



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Departamento de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



ANA LUIZA SEREIA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DOS EFEITOS PROTETORES DE EXTRATOS
VEGETAIS CONTRA TOXICIDADE INDUZIDA POR β A₂₅₋₃₅ EM
CÉLULAS SH-SY5Y**

MARINGÁ

2019

ANA LUIZA SEREIA

Avaliação *in vitro* dos efeitos protetores de extratos vegetais contra toxicidade induzida por βA_{25-35} em células SH-SY5Y

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE PESQUISA OU ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

S483a Sereia, Ana Luiza
Avaliação *in vitro* dos efeitos protetores de extratos vegetais contra toxicidade induzida por β A₂₅₋₃₅ em células SH-SY5Y / Ana Luiza Sereia. -- Maringá, PR, 2019.
87 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

1. Doença de Alzheimer. 2. Frações acetato de etila. 3. Fitoquímica. 4. Vegetais brasileiros - Uso medicinal. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 23.ed. 615.321

Márcia Regina Paiva de Brito – CRB-9/1267

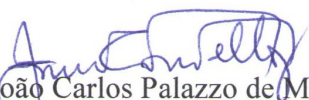
ANA LUIZA SEREIA

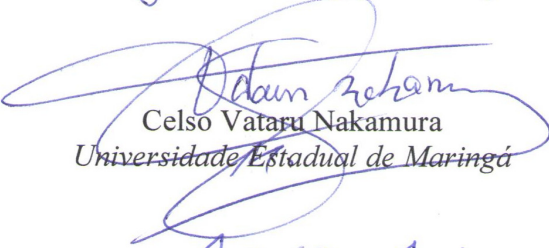
**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS PROTETORES DE EXTRATOS
VEGETAIS CONTRA TOXICIDADE INDUZIDA
POR β A₂₅₋₃₅ EM CÉLULAS SH-SY5Y**


103ª Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual
de Maringá como requisito para obtenção do título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

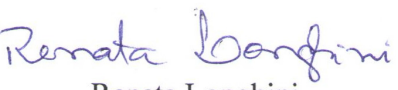
Aprovada em 15 de abril de 2019

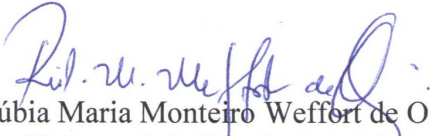
BANCA EXAMINADORA


João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá


Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Maringá


Mário Sérgio Mantovani
Universidade Estadual de Londrina


Renata Longhini
Prefeitura Municipal de Maringá


Rúbia Maria Monteiro Weffert de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá

As espécies vegetais utilizadas neste trabalho foram identificadas botanicamente pela Prof^ª Dr^ª Cássia Mônica Sakuragui (Universidade Federal do Rio de Janeiro), Prof^ª Dr^ª Lilian Auler Mentz (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e Prof^ª Dr^ª Maria Conceição de Souza (Universidade Estadual de Maringá).

O preparo dos extratos bruto (EBs) e frações acetato de etila (FAEs), bem como a determinação do teor de polifenóis totais, o controle de qualidade da FAE de *Stryphnodendron adstringens* por cromatografia líquida de alta eficiência, e as demais atividades para manutenção da linhagem celular foram realizados utilizando toda a estrutura do Laboratório de Biologia Farmacêutica – PALAFITO, da Universidade Estadual de Maringá (Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello).

Os ensaios de inibição da acetilcolinesterase e atividade antioxidante foram realizados no Laboratório de Inovações Tecnológicas no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, da Universidade Estadual de Maringá (Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura).

As análises quimiométricas foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica – LATTESC, da Universidade Federal de Santa Catarina (Prof. Dr. Acácio A.F. Zielinski).

Os ensaios de viabilidade celular e reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-qPCR) foram realizados no Laboratório de Genética Toxicológica - GENTOX, da Universidade Estadual de Londrina (Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani).

Os ensaios de potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), peroxidação lipídica e o desenvolvimento das metodologias analíticas por eletroforese capilar foram realizados utilizando equipamentos do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), da Universidade Estadual de Maringá, em parceria com os Laboratórios PALAFITO e Laboratório de Inovações Tecnológicas no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos.

Partes deste trabalho foram apresentados nos seguintes eventos:

ISOLANI, R. G.; ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; BLAINSKI, A.; SEREIA, A. L.; MELLO, J. C. P. Capillary electrophoresis for quality control of semipurified fraction of *Limonium brasiliense*. *10th International Congress of Pharmaceutical Sciences – CIFARP*. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2015.

SEREIA, A. L.; MARQUES, L. L. M.; ISOLANI, R. G.; ZIELINSKI, A. A. F.; NOVELLO, C. R.; MELLO, J. C. P. Quimiometria como ferramenta para seleção de extratos e/ou frações vegetais com potencial ação neuroprotetora em modelos de doença de Alzheimer. *VII Seminário Anual do PCF*. Maringá, Paraná, Brasil, 2016.

SEREIA, A. L.; OLIVEIRA, M. T.; BARANOSKI, A.; RIBEIRO, T. D. V. R.; TAKAHASHI, C. S.; MANTOVANI, M. S.; MELLO, J. C. P. Avaliação da atividade neuroprotetora de fração semipurificada de *Stryphnodendron adstringens* em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. *XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, XVI Simpósio Latinoamericano de Farmacobotânica*. Curitiba, Paraná, Brasil, 2017.

SEREIA, A. L.; OLIVEIRA, M. T.; BARANOSKI, A.; MANTOVANI, M. S.; MELLO, J. C. P. Semipurified fraction of *Stryphnodendron adstringens* protects against A β peptide cytotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *VIII Seminário Anual do PCF*. Maringá, Paraná, Brasil, 2017.

MEDEIROS, D. C.; SEREIA, A. L.; CHIERRITO, D.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P. Fração de *Stryphnodendron adstringens* protege células SH-SY5Y contra danos induzidos por β -amiloide₍₂₅₋₃₅₎. 7º COSIMP – 7º Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul, 7º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul e 2º Encontro de Pesquisa e Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Cascavel, Paraná, Brasil, 2018.

SEREIA, A. L.; OLIVEIRA, M. T.; BARANOSKI, A.; MANTOVANI, M. S.; MELLO, J. C. P. Electropherogram fingerprints and protective effect of brazilian plant extracts against cytotoxicity induced by $A\beta_{25-35}$. I International Meeting of Pharmaceutical Science, IX Seminário anual do PCF, I Seminário anual do PROFAR. Maringá, Paraná, Brasil, 2018.

Parte deste trabalho foi publicado na revista PLoS ONE (IF: 2,766):

SEREIA, A. L.; OLIVEIRA, M. T.; BARANOSKI, A.; MARQUES, L. L. M.; RIBEIRO, F. M.; ISOLANI, R. G.; MEDEIROS, D. C.; CHIERRITO, D.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; ZIELINSKI, A. A. F.; NOVELLO, C. R.; NAKAMURA, C. V.; MANTOVANI, M. S.; MELLO, J. C. P. *In vitro* evaluation of the protective effects of plant extracts against amyloid-beta peptide-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *PLoS ONE*, v. 14, n. 2, p. e0212089, 2019. (<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0212089>).

À memória de meu avô,
Jesus Sereia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por estar presente em todos os momentos, abençoando e protegendo a minha vida;

À minha família, em especial aos meus pais Donizeti e Josiane, e ao meu esposo André, por todo apoio, carinho e amor, e por me inspirarem a ser uma pessoa melhor;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de aprendizado e realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, pela disponibilidade irrestrita, ensinamentos, incentivo, compreensão e orientação desde a graduação;

Aos demais docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo conhecimento transmitido;

Aos professores Dr. Acácio A. F. Zielinski, Dr. Celso V. Nakamura, Dr. Cláudio R. Novello e Dr. Mário S. Mantovani, pela generosidade e por todo o suporte oferecido para a realização deste trabalho;

Aos doutores Adrivânio Baranoski, Daniela C. Medeiros, Danielle Lazarin-Bidóia, Leila L. M. Marques, Marcelo T. de Oliveira, Willian O. Castillo, doutorandos Danielly Chierrito, Fabianne M. Ribeiro, Mariane Ritter, Raquel G. Isolani e demais colegas do Laboratório PALAFITO, pela amizade, companheirismo e por compartilharem seus conhecimentos e dedicarem o seu tempo, contribuindo com a realização dos ensaios;

À prefeitura municipal de Maringá e aos meus colegas de trabalho, pela licença concedida para a realização dos experimentos na Universidade Estadual de Londrina;

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Helena, ao técnico Admir, e aos demais funcionários da Universidade Estadual de Maringá, pela atenção, paciência e suporte;

Aos membros da banca de qualificação e tese, pelo tempo dedicado à apreciação deste trabalho e contribuições;

À Prof^a Dr^a Catarina Satie Takahashi por cordialmente fornecer a linhagem celular SH-SY5Y, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Inovação Farmacêutica (INCT_if), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP/UEM) e à Fundação Araucária, pelo suporte financeiro e bolsa concedida durante os anos de 2014-15;

Finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, permitiram que eu pudesse concluir mais esta etapa em minha vida... muito obrigada!

“Nós, nos primeiros estágios da doença de Alzheimer, ainda não somos completamente incompetentes. Não somos desprovidos de linguagem nem de opiniões importantes, nem de períodos extensos de lucidez. Mas já não temos competência suficiente para que nos sejam confiadas muitas demandas e responsabilidades de nossa vida anterior. Temos a sensação de não estar nem cá nem lá, como um personagem numa terra bizarra. É um lugar muito solitário e frustrante para se estar (...) E não tenho nenhum controle sobre os objetos que conservo e os que são apagados. Não há como negociar com esta doença. Não posso oferecer a ela os nomes dos presidentes dos Estados Unidos em troca dos nomes dos meus filhos. Não posso lhe dar os nomes das capitais dos estados e conservar as lembranças de meu marido (...) Meus objetos estão desaparecendo e meus amanhã são incertos. Então, para que eu vivo? Vivo para cada dia. Vivo o presente. Num amanhã próximo, esquecerei que estive aqui diante de vocês e que fiz este discurso. Mas o simples fato de eu vir a esquecê-lo num amanhã qualquer não significa que hoje eu não tenha vivido cada segundo dele. Esquecerei o hoje, mas isso não significa que o hoje não tem importância.”

(Lisa Genova, em *Para sempre Alice*)

BIOGRAFIA



Ana Luiza Sereia nasceu em Londrina – PR, no dia 28 de fevereiro de 1987. Em 2006, iniciou o curso de Farmácia pela Universidade Estadual de Maringá. Durante a graduação, foi bolsista do Programa de Educação Tutorial (PET) da Farmácia (MEC/SESu), participou do Programa de Iniciação Científica (PIC) e de outros projetos de ensino, pesquisa e extensão. Realizou estágios em indústria farmacêutica e laboratório de bioequivalência, formando-se em 2010. Em 2011, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, concluindo-o em 2013. Em 2012-13, foi professora substituta no Instituto Federal do Paraná, campus Paranavaí, no curso Técnico em Alimentos em nível subsequente ao ensino médio. Atualmente, é farmacêutica na prefeitura municipal de Maringá, e desde o ano de 2013 realiza seu trabalho de doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello. Participou de eventos nacionais e internacionais com apresentação de trabalhos, tendo resumos e artigos publicados nas revistas *Acta Scientiarum – Health Sciences*, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, *Phytochemical Analysis*, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* e *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*.

SEREIA, A L 2019. Avaliação *in vitro* dos efeitos protetores de extratos vegetais contra toxicidade induzida por βA_{25-35} em células SH-SY5Y. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 87p.

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência e, até o momento, não possui cura. Os produtos naturais podem ser uma potencial fonte de novas alternativas terapêuticas. Estratégias terapêuticas que diminuem o stress oxidativo, modulam o acúmulo e toxicidade da beta-amiloide (βA) e inibem a hiperfosforilação da proteína tau são procuradas para prevenir o desenvolvimento e a progressão da DA. O objetivo deste estudo foi triar os extratos bruto (EBs) e as frações acetato de etila (FAEs) de *Guazuma ulmifolia*, *Limonium brasiliense*, *Paullinia cupana*, *Poincianella pluviosa*, *Stryphnodendron adstringens* e *Trichilia catigua* utilizando bioensaios preliminares *in vitro* (inibição da acetilcolinesterase, atividade antioxidante e teor de polifenóis totais). Ferramentas quimiométricas foram aplicadas para selecionar os extratos/frações com maior potencial e avaliar seus efeitos protetores contra a toxicidade induzida pela βA_{25-35} em células SH-SY5Y pelo ensaio do metil-tiazol-tetrazólio (MTT). Os efeitos da FAE de *S. adstringens* no potencial da membrana mitocondrial, produção de superóxidos, e peroxidação lipídica foram avaliados utilizando os ensaios com rodamina 123 (Rh123), 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA) e difenil-1-pirenilfosfina (DPPP), respectivamente. A ação da FAE de *S. adstringens* na expressão do mRNA de 10 genes relacionados à DA (*A2M*, *ACHE*, *ADAM10*, *APOE*, *APP*, *GSK3 β* , *LRP1*, *MAPT*, *PSEN1* e *PSEN2*) foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-qPCR), e os perfis eletroforéticos das FAEs de *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa*, e *S. adstringens* foram estabelecidos por eletroforese capilar. A análise de componentes principais (ACP) e a análise de agrupamento hierárquico (AAH) dividiu os extratos/frações em quatro grupos. O pré-tratamento com as FAEs agrupadas no cluster 1 (*S. adstringens*, *P. pluviosa* e *L. brasiliense*) protegeu as células SH-SY5Y da toxicidade induzida pela βA_{25-35} , sugerindo a atividade neuroprotetora dessas frações. A FAE de *S. adstringens* a 15,62 $\mu g/mL$ foi capaz de inibir completamente a despolarização mitocondrial (69%), produção de superóxidos (49%) e peroxidação lipídica (35%) induzidas pela βA_{25-35} . A FAE de *S. adstringens* também preveniu a superexpressão do mRNA do gene *MAPT* (razão de expressão de 2,387x) induzida pela βA_{25-35} , o que pode estar relacionado a hiperfosforilação da proteína tau. Com relação ao desenvolvimento analítico, as metodologias desenvolvidas para as FAEs de *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa*, e *S. adstringens* são mais rápidas, econômicas e menos poluentes que os métodos equivalentes previamente estabelecidos por cromatografia líquida de alta eficiência, e podem ser adotadas para a rotina de controle de qualidade após adequada validação. Esta é a primeira vez que os efeitos neuroprotetores das FAEs de *S. adstringens*, *P. pluviosa* e *L. brasiliense* foram demonstrados e que os perfis eletroforéticos para as FAEs de *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. pluviosa*, e *S. adstringens* foram estabelecidos. Este estudo expande o conhecimento sobre os efeitos protetores *in vitro* e controle de qualidade das frações avaliadas.

Palavras-chave: Atividade neuroprotetora, Beta-amiloide, Células SH-SY5Y, Doença de Alzheimer, Espécies vegetais brasileiras.

SEREIA, A L 2019. *In vitro* evaluation of the protective effects of plant extracts against A β ₂₅₋₃₅ induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. Ph.D. Thesis, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 87p.

