocer, A., Boluk A., Gurel A., Armutcu F., 2005. Erdosteine ameliorates PTZ-induced oxidative stress in mice seizure model. Brain Res. Bull. 65, 495-499.
- Johnston, M.V., 1997. Neurotransmitters and Epilepsy. In: The Treatment of Epilepsy: Principles and Practice. Wyllie E (Ed.). Williams & Wilkins, MD, USA, 122-138.
- Juroszec, P., Lumpkin, H.M., Yang, R.Y., Ledesma, D.R., Ma, C., 2009. Fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity of tomatoes grown on-farm: comparison of organic and conventional management systems. J. Agric. Food Chem. 57, 1188-1194.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 186, 464-478.
- Liu, X., Jernigan, C., 2011. Effects of caffeine on persistence and reinstatement of nicotine-seeking behavior in rats: interaction with nicotine-associated cues. Psychopharmacology. 1-10.
- Lombardi-Boccia, G., Lucarini, M., Aguzzi, A., Capelloni, M., 2004. Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: a comparative study. J. Agric. Food Chem. 52, 90-94.
- López-Hernandez, E., Bravo, J., Solís, H. 2005. Epilepsia y antiepilepticos de primera y segunda generación. Aspectos básicos útiles em la práctica clínica. Rev. Fac. Med. 5, 201-209.
- Löscher, V., Fiedler, K., 1996. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. VI. Seasonal influences on maximal electroshock and pentylenetetrazol seizure thresholds. Epilepsy Res. 25, 3-10.
- Mandel, S., Youdim, M., 2004. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative disease. Free Radic. Biol. Med. 3, 304-317.
- Merrill, D.A., Chiba, A.A., Tuszyński, M.H., 2001. Conservation of neuronal number and size in the entorhinal cortex of behaviorally characterized aged rats. J. Comp. Neurol. 438, 445-456.
- Militão, G.C., Ferreira, P.M., Freitas, R.M., 2010. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. Neurochem. Int. 1, 16-20.
- Miranda, D.D.C., Arçari, D.P., Pedrazzoli, Jr.J., Carvalho, P.O., Cerutti, S.M., Bastos, D.H.M., Ribeiro, M.L., 2008. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. Mutagenesis. 4, 261-265.

- Nassiri-Asl, M., Shariati-Rad, S., Zamansoltani, F., 2008. Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 32, 989-993.
- Nassiri-Asl, M., Mortazavi, S.R., Samiee-Rad, F., Zangivand, A.A., Safdari, F., Saroukhani, S., Abbasi, E., 2010. The effects of rutin on the development of pentylenetetrazole kindling and memory retrieval in rats. *Epilepsy Behav.* 18, 50-53.
- Naziroglu, M., Kutluhan, S., Uguz, A.C., Celik, O., Bal, R., Butterworth, P.J., 2009. Topiramate and vitamin e modulate the electroencephalographic records, brain microsomal and blood antioxidant redox system in pentylenetetrazol-induced seizure of rats. *J. Membr. Biol.* 3,131-40.
- Obay, B.D., Tasdemir, E., Tümer, C., Bilgin, H.M., Atmaca, M., 2008. Dose dependent effects of ghrelin on pentylenetetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides.* 29, 448-455.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Georgiou, C.D., Angelatou, F., Matsokis, N.A., Panagopoulos, N.T., 2004. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on thiol redox state in the mouse cerebral cortex. *Epilepsy Res.* 62, 65-74.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 14, 149-167.
- Racine, R.J., 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32, 281-294.
- Santos, I.M.S., Tomé, A.R., Saldanha, G.B., Ferreira, P.M.P., Militão, G.C.G., Freitas, R.M., 2009. Oxidative stress in the hippocampus during experimental seizures can be ameriolate with the antioxidant ascorbic acid. *Oxid. Med. Cell Longev.* 4, 214-221.
- Schaffer, S., Halliwell, B., 2012. Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. *Genes Nutr.* 2, 99-109.
- Schneider Oliveira, M., Flávia Furian, A., Freire Royes, L.F., Rechia Fighera, M., de Carvalho Myskiw, J., GindriFiorenza, N., Mello, C.F., 2004. Ascorbate modulates pentylenetetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience.* 128, 721-8.
- Schinella, G.R., Troiani, G., Davila, V., de Buschiazzo, P.M., Tournier, H.A., 2000. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 357-360.
- Sharma, V., Nehru, B., Munshi, A., Jyothy, A., 2010. Antioxidant potential of curcumin against oxidative insult induced by pentylenetetrazol in epileptic rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 32, 227-232.
- Silva, M.I.G., Silva, M.A.G., Neto, M.R.A., Moura, B.A., Sousa, H.L., Lavor, E.P.H.,

- Vasconcelos, P.F., Macedo, D.S., Sousa, D.P., Vasconcelos, S.M.M., Sousa, F.C.L., 2009. Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. *Fitoterapia*. 8, 506-513.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
- Smith, M., Wilcox, K.S., White, H.S., 2007. Discovery of antiepileptic drugs. *Neurotherapeutics. J. Am. Soc. Exp. Therap.* 4, 12-17.
- Soltoft, M., Nielsen, J., Laursen, H.K., Husted, S., Halekoh, U., Knuthsen, P., 2010. Effects of organic and conventional growth systems on the content of flavor onions and phenolic acids in carrots and potatoes. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10323-9.
- Spencer, J.P.O., 2010. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *B. J. Nutrition.* 104, 41-47.
- Sudha, K., Ashalatha, V.R., Anjali, R., 2001. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clin. Chim. Acta.* 303, 19-24.
- Sun, X.Y., Wei, C.X., Deng, X.Q., Sun, Z.G., Quan, Z.S., 2010. Evaluation of the anticonvulsant activity of 6-(4-chlorophenoxy)-tetrazolo[5,1-a]phthalazine in various experimental seizure models in mice. *Pharmacol. Rep.* 2, 273-277.
- Thomas, K., Chang, H., Abott, F.S., 2006. Oxidative stress as a mechanism of valproic acid-associated hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* 38, 627-639.
- Tomé, A.R., Feng, D., Freitas, R.M., 2010. The effects of alpha-tocopherol on hippocampal oxidative stress prior to in pilocarpine-induced seizures. *Neurochem. Res.* 35, 580-587.
- Turner, C., Schapira, A.H. 2001. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders and ageing. *Adv. Exp. Med. Biol.* 487, 229-251.
- Vázquez, A., Moyna, P. 1986. Studies on mate drinking. *J. Ethnopharmacol.* 18, 267-272.
- Wills, E.D., 1966. Mechanism of lipid peroxidation formation in animal tissues. *Biochem. J.* 3, 667-676.
- World Health Organization (WHO), 2011. Health topics: Epilepsy. Find in: [≤http://www.who.int/topics/epilepsy/en>](http://www.who.int/topics/epilepsy/en) Accessed: July, 2011.

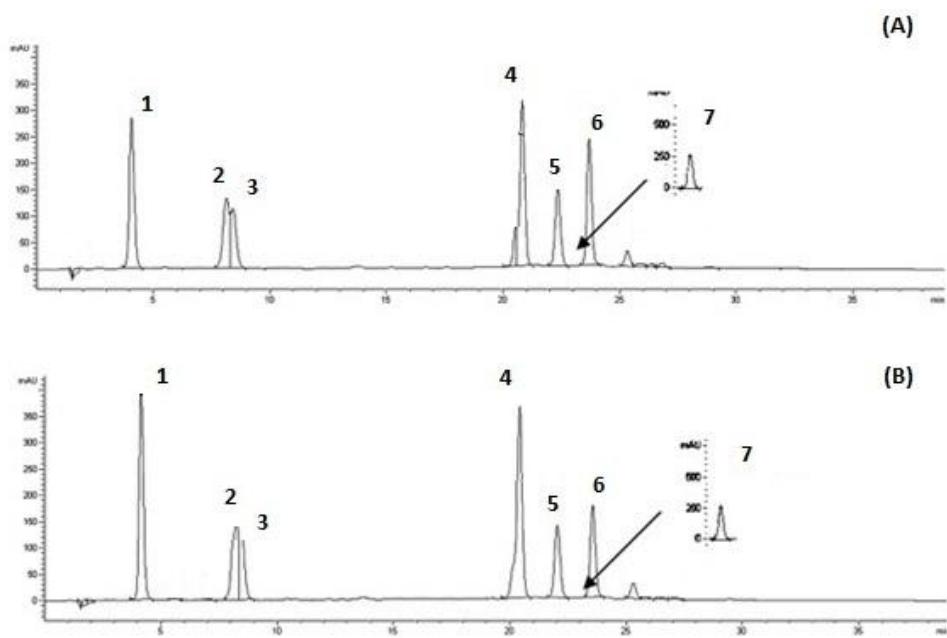


Figure 1. Chromatographic (HPLC-DAD) profile at 355 nm of both yerba mate infusions. The upper trace shows the organically cultivated sample (A), the lower trace shows the conventionally cultivated sample (B).
Legend: (1) chlorogenic acid; (2-6) acyl derivatives of chlorogenic acid; (7) rutin.

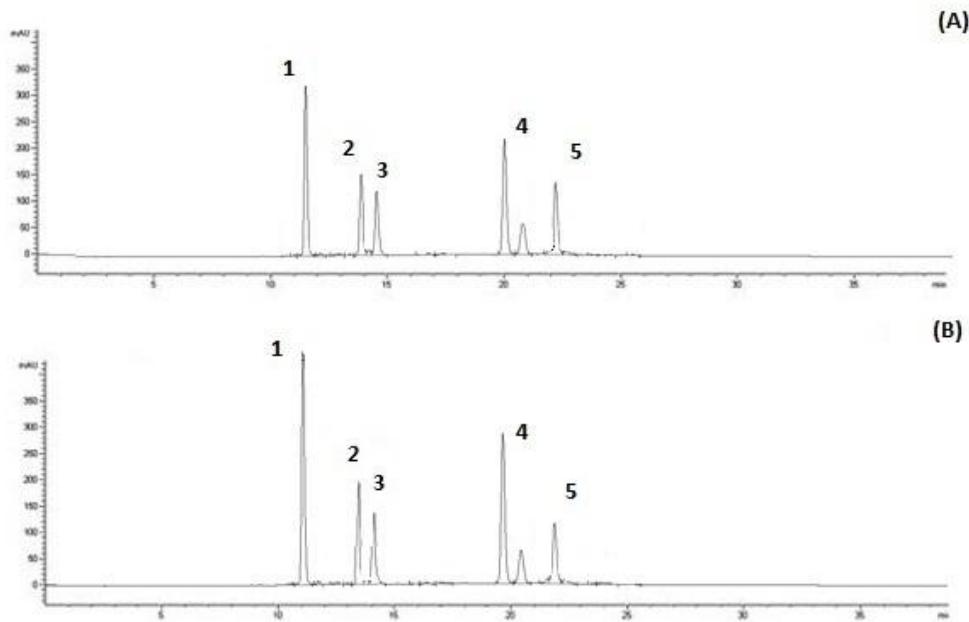


Figure 2. Chromatographic (HPLC-DAD) profile at 325 nm of both yerba mate infusions. The upper trace shows the organically cultivated sample (A), and the lower trace shows the conventionally cultivated sample (B).
Legend: (1) caffeine; (2-5) acyl derivatives of chlorogenic acid.

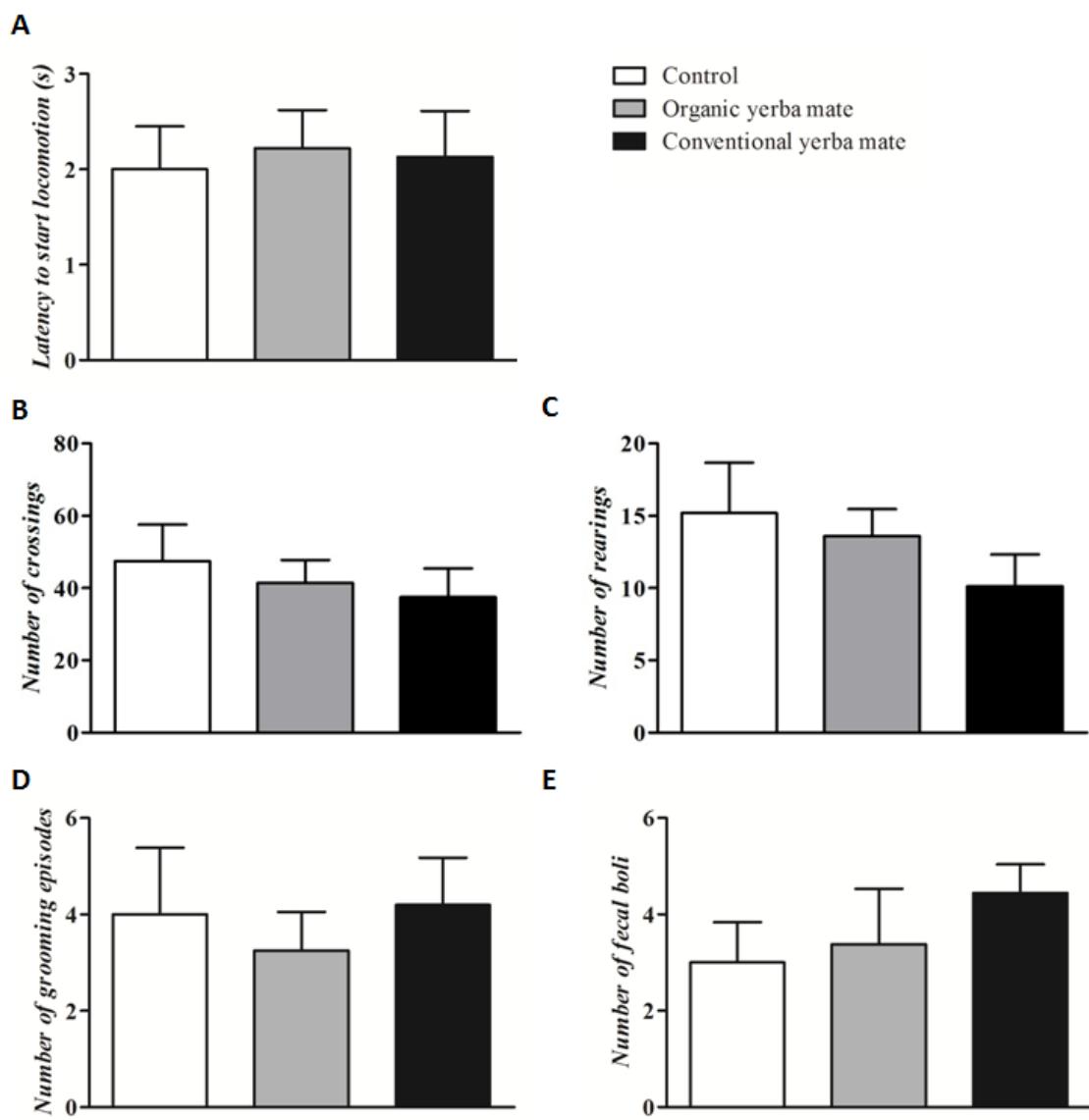


Figure 3. Effects of treatment with organic and conventional yerba mate infusions (*Ilex paraguariensis*) on behaviors in the open field test. (A) The latency to start locomotion, (B) the number of crossings, (C) the number of rearings, (D) the number of grooming episodes and (E) number of fecal boli are shown. The data are expressed as the mean \pm S.E.M.