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and, to date, there is no cure. Natural products can be a potential source of new therapeutic alternatives. Therapeutic strategies focusing on the reduction of oxidative stress, modulation of amyloid-beta (A β) toxicity and inhibition of tau protein hyperphosphorylation are warranted to avoid the development and progression of AD. The aim of this study was to screen the crude extracts (CEs) and ethyl-acetate fractions (EAFs) of *Guazuma ulmifolia*, *Limonium brasiliense*, *Paullinia cupana*, *Poincianella pluviosa*, *Stryphnodendron adstringens* and *Trichilia catigua* using preliminary *in vitro* bioassays (acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity, and total polyphenol content). Chemometric tools were applied to select extracts/fractions with greater potential and assess their protective effects against A β ₂₅₋₃₅ toxicity in SH-SY5Y cells by the methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay. The effects of the EAF of *S. adstringens* on mitochondrial membrane potential, superoxide production, and lipid peroxidation were evaluated using rhodamine 123 (Rh123), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA), and diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) probe, respectively. The action of the EAF of *S. adstringens* on the mRNA expression of 10 genes related to AD (*A2M*, *ACHE*, *ADAM10*, *APOE*, *APP*, *GSK3 β* , *LRPI*, *MAPT*, *PSENI* and *PSEN2*) was evaluated by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR), and the electropherogram fingerprints of EAFs of *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa*, and *S. adstringens* were established by capillary electrophoresis. Principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) divided extracts/fractions into four clusters. Pretreatment with the EAFs grouped in cluster 1 (*S. adstringens*, *P. pluviosa* and *L. brasiliense*) protected SH-SY5Y cells from A β ₂₅₋₃₅-induced toxicity, which suggests the neuroprotective activity of these fractions. The EAF of *S. adstringens* at 15.62 μ g/mL was able completely to inhibit the mitochondrial depolarization (69%), superoxide production (49%) and A β ₂₅₋₃₅-induced lipid peroxidation (35%). The EAF of *S. adstringens* also prevented the *MAPT* mRNA overexpression (expression ratio of 2.387x) induced by A β ₂₅₋₃₅, which may be related to tau protein hyperphosphorylation. With respect to analytical development, the developed methodologies for the EAFs of *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa*, and *S. adstringens* are faster, more economical and less polluting than the equivalent methods previously established by high performance liquid chromatography, and can be adopted for quality control routine after adequate validation. This is the first time that the neuroprotective effects of the EAFs of *S. adstringens*, *P. pluviosa*, and *L. brasiliense* have been demonstrated and that the electropherogram fingerprints for the EAFs of *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. pluviosa* and *S. adstringens* have been established. The study expands knowledge of the *in vitro* protective effects and quality control of the evaluated fractions.

Keywords: A β ₂₅₋₃₅-induced toxicity, Alzheimer's disease, Brazilian herbal species, Neuroprotective activity, SH-SY5Y cell line.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Células SH-SY5Y indiferenciadas.....	10
2	Folhas e fruto de <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. (Sterculiaceae).....	11
3	Rizomas de <i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae).....	13
4	Frutos de <i>Paullinia cupana</i> Kunth (Sapindaceae).....	14
5	(A) Árvore de <i>Poincianella pluviosa</i> (DC.) L.P. Queiroz (Fabaceae). (B) Folhas e flores de <i>P. pluviosa</i> . (C) Cascas de <i>P. pluviosa</i>	16
6	Ramos de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville (Mimosaceae).....	17
7	Folhas e inflorescências de <i>Trichilia catigua</i> A.Juss. (Meliaceae).....	18
8	Representação esquemática do sistema de Eletroforese Capilar (EC).....	23
9	Efeitos das FAEs de <i>Limonium brasiliense</i> , <i>Poincianella pluviosa</i> e <i>Stryphnodendron adstringens</i> na citotoxicidade induzida pela βA_{25-35}	39
10	Efeitos da FAE de <i>Stryphnodendron adstringens</i> na despolarização da membrana mitocondrial induzida pela βA_{25-35} em células SH-SY5Y.....	41
11	Efeitos da FAE de <i>Stryphnodendron adstringens</i> no acúmulo intracelular de EROs e peroxidação lipídica induzidos pela βA_{25-35}	42
12	Efeitos da FAE de <i>Stryphnodendron adstringens</i> na expressão de mRNA de genes relacionados à DA.....	43
13	Perfis eletroforéticos das FAEs de <i>Guazuma ulmifolia</i> , <i>Limonium brasiliense</i> , <i>Paullinia cupana</i> , <i>Poincianella pluviosa</i> e <i>Stryphnodendron adstringens</i>	45
S1	Gráfico de dispersão da análise de componentes principais das principais fontes de variabilidade entre os EBs/FAEs avaliados.....	59
S2	Efeitos das FAEs de <i>Limonium brasiliense</i> , <i>Poincianella pluviosa</i> e <i>Stryphnodendron adstringens</i> na viabilidade de células SH-SY5Y.....	60
S3	Perfil eletroforético da FAE de <i>Guazuma ulmifolia</i>	61
S4	Perfil eletroforético da FAE de <i>Limonium brasiliense</i>	61
S5	Perfil eletroforético da FAE de <i>Paullinia cupana</i>	61
S6	Perfil eletroforético da FAE de <i>Poincianella pluviosa</i>	62
S7	Perfil eletroforético da FAE de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	62

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Ensaio antioxidante, teor de polifenóis totais (TPT) e atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) <i>in vitro</i> em extratos vegetais selecionados e suas frações semipurificadas.....	33
2	Valores médios de atividade antioxidante, teor de polifenóis totais (TPT) e atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) nos extratos brutos e frações semipurificadas classificadas pela análise hierárquica de clusters.....	37
3	Ensaio de potencial de membrana mitocondrial em células SH-SY5Y tratadas com Rh123.....	41
4	Condições experimentais estabelecidas por eletroforese capilar para avaliação dos perfis eletroforéticos das frações semipurificadas.....	44
S1	Análise de dados da expressão de mRNA de genes relacionados à doença de Alzheimer usando o software REST 2009 com correção de eficiência	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β A	Beta-amiloide
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
A2M	Alfa-2-macroglobulina
AAH	Análise de agrupamento hierárquico
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
AChE/ <i>ACHE</i>	Acetilcolinesterase
ACP	Análise de componentes principais
<i>ADAM10</i>	Proteína 10 com domínios desintegrina e metaloproteinase
APOE	Apolipoproteína E
<i>APP</i>	Proteína precursora de beta-amiloide
CCE	Cromatografia capilar eletroosmótica
CCEM	Cromatografia capilar eletrocínética micelar
CD	Ciclodextrina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DA	Doença de Alzheimer
DHA	Ácido docosahexaenóico
d.i.	Diâmetro interno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPP	Difeni-1-pirenilfosfina
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EB	Extrato bruto
EC	Eletroforese capilar
ECG	Eletroforese capilar em gel
ECZ	Eletroforese capilar de zona
EM	Espectrometria de massas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAE	Fração acetato de etila
FIC	Focalização isoeétrica capilar
FRAP	Poder de redução do íon ferro
<i>GSK3β</i>	Glicogênio sintase quinase 3 beta
H ₂ DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
ITFC	Isotacoforese capilar
<i>LRP1</i>	Proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade

<i>MAPT</i>	Proteína tau associada aos microtúbulos
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
NMDA	N-metil-D-aspartato
PALAFITO	Laboratório de Biologia Farmacêutica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
<i>PSEN</i>	Presenilina
Rh123	Rodamina 123
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
SNC	Sistema nervoso central
TPT	Teor de polifenóis totais
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UV	Ultravioleta

LIST OF ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

β -CD	β -cyclodextrin
$\Delta\Psi_m$	Mitochondrial membrane potential
A β	Amyloid-beta
<i>A2M</i>	Alpha-2-macroglobulin
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AChE/ <i>ACHE</i>	Acetylcholinesterase
AD	Alzheimer's disease
<i>ADAM10</i>	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
ANOVA	Analysis of variance
<i>APOE</i>	Apolipoprotein E
APP	Amyloid beta precursor protein
BGE	Background electrolyte
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CE	Crude extract
DCF	2',7'-dichlorofluorescein
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPP	Diphenyl-1-pyrenylphosphine
DPPP-O	Diphenyl-1-pyrenylphosphine oxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAF	Ethyl-acetate fraction
FBS	Foetal bovine serum
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GAE	Gallic acid equivalent
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<i>GSK3β</i>	Glycogen synthase kinase 3 beta
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
HCA	Hierarchical cluster analysis
HP- β -CD	2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin
HPLC	High performance liquid chromatography
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HUEM	Herbarium of the Universidade Estadual de Maringá

IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
id	Inside diameter
IV	Index of variation
<i>LRPI</i>	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
LSD	Least significant difference
M-β-CD	Methyl-β-cyclodextrin
<i>MAPT</i>	Microtubule associated protein tau
MC	Median fluorescence for the control cells
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MT	Median fluorescence for the treated cells
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
n	Total number of observations
od	Outside diameter
PB	Procyanidin B
PC	Principal component
PCA	Principal component analysis
PDA	Photodiode array
pH	Potential of hydrogen
<i>PSEN</i>	Presenilin
REST	Relative expression software tool
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
ROS	Reactive oxygen species
RT	Retention time
RT-qPCR	Real-time quantitative reverse transcription
S	South
SD	Standard deviation
SPE	Solid-phase extraction
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TPC	Total polyphenol content
UDG	Uracil-DNA glycosylase
W	West

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°	Grau
'	Minuto
”	Segundo
°C	Grau Celsius
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
μA	Microampère
$\mu g/mg$	Micrograma por miligrama
$\mu g/mL$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
$\mu mol/L$	Micromol por litro
cm	Centímetro
h	Horas
kV	Quilovolt
mg	Miligrama
mg/Kg	Miligrama por quilograma
mg/L	Miligrama por litro
mg/mL	Miligrama por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol/L	Milimol por litro
ng	Nanograma
ng/ μL	Nanograma por microlitro
nm	Nanometro
p	Probabilidade
pmol	Picomol
pmol/ μL	Picomol por microlitro
r^2	Coefficiente de determinação
s	Segundo
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 A Doença de Alzheimer	5
2.2 A linhagem celular SH-SY5Y	9
2.3 Aspectos gerais das espécies vegetais avaliadas	11
2.3.1 <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.	11
2.3.2 <i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze	12
2.3.3 <i>Paullinia cupana</i> Kunth	13
2.3.4 <i>Poincianella pluviosa</i> (DC.) L.P. Queiroz	15
2.3.5 <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	16
2.3.6 <i>Trichilia catigua</i> A.Juss.	18
2.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa	19
2.5 Eletroforese Capilar	22
3 OBJETIVO	27
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 ARTIGO: Avaliação <i>in vitro</i> dos efeitos protetores de extratos vegetais contra a toxicidade induzida pelo peptídeo beta-amiloide em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	29
4.1 Introdução	31
4.2 Resultados e discussão	32
4.2.1 <i>Atividade antioxidante, teor de polifenóis totais e atividade inibitória da AChE</i>	32
4.2.2 <i>Uso de ferramentas quimiométricas para selecionar extratos/frações para investigação</i> ..	35
4.2.3 <i>Efeitos neuroprotetores das FAEs de L. brasiliense, P. pluviosa e S. adstringens</i>	38
4.2.4 <i>Efeitos da FAE de S. adstringens no potencial de membrana mitocondrial, produção de EROs e peroxidação lipídica</i>	40
4.2.5 <i>Efeitos da FAE de S. adstringens na expressão de mRNA de genes relacionados com a DA</i>	42
4.2.6 <i>Perfil por eletroforese capilar das FAEs de G. ulmifolia, L. brasiliense, P. cupana, P. pluviosa e S. adstringens</i>	43
4.2.7 <i>Controle de qualidade da FAE de S. adstringens</i>	46
4.3 Materiais e métodos	47
4.3.1 <i>Reagentes</i>	47
4.3.2 <i>Materiais vegetais</i>	48
4.3.3 <i>Preparo de extratos bruto e frações semipurificadas</i>	48
4.3.4 <i>Avaliação da atividade antioxidante utilizando ensaios in vitro</i>	48

4.3.5 Determinação do teor de polifenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu	49
4.3.6 Avaliação da atividade inibitória da AChE pelo ensaio de inibição da AChE em microplaca	50
4.3.7 Efeitos neuroprotetores das FAEs de <i>L. brasiliense</i> , <i>P. pluviosa</i> e <i>S. adstringens</i>	50
4.3.8 Avaliação dos efeitos protetores da FAE de <i>S. adstringens</i>	51
4.3.9 Desenvolvimento dos perfis por eletroforese capilar.....	52
4.3.10 Controle de qualidade da FAE de <i>S. adstringens</i>	53
4.3.11 Análises estatísticas.....	53
4.4 Conclusão	54
Referências.....	54
Material suplementar.....	59
5 DISCUSSÃO GERAL.....	65
6 CONCLUSÃO GERAL.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

Atualmente, existem no mundo mais de 50 milhões de pessoas com demência (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL [ADI], 2018). Cerca de dois terços dessas pessoas (aproximadamente 33,4 milhões) sofrem com a doença de Alzheimer (DA), enquanto o restante manifesta outras formas de demência, tais como: demência vascular, demência mista, demência com corpos de Lewy e demência frontotemporal (ADI, 2018). Considerando que a expectativa de vida dos indivíduos tem crescido, é de se esperar que o número de pessoas afetadas aumente, o que representa um enorme desafio social e econômico para o mundo todo (ADI, 2018; FISH et al., 2019; PRINCE et al., 2016). Estima-se que, até 2050, mais de 152 milhões de pessoas apresentem algum tipo de demência e que, até 2030, os custos com a doença atinjam cerca de US\$ 2 trilhões (ADI, 2018).

A DA destaca-se por ser considerada a principal forma de demência senil e atingir cerca de 40% dos indivíduos com mais de 85 anos, causando pronunciada e progressiva deterioração da função cognitiva e motora, e podendo levar o indivíduo à morte (FISH et al., 2019; LINDEBOOMA; WEINSTEIN, 2004; PEÑA-BAUTISTA et al., 2019; PRASANSUKLAB; TENCOMNAO, 2013; VENKATRAGHAVAN et al., 2019). Mundialmente, calcula-se que surge um novo caso de Alzheimer a cada três segundos. Nos Estados Unidos, esta doença já é responsável por um número de mortes maior do que os cânceres de mama e de próstata juntos (ADI, 2018).

Dentre as causas da DA, duas proteínas parecem estar fortemente envolvidas: a beta-amiloide (β A) e a tau. Ambas atingem níveis anormais no cérebro do indivíduo afetado, interrompendo a função dos neurônios (ADI, 2018; VENKATRAGHAVAN et al., 2019). Outros mecanismos também podem contribuir para o desenvolvimento e progressão do Alzheimer e têm sido estudados, como: deficiência na produção do neurotransmissor acetilcolina, ativação da enzima acetilcolinesterase (AChE) e stress oxidativo (ALI et al., 2013; MANI et al., 2012; NAAZ et al., 2013; OKADA; OKADA, 2013; PEÑA-BAUTISTA et al., 2019; PRASANSUKLAB; TENCOMNAO, 2013; SHAKIR; COULIBALY; KEHOE, 2013).

Desde a década de 90, mais de 100 medicamentos foram testados contra a DA (ADI, 2018). Contudo, até os dias de hoje, as opções terapêuticas disponíveis incluem apenas três inibidores da AChE (rivastigmina, donepezila e galantamina) e um antagonista parcial do receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA), a memantina (ADI, 2018; ALI et al., 2013; BHANDARI, 2013; FISH et al., 2019). Embora esses fármacos contribuam para o tratamento sintomático, até o momento, não existe um medicamento capaz de curar, prevenir ou impedir, de forma definitiva, a progressão da doença, o que justifica a busca por novos agentes terapêuticos (ADI, 2018; ALI et al., 2013; BHANDARI, 2013; FISH et al., 2019).

Neste sentido, as espécies vegetais constituem uma abundante fonte de agentes medicinais, compostos bioativos e protótipos de novos fármacos com potencial econômico, uma vez que podem fornecer compostos com diferentes atividades biológicas e características estruturais. Estudos criteriosos são indispensáveis para garantir a eficácia, segurança e qualidade, ampliar a variedade de fitoterápicos ou fitomedicamentos disponíveis no mercado e estimular parcerias com órgãos públicos e indústrias

farmacêuticas, já que estes medicamentos são bem aceitos pela população e são promissores para melhorar o bem-estar humano e promover a saúde (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; GOMES, 2007; PARK, 2010; PRASANSUKLAB; TENCOMNAO, 2013; RODRIGUES; CARLINI, 2002; VALMORBIDA, 2007; RODRIGUES et al., 2019; YOO; PARK, 2012; YUNES; CECHINEL-FILHO, 2012).

Pesquisas indicam que extratos ou frações vegetais ricas em polifenóis podem exibir múltiplas propriedades biológicas, dentre elas as atividades neuroprotetora e anticolinesterásica (BERNARDO et al., 2018; GAO et al., 2013, HARTMAN et al., 2006; OMAR et al., 2017; TORMA et al., 2017; SERENIKI; VITAL, 2008; SHAKIR; COULIBALY; KEHOE, 2013). Ademais, os bioensaios com cultura de células podem ser úteis para a avaliação do potencial biológico de espécies vegetais, substituindo, em parte, os experimentos que utilizam animais (MAHLKE, 2007).

Dentre as espécies vegetais estudadas no Laboratório de Biologia Farmacêutica (PALAFITO) da Universidade Estadual de Maringá, *Guazuma ulmifolia* (Mutamba), *Limonium brasiliense* (Baicuru), *Paullinia cupana* (Guaraná), *Poincianella pluviosa* (Sibipiruna), *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) e *Trichilia catigua* (Catuaba) destacam-se por seu perfil químico e potencial biológico (BLAINSKI et al., 2017a,b; BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013; BUENO et al., 2014; CALEARE et al., 2017; GODINHO et al., 2018; ISHIDA et al., 2006; KLEIN et al., 2013; KLEIN; LONGHINI; MELLO, 2012; LONGHINI et al., 2013; LONGHINI et al., 2017; LOPES et al., 2009b; MARQUES et al., 2016; MARQUES et al., 2018; RESENDE et al., 2011; SEREIA et al., 2017; TRUITI et al., 2015; VICENTINI et al., 2018).

Alguns autores sugerem que o extrato padronizado ou constituintes e frações derivadas dessas espécies, associadas ou não a outras drogas disponíveis, podem representar uma possível alternativa para o tratamento de doenças desencadeadas por radicais livres (BERNARDO et al., 2018; BRIGHENTE et al., 2007; CHASSOT et al., 2011; RESENDE, 2007), acúmulo de proteínas (BOASQUÍVIS et al., 2018) e processos inflamatórios (BARBOSA et al., 2004). Embora as atividades biológicas encontradas subsidiem a perspectiva de potencial aplicação dessas espécies vegetais contra a DA, até o momento, não há relatos na literatura sobre a investigação do efeito citoprotetor desses extratos e/ou frações semipurificadas em células de neuroblastoma humano.

2.1 A Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) destaca-se entre as desordens neurodegenerativas por ser a principal forma de demência senil, causando pronunciada e progressiva deterioração da função cognitiva e considerável impacto social e econômico no mundo todo (ADI, 2018; FISH et al., 2019; PEÑA-BAUTISTA et al., 2019; PRINCE et al., 2016; VENKATRAGHAVAN et al., 2019). Estima-se que cerca de 10% dos indivíduos com mais de 65 anos e 40% acima de 85 anos sejam afetados pela DA (HARTMAN et al., 2006; LINDEBOOMA; WEINSTEIN, 2004; PRASANSUKLAB; TENCOMNAO, 2013).

Inicialmente, a doença caracteriza-se pela perda da memória recente. À medida que progride, outros sintomas aparecem, como: declínio da função cognitiva (dificuldade de raciocínio, decisão e resolução de problemas), alterações comportamentais (como depressão, paranoia, irritabilidade, agressividade física e verbal, mudanças de humor, hiperatividade e comprometimento na execução de atividades triviais), desorientação e deficiências de linguagem. Em estágios avançados, ocorrem também perda de memória a longo prazo, deficiências nas funções visuo-espaciais, sintomas psicóticos (delírios e alucinações) e perda gradativa da função motora, podendo levar o indivíduo à morte por má nutrição, morte cerebral e/ou falência múltipla de órgãos (FISH et al., 2019; LINDEBOOMA; WEINSTEIN, 2004; MATTSON, 2004; PARK, 2010; PRASANSUKLAB; TENCOMNAO, 2013; RASKIND; BARNES, 2002; SELKOE, 2001; SERENIKI; VITAL, 2008; SHAKIR; COULIBALY; KEHOE, 2013).

Há muitos fatores de risco que podem predispor o indivíduo à doença, tais como: estilo de vida (dieta, sedentarismo, tabagismo, etilismo), fatores genéticos (sendo o gene da apolipoproteína E e4 o principal fator de risco genético associado a DA), idade avançada, sexo, diabetes, hipertensão, síndrome de Down e altos níveis plasmáticos de colesterol (ADI, 2018; BERNHARDI, 2007; FARFARA; LIFSHITZ; FRENKEL, 2008; FISH et al., 2019; HARTMAN et al., 2006; MATTSON, 2004; PRASANSUKLAB; TENCOMNAO, 2013; SELKOE, 2001; SERENIKI; VITAL, 2008; SHAKIR; COULIBALY; KEHOE, 2013). Dentre esses, estima-se que os fatores genéticos, o estilo de vida e, principalmente, a idade avançada respondam pela maior parte dos casos de Alzheimer (ADI, 2018; FISH et al., 2019; SELKOE, 2001; SERENIKI; VITAL, 2008).

A patogênese da DA é complexa e, até o momento, não está completamente elucidada (ADI, 2018; VENKATRAGHAVAN et al., 2019). A maioria dos cientistas concorda que existem duas proteínas no cérebro que estão fortemente envolvidas e são os principais marcadores da doença: a beta-amiloide (β A), que atinge níveis anormais e forma placas que se acumulam entre os neurônios e interrompem a função das células, e a proteína tau, que também atinge níveis anormais e forma emaranhados neurofibrilares dentro dos neurônios, bloqueando o sistema de transporte (ADI, 2018; FISH et al., 2019; VENKATRAGHAVAN et al., 2019). Contudo, outros mecanismos também

contribuem para o desenvolvimento e progressão da DA e são alvos de estudos, como: deficiência na produção do neurotransmissor acetilcolina, redução na quantidade da enzima colina acetiltransferase, ativação da enzima acetilcolinesterase (AChE), morte neuronal com consequente déficit no estabelecimento e funções das sinapses, presença de neuritos distróficos, déficit no fluxo sanguíneo cerebral, stress oxidativo, neuroinflamação, neurotoxicidade mediada pelo glutamato e alterações da glia (ALI et al., 2013; BERNHARDI, 2007; FARFARA; LIFSHITZ; FRENKEL, 2008; FISH et al., 2019; GAO et al., 2013; GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013; MAHLKE, 2007; MANI et al., 2012; MATTSON, 2004; NAAZ et al., 2013; OKADA; OKADA, 2013; PARK, 2010; PEÑA-BAUTISTA et al., 2019; PRASANSUKLAB; TENCOMNAO, 2013; SELKOE, 2001; SHAKIR; COULIBALY; KEHOE, 2013; ZHAO; TANG, 2002).

Com relação às áreas do sistema nervoso central (SNC) afetadas pela doença, observaram-se alterações no prosencéfalo basal, hipocampo, giro parahipocampal, amígdala, nos córtex transentorrinal, límbico, cerebral, frontal, temporal, parietal e occipital, núcleo accumbens, núcleo dorsal da rafe, núcleo septal e alguns núcleos subcorticais (MATTSON, 2004; PIVETTA, 2008; PRASANSUKLAB; TENCOMNAO, 2013; SELKOE, 2001; VENKATRAGHAVAN et al., 2019).

O diagnóstico da DA ainda é um desafio (ADI, 2018). Durante muitos anos, acreditou-se que a demência era parte normal do envelhecimento. Hoje, existem diretrizes clínicas para o diagnóstico da demência em um estágio pré-clínico, que são usadas principalmente em um cenário de pesquisa ou deficiências cognitivas leves, e também em algumas clínicas, para a DA e outras formas de demência onde há claro declínio cognitivo (ADI, 2018). Grande avanço tem sido feito no campo dos biomarcadores estruturais com o acesso a exames de varredura estrutural, como ressonância magnética, tomografia computadorizada e tomografia por emissão de pósitrons, que permitem a visualização de alterações inflamatórias, placas de β A, emaranhados da tau e redução da massa encefálica, dependendo do ligante utilizado, mesmo antes dos sintomas clínicos se manifestarem (ADI, 2018; FISH et al., 2019). As alterações estruturais mais precoces podem ser visualizadas no núcleo accumbens, lobo temporal, seguida por estruturas centrais, lobo frontal, lobo parietal e lobo occipital (VENKATRAGHAVAN et al., 2019).

Biomarcadores cognitivos, como o mini-exame do estado mental e a escala de avaliação da DA, também são ferramentas úteis para o diagnóstico, e sinalizam alterações antes mesmo que anormalidades no hipocampo ou em outras estruturas sejam visíveis por ressonância magnética (VENKATRAGHAVAN et al., 2019).

Além desses, pesquisadores têm avaliado a presença de biomarcadores como β A, proteína tau fosforilada e metabólitos de peroxidação lipídica no sangue (plasma e soro), no líquido cefalorraquidiano e na urina (ADI, 2018; PEÑA-BAUTISTA et al., 2019; VENKATRAGHAVAN et al., 2019). Estudos mostram que a β A é o primeiro marcador a se tornar anormal no líquido cefalorraquidiano, seguido pela proteína tau fosforilada (ADI, 2018; VENKATRAGHAVAN et al., 2019). No entanto, até o momento,

a análise dessas substâncias restringe-se mais ao contexto da pesquisa do que da clínica, e o diagnóstico da DA ainda não é um processo direto ou rápido (ADI, 2018).

No tocante ao tratamento, desde 1998, mais de 100 drogas foram testadas contra a DA (ADI, 2018). Ainda assim, até os dias de hoje, as opções terapêuticas disponíveis incluem, apenas, três inibidores da AChE (rivastigmina, donepezila e galantamina) e um antagonista parcial do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), a memantina (ADI, 2018; ALI et al., 2013; BHANDARI, 2013; FISH et al., 2019). Embora esses fármacos contribuam para o tratamento sintomático da DA melhorando principalmente a função cognitiva, não existe até o momento um medicamento capaz de curar, prevenir ou impedir a progressão, de forma definitiva, desta doença, o que justifica a busca por novos agentes terapêuticos (ADI, 2018; ALI et al., 2013; BHANDARI, 2013; FISH et al., 2019).

A maioria dos estudos realizados com o objetivo de encontrar novas terapias para a DA está focada na modificação da doença, ou seja, são tratamentos que buscam diminuir, parar ou mesmo reverter a progressão da doença, quer por interferência na cascata da β A ou na biologia da tau (FISH et al., 2019). Todavia, poucos estudos têm avançado as fases da pesquisa clínica. Em 2016, havia apenas oito novos agentes contra a DA entrando na fase I. Em 2018, este número chegou a doze, situação um pouco melhor, mas ainda crítica, principalmente quando comparamos à busca por agente anticâncer, onde temos centenas de novos agentes entrando na fase I a cada ano (ADI, 2018).

Existem, ainda, abordagens não farmacológicas para o tratamento de pessoas com DA. Há algumas intervenções sendo desenvolvidas em uma área psicossocial, como por exemplo terapia de estimulação cognitiva e remediação cognitiva, que parecem funcionar para pessoas em estágio leve a moderado de demência, apenas preservando a capacidade cognitiva por um pouco mais de tempo (ADI, 2018).

Terapias que buscam a regeneração do cérebro doente, substituindo neurônios e circuitos perdidos, permanecem como uma abordagem muito hipotética, sendo indiscutivelmente um passo longe demais para a DA neste momento (FISH et al., 2019).

Considerando a necessidade clínica, as plantas medicinais surgem como fonte de compostos bioativos ou protótipos que podem contribuir para o tratamento de distúrbios neurológicos (BERNARDO et al., 2018; BHANDARI, 2013; MAHLKE, 2007; PARK, 2010; VASUDEVAN; PARLE, 2006; YOO; PARK, 2012). Vários estudos sugerem que extratos vegetais ou metabólitos derivados de plantas podem ser eficazes para a prevenção ou tratamento da DA (BOASQUÍVIS et al., 2018; NAAZ et al., 2013; PRASANSUKLAB; TENCOMNAO, 2013; RODRIGUES et al., 2019; SHAKIR; COULIBALY; KEHOE, 2013).

Algumas espécies que tiveram a sua atividade avaliada em modelos da DA foram: *Daucus carota* (VASUDEVAN; PARLE, 2006), *Buddleja thyrsoides* (MAHLKE, 2007), *Ginkgo biloba*, *Huperzia serrata* (PARK, 2010), *Cassia obtusifolia*, *Curcuma longa*, *Desmodium gangeticum*, *Melissa officinalis*, *Moringa oleifera*, *Salvia officinalis*, *Yizhi jiannao* (OBULESU; RAO, 2011), *Murraya koenigii* (MANI et al., 2012), *Cannabis sativa*, *Catharanthus roseus*, *Erythrina senegalensis*, *Scoparia*

dulcis, *Sesamum indicum*, *Vigna unguiculata* (SHAKIR; COULIBALY; KEHOE, 2013), *Hunteria zeylanica*, *Pleiocarpa mutica*, *Polyalthia longifolia* (NAAZ et al., 2013), *Adhatoda vasica*, *Embllica officinalis*, *Ferula assafoetida*, *Peganum harmala*, *Syzygium aromaticum*, *Terminalia arjuna*, *T. chebula*, *Zingiber officinalis* (ALI et al., 2013), *Salvia miltiorrhiza* (YU et al., 2014), *Limonium algarvense*, *Camellia sinensis* (RODRIGUES et al., 2019) e *P. cupana* (BOASQUÍVIS et al., 2018).

Estudos indicam que alcaloides (ALI et al., 2013; MANI et al., 2012; NAAZ et al., 2013; ZHAO; TANG, 2002), cumarinas (MAHLKE, 2007), flavonoides (BERNARDO et al., 2018; HARTMAN et al., 2006; SERENIKI; VITAL, 2008; SHAKIR; COULIBALY; KEHOE, 2013), terpenoides (YOO; PARK, 2012), triterpenoides, fenilpropanoides, saponinas e polissacarídeos (GAO et al., 2013) possam estar envolvidos com a atividade neuroprotetora e anticolinesterásica apresentadas pelos extratos e/ou frações vegetais. Haja vista a complexidade patogênica da DA, é de se esperar que o desenvolvimento de novos medicamentos se fundamente em agentes com múltiplas propriedades biológicas, como as apresentadas por flavonoides e fenilpropanoides (GAO et al., 2013). Contudo, avaliações mais rigorosas e estudos clínicos são necessários antes de se fazer a indicação formal do uso dessas plantas e/ou metabólitos para esta finalidade (SHAKIR; COULIBALY; KEHOE, 2013; YOO; PARK, 2012).