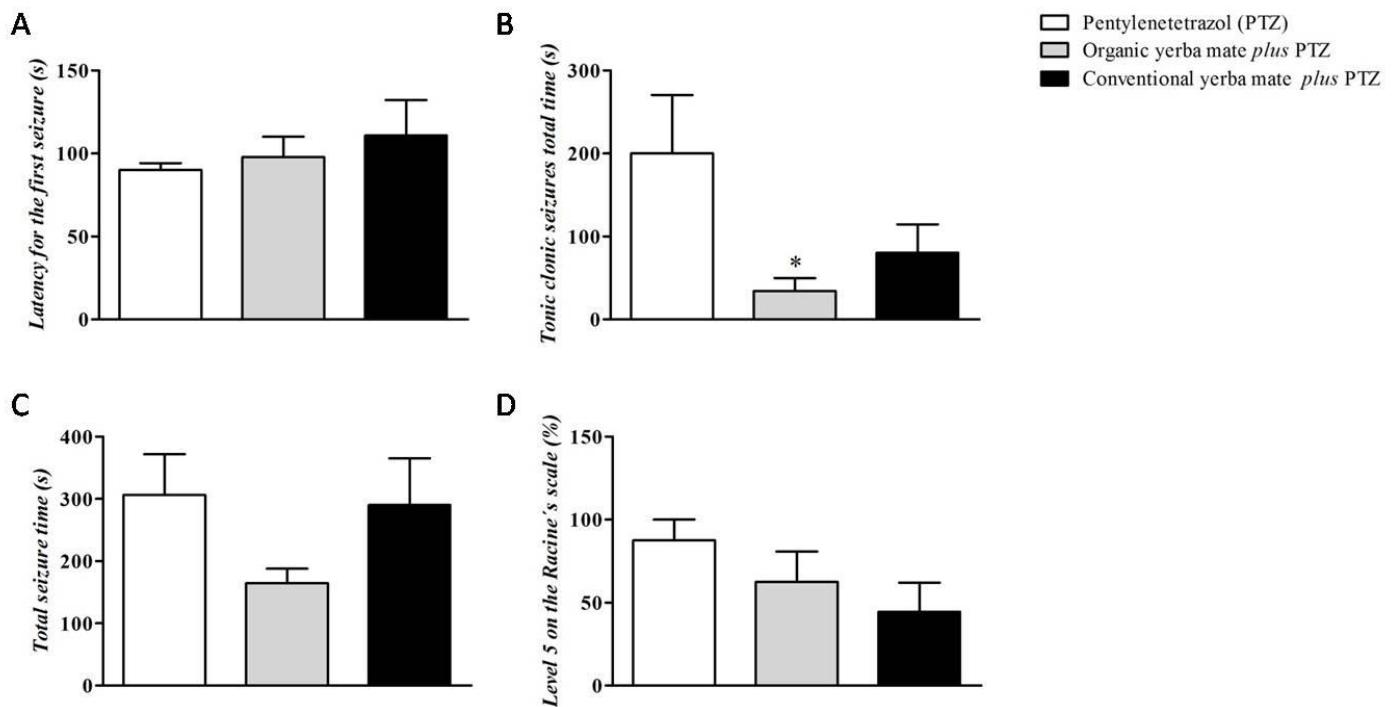


Figure 4. Effects of treatment with organic and conventional yerba mate infusions (*Ilex paraguariensis*) on PTZ-induced seizures in Wistar rats for: (A) the latency for the first seizure; (B) the total seizure time; (C) the tonic-clonic seizures total time; (D) level 5 on Racine's scale. The data are expressed as the mean \pm S.E.M. * Indicates a significant difference compared with the PTZ group using an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test ($p \leq 0.05$).

GROUPS	TBARS (nmol TBARS/mg of protein)	Carbonyl protein (nmol/mg of protein)	Nitric oxide (nM nitrite/mg of protein)	Sulphydryl protein (nmol DTNB/mg of protein)	Superoxide dismutase (U SOD/mg of protein)	Catalase (mmol H ₂ O ₂ /min/ mg of protein)
Control (saline)	0.33 ± 0.06 ^{*a}	3.20 ± 0.15 ^a	0.99 ± 0.08 ^a	0.29 ± 0.02 ^a	28.81 ± 0.44 ^a	12.20 ± 0.22 ^a
Pentylenetetrazol (PTZ)	1.87 ± 0.05 ^b	8.44 ± 0.02 ^b	4.72 ± 0.13 ^b	0.09 ± 0.01 ^b	15.50 ± 0.48 ^b	4.86 ± 0.01 ^b
Organic yerba mate	0.28 ± 0.04 ^a	3.32 ± 0.29 ^a	1.13 ± 0.04 ^a	0.31 ± 0.02 ^a	33.52 ± 0.84 ^d	13.40 ± 0.83 ^a
Organic yerba mate plus PTZ	0.34 ± 0.01 ^a	3.69 ± 0.39 ^a	2.73 ± 0.48 ^c	0.33 ± 0.01 ^a	32.03 ± 0.43 ^d	7.10 ± 0.35 ^c
Conventional yerba mate	0.32 ± 0.01 ^a	2.87 ± 0.31 ^a	1.16 ± 0.04 ^a	0.28 ± 0.04 ^a	24.79 ± 0.82 ^c	12.00 ± 0.50 ^a
Conventional yerba mate plus PTZ	0.35 ± 0.02 ^a	2.31 ± 0.14 ^c	2.65 ± 0.17 ^c	0.31 ± 0.01 ^a	22.97 ± 0.96 ^c	8.80 ± 0.23 ^c

Table 1: Determination of the thiobarbituric acid reactive substances, carbonyl protein, nitric oxide production, sulphydryl protein, and superoxide dismutase and catalase activities on the cerebellum of rats treated with organic and conventional yerba mate (50 mg/kg) for PTZ-induced seizures. * The data are presented as the mean ± S.E.M. values. Different letters indicate a significant difference according to an analysis of variance and Tukey's post-hoc test ($P<0.05$) for each parameter evaluated.

GROUPS	TBARS (nmol TBARS/mg of protein)	Carbonyl protein (nmol/mg of protein)	Nitric oxide (nM nitrite/mg of protein)	Sulphydryl protein (nmol DTNB/mg of protein)	Superoxide dismutase (U SOD/mg of protein)	Catalase (mmol H ₂ O ₂ /min/ mg of protein)
Control (saline)	1.19 ± 0.22 ^{*a}	2.59 ± 0.27 ^a	0.41 ± 0.03 ^a	0.31 ± 0.04 ^a	43.53 ± 1.05 ^a	11.40 ± 0.15 ^a
Pentylenetetrazol (PTZ)	3.23 ± 0.19 ^b	6.15 ± 0.02 ^b	2.42 ± 0.27 ^b	0.15 ± 0.01 ^b	22.71 ± 1.99 ^b	4.36 ± 0.04 ^b
Organic yerba mate	0.91 ± 0.04 ^a	2.30 ± 0.11 ^a	0.45 ± 0.04 ^a	0.32 ± 0.02 ^a	50.35 ± 1.19 ^c	10.50 ± 0.25 ^a
Organic yerba mate plus PTZ	1.13 ± 0.15 ^a	2.69 ± 0.24 ^a	1.14 ± 0.10 ^c	0.26 ± 0.04 ^a	42.22 ± 1.22 ^a	7.20 ± 0.25 ^c
Conventional yerba mate	1.00 ± 0.07 ^a	2.36 ± 0.12 ^a	0.50 ± 0.03 ^a	0.27 ± 0.03 ^a	50.83 ± 2.05 ^c	10.90 ± 0.05 ^a
Conventional yerba mate plus PTZ	1.19 ± 0.29 ^a	2.72 ± 0.14 ^a	1.06 ± 0.02 ^{ac}	0.24 ± 0.02 ^a	32.83 ± 0.95 ^d	8.10 ± 0.30 ^c

Table 2: Determination of the thiobarbituric acid reactive substances, carbonyl protein, nitric oxide production, sulphydryl protein, and superoxide dismutase and catalase activities on the cerebral cortex of rats treated with organic and conventional yerba mate (50 mg/kg) for PTZ-induced seizures. *The data are presented as the mean ± S.E.M. values. Different letters indicate a significant difference according to an analysis of variance and Tukey's post-hoc test (P<0.05) for each parameter evaluated.

GROUPS	TBARS (nmol TBARS/mg of protein)	Carbonyl protein (nmol/mg of protein)	Nitric oxide (nM nitrite/mg of protein)	Sulphydryl protein (nmol DTNB/mg of protein)	Superoxide dismutase (U SOD/mg of protein)	Catalase (mmol H ₂ O ₂ /min/ mg of protein)
Control (saline)	1.07 ± 0.10 ^{*a}	1.57 ± 0.19 ^a	1.03 ± 0.04 ^a	0.30 ± 0.03 ^a	23.05 ± 0.37 ^a	9.62 ± 0.35 ^a
Pentylenetetrazol (PTZ)	6.22 ± 0.07 ^b	4.09 ± 0.29 ^b	1.52 ± 0.01 ^b	0.06 ± 0.01 ^b	15.40 ± 0.01 ^b	6.15 ± 0.11 ^b
Organic yerba mate	0.88 ± 0.03 ^c	1.27 ± 0.19 ^a	0.97 ± 0.04 ^a	0.27 ± 0.04 ^a	24.31 ± 0.17 ^a	10.67 ± 0.40 ^c
Organic yerba mate plus PTZ	0.97 ± 0.04 ^{ac}	2.13 ± 0.26 ^c	1.05 ± 0.06 ^a	0.12 ± 0.01 ^c	23.59 ± 0.72 ^a	8.40 ± 0.36 ^a
Conventional yerba mate	0.79 ± 0.06 ^c	0.87 ± 0.07 ^d	1.03 ± 0.03 ^a	0.26 ± 0.01 ^a	23.06 ± 0.14 ^a	10.45 ± 0.35 ^c
Conventional yerba mate plus PTZ	1.13 ± 0.03 ^a	2.09 ± 0.12 ^c	1.17 ± 0.05 ^a	0.11 ± 0.01 ^c	22.96 ± 0.31 ^a	8.68 ± 0.23 ^a

Table 3: Determination of the thiobarbituric acid reactive substances, carbonyl protein, nitric oxide production, sulphydryl protein, and superoxide dismutase and catalase activities on the hippocampus of rats treated with organic and conventional yerba mate (50 mg/kg) for PTZ-induced seizures. *Data are presented as the mean ± S.E.M. values. Different letters indicate a significant difference according to an analysis of variance and Tukey's post-hoc test ($P<0.05$) for each parameter evaluated.

4.2 CAPÍTULO 2

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) prevent PTZ-induced oxidative damage in liver and serum of Wistar rats

Cátia dos Santos Branco^a, Gustavo Scola^a, Adriana Dalpicolli Rodrigues^a, Verónica Cesio^b,
Horacio Heinzen^b, Alessandra Eifler Guerra Godoy^c, Cláudia Funchal^d, Adriana Simon
Coitinho^e and Mirian Salvador^{a*}

^a Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

^bCátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, DQO, Facultad de Química, Universidad
de La República, Montevideo, Uruguay.

^cServiço de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Caxias do Sul, RS,
Brazil.

^dCentro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, RS

^eDepartamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, ICBS, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

***Corresponding author:**

Mirian Salvador, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco
Getúlio Vargas 1130, Caxias do Sul, RS, Brazil, 95070-560. (Fax: 55 54 3218 2664, e-mail:
msalvado@ucs.br)

ABSTRACT

Epilepsy is characterized by recurrent seizures, which can increase the reactive species content and induce deleterious systemic effects. *Ilex paraguariensis* (yerba mate) is a polyphenol-enriched plant with powerful antioxidant activity. The aim of this study was to investigate the possible protective effect of yerba mate in the liver and serum of Wistar rats that were treated with pentylenetetrazol (PTZ), which is a convulsant drug. Animals (n=28) received distilled water (control) or a yerba mate infusion (50 mg/kg of body weight) for fifteen days. Half of the rats of each group received PTZ (60 mg/kg) or saline solution; after 30 minutes, the animals were killed and their livers and serum were collected. The animals that received the yerba mate infusion avoided PTZ-induced oxidative damage in the lipids and proteins, avoided nitric oxide production, and had decreased levels of enzymatic (superoxide dismutase and catalase) and non-enzymatic (sulphydryl protein content) defenses in the liver and serum. Furthermore, a histopathologic evaluation of the liver indicated that yerba mate reduced hepatocellular degeneration, steatosis, inflammation and apoptosis. These findings indicate that *I. paraguariensis* provides hepatic and systemic protection against oxidative damage, which may lead to the development of new therapeutic strategies with natural compounds for epileptic patients.

Keywords

Epilepsy, *Ilex paraguariensis*, yerba mate, antioxidant, oxidative damage

1. Introduction

Epilepsy is one of the most common chronic neurological disorders, as it affects more than 50 million people worldwide (WHO, 2011). It is characterized by the occurrence of spontaneous and recurrent seizures, which can increase the reactive oxygen species (ROS) levels (Sudha *et al.*, 2001; Costello and Delanty, 2004; Hayashi, 2009; Sharma *et al.*, 2010). This increase in ROS levels can induce deleterious systemic effects and increase the incidences of secondary diseases associated with oxidative stress, such as neurodegenerative disorders and cirrhosis (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Antiepileptic drugs, such as phenytoin, phenobarbital and carbamazepine, are the most widely used drugs in the treatment of epilepsy. However, approximately 30% of patients do not respond satisfactorily to pharmacological treatment (Sun *et al.*, 2010). Moreover, the antiepileptic drugs can have a variety of side effects, including detrimental effects on the blood antioxidant system (Yuksel *et al.*, 2000), hematopoietic system toxicity (Kojima *et al.*, 2009), serum lipid peroxidation (Sudha, 2001; Hamed *et al.*, 2004) and hepatotoxicity (Bota *et al.*, 2011).

The liver is one of the most important organs involved in metabolic regulation, and it is especially sensitive to oxidative damage (Seyhan and Canseven, 2006). Prolonged epileptic seizures can produce oxidative stress in the liver (Decell *et al.*, 1994; Dillioglugil *et al.*, 2010). Fulminant hepatic failure is a rare secondary complication of epilepsy, but it presents high mortality rates (Akbas *et al.*, 2005). This physiologic phenomenon appears to be multifactorial and includes the alteration of redox metabolism in hepatocytes (Ichai *et al.*, 2003).

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*, A. Saint Hilaire) is a widely consumed plant in Southern Latin American countries, and it has gained rapid popularity in the world markets, including the United States, Asia and Europe (Heck and Mejia, 2007; Berté *et al.*, 2011). The

leaves of yerba mate are used to prepare different beverages, including “chimarrão” (an infusion of fresh or dried leaves with hot water), “tererê” (an infusion of fresh or dry leaves in cold water) and the mate tea (an infusion of fermented-toasted leaves with hot water) (Miranda *et al.*, 2008). Among these beverages, the “chimarrão” is the most used by South America population, representing 92% of the total consumption (Valduga, 2002). Yerba mate infusions have hypocholesterolemic, vasodilatory and anti-inflammatory properties (for review, see Bracesco *et al.*, 2011) and also present choleretic and intestinal propulsion effects (Martins *et al.*, 2009). The physiological effects of yerba mate have been attributed to bioactive compounds, mainly phenolic acids (chlorogenic acid and its acyl derivatives) and the flavonoid rutin (Deladino, 2007; Heck and Mejia, 2007). In addition, yerba mate infusions have antioxidant activity in both *in vitro* and *in vivo* assays (Bracesco *et al.*, 2011).