Conhecer os mecanismos envolvidos com a DA é essencial para a investigação de novos agentes terapêuticos, sendo o principal objetivo e desafio dos pesquisadores (SERENIKI; VITAL, 2008). Além de inibidores da AChE, sugere-se a avaliação de outras estratégias, como: inibidores da butirilcolinesterase, inibidores da produção ou agregação da proteína β A, modificadores de monoaminas, antioxidantes (ALI et al., 2013; NAGELE et al., 2004; OBULESU; RAO, 2011; PARK, 2010; PRASANSUKLAB; TENCOMNAO, 2013; RODRIGUES et al., 2019; SELKOE, 2001; ZHAO; TANG, 2002), controladores da ativação glial, inibidores da apoptose neuronal (JANA; PAHAN, 2010), inibidores das enzimas que metabolizam a proteína precursora da β A (β e γ secretase) (MANI et al., 2012; MATTSON, 2004; PARK, 2010), anti-inflamatórios que interfiram na resposta da microglia, astrócitos e citocinas, além de bloqueadores do canal de cálcio e moduladores de determinados sinais de transdução que podem proteger os neurônios dos efeitos deletérios causados pelo acúmulo da β A (SELKOE, 2001).

Os bioensaios *in vitro* (como cultura de células, estudo de enzima ou receptores) substituem, em parte, os experimentos que utilizam animais ou tecidos e contornam problemas relacionados à ética e comercialização de animais, bem como orientam o fracionamento de compostos responsáveis por determinadas atividades (MAHLKE, 2007).

Diversos estudos com extratos e frações vegetais têm sido realizados no laboratório PALAFITO, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), envolvendo os Departamentos de Farmácia, Farmacologia e Terapêutica e Ciências Básicas da Saúde da UEM, e Farmacologia, Microbiologia e Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Dentre as espécies avaliadas, *Guazuma ulmifolia* (Mutamba), *Limonium brasiliense* (Baicuru), *Paullinia cupana* (Guaraná), *Poincianella pluviosa* (Sibipiruna), *Stryphnodendron adstringens*

(Barbatimão) e *Trichilia catigua* (Catuaba) destacam-se por seu potencial biológico e perfil químico rico em compostos fenólicos. Sabe-se que esse tipo de substâncias possui potencial contra doenças neurodegenerativas, geralmente por apresentarem atividade antioxidante, anticolinesterásica e anti- β A (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; BERNARDO et al., 2018; BOASQUÍVIS et al., 2018; CALIXTO-JÚNIOR et al., 2016; DEY et al., 2017; MORAIS et al., 2017; OMAR et al., 2017; PARK, 2010; RODRIGUES et al., 2019; SHAKIR; COULIBALY; KEHOE, 2013; TORMA et al., 2017; YU et al., 2014; ZENG et al., 2010). Logo, a atividade biológica de extratos/frações semipurificadas oriundas dessas espécies contra a DA deve ser investigada.

2.2 A linhagem celular SH-SY5Y

A utilização de neurônios humanos adultos vivos em estudos funcionais e de intervenção nas áreas de neurobiologia e neurociência nem sempre é possível, uma vez que é acompanhada por uma série de dificuldades, que incluem condições específicas de cultura, alta heterogeneidade na cultura, além das questões éticas evidentes (AGHOLME et al., 2010). Deste modo, é recomendável que se recorra a outros modelos experimentais, que podem variar de sistemas puramente moleculares a cultura celular, cultura de tecidos e modelos animais (FORSTER et al., 2016).

As linhagens celulares imortalizadas e proliferativas são utilizadas como uma ferramenta científica importante para as pesquisas, particularmente no campo da DA, tendo em vista que se constituem em modelos mais simples e nos permitem estudar as relações entre os eventos moleculares e a fisiologia celular, possibilitando a caracterização de mecanismos moleculares, funcionalidades de proteínas e avaliações preliminares de drogas/fármacos (AGHOLME et al., 2010; FORSTER et al., 2016; SHIPLEY; MANGOLD; SZPARA, 2016). Dentre os modelos *in vitro* disponíveis, a linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y destaca-se como uma das mais frequentemente utilizadas (AGHOLME et al., 2010; FORSTER et al., 2016).

Estas células são um subclone derivado da linhagem celular SK-N-SH, originalmente obtida a partir da biópsia da medula óssea de um tumor ósseo metastático de uma paciente de 4 anos idade, e que se presume que surja de células da crista neural (FORSTER et al., 2016; KOVALEVICH; LANGFORD, 2013; SHIPLEY; MANGOLA; SZPARA, 2016). Células SK-N-SH foram subclonadas três vezes; primeiro para SH-SY, que são semelhantes aos neuroblastos na aparência, com neuritos de comprimento pequeno a médio que se estendem radialmente a partir do corpo celular, subsequentemente, as células SH-SY foram subclonadas após nove semanas em cultura contínua (designadas SH-SYS) e, finalmente, reclonadas após 12 semanas adicionais para se obter a linhagem celular SH-SY5Y (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013; ROSS; SPENGLER; BIEDLER, 1983).

As células SH-SY5Y (Figura 1) têm um cariótipo estável que consiste em 47 cromossomos, corpos celulares redondos e pequenos, citoplasma escasso e processos citoplasmáticos semelhantes aos neuritos (ROSS; SPENGLER; BIEDLER, 1983; SHIPLEY; MANGOLD; SZPARA, 2016). As culturas

podem incluir células aderentes e flutuantes, ambas viáveis, embora seja comum entre os pesquisadores descartar as células flutuantes durante as trocas de meio (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). Estima-se que o tempo de duplicação seja de aproximadamente 27 h e a densidade de saturação de crescimento maior que 1×10^6 células/cm² (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). Com relação ao crescimento, podem crescer em multicamadas e formar densos aglomerados celulares focais (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013; ROSS; SPENGLER; BIEDLER, 1983).

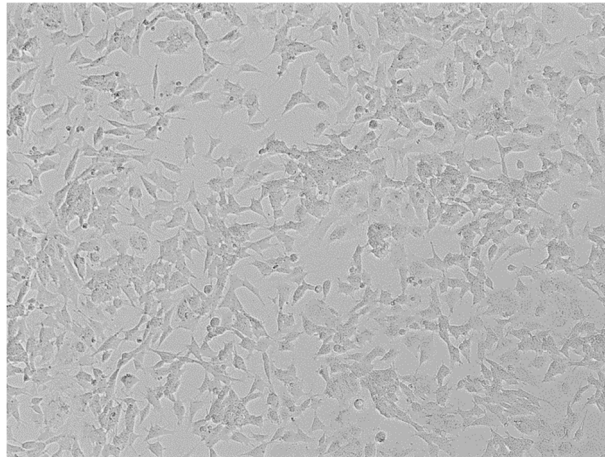


Figura 1. Células SH-SY5Y indiferenciadas. **Fonte:** Adrivânio Baranoski (2016).

Na literatura, é possível encontrar vários estudos que confirmam que as células SH-SY5Y indiferenciadas podem ser um modelo experimental *in vitro* útil para investigação dos efeitos protetores de substâncias/extratos contra a toxicidade induzida pela proteína β A e/ou seu fragmento (CHEN et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2011; YU et al., 2014; ZHANG et al., 2010). Hashimoto e co-autores (2011) utilizaram as células SH-SY5Y para investigar o efeito protetor do ácido docosahexaenoico (DHA, uma forma de ômega 3) e comprovaram que o DHA não só inibe a fibrilação da β A₂₅₋₃₅, como também protege as células da degeneração neurotóxica induzida pelo fragmento β A. Chen e colaboradores (2013) avaliaram os efeitos sinérgicos ou aditivos da combinação de ácido fólico e memantina na proteção contra a neurotoxicidade induzida pela β A e observaram que o tratamento combinado é capaz de diminuir a apoptose, a produção de superóxidos, a despolarização da membrana mitocondrial e a liberação de citocromo C para o citosol induzidas pela β A₂₅₋₃₅. Yu et al. (2014) mostraram que um extrato de *Salvia miltiorrhiza* fornece neuroproteção substancial às células SH-SY5Y, pelo menos em parte, inibindo o estresse oxidativo e atenuando a apoptose induzida pelo fragmento da β A, sugerindo que os ensaios com as células SH-SY5Y podem ser válidos para a triagem de agentes terapêuticos para a DA. Ademais, as células SH-SY5Y também podem ser utilizadas em experimentos *in vitro* na forma diferenciada em um fenótipo semelhante aos neurônios humanos maduros, o que expande o seu potencial de uso para o estudo de outras doenças, incluindo Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e doença de Huntington (FORSTER et al., 2016; KOVALEVICH; LANGFORD, 2013; SHIPLEY; MANGOLD; SZPARA, 2016).

2.3 Aspectos gerais das espécies vegetais avaliadas

2.3.1 *Guazuma ulmifolia* Lam.

Guazuma ulmifolia Lam. (Figura 2) é uma espécie pertencente à família Sterculiaceae e ordem Malvaceae, amplamente distribuída por toda a América Latina (CARVALHO, 2007; PEREIRA et al., 2019). Apresenta-se como um arbusto ou árvore perenifólia, de galhos finos, capaz de atingir dimensões próximas à 30 m de altura na idade adulta (CARVALHO, 2007). Popularmente, é conhecida como mutamba, mutamba-preta, mutambo, mutamba-verdadeira, guaxima-macho, cabeça-de-negro, periquiteira, chico-magro, envireira, pau-de-bicho, camacã, pau-de-motamba, embireira, araticum-bravo, coração-de-negro, guaxima-torcida, maria-preta, marolinho, motambo, umbigo-de-caçador e umbigo-de-vaqueiro (CARVALHO, 2007).



Figura 2. Folhas e fruto de *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae). **Fonte:** Gerleni Lopes Esteves (2014).

Em todas as regiões onde é encontrada, extratos da casca, folhas e raízes são utilizados na medicina tradicional para tratamento de transtornos gastrointestinais, cutâneos, dermatológicos (como queda de cabelo), respiratórios, cardiovasculares, inflamatórios, problemas relacionados à próstata, rins e fígado, diabetes, febre e como estimulante para contrações uterinas (ALONSO-CASTRO; SALAZAR-OLIVO, 2008; BERENGUER et al., 2007; CARVALHO, 2007; KARTHIKA et al., 2017; MAGOS et al., 2008; MALDINI et al., 2013; MORAIS et al., 2017).

Na literatura, é possível encontrar estudos que atestam as atividades anti-secretora (HÖR; HEINRICH; RIMPLER, 1996), antioxidante, gastroprotetora, anti-úlceras (BERENGUER et al., 2007), antidiabética (ALONSO-CASTRO; SALAZAR-OLIVO, 2008), anti-hipertensiva, vasodilatadora (MAGOS et al., 2008), antibacteriana (CAMPORESE et al., 2003), anticolinesterásica, antifúngica (MORAIS et al., 2017), anti-inflamatória (MALDINI et al., 2013), antiparasitária (CALIXTO-JÚNIOR et al. 2016) e antiobesidade, através da inibição da enzima lipase pancreática (ISWANTINI et al., 2011).

Extrato da casca de *G. ulmifolia* também foi utilizado para síntese verde de nanopartículas de ouro, prata e prata/ouro que demonstraram efetivo potencial anticâncer, antibacteriano e antifúngico (KARTHIKA et al., 2017), o que amplia o seu uso para a área de nanotecnologia.

Fitoquimicamente, a mutamba apresenta saponinas, esteroides (ISWANTINI et al., 2011), glicosídeos cianogênicos (SEIGLER et al., 2005), mucilagem (PEREIRA et al., 2019) e é rica em substâncias antioxidantes, como taninos, flavonoides, ácidos fenólicos e proantocianidinas (HÖR; HEINRICH; RIMPLER, 1996; ISWANTINI et al., 2011; KARTHIKA et al., 2017). As cascas destacam-se por possuir maior teor de proantocianidinas, frequentemente associadas à atividade biológica, e por isso são geralmente utilizadas (BERENQUER et al., 2007). Cariofileno, farnesol, friedelina, ácido caurenóico, precoceno I, procianidina B5, procianidina C1, sitosterol (KARTHIKA et al., 2017), *ent*-catequina, epicatequina, *ent*-galocatequina, epigalocatequina, epiafzelequina-(4 β →8)-epicatequina, procianidina B1, procianidina B2, epicatequina-(4 β →8)-epigalocatequina, 4'-O-metil-epiafzelequina (LOPES et al., 2009b), (-)-epicatequina-[4 β →8]-(-)-epicatequina-4 β -benziltioeter, (-)-epicatequina-[4 β →6]-(-)-epicatequina-4 β -benziltioeter, (-)-epicatequina-[4 β →6]-(-)-epicatequina-[4 β →8]-(-)-epicatequina, (-)-epicatequina-[4 β →8]-(-)-epicatequina-[4 β →6]-(-)-epicatequina, (-)-epicatequina-[4 β →8]-(-)-epicatequina-[4 β →8]-(-)-epicatequina-[4 β →8] (HÖR; HEINRICH; RIMPLER, 1996), epifilocumarina, epifilocumarina-[4 β →8]-(-)-epicatequina e epifilocumarina-[4 β →8]-(-)-epicatequina-[4 β →8]-(-)-epicatequina (MALDINI et al., 2013) são exemplos de substâncias isoladas e identificadas das cascas de *G. ulmifolia*. Dentre as substâncias isoladas das folhas estão a taxifilina, durrina (SEIGLER et al., 2005), catequina, rutina, quercetrina, quercetina, luteolina, ácido clorogênico e cafeico (CALIXTO-JÚNIOR et al., 2016; MORAIS et al., 2017).

2.3.2 *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae), popularmente conhecida como baicuru, guaicurá ou guaicuru (Figura 3), é uma planta herbácea comumente encontrada no Uruguai, Argentina e na costa sul do Brasil (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2015a,b; BLAINSKI et al., 2017a,b; BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013; CALEARE et al., 2017; MOURA et al., 1985; MURRAY et al., 2004). Seus rizomas são empiricamente utilizados na medicina popular nas formas de infuso e decoco, como adstringente, depurativo, cardioprotetor, antisséptico em infecções genito-urinárias e para tratamento de inflamação uterina e ovarianas, síndrome pré-menstrual, cólicas menstruais e outros distúrbios menstruais (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2015a,b; BLAINSKI et al., 2017a,b; BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013; CALEARE et al., 2017; MOURA et al., 1985; MURRAY et al., 2004).



Figura 3. Rizomas de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae). **Fonte:** ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2015b.

Trata-se de uma espécie ainda pouco avaliada, tendo, desta forma, um amplo potencial a ser explorado. Alguns estudos comprovam que *L. brasiliense* possui atividade anti-inflamatória (MOURA et al., 1985), antioxidante (BLAINSKI et al., 2017a; MURRAY et al., 2004) e antibacteriana contra *Porphyromonas gingivalis* (CALEARE et al., 2017) e bactérias gram-positivas multirresistentes, como *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (BLAINSKI et al., 2017b). Antonelli-Ushirobira e colaboradores (2015a) mostraram que o extrato bruto (EB) de rizomas de *L. brasiliense* é seguro, possuindo baixa ou nenhuma toxicidade, hepatotoxicidade ou capacidade mutagênica em ratos Wistar.

Quimicamente, a espécie caracteriza-se pela presença de taninos, ácidos fenólicos como ácido gálico (MOURA et al., 1985), flavonoides como miricetina 3-*O*- α -ramnopiranosídeo, epigalocatequina-3-*O*-galato, epigalocatequina, galocatequina (BLAINSKI et al., 2017a,b; MURRAY et al., 2004), e proantocianidinas, como as samarangeninas A e B (CALEARE et al., 2017). Sugere-se, ainda, a presença de metilgalato e monômeros e dímeros do tipo A e B de prodelfinidinas-galato (BLAINSKI et al., 2017b).

2.3.3 *Paullinia cupana* Kunth

Paullinia cupana Kunth, pertencente à família Sapindaceae, é uma planta nativa da região Amazônica, de pequeno porte e casca muito escura, conhecida popularmente como guaraná (Figura 4) (CORRÊA, 1984; MENEZES-JÚNIOR, 1942).



Figura 4. Frutos de *Paullinia cupana* Kunth (Sapindaceae). **Fonte:** MARQUES, 2016.

Na medicina tradicional, o guaraná é amplamente utilizado como estimulante das funções cerebrais, afrodisíaco, tônico, diurético, febrífugo, sedativo, assim como no tratamento da enxaqueca, blenorragia, epilepsia, flatulência (CORRÊA, 1984), disenteria, aterosclerose, nevralgia, leucorreia, entre outras (DUKE, 1985; HENMAN, 1982). Altas doses de guaraná podem causar efeitos no SNC, tais como: hiperexcitação, tremor, ansiedade, irritabilidade, insônia e hipertermia; sendo contraindicado para pessoas com hipertensão e problemas cardíacos (CASTLEMAN, 1991; DUKE, 1985; GRIEVE, 1967).

Recente revisão (MARQUES et al., 2018) mostrou que é possível encontrar na literatura diversos estudos que avaliam o potencial biológico e composição química desta espécie vegetal. Como exemplo, alguns pesquisadores demonstraram que *P. cupana* tem ação antiagregante e desagregante em plaquetas (BYDLOOWSKI; YUNKER; SUBBIAB, 1988), antibacteriana (BASILE et al., 2005; MAJHENIC; SKERGET; KNEZ, 2007), antioxidante (BASILE et al., 2005; BITTENCOURT et al., 2013; MAJHENIC; SKERGET; KNEZ, 2007; MATTEI et al., 1998), gastroprotetora (CAMPOS et al., 2003), antigenotóxica (FUKUMASU et al., 2006a), anticarcinogênica (FUKUMASU et al., 2006b), antitumoral (FUKUMASU et al., 2008), reduz danos hepáticos (RUCHEL et al., 2017), reverte o processo inicial de senescência de células mesenquimatosas do tecido adiposo (MACHADO et al., 2015), protege células do epitélio pigmentado da retina (BONADIMAN et al., 2017), melhora a capacidade física (CAMPOS et al., 2005a; ESPÍNOLA et al., 1997), o humor (DORNELES et al., 2018), o desempenho cognitivo/memória (KENNEDY et al., 2004; RUCHEL et al., 2017) e reduz a fadiga (DORNELES et al., 2018; KENNEDY et al., 2008).

Em ensaios realizados por nosso grupo de pesquisa e parceiros, também foi possível observar que EB e/ou frações semipurificadas das sementes de guaraná possuem atividades antioxidante (OTOBONE et al., 2005; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007), antibacteriana (BARBOSA; MELLO, 2004; MARQUES et al., 2016; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007), reduz a adesão de *Candida albicans* à células do epitélio bucal e ao poliestireno (MATSUURA et al., 2015), melhoram a cognição (OTOBONE et al., 2005), e apresentam efeitos antidepressivo (OTOBONE et al., 2005; OTOBONE et al., 2007), antiamnésia, estimulante (OTOBONE et al., 2005), ansiolítico (RANGEL; MELLO; AUDI, 2013) e panicolítico (RANGEL; MELLO; AUDI, 2013; RONCON et al., 2011). Nosso grupo também

desenvolveu e caracterizou comprimidos contendo micropartículas de um extrato semipurificado de *P. cupana*, adequados para administração oral (KLEIN et al., 2013).

Fitoquimicamente, a espécie apresenta metilxantinas (predominantemente cafeína) (BRASIL, 2010; CORRÊA, 1984; HENMAN, 1982), taninos (BRASIL, 2010), flavonoides, saponinas, polissacarídeos, dissacarídeos, gordura, resina, substâncias mucosas, minerais, água, óleos essenciais, ácido nicotínico, colina e alcaloides (CARLSON; THOMPSON, 1998; MARX, 1990). Dentre as substâncias com reconhecido potencial biológico isoladas e identificadas no PALAFITO estão: cafeína, epicatequina, catequina, *ent*-epicatequina e procianidinas A2, B1, B2, B3, B4 e C1 (USHIROBIRA et al., 2007; YAMAGUTI-SASAKI 2007). Um método de extração por fluido supercrítico também foi otimizado para obtenção de extrato com maior teor de polifenóis, epicatequina e catequina (MARQUES, 2016; MARQUES et al., 2016).

Recentemente, Boasquívís e colaboradores (2018) mostraram que o extrato hidroalcoólico de guaraná apresenta efeito protetor no modelo de *Caenorhabditis elegans* para a DA, diminuindo a agregação e toxicidade da β A, e que este efeito pode estar associado à atividade antioxidante do extrato. Em conjunto, esses resultados evidenciam a atividade neuroprotetora desta espécie e reiteram a necessidade de mais estudos na área para que, no futuro, *P. cupana* possa ser utilizada para a prevenção ou tratamento da DA.

2.3.4 *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P.Queiroz

Poincianella pluviosa (DC.) L.P.Queiroz (Figura 5), popularmente conhecida como sibipiruna, falso-pau-brasil, sebipirana ou sepepirana, é um arbusto ou árvore de 5 a 10 m, pertencente à família Fabaceae, que distribui-se pelo Brasil, Bolívia, Argentina e Paraguai, sendo frequentemente utilizada na arborização urbana (LEWIS, 2015; MEIRA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017; TOZZI, 2016). Possui como sinónímia *Caesalpinia peltophoroides* Benth., *Caesalpinia pluviosa* DC. e *Caesalpinia pluviosa* var. *Peltophoroides* (Benth.) L.P.Queiroz (BUENO, 2014).



Figura 5. (A) Árvore de *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P.Queiroz (Fabaceae). (B) Folhas e flores de *P. pluviosa*. (C) Cascas de *P. pluviosa*. **Fonte:** BUENO, 2014.

Na medicina tradicional, as cascas e entrecascas de *P. pluviosa* são utilizadas empiricamente para o tratamento de câncer, labirintite, dor de estômago, dor nas costas, inflamação, reumatismo e como depurativo, na forma de macerados ou fresca (RIBEIRO et al., 2017). Estudo realizado no laboratório PALAFITO por Bueno e colaboradores (2014) comprovou que o extrato hidroalcoólico e uma fração semipurificada de sibipiruna possuem ação cicatrizante, estimulando queratinócitos humanos e fibroblastos dérmicos *in vitro*. Extrato hidroalcoólico de *P. pluviosa* também promoveu a regulação das proteínas e ajudou a acelerar os processos envolvidos na cicatrização, promovendo a angiogênese precoce e aumentando a maturação das fibras de colágeno em processo de cicatrização de feridas *in vivo* (BUENO et al., 2016).

Quimicamente, sugere-se a presença de pirogalol, ácido gálico, éster metílico do ácido gálico, ácido elágico, corilagina, 1,4,6-tri-*O*-galoil-glicose, telimagrandina I, 1,2,3,6-tetra-*O*-galoil-glicose, ácido malotínico, telimagrandina II, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil- glicose, geranina e ácido malotusínico (BUENO et al., 2014). Apesar de possuir vários polifenóis e taninos hidrolisáveis em sua composição, ainda são raros os estudos que utilizaram *P. pluviosa* para avaliação de suas atividades biológicas.

2.3.5 *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville (Mimosaceae), popularmente conhecida como casca-da-mocidade ou barbatimão (Figura 6), é uma espécie vegetal típica do cerrado brasileiro (COSTA et al., 2010; ISHIDA et al., 2006; LIMA; MARTINS; SOUZA-JÚNIOR, 1998; SANTOS et al., 2018). Suas cascas, cascas dos caules e entrecascas são popularmente utilizadas como anti-inflamatória, adstringente e no tratamento de diarreia, feridas e infecções vaginais, na forma de decocos, infusões e tinturas (BRASIL, 2014; FREITAS et al., 2018; SANTOS et al., 2002).



Figura 6. Ramos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Mimosaceae). **Fonte:** João Carlos Mello, 2014.

Avaliação biológica comprovou que extratos e frações de *S. adstringens* apresentam atividades anti-inflamatória (LIMA; MARTINS; SOUZA-JÚNIOR, 1998), antiúlcera (AUDI et al., 1999), antiparasitária (LUIZE et al., 2005), antibacteriana, cicatrizante (BRASIL, 2014), antifúngica (FREITAS et al., 2018), antioxidante e anticancer contra células de melanoma B16F10Nex-2 (SANTOS et al., 2018). Estudos mostraram, ainda, que frações ricas em polímeros de proantocianidinas não são genotóxicas (COSTA et al., 2010) e possuem baixa citotoxicidade para células Vero, macrófagos e glóbulos vermelhos (ISHIDA et al., 2006).

Fitoquimicamente, a espécie destaca-se por seu alto teor de taninos (aproximadamente 20%) nas cascas (COSTA et al., 2010), além de apresentar chalconas e compostos triterpenoides (LIMA; MARTINS; SOUZA-JÚNIOR, 1998). Dentre as substâncias isoladas e identificadas, estão os flavonoides galocatequina, epigalocatequina, epigalocatequina-3-*O*-galato, 4'-*O*-metilgalocatequina, epigalocatequina-3-*O*-(3,5-dimetil)-galato, as prodelphinidinas epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina, epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina, epigalocatequina-(4 β →6)-epigalocatequina, epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina-3-*O*-galato, epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina-3-*O*-*p*-hidroxibenzoato, epigalocatequina-3-*O*-*p*-hidroxibenzoato, galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina-3-*O*-*p*-hidroxibenzoato (MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1996a), as prorobinetidinas robinetidinol-(4 β →8)-epigalocatequina, robinetidinol-(4 α →8)-epigalocatequina, robinetidinol-(4 α →6)-epigalocatequina, robinetidinol-(4 β →8)-epigalocatequina-3-*O*-galato, robinetidinol-(4 α →8)-epigalocatequina-3-*O*-galato, robinetidinol-(4 α →6)-galocatequina, robinetidinol-[4 β →6(8)]-galocatequina, robinetidinol-(4 α →8)-galocatequina, 4'-*O*-metilrobinetidinol-4'-*O*-metilepigalocatequina, 4'-*O*-metilrobinetidinol-4'-*O*-metilgalocatequina (LOPES et al., 2009a; MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1996b), e as proantocianidinas epigalocatequina 3-*O*-galato-(4 β →8)-epigalocatequina 3-*O*-galato, epigalocatequina-epigalocatequina-3-*O*-(3,5-dimetil)-galato, epigalocatequina-3-*O*-(3-metoxi-4-hidroxi)-benzoato, galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina-3-*O*-

galato e 4'-*O*-metilgalocatequina-(4 α →8)-4'-*O*-metilgalocatequina (MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1996a; MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1999).

2.3.6 *Trichilia catigua* A.Juss.

A espécie *Trichilia catigua* A.Juss. (Figura 7), pertencente à família Meliaceae, é representada por árvores frondosas com 3 a 7,5 m de altura que florescem o ano todo (PATRÍCIO; CERVI, 2005; SILVA, 2004a). Popularmente, é conhecida como catuaba, catiguá (DUCKE, 1966), tatuaba, caramuru, pyrantacara (SILVA, 2004a), catiguá-vermelho, lagarteiro, cataguá, angelim-rosa, mangaltô-catinga e espeto. No Brasil, distribui-se pelos estados de Pará, Manaus, Ceará, Pernambuco, Bahia, Sergipe, Alagoas, Maranhão, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (PATRÍCIO; CERVI, 2005; SILVA, 2004a).



Figura 7. Folhas e inflorescências de *Trichilia catigua* A.Juss. (Meliaceae). **Fonte:** Cláudio Roberto Novello (2008).

As cascas da catuaba são muito requisitadas na medicina popular ou como matéria-prima industrial para produção de medicamentos, bebidas e corantes, além de ser útil para o curtume (LAGOS, 2006; MELO; AMORIM; ALBUQUERQUE, 2009; MING; CORREA-JUNIOR, 2002; PATRÍCIO E CERVI, 2005; SILVA, 2004a).

Sob o ponto de vista medicinal, *T. catigua* é empregada empiricamente em forma de extrato fluido, tintura, infusão, vinho e xarope (SILVA, 2004b) como afrodisíaco (DUCKE, 1966), estimulante sexual (BELTRAME et al., 2004) e do sistema nervoso (SILVA, 2004a), tônico, digestivo ou purgante (MING; CORREA-JUNIOR, 2002). Externamente, é usada contra o reumatismo e a hidropisia (PATRÍCIO; CERVI, 2005).

No cenário científico, esta espécie destaca-se por apresentar uma série de atividades biológicas comprovadas (LONGHINI et al., 2017). Estudos mostraram que *T. catigua* apresenta atividade analgésica (QUINTÃO et al., 2008; VAZ; MATA; CALIXTO, 1997; VIANA et al., 2011), anti-

inflamatória (BARBOSA et al., 2004), antiparasitária (PIZZOLATTI et al., 2002), vasodilatadora (ANTUNES et al., 2001; CALIXTO; CABRINI, 1997; PONTIERI et al., 2007), antioxidante (BERNARDO et al., 2018; BRIGHENTE et al., 2007; CHASSOT et al., 2011; LONNI et al., 2012; RESENDE, 2007; RESENDE et al., 2011; TANG et al., 2007; VICENTINI et al., 2018), cicatrizante (VICENTINI et al., 2018), antidepressiva (BONASSOLI et al., 2012; CAMPOS et al., 2005b; CHASSOT et al., 2011), antiamnésia (CHASSOT et al., 2011; GODINHO et al., 2018), anticolinesterásica e multimodal no SNC (BERNARDO et al., 2018), além de ser capaz de aumentar a proliferação de células do hipocampo (BONASSOLI et al., 2012), promover a recuperação funcional, e proteger camundongos contra deficiências cognitivas e morte celular hipocampal induzida por oclusão carotídea comum bilateral (TRUITI et al., 2015).

Fitoquimicamente, a espécie apresenta esteroides (LAGOS, 2006; MATOS, 2006), saponinas (MARQUES, 1998), heterosídeos (LAGOS, 2006), flavolignanas (BELTRAME et al., 2006; MARTINELLI, 2010; RESENDE, 2007; TANG et al., 2007; VIANA et al., 2011), limonoides (MATOS, 2006; MATOS et al., 2009), derivados do ácido quínico (BERNARDO et al., 2018), flavonoides, fenilpropanoides, taninos e mucilagem (BERNARDO et al., 2018; LAGOS, 2006; NEBO, 2008; RESENDE, 2007; RESENDE et al., 2011; SILVA, 2005; TANG et al., 2007). Algumas das substâncias isoladas e identificadas nesta espécie foram: *ent*-catequina (NEBO, 2008), catequina, epicatequina, ácido clorogênico, estigmasterol, β -sitosterol (LAGOS, 2006), 3- β -O- β -D-glucopiranosil sitosterol (MATOS, 2006), catiguanina A, catiguanina B (TANG et al., 2007), cedrelona, angolensato de metila, fotogedunina (MATOS et al., 2009), 11 β -metoxicedrelona (MATOS, 2006), apocinina E, cinchonáinas Ia, Ib, Ic, Id, IIa e IIb (BELTRAME et al., 2006; BERNARDO et al., 2018; MARTINELLI, 2010; RESENDE, 2007; TANG et al., 2007; VIANA et al., 2011), procianidinas B₂, B₄ e C₁ (RESENDE, 2007), ácidos 3-metoxi-benzoilquínico, 3-cafeoilquínico, 4-metoxi-benzoilquínico, 5-metoxi-benzoilquínico, 4-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico, e dihidro-apocinina E (BERNARDO et al., 2018).