The aim of this work was to evaluate the potential of a yerba mate infusion to prevent PTZ-induced oxidative damage in the liver and serum of Wistar rats. To determine the protective effect of yerba mate infusions, the oxidative damage to proteins and lipids, nitric oxide production, and antioxidant defenses (SOD, CAT and sulphydryl protein content–SH) was evaluated.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

The reagents pentylenetetrazole (PTZ), thiobarbituric acid, 2,4-dinitrophenylhydrazine, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), (-)-epinephrine, chlorogenic acid and guanidine hydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The water used in this study was glass-distilled water (distiller QUIMIS®, Quimis Aparelhos Científicos LTDA, Diadema-SP, Ind. Brasileira). All other reagents (Merck and Hexapur) and solvents (Nuclear) were of analytical grade.

2.2 Yerba mate infusion

An *Ilex paraguariensis* infusion was prepared by dissolving 20 g of powdered leaves (commercial sample acquired in the local market) in 100 mL of distilled water at 90°C for 90 seconds, which simulated the traditional use by the general population. After cooling to 25°C, the sample was filtered in Millipore equipment (pore size, 0.45 µm; catalog number SFGS 047LS, Millipore Corp., São Paulo, Brazil). The obtained liquid extract was freeze-dried (Liobras, model L101, Brazil freeze dryer) at 40°C and 10⁻¹ bar and was stored at -20°C. The lyophilized yerba mate sample was solubilized in glass-distilled water immediately before use.

2.3 Animals and treatment

Twenty-eight male Wistar rats (3 months old, weighing 250–300 g) from a breeding colony of the Centro Universitário Metodista (Porto Alegre, Brazil) were used in the experiments. They were maintained at a temperature of 22–24°C, on a 12 h light/12 h dark cycle, with free access to food and water. The number of animals was determined by the statistical F-test MANOVA ($F=3.21$, $\alpha=0.05$, power=90%). The experiments were performed in accordance with the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHEW, publication no. (NIH) 85-23, 1985” and approved by the local ethical committee at Centro Universitário Metodista IPA (439/2009). The animals were randomly allocated to one of the two experimental groups ($n=14$ per group): group 1 served as control and received distilled water and group 2 was given the yerba mate (50 mg/kg of body weight) by oral gavage once a day for 15 days. On day 15, half of the rats of each group ($n=7$) received intraperitoneally (i.p.) a single dose of the convulsant drug PTZ (60 mg/kg of body weight) dissolved in sterile isotonic saline. The other half of the rats of each group (negative control, group 1) received only saline solution (i.p.). After 30 minutes, the animals were euthanized by decapitation, and the blood and liver were collected. Serum samples were obtained from the blood by

centrifugation (5 minutes at 3000 x g). The liver was washed three times with iced 1.5% KCl to remove all of the blood. The liver and serum were stored at -80°C until biochemical analysis. Slices from the liver were used for histopathological analysis. Before each biochemical assay, the liver samples were homogenized in phosphate buffered saline (pH 7.4) using a ground-glass-type Potter-Elvehjem homogenizer and centrifuged for five minutes. The supernatant was used in the assays, and all processes were performed under cold.

2.4 Protective effects of yerba mate in the liver and serum of rats

The oxidative damage to the lipids and proteins, nitric oxide production and the antioxidant enzyme activities (superoxide dismutase and catalase) were analyzed. The protein sulphydryl content was assessed as a non-enzymatic cellular defense. The lipid oxidative damage was determined by a method that was based on the reaction with thiobarbituric acid reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction. This sensitive method is widely adopted for measuring lipid peroxidation, as previously described (Wills, 1966). The results were expressed as nmol of TBARS/mg of protein. The protein oxidative damage was measured by determination of the carbonyl group by a reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), according to Levine *et al.* (1990). DNPH reacts with protein carbonyls to form hydrazones that can be measured spectrophotometrically. The results were expressed as nmol of DNPH/mg of protein.

NO measurements are very difficult to access in biological specimens. Therefore, the Griess reaction was used to determine the tissue nitrites (NO^{-2}) and nitrates (NO^{-3}) as an index of NO production (Ilhan *et al.*, 2005), according to Green (1981). The results were expressed as nmol of nitrite/mg protein.

The superoxide dismutase (SOD) activity was determined according to Bannister and Calabrese (1987), and the results were expressed as USOD/mg of protein. One unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation by 50%.

The catalase (CAT) activity was determined by the hydrogen peroxide (H_2O_2) decomposition rate, according to Aebi (1984). The values were expressed as mmol of H_2O_2 /minute/mg of protein. The protein sulphydryl content was determined by a reaction with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), according to Askenov and Markesbery (2001), and the results were expressed as nmol of DTNB/mg of protein. The protein concentration was measured using the Bradford method (1976), with bovine serum albumin as a standard for the liver tissues and the Total Proteins kit from Labtest (Protein Kit, Labtest Diagnostica S.A., Brazil) for the serum. All assays were performed in triplicate.

2.5 Histopathological analysis of the liver tissues

Seven micrometer thick paraffin sections of buffered formalin-fixed liver samples were stained with hematoxylin-eosin (H&E), according to Gamble (2008), for photomicroscopic observation of the liver histological architecture of the control group and the treated rats.

2.6 Statistical analysis

All the values are presented as the means plus the standard error of mean (S.E.M). The results were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and a Tukey's post-hoc test ($p \leq 0.05$). The data were evaluated using a SPSS 18.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results

In this work, the effects of a yerba mate treatment on the liver and serum of Wistar rats were evaluated in a PTZ-induced seizure model. All the animals that received PTZ presented generalized seizures with an intense epilepticus status. The animals that were administered yerba mate did not show convulsant effects (data not shown). The results showed that the PTZ treatment induced an increase in lipid peroxidation, oxidative damage to protein and nitric oxide production, both in the liver (Table 1) and in the serum (Table 2) of rats. Additionally, the sulphydryl protein content and the activities of SOD and CAT were significantly decreased

in the PTZ group, which indicated depletion of the antioxidant system of the liver (Table 1) and serum (Table 2).

Interestingly, yerba mate administration prevented oxidative damage to the lipids and proteins and prevented the increase in nitric oxide production that is induced by PTZ in the liver and serum of rats (Tables 1 and 2, respectively). In addition, the yerba mate treatment prevented a decrease in the SOD and CAT activities and in the sulphydryl protein content induced by PTZ, both in the liver (Table 1) and serum (Table 2). Yerba mate alone did not induce oxidative damage to the lipids and proteins or increase nitric oxide production. Furthermore, the yerba mate infusion maintained or increased the activities of SOD and CAT and prevented the decrease of the sulphydryl protein content in the liver (Table 1) and serum (Table 2), when compared with the control group.

A morphological evaluation of liver slices showed that the control group had normal characteristics, with the expected glycogen amount and no evidence of suffering (Figure 1 A). Similar findings were observed in the rats treated with the yerba mate infusion (Figure 1 B), which presented normal liver cellular architectures. The PTZ administration induced liver damage, with evidence of hepatocellular degeneration, edema, infiltration of inflammatory cells, steatosis and apoptosis (Figure 1 D, E and F). The yerba mate pretreatment markedly reduced the liver damage caused by PTZ, with no evidence of suffering and the liver cells presented normal hepatocyte architecture (Figure 1 C).

4. Discussion

There is an emerging focus on the oxidative stress resulting from epileptic seizures (Sudha *et al.*, 2001; Liang and Patel, 2004; Obay *et al.*, 2008). Recurrent and prolonged seizures can increase the reactive species levels in the body (Costello and Delanty, 2004), which may result in serious deleterious effects for the epileptic patients. Epilepsy is commonly treated with anticonvulsant drug therapy; however, many patients have no

satisfactory seizure control (Sun *et al.*, 2010). In addition, many antiepileptic drugs can elicit systemic toxicity by the generation of reactive metabolites that can covalently bind to macromolecules, such as proteins or other vital biomolecules (Niketic *et al.*, 1995; Graf *et al.*, 1998; Yuksel *et al.*, 2000).

We investigated the protective effects of yerba mate, which is an important source of polyphenols, in the liver and serum of Wistar rats that were treated with PTZ, which is a drug widely used to simulate seizures (Sahin *et al.*, 2003; Seyhan and Canseven, 2006).

The results demonstrated that yerba mate infusions allow the rats to completely avoid an increase in the lipid and protein oxidative damage and the nitric oxide production that is induced by PTZ, both in the liver (Table 1) and serum (Table 2). Damage to lipids and proteins, as well as high amounts of nitric oxide, affects the cellular redox balance. Increased concentrations of nitric oxide can rapidly cause protein nitration or nitrosylation and lipid peroxidation, leading to cell death (Hoeldtke, 2003; Radi, 2004).

High doses of instant mate tea can reduce the oxidative damage to lipids in the liver and serum of Swiss rats (Martins *et al.*, 2009), and the blood of healthy women (Matsumoto and Bastos, 2009). However, this is the first study using a yerba mate infusion (chimarrão), which is the most commonly consumed form of yerba mate by the population.

Yerba mate infusions prevented the decrease of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in the liver (Table 1) and serum (Table 2) of rats. Antioxidant enzymes (SOD and CAT) and non-enzymatic defenses (sulphydryl protein content -SH) play an important role in cellular defense against oxidative damage and they are able to minimize the risk of various systemic diseases, such as neurodegenerative disorders, atherosclerosis and cirrhosis (Halliwell and Gutteridge, 2007). Superoxide dismutase catalyzes the dismutation of superoxide anions by producing H₂O₂, which can be eliminated by the action of the CAT

enzyme. These enzymes play a crucial role in the antioxidant defense system as they are responsible for protection against increased ROS production (Naziroglu *et al.*, 2009).

This protective effect was also shown in a histopathological study, which demonstrated, for the first time, that rats treated with the yerba mate infusion avoided PTZ-induced liver damage (Figure 1 C). These results suggest that *Ilex paraguariensis* could accelerate the regeneration of liver cells and thus protect against hepatocyte fragility.

Polyphenols are important natural antioxidants that can prevent the generation of ROS, chelate trace elements involved in radical production, scavenge reactive species and regulate or protect antioxidant defenses (Halliwell and Gutteridge, 2007). Previous results of our group showed that yerba mate infusions have high levels of phenolic compounds (319.0 ± 7.07 chlorogenic acid equivalents), including rutin, chlorogenic acid and their acyl derivatives (unpublished data). Caffeoylquinic acids have been described as the main constituents of yerba mate infusions, in addition to caffeic acid and small amounts of flavonols (mainly kaempferol and rutin derivatives). Chlorogenic acid and rutin are potent antioxidants and may act as hydrogen or electron donors, as well as transition metal ion chelators (Schinella *et al.*, 2000). The presence of these compounds in yerba mate infusions could explain, at least in part, the protective effects observed in this work.

Seizures produce oxidative stress in the liver (Akbas *et al.*, 2005), thus increasing the susceptibility to fulminant hepatic failure, which is a rare complication that can lead to death (Decell *et al.*, 1994; Ichai *et al.*, 2003). In addition, epileptic patients have an increased generation of free radicals and a reduced activity of the antioxidant defense mechanisms in the serum (Sudha *et al.*, 2001; Hamed *et al.*, 2004).

In this work, we demonstrated that yerba mate (*I. paraguariensis*) infusions present significant hepatic and systemic protection against PTZ-induced seizures in Wistar rats. These effects may be important in reducing the oxidative damage in epileptic patients and may

promote new perspectives for the development of therapeutic strategies with natural compounds in epilepsy research.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa no Rio Grande do Sul (FAPERGS) for their financial support.

REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol. 105, 121-126.
- Akbas, S.H., Yegin, A., Ozben, T., 2005. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. Clin. Biochem. 38, 1009-1014.
- Askenov, M.Y., Markesberry, W.R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. Neurosci. Lett. 302, 141-145.
- Bannister, J.V., Calabrese, L., 1987. Assays for Sod. Methods Biochem. Anal. 32, 279-312.
- Berté, K.A.S., Beux, M.R., Spada, P.K.D.S., Salvador, M., Hoffmann-Ribani, R., 2011. Chemical composition and antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St.Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. J. Agric. Food Chem. 59, 5523-5527.
- Bota, R.G., Ligasan, A.P., Najdowski, T.G., Novac, A., 2011. Acute hypersensitivity syndrome caused by valproic acid: A review of the literature and a case report. The Permanente Journal. 15, 80-84.
- Brancesco, N., Sanchez, A.G., Contreras, V., Menini, T., Gucliucci, A., 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. J. Ethnopharmacol. 136, 378-384.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-54.
- Costello, D.J., Delanty, N., 2004. Oxidative injury in epilepsy: potential for antioxidant therapy? Exp. Ver. Neurother. 3, 541-553.
- Decell, M.L., Gordon, J.B., Silver, K., Meagher-Villemure, K., 1994. Fulminant hepatic failure associated with status epilepticus in children: three cases and a review of potential mechanisms. Intensive Care Med. 20, 375-378.
- Deladino, L., Anbinder, P.S., Navarro, A.S., Martino, M.N., 2007. Encapsulation of natural

- antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. Carbohyd. Polym. 71, 126-134.
- Dillioglugil, M.O., Kir, H.M., Demir, C., Ilbay, G., Sahin, D., Dillioglugil, O., Bambal, G., Mekik, H., Ates, N., 2010. Effect of pentylenetetrazole and sound stimulation induced single and repeated convulsive seizures on the MDA, GSH and NO levels, and SOD activities in rat liver and kidney tissues. Brain Res. Bull. 83,356-359.
- Gamble, M., 2008. The hematoxylin and eosin. In: Bancroft, JD & Gamble, M.: Theory and Practice of Histological Techniques, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, USA, 121 – 134.
- Graf, W.D., Oleinik, O.E., Glauser, T.A., Maertens, P., Eder, D.N., Pippenger, C.E., 1998. Altered antioxidant activities in children with a serious side adverse experience related to valproic acid therapy. Neuropediatrics. 29, 195-201.
- Green, L.C. Tannenbaum, S.R. Goldman, P., 1981. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. Science. 212, 56–58.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. Free Radicals in Biology and Medicine, third ed. Oxford, New York.
- Hamed, S.A., Abdellah, M.M., El-Melegy, N., 2004. Blood levels of trace elements, electrolytes, and oxidative stress/antioxidant systems in epileptic patients. J. Pharmacol. Sci. 96, 465-473.
- Hayashi, M., 2009. Oxidative stress in developmental brain disorders. Neuropathology. 29, 1-8.
- Heck, C., Mejia, D.E., 2007. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. J. Food Sci. 7, 138-151.
- Hoeldtke, R., 2003. Nitrosative stress in early Type 1 diabetes. Clin Auton Res. 13, 406–421.
- Ichai, P., Huguet, E., Guettier, C., Azoulay, D., Gonzalez, M.E., Fromenty, B., Masnou, P., Saliba, F., Roche, B., Zeitoun, F., Castaing, D., Samuel, D., 2003. Fulminant hepatitis after grand mal seizures: mechanisms and role of liver transplantation. Hepatology. 38, 443-451.
- Ilhan, A., Aladag, M.A., Kocer, A., Boluk A., Gurel A., Armutcu F., 2005. Erdosteine ameliorates PTZ-induced oxidative stress in mice seizure model. Brain Res. Bull. 65, 495-499.
- Kojima, S., Sasaki, J., Tomita, M., Saka, M., Ishizuka, K., Kawakatsu, H., Youshida, T., Kosaka, T., Enomoto, A., Nakashima, N., Harada, T., 2009. Multiple organ toxicity, including hypochromic anemia, following repeated dose oral administration of Phenobarbital (PB) in rats. J. Toxicol. Sciences. 34, 527-539.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W.,

- Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464-478.
- Liang, L.P., Patel, M., 2004. Mitochondrial oxidative stress and increased seizure susceptibility in Sod2(-/+) mice. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 542-554.
- Martins, F., Suzan, A.J., Cerutti, S.M., Arçari, D.P., Ribeiro, M.L., Bastos, D.H.M., Carvalho, P.O., 2009. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. *B. J. Nutrition.* 101, 527-532.
- Matsumoto, R.L.T., Bastos, D.H.M., 2009. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 1775-1780.
- Miranda, D.D.C., Arçari, D.P., Pedrazzoli, Jr.J., Carvalho, P.O., Cerutti, S.M., Bastos, D.H.M., Ribeiro, M.L., 2008. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis.* 4, 261–265.
- Naziroglu, M., Kutluhan, S., Uguz, A.C., Celik, O., Bal, R., Butterworth, P.J., 2009. Topiramate and vitamin e modulate the electroencephalographic records, brain microsomal and blood antioxidant redox system in pentylenetetrazol-induced seizure of rats. *J. Membr. Biol.* 3,131-40.
- Niketic, V., Ristic, S., Saicic, Z.S., Spasic, M., Buzadzic, B., Stojkovic, M., 1995. Activities of antioxidant enzymes and formation of the glutathione adduct of hemoglobin (Hb ASSG) in epileptic patients with long-term antiepileptic therapy. *Farmaco.* 50, 811-813.
- Obay, B.D., Tasdemir, E., Tümer, C., Bilgin, H.M., Atmaca, M., 2008. Dose dependent effects of ghrelin on pentylenetetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides.* 29, 448-455.
- Radi, R., 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci.* 101, 4003–4008.
- Sahin, D., Ilbay, G., Ates, N., 2003. Changes in the blood-brain barrier permeability and in the brain tissue trace element concentrations after sinle and repeated pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Pharmacol. Res.* 48, 69-73.
- Seyan, N., Canseven, A.G., 2006. *In vivo* effects of ELF MFs on collagen synthesis, free radical process, natural antioxidant system, respiratory burst system, immune system activities, and electrolytes in the skin, plasma, spleen, lung, kidney, and brain tissues. *Electromagn. Biol. Med.* 25, 291-305.
- Sharma, V., Nehru, B., Munshi, A., Jyothy, A., 2010. Antioxidant potential of curcumin against oxidative insult induced by pentylenetetrazol in epileptic rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 32, 227-232.
- Schinella, G. R., Troiani, G., Dávila, V., Buschiazza, P.M., Tournier, H.A., 2000. Antioxidant

- effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 269, 257-360.
- Sudha, K., Ashalatha, V.R., Anjali, R., 2001. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. Clin. Chim. Acta.303, 19-24.
- Sun, X.Y., Wei, C.X., Deng, X.Q., Sun, Z.G., Quan, Z.S., 2010. Evaluation of the anticonvulsant activity of 6-(4-chlorophenoxy)-tetrazolo[5,1-a]phthalazine in various experimental seizure models in mice. Pharmacol. Rep. 2, 273-277.
- Valduga, A.T., 2002. Uso Sustentado e Processamento de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Erva-mate). Tese de doutoramento. Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, UFRGS, Porto Alegre, RS.
- Wills, E.D., 1966. Mechanism of lipid peroxidation formation in animal tissues. Biochem. J. 3, 667-676.
- World Health Organization (WHO)., 2011. Health topics: Epilepsy. Find in: <<http://www.who.int/topics/epilepsy/en>> Accessed: July, 2011.
- Yuksel, A., Cengiz, M., Seven, M., Ulutin, T., 2000. Erythrocyte glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and serum lipid peroxidation in epileptic children with valproate and carbamazepine monotherapy. J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol. 11, 73-81.

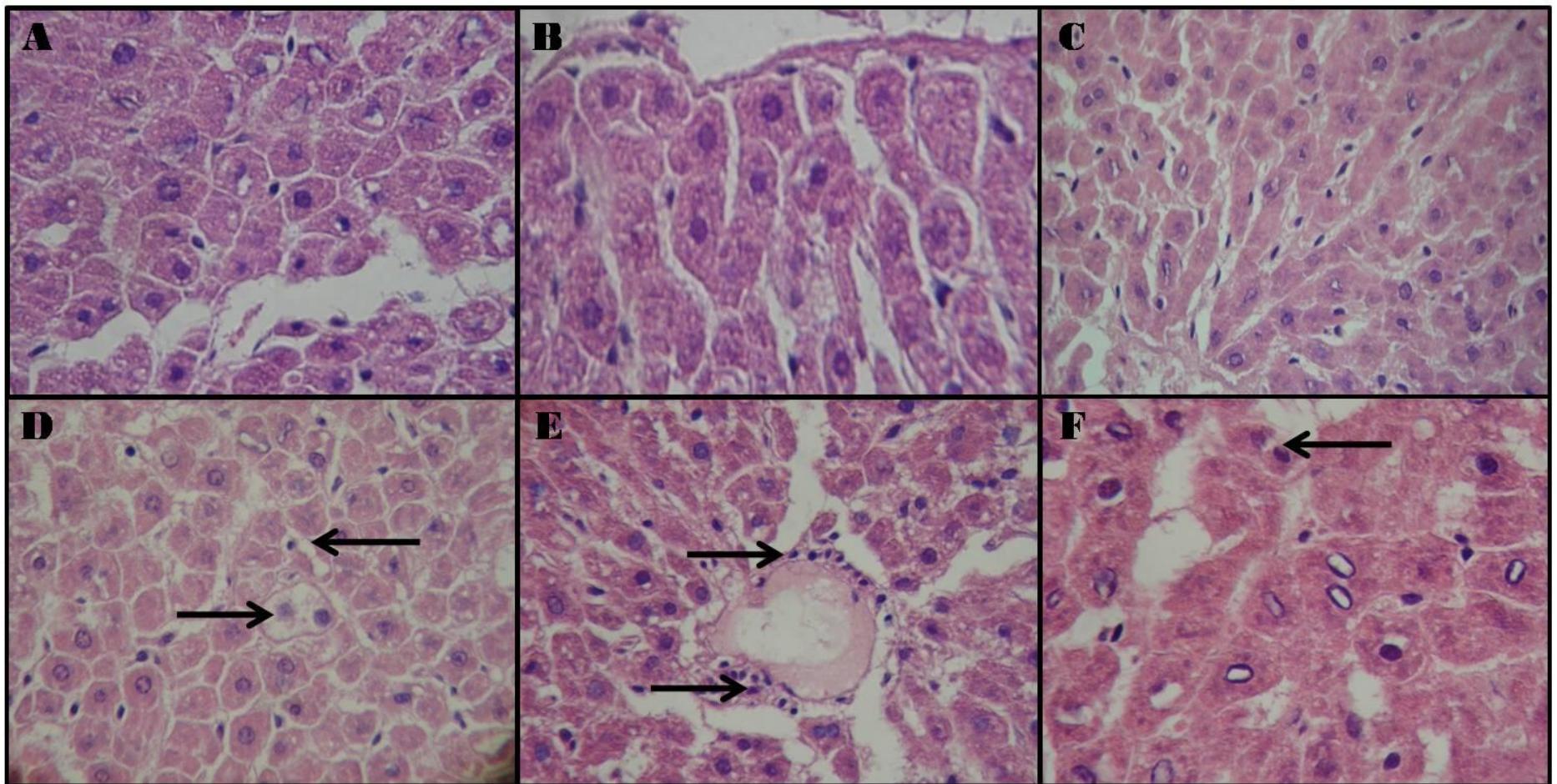


Figure 1. Photomicrographs of the rat livers (HE, 400X). (A) control group; (B) yerba mate treatment (50 mg/kg); (C) yerba mate treatment (50 mg/kg) plus PTZ; (D) PTZ administration showed steatosis; (E) PTZ administration showed infiltration of inflammatory cells; (F) PTZ administration showed hepatocyte apoptosis; (A, B and C: normal hepatocytes). The photomicrographs show the most representative slide of each group.

GROUPS	TBARS (nmol /mg of protein)	Carbonyl protein (nmol/mg of protein)	Nitric oxide (nM nitrite/mg of protein)	Sulphydryl protein (nmol DTNB/mg of protein)	Superoxide dismutase (U SOD/mg of protein)	Catalase (mmol H ₂ O ₂ /min/ mg of protein)
Control (saline)	1.30 ± 0.11 ^{a*}	1.62 ± 0.16 ^a	1.14 ± 0.22 ^a	0.35 ± 0.04 ^a	13.37 ± 1.12 ^a	70.10 ± 1.20 ^a
Pentylenetetrazol (PTZ)	3.53 ± 0.02 ^b	4.77 ± 0.16 ^b	3.43 ± 0.17 ^b	0.11 ± 0.01 ^b	1.58 ± 0.11 ^b	43.24 ± 0.93 ^b
Yerba mate	1.24 ± 0.05 ^a	1.55 ± 0.09 ^a	0.94 ± 0.18 ^a	0.41 ± 0.07 ^a	16.17 ± 1.14 ^a	77.70 ± 1.09 ^a
Yerba mate plus PTZ	1.36 ± 0.33 ^a	2.12 ± 0.19 ^{ac}	1.12 ± 0.08 ^a	0.29 ± 0.03 ^a	8.19 ± 0.75 ^c	66.00 ± 1.13 ^{ac}

Table 1: Determination of the thiobarbituric acid reacting substances, carbonyl protein, nitric oxide production, sulphydryl protein content, superoxide dismutase and catalase activities on the liver of rats treated with the yerba mate infusion (50 mg/kg) in PTZ-induced seizures. *Data are the mean ± S.E.M. values. The different letters indicate a significant difference among the groups according to the analysis of variance and the Tukey's post-hoc test (P<0.05) for each parameter evaluated.

GROUPS	TBARS (nmol /mg of protein)	Carbonyl protein (nmol/mg of protein)	Nitric oxide (nM nitrite/mg of protein)	Sulphydryl protein (nmol DTNB/mg of protein)	Superoxide dismutase (U SOD/mg of protein)	Catalase (mmol H ₂ O ₂ /min/ mg of protein)
Control (saline)	1.74 ± 0.08 ^{a*}	1.59 ± 0.24 ^a	1.89 ± 0.22 ^a	0.43 ± 0.07 ^a	5.30 ± 0.70 ^a	13.52 ± 0.57 ^a
Pentylenetetrazol (PTZ)	2.44 ± 0.06 ^b	3.78 ± 0.10 ^b	5.13 ± 0.06 ^b	0.07 ± 0.01 ^b	0.25 ± 0.02 ^b	7.20 ± 0.70 ^b
Yerba mate	1.76 ± 0.04 ^a	1.48 ± 0.17 ^a	2.02 ± 0.56 ^a	0.46 ± 0.03 ^a	7.19 ± 0.36 ^{ac}	14.53 ± 0.70 ^a
Yerba mate plus PTZ	1.90 ± 0.17 ^{ac}	2.05 ± 0.18 ^{ac}	2.26 ± 0.72 ^a	0.34 ± 0.06 ^a	5.13 ± 0.77 ^a	11.10 ± 0.90 ^{ac}

Table 2: Determination of the thiobarbituric acid reacting substances, carbonyl protein, nitric oxide production, sulphydryl protein content, superoxide dismutase and catalase activities on the serum of rats treated with the yerba mate infusion (50 mg/kg) in PTZ-induced seizures. *Data are the mean ± S.E.M. values. The different letters indicate a significant difference among the groups according to the analysis of variance and the Tukey's post-hoc test ($P<0.05$) for each parameter evaluated.

5 DISCUSSÃO GERAL

A epilepsia é uma desordem neurológica crônica que afeta milhões de pessoas no mundo todo (WHO, 2011). Caracteriza-se pela ocorrência de crises convulsivas geradas por uma excessiva, hipersincrônica e súbita descarga elétrica em neurônios do sistema nervoso central (Lowenstein, 2001). Sabe-se que as crises recorrentes sucessivas podem aumentar a geração de ER no organismo (Sudha *et al.*, 2001; Costello and Delanty, 2004; Hayashi, 2009; Sharma *et al.*, 2010), induzindo efeitos deletérios sistêmicos e aumentando a incidência de doenças associadas ao estresse oxidativo, como as neurodegenerativas, cirrose, aterosclerose, câncer, dentre outras (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Atualmente, apesar do vasto arsenal de fármacos anticonvulsivantes existentes, muitos pacientes não respondem satisfatoriamente ao tratamento. Estima-se que um em cada três indivíduos ainda continue a manifestar as crises, mesmo fazendo uso de fármacos (Devinsky, 1999). Além disso, estudos têm mostrado uma elevada geração de ER e redução nos mecanismos de defesa antioxidante séricos em pacientes sob tratamento medicamentoso para epilepsia (Hamed *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2006).

Em vista disso, alguns antioxidantes têm sido estudados na busca de alternativas para o tratamento desta doença. Considerando-se que a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) apresenta uma elevada concentração de polifenóis (Heck & Mejia, 2007; Berté *et al.*, 2011), compostos com reconhecida atividade antioxidante, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anticonvulsivante e antioxidante de erva-mate, orgânica e convencional, e seu efeito sobre o comportamento dos ratos Wistar.

Para a avaliação do comportamento dos animais tratados com a erva-mate utilizou-se o teste de campo aberto (*Open Field*). Este é um dos métodos mais utilizados experimentalmente para avaliar a capacidade locomotora, a hiperatividade e o comportamento

exploratório dos animais e constitui-se num parâmetro confiável para níveis de ansiedade (Pellow *et al.*, 1985). Observou-se, em nosso estudo, que a administração das infusões de erva-mate orgânica e convencional não alterou os parâmetros comportamentais avaliados (locomoção, exploração e manifestações de ansiedade), não exercendo efeito estimulatório ou depressivo sobre o SNC dos animais (Figura 3, Capítulo 1). Nesse sentido, cabe ressaltar que, embora ambas as amostras de erva-mate tenham apresentado cafeína (Figura 1, Capítulo 1), não foi observado efeito estimulante nos animais tratados. Considerando-se que a erva-mate apresenta cerca de 1% de cafeína (Heck & Mejia, 2007), e que sua concentração em uma infusão típica de erva-mate é de 0.56%, aproximadamente (Vasquez & Moyna, 1986), a concentração administrada em cada tratamento foi de cerca de 2 mg/kg. Já foi relatado que concentrações de cafeína abaixo de 10 mg/kg não alteram a atividade comportamental em animais (Cohen *et al.*, 1991; Antoniou *et al.*, 1998; Liu & Jernigan, 2011), o que corrobora os resultados encontrados em nosso trabalho.

A indução das convulsões em nosso estudo foi realizada com uma dose única de PTZ 60 mg/kg administrada intraperitonealmente (i.p.). Esta concentração encontra-se entre a menor dose efetiva para causar convulsões (33 mg/kg) e a dose média letal (75 mg/kg) (Ilhan *et al.*, 2005). Para avaliar a intensidade das convulsões, utilizou-se a escala de Racine, um dos instrumentos mais empregados na avaliação do comportamento animal durante as crises. Esta escala classifica as convulsões em cinco estágios de intensidade: nível 1 (ocorrência de bruscos movimentos faciais); nível 2 (presença de movimentos do tipo balançar da cabeça); nível 3 (ocorrência de movimentos clônicos do tórax); nível 4 (convulsões caracterizadas por levantamento vertical do corpo); e nível 5 (ocorrência de levantamento vertical e a queda do corpo do animal) (Racine, 1972).

Observou-se, no presente estudo, que o PTZ induziu a primeira crise convulsiva aos 90.00 ± 4.17 segundos (Figura 4 A, Capítulo 1), e que todos os animais apresentaram

convulsões generalizadas intensas, com um percentual de mortalidade de 50% (Anexo I). A administração de erva mate orgânica foi capaz de reduzir o índice de mortalidade dos animais para 37%, enquanto que a convencional reduziu para 11% (Anexo I). Até o momento, os mecanismos responsáveis pela mortalidade induzida pelo pentilenotetrazol não estão completamente esclarecidos, sendo necessários mais estudos para melhor compreender estes resultados.