2.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa

A utilização de técnicas que fornecem informações gênicas sobre as células é fundamental para que se entenda os mecanismos moleculares envolvidos na fisiologia, patologia, desenvolvimento e respostas terapêuticas (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011). A reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional é uma técnica que surgiu na década de 80 e que possibilita a amplificação de determinadas sequências de DNA (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Este método, considerado qualitativo ou semiquantitativo, é baseado na amplificação das sequências-alvo seguidas por eletroforese em gel de agarose para detecção do DNA amplificado com um corante capaz de intercalar no DNA e fluorescer sob exposição à luz ultravioleta, tal como o brometo de etídio (NASCIMENTO;

SUAREZ; PINHAL, 2010). A PCR trouxe enormes benefícios e desenvolvimento científico na área da biologia molecular, como o sequenciamento de genomas, o estudo da expressão de genes, o diagnóstico de doenças genéticas e a detecção de agentes infecciosos (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004), contudo, esta metodologia possui algumas desvantagens, dentre elas destaca-se o fato de permitir a detecção dos produtos de reação apenas no final de todos os ciclos de termociclagem (entre 25 e 30 ciclos), momento no qual o DNA-alvo se encontra amplificado em condições de saturação e onde, muitas vezes, não se é possível detectar diferenças na expressão de determinados genes (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010).

Atualmente, a reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-qPCR), uma variante da PCR convencional, vem ganhando espaço nos laboratórios de pesquisa como um dos métodos mais difundido e confiável para quantificação da expressão gênica em tecidos ou amostras biológicas (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Esta técnica pode ser aplicada em diversas áreas como: biotecnologia, investigação médica ou forense, detecção de microrganismos, genotipagem, biossegurança, diagnóstico de doenças infecciosas graves ou de origem genética, mapeamento genético, clonagem de genes, elaboração de árvores filogenéticas e detecção de organismos geneticamente modificados, e destaca-se por sua rapidez, especificidade e sensibilidade, permitindo que resultados confiáveis sejam obtidos a partir de pequenas quantidades de DNA (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; RUTHS; MACEDO; NASCIMENTO, 2017). Sua aplicação em diversos segmentos se dá pela existência de diferentes tipos de polimorfismo do DNA, que são classificados de acordo com a sua natureza molecular e localização no genoma, permitindo assim que estudos sejam realizados para as mais diversas finalidades (RUTHS; MACEDO; NASCIMENTO, 2017).

A principal característica da RT-qPCR é que a amplificação, a detecção e a quantificação da sequência alvo ocorrem de forma simultânea e podem ser monitorados em tempo real durante cada ciclo da PCR, com elevada sensibilidade e especificidade, possibilitando a análise comparativa da expressão de determinado gene entre as amostras logo no início da fase exponencial de amplificação (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010; RUTHS; MACEDO; NASCIMENTO, 2017). Para isto, a RT-qPCR requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema óptico para a excitação da fluorescência e coleção da emissão, e um computador com um software para monitorar a evolução da reação de PCR, possibilitando a aquisição de dados e a construção em tempo real de um gráfico que relaciona os ciclos de termociclagem com a intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação do DNA nas amostras, ciclo a ciclo (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; RUTHS; MACEDO; NASCIMENTO, 2017).

Para a realização da RT-qPCR é importante que, inicialmente, se obtenha uma amostra mais pura possível. Para tanto, a extração do RNA mensageiro (RNAm) é realizada a partir da lise de um grupo celular homogêneo. Uma das formas de realizar esta tarefa em uma única etapa é com guanidina isotiocianato, fenol e clorofórmio, conjunto comercialmente chamado de reagente Trizol. Em seguida,

tem-se a fase de transcrição reversa, que é a reação de formação de DNA fita dupla (DNA complementar ou DNAc) a partir do RNAm por uma DNA polimerase RNA-dependente, ou seja, uma enzima que produz DNA a partir de um molde de RNA. Na sequência, inicia-se a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), que recebe esse nome por dar resultados quantitativos. Essa etapa caracteriza-se pela amplificação de um sítio específico no conjunto de DNAc, que ocorre, resumidamente, catalisada por meio do uso de uma enzima DNA polimerase DNA-dependente termoestável (Taq DNA polimerase), dois oligômeros específicos para servirem de iniciadores para a polimerase (*primers*) e um fluoróforo não específico de DNA (como SYBR Green, por exemplo). Esta etapa permite que uma sequência do genoma seja amplificada um bilhão de vezes. Conforme as cadeias duplas do DNAc-alvo vão sendo sintetizadas, o fluoróforo se liga a elas e, após ser excitado, emite luz proporcionalmente ao número de cadeias duplas. Assim, a reação é monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real. Através de análise gráfica pode-se quantificar a amostra inicial de DNAc que, na ausência de erros, é proporcional a de RNAm (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A RT-qPCR apresenta três fases distintas:

- a) 1ª fase – lag: com flutuação, não há a liberação do corante para que seja possível realizar a detecção da fluorescência;
- b) 2ª fase – log ou exponencial: nesta fase já ocorre o aumento do sinal fluorescente, e a quantidade de produtos de amplificação dobra a cada ciclo. É nessa fase que se realiza a quantificação da PCR devido ao grande número de cópias da região alvo amplificadas. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (C_T). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência;
- c) 3ª fase – estabilização: é a fase final, onde já não se tem mais o aumento exponencial do número de produtos da região alvo devido ao consumo total de algum dos reagentes da reação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; RUTHS; MACEDO; NASCIMENTO, 2017).

Cumprido ser observado que a eficiência das reações de amplificação por RT-qPCR depende de diversos fatores, tais como: o cuidado nas pipetagens, a qualidade e integridade das amostras (molde de RNA e DNAc), desenho dos primers, condições de termociclagem (temperatura de desnaturação, anelamento dos *primers*), qualidade e quantidade dos reagentes e também o tamanho do produto a ser amplificado. Desta forma, devem ser padronizadas condições específicas para cada experimento (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010).

A RT-qPCR ainda pode ser incrementada com a utilização de sondas (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA, como TaqMan ou *Molecular beacons*), que se ligam a sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados, aumentando a especificidade do método (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; RUTHS; MACEDO; NASCIMENTO, 2017). Essas sondas possuem em uma das suas extremidades um fluoróforo e, na outra, uma molécula que dissipa a energia do fluoróforo na forma de luz ou calor (o *quencher*) (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; RUTHS;

MACEDO; NASCIMENTO, 2017). Durante o processo de amplificação, o fluoróforo é separado do *quencher*, o que resulta em um aumento da intensidade da fluorescência de forma exponencial (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Por ser uma técnica de elevada sensibilidade, acurácia e rapidez na emissão de resultados, a RT-qPCR tem sido uma ferramenta cada vez mais aplicada, destacando-se na pesquisa básica e no diagnóstico clínico-laboratorial (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010; RUTHS; MACEDO; NASCIMENTO, 2017). Na pesquisa básica, a aplicação mais frequente da RT-qPCR é na determinação da expressão absoluta ou relativa de um gene de interesse (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010).

Neste estudo, dez genes-alvos envolvidos com a patogênese da DA foram selecionados para serem avaliados por RT-qPCR: *A2M*, *ACHE*, *ADAM10*, *APOE*, *APP*, *GSK3 β* , *LRP1*, *MAPT*, *PSEN1* e *PSEN2*. Como colocado anteriormente, a DA é caracterizada pela formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares no cérebro. Como a β A é o principal componente das placas senis, genes que codificam a proteína precursora de β A (*APP*) (NALIVAEVA; TURNER, 2016), e que estão envolvidos com o acúmulo de placas de β A, como os genes *APOE* (CASTELLANO et al., 2011), *A2M* (alfa-2-macroglobulina), *LRP1* (proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade) (YUAN et al., 2013), *PSEN1* (presenilina 1) e *PSEN2* (GUERREIRO; GUSTAFSON; HARDY, 2012) são de grande interesse na patogênese da DA. O gene da acetilcolinesterase (*ACHE*) tem uma ampla gama de funções vitais, e está ligado à patogênese da DA tanto por aumentar o déficit colinérgico quanto por exacerbar a formação e a toxicidade da fibrila de β A (NALIVAEVA; TURNER, 2016). O gene da proteína tau associada aos microtúbulos (*MAPT*) atua na formação dos emaranhados neurofibrilares resultantes da hiperfosforilação da proteína tau (TRABZUNI et al., 2012) e pode mediar a toxicidade da β A (MEDINA; AVILA, 2014). De forma semelhante, genes de quinases como a glicogênio sintase quinase 3 beta (*GSK3 β*), também têm sido amplamente estudados por alterarem a neurotoxicidade de substratos como a tau, a APP e a β A (PLÁTENÍK et al., 2014). Outros genes despertam o interesse de estudo por favorecerem mecanismos de neuroproteção. É o caso do gene *ADAM10* (proteína 10 com domínios desintegrina e metaloproteinase). Este gene é responsável por codificar uma proteína capaz de clivar a APP por uma via não-amiloidogênica, liberando um fragmento solúvel (sAPP α) e prevenindo a formação de placas senis (MANZINE et al., 2019).

2.5 Eletroforese Capilar

O crescente interesse por medicamentos derivados de drogas vegetais em países como Brasil, Estados Unidos, Alemanha, Índia e China, tem aumentado o rigor na padronização e controle de qualidade desses produtos (YUNES; CECHINEL-FILHO, 2012).

Técnicas analíticas sofisticadas aliadas a detectores de alta sensibilidade permitem a identificação de metabólitos (primários e secundários) de produtos naturais e a caracterização química

da espécie, tornando-se ferramentas úteis para o controle de qualidade das matérias-primas e medicamentos derivados (BELTRAME et al., 2004; DAOLIO et al., 2008; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

A eletroforese capilar (EC) representa uma fusão das tecnologias derivadas da eletroforese tradicional e da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e permite a separação de moléculas baseada na migração dessas espécies através de um fluido sobre a influência de um campo elétrico. O fluido, conhecido como tampão de corrida, é uma solução que mantém o pH e fornece condutividade suficiente para permitir a passagem da corrente necessária para a separação (BAKER, 1995; CHU et al., 2008; EVANS; STALCUP, 2003; HEEGAARD; NILSSON; GUZMAN, 1998; HU; MARTIN, 1999; LUNTE; MARTIN; LUNTE, 2002; MELLO; ITO, 2011; TAGLIARO et al., 1998; WEINBERGER, 1993).

O sistema de EC (Figura 8) consiste em um capilar de sílica fundida, com 10 a 120 cm de comprimento e 5 a 100 μm de diâmetro interno (d.i.), preenchido com um tampão e colocado entre dois reservatórios com eletrodos imersos no tampão. Uma fonte de energia de alta voltagem é utilizada para aplicar um campo elétrico através do capilar de até 30 kV e corrente elétrica de 0 a 300 μA . Em polaridade normal, a carga na parede interna do capilar, provoca o fluxo eletro-osmótico na direção do ânodo (eletrodo positivo, onde a amostra é aplicada) para o cátodo (eletrodo negativo, onde a amostra é analisada). A detecção pode ser realizada diretamente no capilar (*on-line*) em tempo real, criando-se uma janela óptica pela remoção de uma pequena parte do revestimento de poliamida do capilar. Os detectores comumente utilizados são por espectrofotometria ultravioleta (UV), espectrometria de massas (EM) e fluorescência induzida por laser. A injeção da amostra pode ser realizada por duas formas: electrocinética ou sifonamento (HEEGAARD; NILSSON; GUZMAN, 1998; HU; MARTIN, 1999; LINHARDT; TOIDA, 2002; LUNTE; MARTIN; LUNTE, 2002; MELLO; ITO, 2011; TAGLIARO et al., 1998; WEINBERGER, 1993).

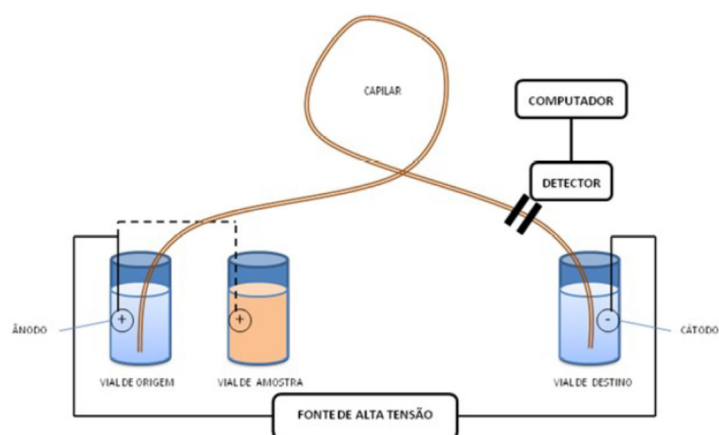


Figura 8. Representação esquemática do sistema de Eletroforese Capilar (EC). **Fonte:** MELLO; ITO, 2011.

Idealmente, o capilar deve ser química e fisicamente resistente, opticamente transparente e ter o menor comprimento e d.i. possível para que se aumente a razão área/volume da superfície interna do capilar. Este aumento permite ao capilar dissipar mais eficientemente o aquecimento, o que se contrapõe ao efeito Joule e permite a aplicação de altas voltagens, resultando em separações extremamente rápidas e com alta eficiência. Contudo, na rotina o uso de capilares com d.i. menor que 50 μm é limitado pelo carregamento da amostra, sensibilidade do detector e entupimento do capilar. Para que a eficiência da separação não seja prejudicada, o volume de injeção deve estar entre 1 a 2% do volume total do capilar (HU; MARTIN, 1999; LUNTE; MARTIN; LUNTE, 2002; TAGLIARO et al., 1998; WEINBERGER, 1993).

No capilar, os analitos migram baseados na combinação entre as forças eletroforéticas e eletro-osmótica. Esta última controla a velocidade e a resolução da separação. Em geral, os íons positivos (cátions) migram primeiro, seguidos pelos compostos neutros e, finalmente, os íons negativos (ânions) (GUTERRES, 2005; HU; MARTIN, 1999; LINHARDT; TOIDA, 2002; LUNTE; MARTIN; LUNTE, 2002; TAGLIARO et al., 1998; WEINBERGER, 1993).

Os modos de EC comumente utilizados são eletroforese capilar em gel (ECG), eletroforese capilar de zona (ECZ), cromatografia capilar eletro-osmótica (CCE), cromatografia capilar eletrocínética micelar (CCEM), focalização isoeétrica capilar (FIC) e isotacoforese capilar (ITFC) (BAKER, 1995; GUTERRES, 2005; HU; MARTIN, 1999; MELLO; ITO, 2011; TAGLIARO et al., 1998; WEINBERGER, 1993). Em geral, a escolha do modo baseia-se na facilidade do desenvolvimento analítico, robustez do processo de separação e características das substâncias que serão analisadas. Dentre os modos, a ECZ destaca-se como a mais reprodutível (WEINBERGER, 1993) e utilizada, devido ao seu poder de separação, versatilidade e simplicidade de operação (GUTERRES, 2005; HU; MARTIN, 1999; WANG, 2000). Os tampões normalmente empregados são fosfato, borato, citrato ou fosfato-borato, em altas concentrações, por apresentarem melhor capacidade tamponante e reduzirem a adsorção de analitos à parede do capilar, principalmente em análises de amostras biológicas (TAGLIARO et al., 1998).

A grande desvantagem da ECZ é que ela não é capaz de separar os analitos neutros. Todavia, a CCCEM pode ser utilizada com este fim. Neste caso, um surfactante com carga, geralmente o dodecil sulfato de sódio, é adicionado ao tampão de corrida acima da concentração micelar crítica e a separação ocorre pelos diferentes graus de partição do analito entre a fase aquosa e as micelas carregadas (GUTERRES, 2005; HU; MARTIN, 1999; LINHARDT; TOIDA, 2002; LUNTE; MARTIN; LUNTE, 2002; TAGLIARO et al., 1998; WEINBERGER, 1993).

O desenvolvimento de métodos por EC pode ser complexo, já que muitas variáveis experimentais necessitam de otimização. A seletividade da separação, bem como a velocidade de separação e a resolução podem ser ajustadas pela escolha do modo adequado de EC, modificações no revestimento da parede do capilar, alterações na concentração ou pH do tampão de corrida, voltagem, direção do fluxo eletro-osmótico e temperatura, gradiente de voltagem ou pelo uso de aditivos como

ciclodextrinas (CDs), surfactantes, sais biliares, proteínas (albumina, anticorpos), metilcelulose, poliacrilamida, íons metálicos, antibióticos, ureia, polímeros lineares, ácidos sulfônicos, aminas quaternárias ou solventes orgânicos (metanol, isopropanol ou acetonitrila). Como pequeno volume de tampão de corrida é utilizado na separação, aditivos que seriam caros para separações por cromatografia líquida podem ser empregados na EC (CHU et al., 2008; EVANS; STALCUP, 2003; GUTERRES, 2005; HEEGAARD; NILSSON; GUZMAN, 1998; HU; MARTIN, 1999; LINHARDT; TOIDA, 2002; LUNTE; MARTIN; LUNTE, 2002; MELLO; ITO, 2011; SEREIA, 2013; SEREIA et al., 2017; TAGLIARO et al., 1998; WEINBERGER, 1993).

O uso de padrões durante o desenvolvimento analítico auxilia na avaliação da separação e otimização do método (EVANS; STALCUP, 2003). Geralmente, o desenvolvimento progride rapidamente devido ao número de pratos teóricos (mais de cem mil) e a enorme capacidade de pico (número de picos separados por unidade de tempo) da técnica. Além disso, a simetria dos picos é excelente, pois a ausência da fase estacionária minimiza muitos fatores que contribuem para o alargamento do pico (WEINBERGER, 1993).

Ferramentas estatísticas, como análise fatorial, colaboram com o desenvolvimento analítico, principalmente quando se utiliza mistura de solventes ternários ou CDs. Estas, principalmente as modificadas, têm sido amplamente utilizadas para separações quirais em misturas racêmicas. Solutos com mobilidades idênticas, como os enantiômeros, podem ser separados baseados nas interações estereoespecíficas entre o par de enantiômeros e a CD, o que dá origem a diferentes velocidades de migração (EVANS; STALCUP, 2003; SEREIA, 2013; SEREIA et al., 2017; TAGLIARO et al., 1998; WEINBERGER, 1993).

Além de separações quirais, a EC aplica-se à análise de uma variedade de amostras, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, substâncias hidro ou lipossolúveis, metabólitos, aminoácidos, íons inorgânicos, ácidos orgânicos, carboidratos, poluentes ambientais, nucleosídeos e nucleotídeos, fármacos, catecolaminas, peptídeos, proteínas, biomarcadores, herbicidas, drogas, biopolímeros e extratos vegetais (BAKER, 1995; EVANS; STALCUP, 2003; HEEGAARD; NILSSON; GUZMAN, 1998; HU; MARTIN, 1999; LUNTE; MARTIN; LUNTE, 2002; MELLO; ITO, 2011; SEREIA, 2013; SEREIA et al., 2017; TAGLIARO et al., 1998).

A aplicação da EC na análise fitoquímica tem se destacado desde o início da década de 90 (GUTERRES, 2005). Diversos relatos empregando, principalmente, a ECZ e CCEM na análise de produtos naturais podem ser encontrados na literatura. Dentre estes, podemos citar estudos com as espécies *Arabidopsis thaliana*, *Cucurbita maxima*, *Erechtites hieracifolia*, *Eucalyptus viminalis*, *Nicotiana tabacum*, *Spinacia oleracea* (KAWAMURA et al., 1996), *Sapindus saponaria* (GUTERRES, 2005), *Prunella vulgaris* L. (CHEUNG; ZHANG, 2008), *Fructus cnidii* (WANG et al., 2010), *Passiflora alata*, *Passiflora quadrangularis*, *Passiflora bogotensis*, *Passiflora tripartita* var. *mollissima* (Costa et al., 2016), *Urceola rosea* (GUFLER et al., 2018), *P. cupana* (ITO, 2011) e *T. catigua* (SEREIA, 2013; SEREIA et al., 2017), sendo estes dois últimos realizados por nosso grupo de pesquisa.

Com relação às outras espécies utilizadas neste estudo, foram encontradas na literatura metodologias desenvolvidas por CLAE-UV ou acoplada à EM para extratos e/ou frações semipurificadas de *G. ulmifolia* (CALIXTO-JÚNIOR et al., 2016; LOPES et al., 2009b; MAGOS et al., 2008; MORAIS et al., 2017), *L. brasiliense* (BLAINSKI et al., 2017a,b; CALEARE et al., 2017), *P. cupana* (KLEIN; LONGHINI; MELLO, 2012; MACHADO et al., 2015; MACHADO et al., 2018; MARQUES et al., 2016; SILVA et al., 2017), *S. adstringens* (BRASIL, 2010) e *T. catigua* (BERNARDO et al., 2018; LONGHINI et al., 2013).

Sabe-se que a EC tem se sobressaído nas últimas décadas por sua automação, reprodutibilidade e confiabilidade e apresenta diversas vantagens quando comparada à CLAE, como alta eficiência, alta resolução, alta seletividade, curto tempo de análise, baixo consumo de reagentes, pequeno volume de amostra, boa recuperação e menor custo (BAKER, 1995; CHU et al., 2008; EVANS; STALCUP, 2003; HEEGAARD; NILSSON; GUZMAN, 1998; HU; MARTIN, 1999; LUNTE; MARTIN; LUNTE, 2002; MELLO; ITO, 2011; TAGLIARO et al., 1998; WEINBERGER, 1993). Em relação às amostras de extratos vegetais, a principal vantagem dos capilares de sílica fundida quando comparados às colunas empacotadas é que as amostras podem ser diretamente injetadas sem qualquer etapa prévia de separação ou purificação (CHEUNG; ZHANG, 2008). Contudo, a extração em fase sólida pode ser aplicada no preparo de amostras com o objetivo de melhorar a seletividade, detectabilidade, confiabilidade, exatidão e repetibilidade das análises pela remoção de interferentes da matriz (GUTERRES, 2005). Ademais, o capilar pode ser facilmente lavado entre as corridas e está livre de contaminação irreversível pela matriz (CHEUNG; ZHANG, 2008). Autores sugerem que a EC se tornará uma ferramenta de rotina nas áreas química, biológica e clínica, devido à alta resolução, fácil automatização e rapidez na análise de matrizes complexas (HEEGAARD; NILSSON; GUZMAN, 1998; HU; MARTIN, 1999; LINHARDT; TOIDA, 2002; TAGLIARO et al., 1998). Ainda assim, nenhum relato que empregue a EC para avaliação de extratos ou frações semipurificadas de *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. pluviosa* e *S. adstringens* foi encontrado na literatura, até o presente momento.

3.1 Objetivo geral

Realizar uma triagem com os extratos bruto (EB) e frações acetato de etila (FAE) de *Guazuma ulmifolia* Lam. (Mutamba), *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Baicuru), *Paullinia cupana* Kunth (Guaraná), *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz (Sibipiruna), *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão) e *Trichilia catigua* A. Juss. (Catuaba) utilizando bioensaios *in vitro* para selecionar os extratos/frações com maior potencial biológico e avaliar o efeito citoprotetor dos extratos/frações selecionados em modelo de toxicidade celular induzida pelo fragmento beta-amiloide (βA_{25-35}) em células SH-SY5Y.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antioxidante do EB e FAE de *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa*, *S. adstringens* e *T. catigua*;
- Determinar o teor de polifenóis totais (TPT) do EB e FAE de *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa*, *S. adstringens* e *T. catigua*;
- Avaliar a atividade anticolinesterásica do EB e FAE de *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa*, *S. adstringens* e *T. catigua*;
- Aplicar ferramentas quimiométricas para selecionar os extratos/frações vegetais com maior potencial biológico;
- Estudar os efeitos das FAEs de *L. brasiliense*, *P. pluviosa* e *S. adstringens* sobre a viabilidade celular em modelo de morte celular induzida pela βA_{25-35} em cultura de células SH-SY5Y;
- Avaliar os efeitos protetores da FAE de *S. adstringens* frente a despolarização da membrana mitocondrial induzida pela βA_{25-35} em cultura de células SH-SY5Y;
- Avaliar os efeitos protetores da FAE de *S. adstringens* frente ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzido pela βA_{25-35} em cultura de células SH-SY5Y;
- Avaliar os efeitos protetores da FAE de *S. adstringens* frente ao aumento da peroxidação lipídica induzida pela βA_{25-35} em cultura de células SH-SY5Y;
- Avaliar o efeito da FAE de *S. adstringens* na expressão do mRNA dos genes *A2M*, *ACHE*, *ADAM10*, *APOE*, *APP*, *GSK3 β* , *LRP1*, *MAPT*, *PSEN1* e *PSEN2*;
- Determinar o teor de ácido gálico e galocatequina presente na FAE de *S. adstringens*;
- Estabelecer os perfis eletroforéticos das FAEs de *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa* e *S. adstringens*.

4 ARTIGO: Avaliação *in vitro* dos efeitos protetores de extratos vegetais contra a toxicidade induzida pelo peptídeo beta-amiloide em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

Esta sessão consiste no artigo publicado pela revista *PLoS ONE*
(<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0212089>).

***In vitro* evaluation of the protective effects of plant extracts against amyloid-beta peptide-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells**

Protective effects of plant extracts against A β ₂₅₋₃₅ toxicity in SH-SY5Y cells

Ana Luiza Sereia¹, Marcelo Tempesta de Oliveira¹, Adivanio Baranoski², Leila Larisa Medeiros Marques¹, Fabianne Martins Ribeiro¹, Raquel Garcia Isolani¹, Daniela Cristina de Medeiros¹, Danielly Chierrito¹, Danielle Lazarin-Bidóia¹, Acácio Antonio Ferreira Zielinski³, Cláudio Roberto Novello⁴, Celso Vataru Nakamura¹, Mário Sérgio Mantovani², and João Carlos Palazzo de Mello^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Department of Pharmacy, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Department of General Biology, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

³ Department of Chemical Engineering and Food Engineering, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

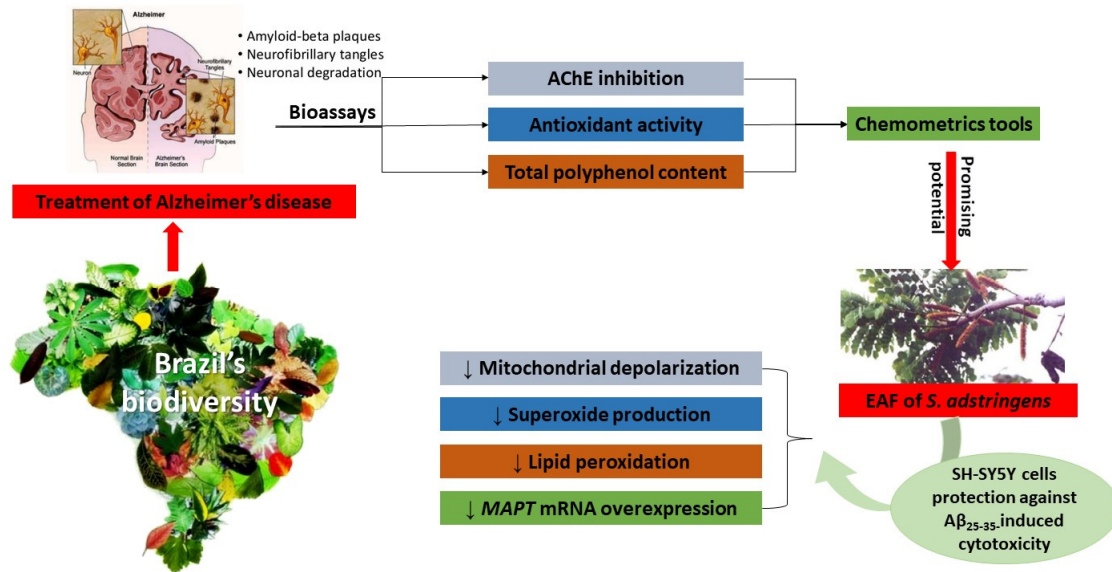
⁴ Academic Department of Chemistry and Biology, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brazil

*Corresponding author

E-mail: mello@uem.br (JCPM)

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and has no cure. Therapeutic strategies focusing on the reduction of oxidative stress, modulation of amyloid-beta (A β) toxicity and inhibition of tau protein hyperphosphorylation are warranted to avoid the development and progression of AD. The aim of this study was to screen the crude extracts (CEs) and ethyl-acetate fractions (EAFs) of *Guazuma ulmifolia*, *Limonium brasiliense*, *Paullinia cupana*, *Poincianella pluviosa*, *Stryphnodendron adstringens* and *Trichilia catigua* using preliminary *in vitro* bioassays (acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and total polyphenol content) to select extracts/fractions and assess their protective effects against A β ₂₅₋₃₅ toxicity in SH-SY5Y cells. The effect of the EAF of *S. adstringens* on mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation, superoxide production and mRNA expression of 10 genes related to AD was also evaluated and the electropherogram fingerprints of EAFs were established by capillary electrophoresis. Chemometric tools were used to correlate the *in vitro* activities of the samples with their potential to be evaluated against AD and to divide extracts/fractions into four clusters. Pretreatment with the EAFs grouped in cluster 1 (*S. adstringens*, *P. pluviosa* and *L. brasiliense*) protected SH-SY5Y cells from A β ₂₅₋₃₅-induced toxicity. The EAF of *S. adstringens* at 15.62 μ g/mL was able completely to inhibit the mitochondrial

depolarization (69%), superoxide production (49%) and $A\beta_{25-35}$ -induced lipid peroxidation (35%). With respect to mRNA expression, the EAF of *S. adstringens* also prevented the *MAPT* mRNA overexpression (expression ratio of 2.387x) induced by $A\beta_{25-35}$, which may be related to tau protein hyperphosphorylation. This is the first time that the neuroprotective effects of these fractions have been demonstrated and that the electropherogram fingerprints for the EAFs of *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa* and *S. adstringens* have been established. The study expands knowledge of the *in vitro* protective effects and quality control of the evaluated fractions.



Keywords: $A\beta_{25-35}$ -induced toxicity, Alzheimer's disease, Brazilian herbal species, Neuroprotective activity, SH-SY5Y cell line.

4.1 Introduction

Ongoing advances and developments in modern medicine and science have increased life expectancy, exponentially increasing the prevalence of senile disorders like dementia [1,2]. Worldwide, it is estimated that more than 47 million people are living with dementia. In 2018, the economic impact will be about US\$3 trillion, becoming one of the biggest global public health and social problems [3].

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and is characterized by the progressive loss of memory, language skills and cognitive ability, ultimately leading to death [4-7]. Pathologically, AD is characterized by excessive deposition of extraneuronal amyloid-beta ($A\beta$) peptide plaques, intracellular neurofibrillary tangles, hyperphosphorylation of tau protein and neuronal cell death. Abnormal $A\beta$ aggregation and the formation of reactive oxygen species (ROS) due to oxidative stress are the main factors responsible for the development and progression of AD [4-13].

Currently, the use of acetylcholinesterase (AChE) inhibitors is the main strategy used to alleviate the cognitive symptoms of AD [1,14-16]. Galantamine and rivastigmine are examples of two licensed

anti-AD drugs based on plant-derived natural products. However, these treatments do not halt or delay disease progression [1,5,14-16], which justifies the search for therapeutic agents acting at other pathologic levels [1,2,17].