O tratamento com a erva-mate, tanto orgânica como convencional, não foi capaz de aumentar o tempo de latência para o início das convulsões (Figura 4 A, Capítulo 1), nem diminuir o tempo total das crises convulsivas (Figura 4 C, Capítulo 1). No entanto, a infusão de erva-mate orgânica foi capaz de reduzir, significativamente, a duração das crises tônico-clônicas em 83%. O tratamento com a erva-mate convencional também foi capaz de reduzir a duração das crises tônico-clônicas, embora sem diferença estatística (Figura 4 B, Capítulo 1). Observou-se, ainda, que o tratamento com ambas as infusões estudadas foi capaz de diminuir significativamente a frequência dos eventos epiléticos, assim como apresentaram uma tendência de diminuição da intensidade das crises convulsivas (nível 5 na escala de Racine; Figure 4 D, Capítulo 1), em relação ao tratamento com PTZ.

Estudos mostram que a gênese da epilepsia está associada a um desequilíbrio causado por um aumento na transmissão excitatória glutamatérgica e/ou diminuição da resposta GABAérgica (Sudha *et al.*, 2001; Kutluhan *et al.*, 2009), sendo o neurotransmissor GABA o responsável pela redução da excitabilidade neuronal no SNC (Paul, 1995). Dessa forma, a descoberta de agonistas da neurotransmissão inibitória do GABA representa uma valiosa alternativa na busca do controle das convulsões. Neste sentido, já foi relatado que o flavonóide rutina é capaz de modular positivamente os receptores GABAérgicos, apresentando atividade anticonvulsivante em ratos tratados com PTZ (Nassiri *et al.*, 2008; 2010). Ambas as infusões de erva mate, orgânica e convencional, apresentaram o flavonóide

rutina em sua composição, entretanto, somente a orgânica foi capaz de reduzir, significativamente, as convulsões tônico-clônicas induzidas pelo PTZ. Além disso, o teor de polifenóis totais foi semelhante (322.0 ± 4.24 CAE mg/100g de peso seco para a variedade orgânica e 319.0 ± 7.07 CAE mg/100 g de peso seco, para a variedade convencional), e verificou-se, ainda, que nenhuma das infusões estudadas apresentou resíduos de pesticidas organofosforados ou carbamatos (dados não mostrados).

Diversos autores têm demonstrado que a absorção e passagem pela barreira hemato-encefálica de polifenóis em tecidos do SNC após administração oral é bastante baixa (na ordem de nmol/g), levantando a hipótese de que os efeitos biológicos observados para esta classe de compostos no cérebro não são devidos, diretamente, à sua atividade antioxidante. Entre as hipóteses capazes de explicar a ação dos polifenóis em tecidos do sistema nervoso, incluem-se a modulação e recaptação de neurotransmissores, regulação de vias de transdução de sinal (equilíbrio oxidante/antioxidante; proliferação e inibição celular; angiogênese) e inibição do decréscimo da bomba Na/K ATPase (para revisão ver Schaffer & Halliwell, 2012).

Curiosamente, a administração da infusão de erva-mate orgânica, apesar de reduzir em 83% as convulsões tônico-clônicas induzidas pelo PTZ nos ratos, não foi capaz de diminuir o tempo total das crises (Figura 4 C, Capítulo 1) nem, tampouco, aumentar o tempo de latência para inicio das crises convulsivas (Figura 4 A, Capítulo 1). Em trabalho realizado com ratos tratados via intracerebroventricular com rutina, observou-se que foi necessária uma concentração de 50 nM deste composto para diminuir as crises tônico-clônicas (Nassiri *et al.*, 2008). Mesmo nesta concentração alta, a rutina não foi capaz de aumentar o tempo de latência para as crises convulsivas. Em nosso trabalho, utilizou-se 50 mg/kg da infusão liofilizada de erva-mate (concentração definida a partir de dados da literatura), ou seja, contendo uma concentração mais baixa do flavonóide rutina, em relação ao estudo de Nassiri *et al.* (2008), o

que poderia explicar a ausência de efeito significativo nos demais parâmetros de crises avaliados.

A administração de vitamina E (Tomé *et al.*, 2010) e vitamina C (Xavier *et al.*, 2007), reconhecidos antioxidantes (Halliwell & Gutteridge, 2007), foi capaz de aumentar o tempo de latência para início das convulsões e diminuir o número de convulsões induzidas por pilocarpina em ratos Wistar. Entretanto, as concentrações utilizadas nos estudos foram bastante altas (200 mg/kg de vitamina E e 250 mg/kg de vitamina C), o que limitaria a sua utilização na prática clínica, visto que, se fosse possível extrapolar, excederiam o consumo máximo recomendado para um indivíduo de 70 kg (1 e 2g, respectivamente), de acordo com a National Academy of Sciences (2011). Compostos como o agente mucolítico erdosteína (50mg/kg; Ilhan *et al.*, 2005) e o monoterpeno isopulegol (200mg/kg; Silva *et al.*, 2009) também foram capazes de aumentar o tempo de latência para início das convulsões em animais (camundongos/ratos Wistar, respectivamente) tratados com PTZ. No entanto, nenhum destes compostos foi capaz de alterar o tempo de duração das crises e o número de crises convulsivas.

As crises convulsivas podem levar a um aumento na geração de ER (Sudha *et al.*, 2001; Costello and Delanty, 2004; Hayashi, 2009; Sharma *et al.*, 2010), predispondo os indivíduos epiléticos a uma maior incidência de doenças secundárias associadas ao estresse oxidativo, incluindo desordens neurodegenerativas e cirrose hepática. Nesse trabalho, observou-se que o pré-tratamento com as infusões de erva-mate foi capaz de reduzir os danos oxidativos no cerebelo, córtex cerebral e hipocampo (Tabela 1, 2 e 3, Capítulo 1), no fígado e soro (Tabela 1 e 2, Capítulo 2; Anexo II e III) dos ratos Wistar tratados com PTZ. Além disso, observou-se que ambas as infusões de erva-mate evitaram a depleção das defesas antioxidantes enzimáticas (Sod e Cat) e não enzimáticas (conteúdo de proteína sulfidrila) induzidas pelo PTZ, tanto no soro quanto nos demais tecidos estudados. O efeito protetor das infusões de

erva-mate orgânica e convencional no fígado dos ratos pode ser visualizado nos cortes histológicos (Figura 1, Capítulo 2; Anexo IV). A proteção hepática observada pode ser atribuída aos polifenóis presentes na erva-mate, os quais poderiam auxiliar na regeneração tecidual. De fato, estudos prévios têm mostrado que os polifenóis são hábeis em prevenir a lipoperoxidação e estabilizar a membrana dos hepatócitos em fígado de ratos (Suja *et al.*, 2004; Dani *et al.*, 2008).

A proteção aos danos oxidativos no SNC é de grande importância, já que o hipocampo é uma das regiões responsáveis pela neurogênese e, juntamente com o córtex, tem papel crucial na formação da memória e nos processos cognitivos e de aprendizagem (Kempermann *et al.*, 1998; Appleby *et al.*, 2011). O cerebelo, por sua vez, é a estrutura responsável pela função e coordenação motora (Merril *et al.*, 2001). A manutenção do equilíbrio redox no fígado e soro pode contribuir com a redução de complicações secundárias à epilepsia, como a insuficiência fulminante do fígado e doenças sistêmicas associadas ao estresse oxidativo.

Os polifenóis são importantes compostos fitoquímicos responsáveis pelo sistema de defesa vegetal (Olsson *et al.*, 2006). Em nosso trabalho, não foi observada diferença no conteúdo fenólico total das infusões de erva-mate orgânica e convencional (322.0 ± 4.24 CAE mg/100g de peso seco para a variedade orgânica e 319.0 ± 7.07 CAE mg/100 g de peso seco, para a variedade convencional). Além disso, ambas as infusões apresentaram rutina e ácido clorogênico em sua composição (Figuras 1 e 2, Capítulo 1). Embora tenha sido observado um conteúdo fenólico maior nos cultivares orgânicos de uva (Dani *et al.*, 2007), amora (Asami *et al.*, 2003), pêssegos e peras (Carbonaro *et al.*, 2002) em relação ao cultivar convencional, não foi observada diferença significativa entre cultivares orgânicos e convencionais de morangos (Hakkinen & Torronen, 2000), tomates (Juroszec *et al.*, 2009), cenoura, cebola e batata (Soltoft *et al.*, 2010), corroborando os achados obtidos neste trabalho.

Em resumo, os resultados obtidos nesta pesquisa mostram a potencialidade da utilização da erva-mate (*I. paraguariensis*) no desenvolvimento de estratégias terapêuticas com compostos naturais para indivíduos portadores de epilepsia, tanto na área farmacêutica como nutracêutica.

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- ✓ A administração das infusões de erva-mate, tanto orgânica como convencional, não afetou os parâmetros comportamentais (locomoção, exploração e manifestações de ansiedade) em ratos Wistar.
- ✓ As infusões de erva-mate, orgânica e convencional, foram capazes de diminuir significativamente a frequência dos eventos epiléticos, além de apresentarem tendência em atenuar a intensidade das crises convulsivas em ratos.
- ✓ A administração da infusão de erva-mate orgânica diminuiu significativamente o tempo de crises tônico-clônicas induzidas pelo PTZ.
- ✓ As infusões de erva-mate estudadas foram capazes de diminuir os danos oxidativos a lipídios e proteínas e a concentração de óxido nítrico, induzidos pelo PTZ, nos tecidos do SNC (cerebelo, córtex cerebral, hipocampo), no fígado e soro dos ratos Wistar.
- ✓ A administração das infusões de erva-mate, orgânica e convencional, evitou a depleção das defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase e catalase) e não enzimáticas (conteúdo de proteína sulfidrila) induzidas pelo PTZ no cerebelo, córtex cerebral, hipocampo, fígado e soro dos ratos.
- ✓ As infusões de erva-mate orgânica e convencional apresentaram conteúdo polifenólico semelhante (322.0 ± 4.24 CAE mg/100 g para a variedade orgânica, e 319.0 ± 7.07 CAE mg/100 g para a convencional).
- ✓ A análise cromatográfica evidenciou a presença de ácido clorogênico e seus derivados, do flavonol rutina e de cafeína tanto na infusão de erva-mate orgânica como convencional.

7 PERSPECTIVAS

Para a continuidade deste trabalho, seria importante:

- ✓ Avaliar o efeito anticonvulsivante e antioxidante de outras concentrações das infusões de erva-mate, em tratamentos agudos e crônicos em ratos Wistar.
- ✓ Avaliar a histopatologia dos tecidos do SNC, antes e após a indução de convulsões em ratos tratados com as infusões de erva-mate orgânica e convencional.
- ✓ Analisar possíveis lesões genotóxicas (teste Cometa) e/ou mutagênicas (teste de Micronúcleos) em linfócitos de ratos tratados com as infusões de erva-mate, em presença ou ausência de PTZ.
- ✓ Quantificar os compostos fitoquímicos presentes nas infusões de erva-mate, orgânica e convencional, a fim de identificar qual(is) pode(m) apresentar atividade biológica.
- ✓ Quantificar os constituintes fenólicos nos tecidos cerebrais dos ratos Wistar tratados com as infusões de erva-mate, visando determinar quais compostos podem atravessar a barreira hemato-encefálica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.** 105:121-126.
- Akbas, S.H.; Yegin, A.; Ozben, T. (2005). Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. **Clin. Biochem.** 38: 1009-1014.
- Albarracin, S.L.; Stab, B.; Casas, Z.; Sutachan, J.J.; Samudio, I.; Gonazalesz, J.; Gonzalo, L.; Capani, F.; Morales, L.; Barreto, G.E. (2012). Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. **Nutr. Neurosci.** 15(1): 1-9.
- Antoniou, K.; Kafetzopoulos, E.; Papadopoulou-Daifoti, Z.; Hyphantis, T.; Marselos, M. (1998). D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. **Neurosci. Biobehav. Res.** 23: 189-196.
- Appleby, P.A.; Kempermann, G.; Wiskott, L. (2011). The Role of Additive Neurogenesis and Synaptic Plasticity in a Hippocampal Memory Model with Grid-Cell Like Input. **PLoS Comput. Biol.** 27; 7:1.
- Arçari, D.P.; Bartchewsky, W. J.; Santos, T. W.; Oliveira, K.A.; Oliveira, C.C.; Gotardo, E.M.; Pedrazolli, J.J.; Gamero, A.; Ferraz, L.F.C.; Carvalho, P.O.; Ribeiro, M.L. (2011). Anti-inflammatory effects of Yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Mol. Cell. End.** 335: 110-115.
- Arçari, D.P.; Bartchewsky, W. S.; Oliveira, K.A.; Pedrazzoli, J. S.; Saad, M. F.; Bastos, D. H.; Gamero, A.; Carvalho, P. O.; Ribeiro, M. L. (2009). Antioesity effects of Yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity.** 12: 2127-2133.
- Aron, P.M.; Kennedy, J.A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. **Mol. Nutr. Food Res.** 52: 79-104.
- Asami, D.K.; Hong, Y.; Barret, D.M.; Mitchell, A.E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. **J. Agric. Food Chem.** 51: 1237-1241.
- Asensi, M.; Ortega, A.; Mena. S.; Feddi. F.; Estrela, J.M. (2011). Natural polyphenols in cancer therapy. **Crit. Rev. in Clin. Lab. Sci.** 48 (5-6): 197- 216.

- Askenov, M.Y.; Markesberry, W.R. (2001). Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters.** 302: 141-145.
- Associação Brasileira de Epilepsia (2011). O mapa da epilepsia no Brasil. **Disponível (on line):** http://portal.saude.gov.br/portal/sas/mac/area.cfm?id_area=83 (23 de fevereiro).
- Bannister, J.V.; Calabrese, L. (1987). Assays for Sod. **Methods Biochem. Anal.** 32: 279-312.
- Barber, A.A.; Bernheim, F. (1967). Lipid peroxidation its measurement occurrence and significance in animal tissues. **Adv. Gerontol. Res.** 2: 355-403.
- Berté, K.A.S.; Beux, M.R.; Spada, P.K.D.S.; Salvador, M.; Hoffmann-Ribani, R. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. **J. Agric. Food Chem.** 59: 5523-5527.
- Bracesco, N.; Sanchez, A.G.; Contreras, V.; Menini, T.; Gucliucci, A. (2011). Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **J. Ethnopharmacol.** 136: 378-384.
- Carbonaro, M.; Mattera, M.; Nicoli, S.; Bergamo, P.; Capelloni, M. (2002). Modulation of antioxidant compounds in organic vs conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and pear, *Pyrus communis* L.) **Food Chem.** 19: 5458-62.
- Cohen, C.; Welzl, H.; Batting, K. (1991). Effects of nicotine, caffeine, and their combination on locomotor activity in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 40: 121-123.
- Costello, D.J.; Delanty, N. (2004). Oxidative injury in epilepsy: potential for antioxidant therapy? **Expert Rev. Neurother.** 4 (3):541-553.
- Danbolt, N.C. (2000). Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology.** 65: 1-105.
- Dani, C.; Oliboni, L. S.; Vanderline, R.; Bonatto, D.; Salvador, M.; Henriques, J. A. (2007). Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally- produced grapes. **Food Chem. Toxicol.** 45: 2574–2580.
- Dani, C.; Oliboni, L.S.; Pasquali, M.A.B.; Oliveira, M.R.; Umezu, F.M.; Salvador, M.; Moreira, J.C.F.; Henriques, J.A.P. (2008). Intake of purple grape juice as a hepatoprotective agent in Wistar rats. **J. Med. Food** 11 (1): 127–132.
- Deladino, L.; Anbinder, P.S.; Navarro, A.S.; Martino, M.N. (2007). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydr. Polym.** 71: 126-134.
- Devinsky, O. (1999). Patients with refractory seizures. **N. Engl. J. Med.** 340(20): 1565-70.

- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2010). **Disponível (on line):**
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ervamate/CultivodaErvamate/> (23 de março).
- Falkenberg, M.B; dos Santos, R.I.; Simões, C.M.O. (2001). **Introdução à Análise Fitoquímica.** In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick. (Ed.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC. pp 165-181.
- FAOSTAT. Food and Agricultural Organization (FAO) Statistics Division (2007). **Disponível (on line):**<http://faostat.fao.org/site/408/DesktopDefault.aspx?PageID=> (12 de março).
- Ferrari, N.; Tosetti, F.; De Flora, S.; Donatelli, F.; Sogno, I.; Noonan, D.M.; Albini, A. (2011). Diet-derived phytochemicals: from cancer chemoprevention to cardio-oncological prevention. **Curr. Drug. Targets**. 12(13): 1909-24.
- Ferguson, L.R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutat. Res.** 475: 89-111.
- Filip, R.; Ferraro G.E. (2003). Researching on new species of “Mate”: *Ilex brevicuspis*: phytochemical and pharmacology study. **Eur. J. Nutr.** 42: 50–4.
- Filip, R.; Lopez, P.; Giberti, G.; Coussio, J.; Ferraro, G. (2001). Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**. 72(7): 774–8.
- Filip, R.; Lotito, S.B.; Ferraro, G.; Fraga, C.G. (2000). Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Res.** 20: 1437–46.
- Fonfria, E.; Marshall, I. C.; Boyfield, I.; Skaper, S. D.; Hughes, J. P.; Owen, D. E.; Zhang, W.; Miller, B. A.; Benham, C. D. and McNulty, S. (2005). Amyloid b-peptide (1–42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures. **J. Neurochem.** 95: 715–723.
- Freitas, R. M. (2009). Investigation of oxidative stress involvement in hippocampus in epilepsy model induced by pilocarpine. **Neurosc. Lett.** 462: 225-229.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.** 201: 1203-1209.
- Gugliucci, A. (1996). Antioxidant effects of *Ilex Paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 224 (1030): 338–344.
- Green, L.C. Tannenbaum, S.R. Goldman, P., 1981. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**. 212, 56-58.

- Hakkinen, S.H.; Torronen, A.R. (2000). Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and Vaccinium species: influence of cultivar, cultivation site and technique. **Food Res. Int.** 33: 517-524.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J. Neurochem.** 97: 1634–1658.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (2007). **Free Radicals in Biology and Medicine**, third ed. Oxford, New York.
- Hamed, S.A.; Abdellah, M.M.; El-Melegy, N. (2004). Blood levels of trace elements, electrolytes, and oxidative stress/antioxidant systems in epileptic patients. **J. Pharmacol. Sci.** 96: 465-473.
- Hayashi, M. (2009). Oxidative stress in developmental brain disorders. **Neuropathology.** 29: 1–8.
- Headley, P. M.; Grillner, S. (1990). Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. **Trends pharmacol Sci.** 11: 205-211.
- Heck, C.; Mejia, D.E. (2007). Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **J. Food Sci.** 72(7): 138-151.
- Heck, C.I.; Schmalko, Miguel.; Mejia, E. G. (2008). Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **J. Agric. Food Chem.** 56 (18): 8394-8403.
- Ichai, P.; Huguet, E.; Guettier, C.; Azoulay, D.; Gonzalez, M.E.; Fromenty, B.; Masnou, P.; Saliba, F.; Roche, B.; Zeitoun, F.; Castaing, D.; Samuel, D. (2003). Fulminant hepatitis after grand mal seizures: mechanisms and role of liver transplantation. **Hepatology.** 38: 443-451.
- Ilhan, A.; Aladag, M. A.; Kocer, A.; Boluk A.; Gurel A.; Armutcu F. (2005). Erdosteine ameliorates PTZ-induced oxidative stress in mice seizure model. **Brain Res. Bull.** 65: 495-499.
- Inoue, M. (1994). Protective mechanism against reactive oxygen species. In: **The Liver. Biology and Pathology.** Ed. Arias, I. M.; Boyer, J.L.; Fausto, N., Jacoby, W.B.; Schachter, D. A. & Shafritz, D. A. Raven Press, New York, 443-460.
- Johnston, M.V. (1995). Neurotransmitters and vulnerability of the developing brain. **Brain Dev.** 17: 301-306.
- Juroszec, P.; Lumpkin, H.M.; Yang, R.Y.; Ledesma, D.R.; Ma, C. (2009). Fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity of tomatoes grown on-farm: comparison

- of organic and conventional management systems. **J. Agric. Food Chem.** 57: 1188-1194.
- Kempermann, G.; Kuhn, H.G.; Winkler, J.; Gage, F.H. (1998). New nerve cells for the adult brain. Adult neurogenesis and stem cell concepts in neurologic research. **Nervenarzt.** 69(10): 851-7.
- Kojima, S.; Sasaki, J.; Tomita, M.; Saka, M.; Ishizuka, K.; Kawakatsu, H.; Youshida, T.; Kosaka, T.; Enomoto, A.; Nakashima, N.; Harada, T. (2009). Multiple organ toxicity, including hypochromic anemia, following repeated dose oral administration of Phenobarbital (PB) in rats. **J. Toxicol. Sciences.** 34: 527-539.
- Kutluhan, S.; Naziroglu, M.; Celik, O.; Yilmaz, M. (2009). Effects of selenium and topiramate on lipid peroxidation and antioxidant vitamin levels in blood of pentylenetetrazol-induced epileptic rats. **Biol. Trace Elem. Res.** 129: 181–189.
- Lanzetti, M. R.D.; Bezerra F. S.; Romana-Souza, B.; Brando-Lima, A. C.; Koatz, V. L. G.; Porto, L. C.; Valenca, S. S. (2008). Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition.** 24: 375–381.
- Lecour, S.; Lamont, K.T. (2011). Natural polyphenols and cardioprotection. **Mini Rev. Med. Chem.** 11(14): 1191-9.
- Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A. G.; Ahn, B.W.; Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** 186: 464-478.
- Lipinski, B. (2001). Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. **J. Diabetes Complications.** 15: 203-210
- Liu, X.; Jernigan, C. (2011). Effects of caffeine on persistence and reinstatement of nicotine-seeking behavior in rats: interaction with nicotine-associated cues. **Psychopharmacology.** 1-10.
- Lombardi-Boccia G.; Lucarini M.; Aguzzi A.; Capelloni M. (2004). Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: a comparative study. **J. Agric. Food Chem.** 52 (1): 90-4.
- López-Hernández, E.; Bravo, J.; Solís H. (2005). Epilepsia y antiepilepticos de primera y segunda generación. Aspectos básicos útiles en la práctica clínica. **Rev. Fac. Med. UNAM.** 48 (5).
- Löscher, W. (1998). New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **Eur. J. Pharmacology.** 342: 1-13.

- Lowenstein, D.H. (2011). Interview: the National Institute of Neurological Diseases and Stroke/American Epilepsy Society benchmarks and research priorities for epilepsy research. **Biomark. Med.** 5(5): 531-5.
- Mares, P. (2009). Age- and dose- specific anticonvulsant action of bumetanide in immature rats. **Physiol. Res.** 58: 927-930.
- Matsumoto, R. L. T.; Bastos, D. H. M.; Mendonça, S.; Nunes, V. S.; Bartchewsky Jr., W.; Ribeiro, M. L.; Carvalho, P. O. (2009). Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. **J. Agric. Food Chem.** 57 (5): 1775-1780.
- Meldrum, B. S.; Akbar, M. T.; Chapman, A. G. (1999). Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. **Epilepsy Res.** 36: 189- 204.
- Merrill, D.A.; Chiba, A.A.; Tuszyński, M.H. (2001). Conservation of neuronal number and size in the entorhinal cortex of behaviorally characterized aged rats. **J. Comp. Neurol.** 438: 445-456.
- Miranda, D.D.C.; Arçari, D.P., Pedrazzoli, Jr.J.; Carvalho, P.O. ; Cerutti, S.M.; Bastos, D.H.M.; Ribeiro, M.L. (2008). Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis.** 23 (4): 261–265.
- Mosele, S.H. (2002). A governança na cadeia agroindustrial da erva-mate na região do Alto Uruguai. **Dissertação de Mestrado.** Centro de Estudos e Pesquisa em Agronegócios, UFRGS, Porto Alegre, RS.
- Nassiri-Asl., M.; Mortazavi, S.; Rad, F.; Zangivand, A.; Safdari, F.; Saroukhani, S.; Abbasi, E. (2010). The effects of rutin on the development of pentylenetetrazole kindling and memory retrieval in rats. **Epilepsy and Behaviour.** 18: 50-53.
- Nassiri-Asl., M.; Shariati-Rad, S.; Zamansoltani, F. (2008). Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. **Progress In Neuro-Psychoph & Biol Res.** 32: 989-993.
- Olney, J. W. (1981). Kainic acid and other excitotoxins: a comparative analysis. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.** 27: 375-384.
- Olsson, M.; Anderson, C.S.; Oredsson, S.; Berglund, R.K.; Gustavsson, K.E. (2006). Antioxidant levels and inhibition of cancer cell proliferation *in vitro* by extracts from organically and conventionally cultivated strawberries. **J. Agric. Food. Chem.** 54: 1248-1255.

- Park, Y.K.; Park, E.; Kim, J.S.; Kang, M.H. (2004). Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. **Mutation Research.** 26; 546 (1-2):103.
- Paul, S. M. (1995). GABA and glycine. In: **Psychopharmacology: The fourth generation of Progress.** Bloom, F. E., and Kupfer, D.J (eds.). Raven Press, New York, pp 87-94.
- Pellow, S.; Chopin, P.; File, S. E.; Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods.** 14(3): 149-67.
- PORTAL DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO (2009). Avaliação da erva-mate para inclusão no projeto mais alimento. **Disponível (online):** <http://www.mda.gov.br/portal/saf/institucional/maisalimentos> (9 de julho).
- Prediger, R.D.S.; Fernandes, M.S.; Rial, D.; Wopereis, S.; Pereira, V.S.; Bosse, T.S.; Da Silva, C.B.; Carradore, R.S.; Machado, M.S.; Cechinel-Filho, V.; Costa-Campos, L. (2008). Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **J. Ethnopharm.** 120: 465-473.
- Racine, R.; Okujava, V.; Chipashvili, S. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.** 32(3): 295-9.
- Radhakrishnan, K. (2009). Challenges in the management of epilepsy in resource-poor countries. **Nat. Rev. Neurol.** 5: 323-330.
- Rao, Y. H.; Lynch, D. R.; Brooks-kayal, A. R. (2001). Role of excitatory aminoacids in developmental epilepsies. **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.** 7: 254-260.
- Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donéche, B. & Lonvaud, A. (2003). **Tratado de Enología: microbiología del vino-vinificaciones.** Vol. 1. Buenos Aires. Editorial Hemisferio Sur. 636.
- Sathyaranayana, R. K. N.; Subbalakshmi, N.K. (2010). An experimental study of the anticonvulsant effect of amlodipine in mice. **Singapore Med.** 5: 424-428.
- Schaffer, S.; Halliwell. (2012). Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. **Genes Nutr.** 7(2):99-109.
- Schomer, D. L.; Black, P. M. A. (2008). 24-Year-Old woman with intractable seizures. Review of Surgery for Epilepsy. **JAMA.** 300(21): 2527-2538.
- Sharma, V.; Nehru, B.; Munshi, A.; Jyothy, A. (2010). Antioxidant potential of curcumin against oxidative insult induced by pentylenetetrazole in epileptic rats. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.** 32: 227-232.

Silva, F.A. (2007). Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* A.St.Hil.- Aquifoliaceae (erva-mate). **Tese de doutoramento.** Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, RS.

Silva, M.I.G.; Silva, M.A.G.; Neto, M.R.A.; Moura, B.A.; Sousa, H.L.; Lavor, E.P.H.; Vasconcelos, P.F.; Macedo, D.S.; Sousa, D.P.; Vasconcelos, S.M.M.; Sousa, F.C.L. (2009). Effects os isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice : possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia.** 506-513.

Simonian N.A.; Coyle J.T. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 36: 83–116.

Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology.** 299: 152-178.

Soltoft, M.; Nielsen, J.; Laursen, H.K.; Husted, S.; Halekoh, U.; Knuthsen, P. (2010). Effects of organic and conventional growth systems on the content of flavor onions and phenolic acids in carrots and potatoes. **J. Agric. Food Chem.** 58: 10323-9.

Spencer, J. P. E. (2010). The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. **Brit. J. Nutr.** 104: 41-47.

Sudha, K.; Ashalatha, V. R; Anjali R. (2001). Oxidative Stress and antioxidants in epilepsy. **Clin. Chim. Acta.** 303: 19-24.

Suja, S.R., Latha, P.G., Pushpangadan, P., Rajasekharan, S. (2004). Evaluation of hepatoprotective effects of *Helminthostachys zeylanica* (L.) hook against carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats. **J. Ethnopharm.** 92: 61-66.

Sun, B.S.; Silva, R.J.M.; Spranger, M.I. (1998) Critical factors of the vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. **J. Agric. Food Chem.** 46: 4267-4274.

Sun, X.Y.; Wei, C.X.; Deng, X.Q.; Sun, Z.G.; Quan, Z.S. (2010). Evaluation of the anticonvulsant activity of 6-(4-chlorophenoxy)-tetrazolo[5,1-a]phthalazine in various experimental seizure models in mice. **Pharmacol. Rep.** 2: 273-277.

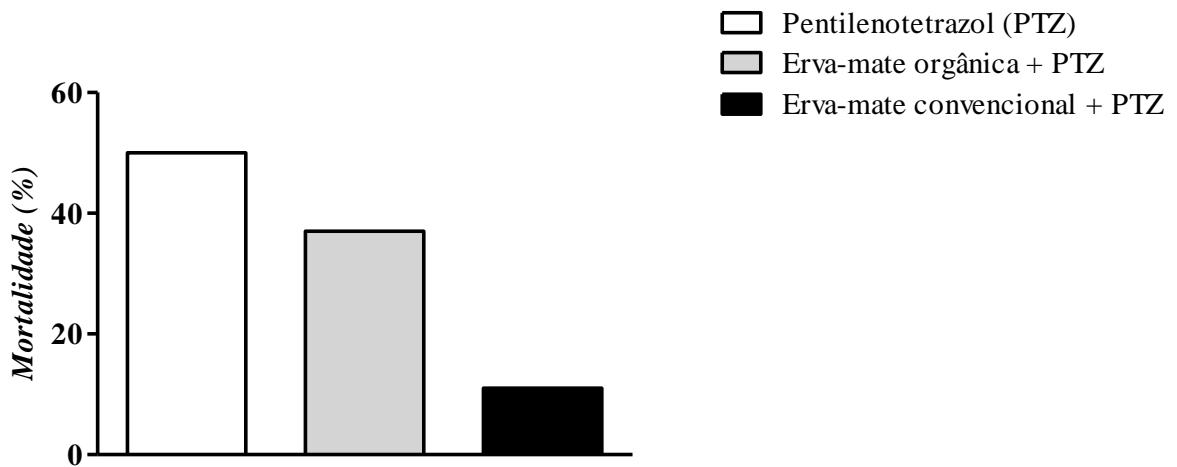
Sutula, T.; Hagen, J.; Pitkänen, A. (2003). Do epileptic seizures damage the brain? **Curr. Opin. Neurol.** 16: 189-195.

Thomas, K., Chang, H., Abott, F.S., 2006. Oxidative stress as a mechanism of valproic acid-associated hepatotoxicity. **Drug Metab. Rev.** 38, 627-639.

- Tomé, A.R.; Feng, D.; Freitas, R.M. (2010). The effects of alpha-tocopherol on hippocampal oxidative stress prior to in pilocarpine-induced seizures. **Neurochem. Res.** 35: 580-587.
- Ursini, M.V.; Parrella, A.; Rosa, G.; Salzano, Martini, G. (1997). Enhanced expression of glucose-6phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. **Biochem. J.** 323: 801-806.
- Valduga, A.T. (2002). Uso Sustentado e Processamento de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Erva-mate). **Tese de doutoramento.** Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, UFRGS, Porto Alegre, RS.
- Vallano, M. L. (1998). Developmental aspects of NMDA receptor function. **Crit. Rev. Neurobiology.** 12: 177-204.
- Valls-Pedret, C.; Lamuela-Raventós, R.M.; Medina-Ramón, A.; Quintana, M.; Corella, D.; Pintó, X.; Martínez-González, M.A.; Estruch, R.; Ros, E. (2012). Polyphenol-rich food in the Mediterranean diet are associated with better cognitive function in elderly subjects at high cardiovascular risk. **J. Alzheimers. Dis.** 29: 1-10.
- Vázquez, A.; Moyna, P. (1986). Studies on mate drinking. **J. Ethnopharmacol.** 18: 267-272.
- Watanabe, M.; Maemura, K.; Kanbara, K.; Tamayama, T.; Hayasaki, H. (2002). GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. **Int. Rev. Cytol.** 213: 1-47.
- World Health Organization (WHO), 2011. Health topics: Epilepsy. Find in: <<http://www.who.int/topics/epilepsy/en>> Accessed: July, 2011.
- Xavier, S.M.; Barbosa, C.O.; Barros, D.O.; Silva, R.F.; Oliveira, A.A.; Freitas, R.M. (2007). Vitamin C antioxidant effects in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. **Neurosci. Lett.** 420: 76-9.
- Zelko, I.N.; Mariani, T.J.; Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparision of the CU-Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structure, evolution and expression. **Free Radic. Biol. Med.** 33(3): 337-49.

ANEXOS

Anexo I



Efeitos da administração do pentilenotetrazol (PTZ) sobre a mortalidade em ratos Wistar, tratados com as infusões de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) orgânica e convencional. Os dados estão expressos em média ± erro padrão.

Anexo II

Grupos	TBARS (nmol /mg de proteína)	Proteína carbonilada (nmol/mg de protéina)	Óxido Nítrico (nmol nitrito/mg de proteína)	Proteína sulfidrila (nmol DTNB/mg de proteína)	Superóxido dismutase (U SOD/mg de proteína)	Catalase (mmol H_2O_2 /min/ mg de proteína)
Controle (salina)	1.30 ± 0.11 ^{a*}	1.62 ± 0.16 ^a	1.14 ± 0.22 ^a	0.35 ± 0.04 ^a	13.37 ± 1.12 ^a	70.10 ± 1.20 ^a
Pentilenotetrazol (PTZ)	3.53 ± 0.02 ^b	4.77 ± 0.16 ^b	3.43 ± 0.17 ^b	0.11 ± 0.01 ^b	1.58 ± 0.11 ^b	43.24 ± 0.93 ^b
Erva mate orgânica	1.33 ± 0.09 ^a	1.49 ± 0.12 ^a	1.09 ± 0.06 ^a	0.49 ± 0.09 ^a	15.28 ± 0.20 ^a	73.82 ± 1.17 ^a
Erva mate orgânica plus PTZ	1.41 ± 0.11 ^a	1.73 ± 0.18 ^{ac}	1.20 ± 0.08 ^a	0.40 ± 0.12 ^a	10.73 ± 0.18 ^c	60.39 ± 2.14 ^c

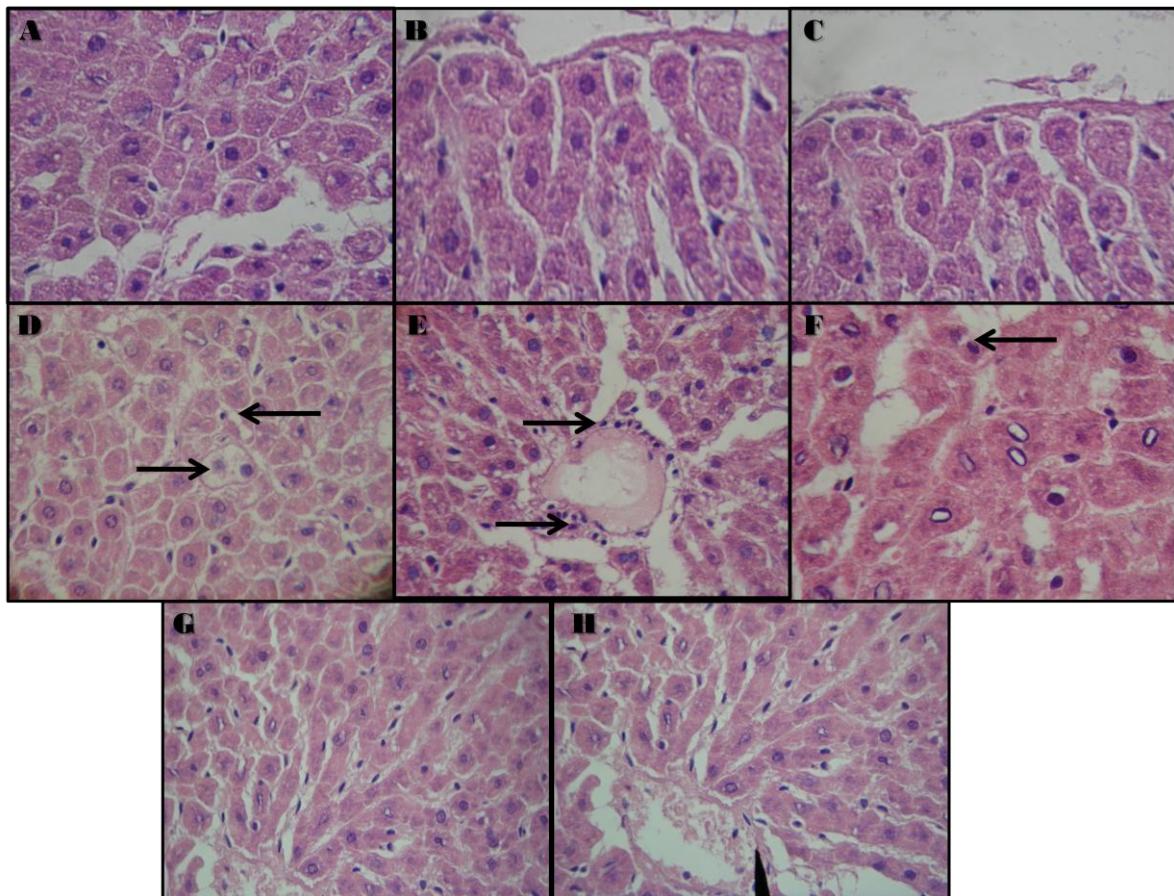
Determinação dos danos oxidativos a lipídios e proteínas, concentração de óxido nítrico, conteúdo de proteína sulfidrila e atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase em fígado de ratos tratados com a infusão de erva-mate orgânica (50 mg/kg), em presença ou ausência de PTZ. *Dados expressos em média ± erro padrão. Diferentes letras indicam diferença estatística, de acordo com a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey ($p<0.05$) para cada parâmetro avaliado.

Anexo III

GRUPOS	TBARS (nmol /mg de proteína)	Proteína carbonilada (nmol/mg de protéina)	Óxido Nítrico (nmol nitrito/mg de proteína)	Proteína sulfidrila (nmol DTNB/mg de proteína)	Superóxido dismutase (U SOD/mg de proteína)	Catalase (mmol H_2O_2 /min/ mg de proteína)
Controle (salina)	1.74 ± 0.08 ^{a*}	1.59 ± 0.24 ^a	1.89 ± 0.22 ^a	0.43 ± 0.07 ^a	5.30 ± 0.70 ^a	13.52 ± 0.57 ^a
Pentilenotetrazol (PTZ)	2.44 ± 0.06 ^b	3.78 ± 0.10 ^b	5.13 ± 0.06 ^b	0.07 ± 0.01 ^b	0.25 ± 0.02 ^b	7.20 ± 0.70 ^b
Erva mate orgânica	1.79 ± 0.13 ^a	1.60 ± 0.15 ^a	2.12 ± 0.40 ^a	0.50 ± 0.10 ^a	8.06 ± 0.31 ^{ac}	15.06 ± 1.02 ^a
Erva mate organic plus PTZ	2.03 ± 0.19 ^{ac}	1.93 ± 0.21 ^{ac}	2.59 ± 0.23 ^a	0.43 ± 0.02 ^a	6.98 ± 0.54 ^a	13.58 ± 1.31 ^{ac}

Determinação dos danos oxidativos a lipídios e proteínas, concentração de óxido nítrico, conteúdo de proteína sulfidrila e atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase em soro de ratos tratados com a infusão de erva-mate orgânica (50 mg/kg), em presença ou ausência de PTZ. *Dados expressos em média ± erro padrão. Diferentes letras indicam diferença estatística, de acordo com a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey ($p<0.05$) para cada parâmetro avaliado.

Anexo IV



Fotomicrografia hepática do fígado de ratos Wistar (HE, 400X). (A) grupo controle; (B) tratamento com erva-mate convencional (50 mg/kg); (C) tratamento com erva-mate orgânica (50 mg/kg); (D) administração de PTZ, mostrando a presença de esteatose; (E) administração de PTZ, mostrando infiltrado de células inflamatórias; (F) administração de PTZ, mostrando apoptose em hepatócito; (G) tratamento com erva-mate convencional *plus* PTZ; (H) tratamento com erva-mate orgânica *plus* PTZ; (A, B, C, G e H) arquitetura celular normal. As fotomicrografias mostram a lâmina mais representativa para cada grupo ensaiado.

Anexo V

Depósito de Pedido de Patente de Invenção junto ao INPI

CÓPIA		< Uso exclusivo do INPI >	
020110054443 26/05/2011 16:30 -NPRJ 0000221105385730			
Espaço reservado ao protocolo		Espaço para etiqueta	

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: FUNDACÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL - UCS
1.2 Qualificação: Instituto privado de pesquisa
1.3 CNPJ/CPF: 88648761000103
1.4 Endereço Completo: Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, Cidade Universitária,
Caxias do Sul, RS, Brasil
1.5 CEP: 16 Telefone: 1.6 1.7 Fax:
1.8 E-mail:

continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: INVENÇÃO

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE EXTRATO DE ILEX, ORGÂNICA E/OU CONVENCIONAL,
EXTRATO OBTIDO, USO DE EXTRATO E COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO EXTRATO COM AÇÃO
ANTICONVULSIVANTE

continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N° Data de Depósito:

5. Prioridade: interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: Mirian Salvador
6.2 Qualificação: Brasileira, Separada 6.3 CPF: 349.500.440-87
6.4 Endereço completo: Rua Santos Dumont, 711/501, Lourdes, Caxias do Sul, RS
6.5 CEP: 95084-390 6.6 Telefone: 6.7 Fax:
6.8 E-mail: msalvador@ucs.br

continua em folha anexa



ANEXO DEPOSITANTES:

Depositantes (71):

Nome: **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS**
Qualificação: Universidade federal Brasileira CPF / CNPJ: 92.969.856/0001-98
Endereço completo: Av. Paulo Gama, nº110, Farroupilha, Porto Alegre, RS
CEP: 90040-060
Telefone: () Fax: ()
E-mail:

RIO DE JANEIRO
Praga Rioano, 19 / 2º andar
Candelária / 20031.050 / RJ
T (21) 3212.8200
F (21) 3212.5201
WWW.ATEMCONSULT.COM.BR

SÃO PAULO
Rua Padre João Menod, 1212 / 6º andar
Centro Cesar / 01411.000 / SP
T (11) 3087.8200
F (11) 3087.8201



ANEXO INVENTORES:

Inventor (72):

Nome: **Adriana Simon Coitinho**

Qualificação: **Brasileira, Casada** CPF: **785.088.780-87**

Endereço completo: **Rua Professor Freitas Cabral 310 apt 702, Jardim Botânico ,Porto Alegre, RS,**

CEP: **90690-130**

Telefone: () Fax: ()

E-mail: **acoitinho@yahoo.com.br/ adriana.simon@ufrgs.br**

Nome: **Cátia dos Santos Branco**

Qualificação: **Brasileira, Solteira** CPF: **005.819.320-05**

Endereço completo: **Estrada Federal BR 116, Km 148, N° 18150; Apto 201, Sagrada Família, Caxias do Sul,RS**

CEP: **95054-780**

Telefone: () Fax: ()

E-mail: **catiasb2004@yahoo.com.br**

RS - PORTO ALEGRE:
Praça Floriano, 19 J 2º andar
Cincinatti / 20031-030 / RS
T (51) 3212.8200
F (51) 3212.8201
www.atemereader.com.br

SÃO PAULO:
Rua Padre João Manuel, 1212 / 6º andar
Cerqueira Cesar / 01411-000 / SP
T (55) 11 3087.8200
F (55) 11 3087.8201

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):

(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome: ATEM E REMER ASSES. CONSULT. PROP. INT. LTDA

9.2 CNPJ/CPF: 07336918/0001-55

9.3 APIQAB: 1946

9.4 Endereço completo: PRAÇA FLORIANO, 19/28º ANDAR - RJ

9.5 CEP: 20031-050

9.6 Telefone: 21 3212-8200

9.7 Fax: 21 3212-8201

9.8 E-Mail: patents@atemeremer.com.br

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

Listagem de sequências em arquivo eletrônico: nº de CDs ou DVDs (original e cópia).

Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fls.

Listagem de sequências em formato impresso: fls.

Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinele e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	1	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	10	fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	2	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	2	fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade		fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	2	fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho		fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1	fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Comprovante de pagamento da guia					1	fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 19 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Rio de Janeiro, 25 de maio de 2011

Local e Data

Assinatura e Carimbo

ATEM & REMER ASSESSORIA E CONSULTORIA DE
PROPRIEDADE INTELECTUAL LTDA.
CNPJ No. 07.336.918/0001-55



Formulário 1.01 – Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 2/2)

Anexo VI

Curriculum Lattes da aluna

Cátia dos Santos Branco
Curriculum Lattes

Junho/2012

Cátia dos Santos Branco

Curriculum Lattes

Dados Pessoais

Nome	Catia dos Santos Branco
Filiação	Joni Tadeu de Quadros Branco e Lucieni Mary dos Santos Branco
Nascimento	15/08/1985 - São Francisco de Paula/RS - Brasil
Endereço residencial	BR 116, Km 148, 18150, Ap. 201 Sagrada Família - Caxias do Sul 95054-780, RS - Brasil Telefone: 054 99999550
Endereço profissional	Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes Rua Francisco Getúlio Vargas,1130 Petrópolis - Caxias do Sul 95070-560, RS - Brasil Telefone: 54 32182105
Endereço eletrônico	e-mail para contato : csbranc1@ucs.br e-mail alternativo : catiasb@hotmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

2009 - 2012	Mestrado em Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil Título: Atividade anticonvulsivante e antioxidante de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>) orgânica e convencional, e seu efeito sobre o comportamento de ratos Wistar. Ano de obtenção: 2012 Orientador: Mirian Salvador Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
2003 - 2009	Graduação em Ciências Biológicas. Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil Título: Atividade Antioxidante do Resveratrol e da Vitamina C na Criopreservação de Sêmen Humano Orientador: Mirian Salvador
2000 - 2003	Ensino Médio (2º grau). Colégio Estadual José de Alencar, CEJA, Brasil
2000 - 2002	Ensino Profissional de nível técnico. Escola Cenecista, CNEC, Brasil
1991 - 1999	Ensino Fundamental (1º grau). Escola Estadual de Ensino Médio Professora Deotília Cardoso Lopes, EEMD, Brasil

Formação complementar

2011 - 2011	Curso de curta duração em METODOS DE EXTRACCION Y ANALISIS DE PRODUCTOS BIOA. Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil
2011 - 2011	Estágio Docência em Biologia Celular. Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil
2009 - 2009	Práticas de Biologia no Ensino Médio. Escola Estadual de Ensino Médio Professor Apolinário Alves dos Santos, EEEMA, Brasil
2008 - 2008	Ensino de Ciências Físicas e Biológicas. Escola Estadual de Ensino Médio Professor Apolinário Alves dos Santos, EEEMA, Brasil
2008 - 2008	As Queimadas nos Campos de Cima de Serra. Associação dos Vereadores dos Campos de Cima da Serra, AVCC, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta duração em Jornada Pedagógica de Professores. Secretaria Municipal de Educação e Cultura, SMEC, Brasil Bolsista do(a): Secretaria Municipal de Educação e Cultura
2003 - 2003	Curso de curta duração em VII Seminário Municipal de Educação. Secretaria Municipal de Educação e Cultura, SMEC, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de Caxias do Sul - UCS

Vínculo institucional

2011 - Atual	Vínculo: Técnico de Laboratório , Enquadramento funcional: Pesquisadora , Carga horária: 20, Regime: Parcial
2009 - 2011	Vínculo: Bolsista CAPES , Enquadramento funcional: Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Integral
2008 - 2009	Vínculo: Bolsista CNPq , Enquadramento funcional: Bolsista Iniciação Científica CNPq , Carga horária: 20, Regime: Parcial
2007 - 2008	Vínculo: Bolsista CNPq , Enquadramento funcional: Bolsista de Iniciação Científica CNPq , Carga horária: 20, Regime: Parcial
2006 - 2007	Vínculo: Bolsista CNPQ , Enquadramento funcional: Bolsista de iniciação científica CNPq , Carga horária: 20, Regime: Parcial
2005 - 2005	Vínculo: Bolsa trabalho , Enquadramento funcional: Bolsista , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

2009 - 2011	Projetos de pesquisa, Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes <i>Participação em projetos:</i> <i>ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE E ANTIOXIDANTE DE ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i>) ORGANICA E CONVENCIONAL E SEU EFEITO SOBRE OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM RATOS WISTAR</i>
2008 - 2009	Projetos de pesquisa, Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão <i>Participação em projetos:</i> <i>Avaliação da Atividade Antioxidante de Extratos de Sementes de Resíduos de</i>

Vinificação.

2006 - 2008 Projetos de pesquisa, Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão

Participação em projetos:

Comparação do Efeito Antioxidante do Resveratrol e da Vitamina C na Criopreservação de Sêmen Humano.

2. Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL

Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Tutora de pólo presencial , Carga horária: 8, Regime: Parcial

3. Escola de Ensino Médio EDIFICARE - EDIFICARE

Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: Professor , Enquadramento funcional: Professor de Biologia para o Ensino Médio , Carga horária: 12, Regime: Parcial

4. Secretaria Municipal da Saúde de Caxias do Sul - SMS

Vínculo institucional

2005 - 2006 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Agente de Saúde , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Projetos

2009 - 2011 ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE E ANTIOXIDANTE DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) ORGÂNICA E CONVENCIONAL E SEU EFEITO SOBRE OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM RATOS WISTAR

Descrição: A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) pertence à família Aquifoliaceae, naturalmente cultivada na Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai. Nos últimos anos, o mate vem ganhando rápida inserção nos mercados mundiais, incluindo Estados Unidos e Europa, tanto como chá, quanto como ingrediente na formulação de alimentos ou suplementos dietéticos, devido às suas reconhecidas propriedades farmacológicas e nutracêuticas. A erva-mate é rica em diversos compostos com atividade biológica, tais como polifenóis e flavonóides, os quais podem agir como antioxidantes, varrendo radicais livres. Estes RL quando produzidos em excesso, podem gerar uma condição designada estresse oxidativo. Este fenômeno está envolvido em vários processos fisiopatológicos, tais como mutagênese, carcinogênese, diabetes mellitus, catarata, envelhecimento, doenças neurodegenerativas e neurológicas. Uma patologia neurológica muito comum é a epilepsia, uma desordem crônica e dinâmica associada com dano neuronal contínuo, recorrente e imprevisível. As crises recorrentes podem aumentar o conteúdo das espécies reativas de oxigênio, as quais, por sua vez, podem induzir novas crises convulsivas por excitação neuronal anormal. Neste caso, os antioxidantes podem desempenhar um importante papel frente aos danos oxidativos relacionados com as crises epiléticas. Em vista disso, o objetivo desta pesquisa é avaliar a atividade anticonvulsivante, antioxidante e neuroprotetora de erva-mate, orgânica e convencional, assim como o efeito de sua administração sobre o comportamento de ratos Wistar.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (4);

Integrantes: Catia dos Santos Branco (Responsável); Mirian Salvador; Adriana S.Coitinho;

Financiador(es):

2008 - 2009 Avaliação da Atividade Antioxidante de Extratos de Sementes de Resíduos de Vinificação.

Descrição: Sementes de uva apresentam compostos polifenólicos, conhecidos por seus efeitos benéficos frente ao estresse oxidativo, tendo ação na prevenção de várias patologias. Tais sementes são descartadas como subprodutos em vinhedos, entretanto, mesmo após o processo de vinificação, apresentam quantidades significativas de compostos antioxidantes. Atualmente, há um crescente interesse em reaproveitar estes subprodutos. Em vista disso, este trabalho teve como objetivo determinar o conteúdo polifenólico e a atividade antioxidante de extratos aquosos de sementes de resíduos de vinificação de *Vitis labrusca* (Bordo e Isabel) e *Vitis vinifera* (Cabernet Sauvignon e Merlot).

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (4);

Integrantes: Catia dos Santos Branco; Mirian Salvador (Responsável); Gustavo Scola; Patrícia Spada; Regina Vanderline; José Cláudio Fonseca Moreira

Financiador(es):

2006 - 2008 Comparação do Efeito Antioxidante do Resveratrol e da Vitamina C na Criopreservação de Sêmen Humano.

Descrição: A criopreservação de espermatozoides humanos representa uma valiosa opção terapêutica no tratamento da infertilidade, no entanto, este procedimento pode causar danos oxidativos estruturais e funcionais ao gameta masculino. O presente trabalho teve como objetivo analisar os parâmetros seminais e de estresse oxidativo, e genotoxicidade em indivíduos férteis e inférteis, antes e após a criopreservação, com e sem o uso dos antioxidantes resveratrol ou ácido ascórbico.

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (2);

Integrantes: Catia dos Santos Branco; Márcia Esteves Garcez; Luana Lara; Mirian Salvador (Responsável); Fábio Pasqualotto

Financiador(es):

Áreas de atuação

1. Biologia Geral
2. Genética
3. Bioquímica
4. Estresse Oxidativo e Antioxidantes

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

Espanhol Compreende Bem , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Da Silva, Fernanda Rabaioli, Da Silva, Juliana, Allgayer, Mariangela da C., Simon, Caroline F., Dias, Johnny F., dos Santos, Carla E.I., Salvador, Mirian, **Branco, Catia**, Schneider, Nayê Balzan, Kahl, Vivian, Rohr, Paula, Kvitko, Kátia, BRANCO, C. S.
Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: Biomarkers of exposure, of early biological effects and of susceptibility. Journal of Hazardous Materials (Print). , v.225-226, p.81 - 90, 2012.
2. Garcez, M E, **Branco, Cátila S.**, Lara, L, Spada, Patrícia, Pasqualotto, F F, Salvador, M
Addition of ascorbic acid to cryopreservation medium reduces oxidative damages in semen of infertile men. Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida (Impresso). , v.15, p.15 - 16, 2011.
3. Garcez, Marcia E., **Branco, Cátila dos Santos**, Lara, Luana Venturin, Pasqualotto, Fabio F., Salvador, Mirian
Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. Fertility and Sterility. , v.94, p.2118 - 2121, 2010.
4. **Branco, Cátila S.**, Garcez, Márcia E., Pasqualotto, Fábio F., Erdtman, Bernardo, Salvador, Mirian
Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. Cryobiology (Print). , v.60, p.235 - 237, 2010.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BRANCO, C. S., Garcez, M E, Lara, L, Pasqualotto, F F, Salvador, M
Resveratrol and Ascorbic Acid reduce DNA damage induced by the Cryopreservation of the Human Semen. In: Free Radicals and Antioxidants in Chile, VI Meeting of SFRBM South American Group, 2009, Santiago.
Free Radicals and Antioxidants in Chile, VI Meeting of SFRBM South American Group.
Santiago, Chile: Salvat Impressores, 2009.
2. BRANCO, C. S., Garcez, M E, Lara, L, Pasqualotto, F F, Salvador, M
Comparação do efeito antioxidante do resveratrol e da vitamina C em pacientes férteis e inférteis. In:
XVI Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul, 2008, Caxias do Sul.
XVI Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul. , 2008.
3. BRANCO, C. S., Garcez, M E, Lara, L, Pasqualotto, F F, Salvador, M
Efeito da suplementação in-vitro de resveratrol na criopreservação de sêmen humano. In: XV Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul, 2007, Caxias do Sul.
XV Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul. , 2007.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. Garcez, M E, BRANCO, C. S., Lara, L, Pasqualotto, F F, Salvador, M
Effects of in-vitro supplementation of ascorbic acid and resveratrol in the cryopreservation of human semen. In: XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB, 2008, Águas de Lindóia, SP.
XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB. , 2008.
2. Garcez, M E, BRANCO, C. S., Lara, L, Pasqualotto, F F, Salvador, M
Effects of in-vitro supplementation of resveratrol in the cryopreservation of human semen. In: Free Radicals in Montevideo; V Meeting of SFRBM-South American Group; V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, Montevideo.
Free Radicals in Montevideo; V Meeting of SFRBM-South American Group; V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species. , 2007.

Apresentação de Trabalho

1. Branco, Cátila dos Santos

"Alimentos funcionais", 2011. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

2. Branco, Cátia dos Santos

"Radicais livres e antioxidantes", 2011. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

3. BRANCO, C. S.

"Radicais livres, homeostasia e saúde", 2011. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

4. Branco, Cátia dos Santos

"Interfaces da Infertilidade: tratamento e criopreservação", 2010. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

5. BRANCO, C. S., Scola, Gustavo, Salvador, M

Conteúdo Polifenólico e Atividade Antioxidante de Resíduos de Vinificação, 2009. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

6. BRANCO, C. S., Garcez, M E, Pasqualotto, F F, Salvador, M

XVII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2009. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

Produção Técnica

Produtos tecnológicos com registro ou patente

1. Branco, Cátia dos Santos, Coitinho, Adriana S., Salvador, M

Processo de produção de extrato de Ilex, orgânica e/ou convencional, extrato obtido, uso de extrato e composição compreendendo extrato com ação anticonvulsivante. Depósito de Patente Junto ao INPI : PI1102312-0, 2011

Patente: Privilégio de Inovação n.PI1102312-0, Processo de produção de extrato de Ilex. 26 de Maio de 2011 (Depósito);

Orientações e Supervisões concluídas

Iniciação científica

1. Leticia Biazus. **Atividade anticonvulsivante, comportamental e antioxidante de erva-mate (Ilex paraguariensis).**.. 2010. Iniciação científica (Farmácia) - Universidade de Caxias do Sul

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação Oral no(a) **Workshop Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes**, 2011. (Encontro)

O impacto dos flavonóides presentes nas frutas sobre a memória e cognição..

2. Apresentação Oral no(a) **XVII Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul**, 2009. (Encontro)

Conteúdo Polifenólico e Atividade Antioxidante de Resíduos de Vinificação.

3. Apresentação Oral no(a) **Seminário Interno Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes**, 2009. (Seminário)

Efeitos protetores do chá mate (Ilex paraguariensis) no dano ao DNA H2O2-induzido e o reparo do DNA em ratos..

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Free Radicals and Antioxidants in Chile, VI Meeting of SFRBM South American Group**, 2009. (Congresso)

Resveratrol and Ascorbic Acid reduce DNA damage induced by the Cryopreservation of the Human

Semen..

5. Apresentação Oral no(a) **XVII Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul**, 2009. (Encontro)

Resveratrol e Ácido Ascórbico diminuem o Dano ao DNA Induzido pela Criopreservação em Sêmen Humano..

6. Apresentação Oral no(a) **Seminário Interno Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes**, 2009. (Seminário)

Um estudo do efeito dos ácidos lipídicos na qualidade espermática..

7. Apresentação Oral no(a) **Seminário Interno Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes**, 2008. (Seminário)

A prevenção do estresse oxidativo e danos ao espermatozóide..

8. Apresentação Oral no(a) **XVI Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul**, 2008. (Encontro)

COMPARAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DO RESVERATROL E DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM PACIENTES FÉRTEIS E INFÉRTEIS.

9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB**, 2008. (Congresso)

Effects of in-vitro supplementation of ascorbic acid and resveratrol in the cryopreservation of human semen..

10. Apresentação Oral no(a) **Seminário Interno Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes**, 2008. (Seminário)

Ensaio Cometa de espermatozóides de touros frescos e criopreservados.

11. Apresentação Oral no(a) **Seminário Interno Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes**, 2007. (Seminário)

Dano ao DNA do espermatozóide e sua relevância clínica na avaliação e reprodução dos resultados.

12. Apresentação Oral no(a) **XV Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul**, 2007. (Encontro)

Efeito da suplementação in vitro do resveratrol na criopreservação de sêmen humano.

13. Apresentação Oral no(a) **Seminário Interno Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes**, 2007. (Seminário)

Efeitos da adição de crioprotetores e protocolos de criopreservação na lipoperoxidação da membrana e na recuperação da motilidade espermática..

14. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Free Radicals in Montevideo; V Meeting of SFRBM-South American Group; V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species**, 2007. (Congresso)

EFFECTS OF IN -VITRO SUPPLEMENTATION OF RESVERATROL IN THE CRYOPRESERVATION OF HUMAN SEMEN.

15. **Semana Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**, 2007. (Oficina)

16. **Ciclo de Palestras do Curso de Biologia**, 2005. (Encontro)

17. **Aula Inaugural do Curso de Ciências Biológicas**, 2003. (Encontro)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	4
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	5
Apresentações de Trabalhos (Conferência ou palestra).....	4
Apresentações de Trabalhos (Seminário).....	2

Produção Técnica

Produtos tecnológicos (outro).....	1
Patentes.....	1

Orientações

Orientação concluída (iniciação científica)	1
---	---

Eventos

Participações em eventos (congresso)	3
Participações em eventos (seminário)	6
Participações em eventos (oficina)	1
Participações em eventos (encontro)	7

Citações em bases bibliográficas

SCOPUS Número total de citações : 4; Número de trabalhos : 2 Data : 19/07/2011

Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações:

Branco, Cátia dos Santos