Compounds that are able to reduce excessive levels of ROS, A β production, oligomerization, neurotoxicity and inflammation induced by A β and inhibit tau protein hyperphosphorylation are potential targets for the discovery of new drugs with anti-AD properties [1,2,6,12,18]. A number of medicinal plants in the form of extracts, fractions, or isolated compounds have been reported as presenting possible anti-AD activity in preclinical and clinical studies [5]. Several authors have suggested that some types of alkaloids, saponins, glucosides, terpenoids, phenolic acids, flavonoids and extracts with antioxidant activity have protective effects against A β -induced toxicity in cell and animal models [1,2,4-7,11,12,18,19].

Among the Brazilian herbal species studied by our research group, *Guazuma ulmifolia* Lam. (Mutamba), *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Baicuru), *Paullinia cupana* Kunth (Guaraná), *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz (Sibipiruna), *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão) and *Trichilia catigua* A. Juss. (Catuaba) stand out due to their chemical profiles and biological potential [20-33]. However, to date, the neuroprotective effects of these species against A β toxicity have not been evaluated *in vitro* or *in vivo*. Thus, the aim of the present study was to evaluate the selected crude extracts (CEs) and their respective ethyl-acetate fractions (EAFs) using different preliminary *in vitro* bioassays related to AD and to apply chemometric tools to selected extracts/fractions to assess their protective effect against A β peptide toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. The effect of the EAF of *S. adstringens* on mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation, ROS production and mRNA expression of 10 genes related to AD was also evaluated. In addition, the chemical fingerprinting of EAFs was carried out by capillary electrophoresis to contribute-to quality control of the evaluated plant fractions.

4.2 Results and discussion

4.2.1 Antioxidant activity, total polyphenol content and AChE inhibitory activity

The investigation of plant extracts, fractions or derived substances usually starts with carefully selected screening *in vitro*, followed by relevant *in vivo* models, with the aim of validation and reducing the number of animal tests [34]. We evaluated six selected CEs and their respective EAFs for antioxidant activity, total polyphenol content (TPC) and AChE inhibitory activity. The data from all tests are compiled in Table 1.

Table 1. *In vitro* antioxidant assays, total polyphenol content (TPC), and acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity in selected plant extracts and their semipurified fractions.

		Antioxidant assays					
	Plant Species	DPPH	Xanthine	FRAP	ABTS	TPC	AChE inhibitory
		IC ₅₀ (µg/mL)	oxidase system IC ₅₀ (µg/mL)	(mmol Trolox/ g sample)	(mmol Trolox/ g sample)	(mg GAE/ g sample)	activity IC ₅₀ (mg/mL)
Crude extract	<i>Guazuma ulmifolia</i>	8.85 ^e ± 0.27	1.29 ^b ± 0.03	5.27 ^{gh} ± 0.18	2.99 ^{ef} ± 0.12	469.34 ^{ef} ± 17.32	2.27 ^b ± 0.08
	<i>Limonium brasiliense</i>	14.86 ^a ± 0.19	0.18 ^h ± 0.01	5.53 ^{fg} ± 0.20	2.78 ^g ± 0.01	329.67 ⁱ ± 1.79	1.56 ^d ± 0.08
	<i>Paullinia cupana</i>	7.84 ^f ± 0.31	1.11 ^c ± 0.05	4.43 ^j ± 0.09	2.23 ⁱ ± 0.10	453.34 ^g ± 9.09	3.38 ^a ± 0.14
	<i>Poincianella pluviosa</i>	11.09 ^c ± 0.41	1.23 ^b ± 0.07	4.78 ^{ij} ± 0.11	2.08 ^j ± 0.08	369.07 ^h ± 5.89	0.25 ⁱ ± 0.01
	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	9.65 ^d ± 0.47	1.70 ^a ± 0.03	5.79 ^{ef} ± 0.08	3.27 ^d ± 0.06	488.06 ^e ± 15.35	0.58 ^g ± 0.00
	<i>Trichilia catigua</i>	5.51 ^h ± 0.27	0.86 ^d ± 0.05	5.51 ^{fg} ± 0.17	3.14 ^d ± 0.07	543.85 ^c ± 10.56	2.14 ^c ± 0.06
Ethyl-acetate fraction	<i>Guazuma ulmifolia</i>	10.10 ^d ± 0.48	0.75 ^e ± 0.03	6.41 ^d ± 0.25	3.12 ^{de} ± 0.08	552.43 ^c ± 12.22	1.14 ^e ± 0.02
	<i>Limonium brasiliense</i>	5.41 ^h ± 0.08	0.69 ^e ± 0.02	6.18 ^{de} ± 0.23	6.64 ^a ± 0.11	551.26 ^c ± 3.10	0.47 ^h ± 0.01
	<i>Paullinia cupana</i>	8.04 ^f ± 0.25	0.50 ^f ± 0.03	5.08 ^{hi} ± 0.16	2.47 ^h ± 0.04	578.18 ^b ± 17.24	1.19 ^e ± 0.04
	<i>Poincianella pluviosa</i>	6.18 ^g ± 0.11	0.30 ^g ± 0.01	11.49 ^b ± 0.22	4.05 ^b ± 0.13	523.56 ^d ± 4.43	0.61 ^g ± 0.00
	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	12.46 ^b ± 0.59	0.30 ^g ± 0.01	13.66 ^a ± 0.38	3.70 ^c ± 0.11	436.17 ^g ± 4.73	0.62 ^g ± 0.03
	<i>Trichilia catigua</i>	5.29 ^h ± 0.09	0.48 ^f ± 0.02	9.37 ^c ± 0.45	2.92 ^{fg} ± 0.03	735.80 ^a ± 18.74	0.77 ^f ± 0.04
p-value		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Note: Results expressed as mean ± SD (n = 3). Probability values obtained by one-way analysis of variance (ANOVA). ^{ab} Different superscript letters in the same column represent statistically different results (p < 0.05).

Given that elevated ROS levels are associated with oxidative damage, increased A β deposition, the formation of senile plaques and cell death [14], the antioxidant activity of the extracts was evaluated. Four different antioxidant test models were estimated: the 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) antioxidant assay and the xanthine oxidase activity assay. Alam and colleagues [35] recommend employing different antioxidant test models as they vary in several respects.

The results showed that the inhibition of DPPH and the xanthine oxidase system ranged from 5.29 to 14.86 and 0.18 to 1.70 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The FRAP and ABTS results ranged from 5.08 to 13.66 and 2.08 to 6.64 mmol Trolox/g sample, respectively. Due to the differences between the tests, it is difficult to compare one method directly with another [35] and consequently to state which extract or EAF presents the highest antioxidant activity. In general, we can say that most fractions obtained presented better antioxidant activity compared to the CEs of origin. With respect to TPC, the results ranged from 329.67 to 735.80 mg of gallic acid equivalent [GAE]/g sample. As in the case of antioxidant activity, most EAF samples showed higher polyphenol content compared to their respective CEs. Indeed, many studies have shown a significant correlation between antioxidant capacity and TPC [19,21,36,37], reinforcing our results.

The CEs and EAFs were also screened for AChE inhibition. The IC₅₀ ranged from 0.25 to 3.38 mg/mL. With the exception of the species *P. pluviosa* and *S. adstringens*, the EAFs also presented better inhibitory activity of AChE compared to the CEs of origin, as shown in other studies [16]. Some authors [38-40] have suggested a synergic correlation between the presence of polyphenols and antioxidant and anti-AChE activities *in vitro*, as we observed. The comparison of the quantitative results of these *in vitro* bioassays with the available literature is difficult, owing to the distinct nature of the extracting solvents and procedures [40]. Morais et al. [38] found that ethanol extract from *G. ulmifolia* leaves exhibit significant anti-AChE activity and suggested that this result can be attributed to the presence of flavonoids and phenolic acids with recognized antioxidant potential in the extract. Rodrigues et al. [39] evaluated another *Limonium* specie and showed that the infusions and decoctions of *L. algarvense* flowers powder had high phenolic contents and strong antioxidant activity and capacity to inhibit AChE (IC₅₀ values of 0.22 to 0.39 mg/mL). Bernardo et al. [40] evaluated the AChE inhibition of an aqueous extract of *T. catigua* in rat brain tissue homogenates and found that the extract, which is rich in flavanols and derivatives, demonstrated an inhibitory effect over the enzymatic activity, besides a valuable antioxidant activity. Ruchel et al. [41] evaluated AChE activity in different brain structures of rats treated with *P. cupana* seed powder and suggested that guaraná powder may be a source of phytochemicals that can be used as an adjuvant therapy in the management of cognitive disorders. Recently, a study showed that the protective effect of *P. cupana* hydroalcoholic extract in *Caenorhabditis elegans* models of AD is associated with antioxidant activity and the considerable number of polyphenol constituents [42]. This

study is the first to evaluate AChE inhibitory activity using extracts/fractions of *L. brasiliense*, *P. pluviosa*, *S. adstringens* and the bark of *G. ulmifolia*.

4.2.2 Use of chemometric tools to select extracts/fractions for investigation

To correlate the *in vitro* activities of the samples under study with their potential for investigation in future studies related to AD, principal component analysis (PCA) was applied to examine their distribution. Several authors have used multivariate statistical tools to rationalize the choice of potential extracts/fractions for investigation and have shown that this method is a suitable approach to check for similarities and differences and to create natural groupings among samples [22,30,37].

The first principal component (PC1) accounted for up to 37.75% of the total variance, while PC2 accounted for 28.04%, totalling 65.79% of the total variance (S1 Fig). PC1 separated the samples according to differences observed in the DPPH (0.536), ABTS (-0.681), FRAP (-0.688), xanthine oxidase system (0.533), TPC (-0.669) and AChE inhibitory activity (0.557) assays. PC2 distinguished samples according to differences observed in the levels of DPPH (-0.804) and TPC (0.596). Through assessment of the scatter plots (*Scores* and *Loadings*, S1 Fig), it was possible to distinguish which plant extracts were most strongly associated with phenolic compounds, antioxidant activity and AChE inhibitory activity. The samples obtained as EAFs showed the highest content of phenolic compounds and better antioxidant and AChE inhibitory activity, as expected and already discussed [21,36,37]. The EAFs also showed better AChE inhibitory activity, probably because the relative abundance of the active constituents in these fractions was higher [34].

In addition, hierarchical cluster analysis (HCA) was used to evaluate the similarity/dissimilarity of the samples; four clusters were suggested. The means for each response variable were also compared between the clusters (Table 2). First, separation between EAFs and CEs was observed (clusters 1 and 2 *versus* clusters 3 and 4), confirming the PCA results. In the EAF, the plants comprising cluster 1 were *S. adstringens*, *P. pluviosa* and *L. brasiliense* presented the best results regarding AChE inhibitory activity (0.57 ± 0.09 mg/mL). In cluster 2, the fractions from *G. ulmifolia*, *P. cupana* and *T. catigua* had the highest TPC (622.14 ± 99.27 mg GAE/g sample), although there was no statistically significant difference between clusters 1 and 2. Regarding antioxidant activity, there was no statistically significant difference between the four clusters ($p > 0.05$). Ali and colleagues [14] suggest that plant extracts with potent free radical scavenging properties ($IC_{50} < 10$ μ g/mL in the DPPH assay) are able to reduce oxidative stress and may be evaluated against AD or other ageing-related diseases. Zeng et al. [12] showed that icariin, a flavonoid from *Epimedium brevicornu* Maxim., significantly reduced $A\beta_{25-35}$ -induced cytotoxicity and apoptosis in PC12 cells. Yu et al. [18] demonstrated that a water extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, which is rich in diterpenoids and phenolic acids, provides substantial

neuroprotection against $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells, at least in part by inhibiting oxidative stress and may have potential effects in preventing or relieving AD.

Several authors have also reported that fractions that have the potential to inhibit AChE and are rich in polyphenols might have neuroprotective effects and thus may be used to prevent or postpone the onset of degenerative diseases such as AD [1,2,5,35,39]. This suggests that the EAFs in clusters 1 and 2 should preferably be used in further studies to explore their potential for the treatment of AD since they present better AChE inhibitory activity and higher polyphenol content.

Table 2. Mean values of antioxidant activity, total polyphenol content (TPC) and acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity from crude extracts and semipurified fractions classified using hierarchical cluster analysis.

Analysis	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	p-value*	p-value**
	EAFs of <i>S. adstringens</i> , <i>P. pluviosa</i> , and <i>L. brasiliense</i>	EAFs of <i>G. ulmifolia</i> , <i>P. cupana</i> , and <i>T. catigua</i>	CEs of <i>S. adstringens</i> , <i>P. pluviosa</i> , and <i>L. brasiliense</i>	CEs of <i>G. ulmifolia</i> , <i>P. cupana</i> , and <i>T. catigua</i>		
DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	8.02 ± 3.87	7.81 ± 2.41	11.87 ± 2.69	7.40 ± 1.71	0.37	0.25
Xanthine oxidase system IC ₅₀ (µg/mL)	0.43 ± 0.23	0.57 ± 0.15	1.04 ± 0.78	1.09 ± 0.21	0.05	0.23
FRAP (mmol Trolox/g sample)	10.44 ± 3.84	6.95 ± 2.20	5.37 ± 0.52	5.07 ± 0.57	0.04	0.09
ABTS (mmol Trolox/g sample)	4.79 ± 1.61	2.84 ± 0.33	2.71 ± 0.59	2.79 ± 0.49	0.03	0.10
TPC (mg GAE/g sample)	503.67 ^{ab} ± 60.07	622.14 ^a ± 99.27	395.60 ^b ± 82.46	488.84 ^{ab} ± 48.31	0.39	0.04
AChE inhibitory activity IC ₅₀ (mg/mL)	0.57 ^c ± 0.09	1.04 ^b ± 0.23	0.79 ^{bc} ± 0.67	2.60 ^a ± 0.68	0.05	< 0.01

Note: Results expressed as mean ± standard deviation (SD). * Probability values obtained from Levene's test of homogeneity of variances. ** Probability values obtained from one-way ANOVA or the Kruskal-Wallis test. ^{ab} Different superscript letters in the same line represent statistically different results (p < 0.05).

Among the CEs, clusters 3 and 4 were grouped similarly to the EAF groups. Cluster 3 showed a better result for AChE inhibitory activity (0.79 ± 0.67 mg/mL). Regarding TPC, no statistically significant difference was observed between the two groups ($p > 0.05$). However, cluster 4 showed a slightly larger mean (488.84 ± 48.31 mg GAE/g sample). It is possible that a non-linear correlation [19] or an undetermined number of secondary metabolites besides polyphenols with different mechanisms of action may be involved in the biological activities of the extracts and semipurified fractions [14], which may explain this finding.

4.2.3 Neuroprotective effects of the EAFs of *L. brasiliense*, *P. pluviosa* and *S. adstringens*

In this work, we aimed to evaluate the neuroprotective effects of the species grouped in cluster 1. We employed human neuron-like SH-SY5Y cells as an *in vitro* model to assess the protective effects of the EAFs of *L. brasiliense*, *P. pluviosa* and *S. adstringens* in a cellular system. To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the neuroprotective effects of these fractions. A β has been widely adopted as an inducer of neuronal injury to analyse the protective potential and mechanisms of new pharmacotherapies [18]. The A β_{25-35} peptide is the most neurotoxic fragment derived from full-length A β_{1-42} and mimics many of the oxidative properties of the native peptide; thus, it is often used for the *in vitro* study of various drugs predicted to modulate A β toxicity [10,12,18,43]. This peptide displays rapid aggregation properties, forms stable fibrils and is neurotoxic immediately upon dissolution [10].

First, we investigated the effects of the EAFs on cell viability in the range of 7.81 to 1000 $\mu\text{g/mL}$ (S2 Fig). The respective fractions at concentrations of 7.81 to 62.5 $\mu\text{g/mL}$ alone did not cause any apparent cytotoxicity after 24 h of treatment, measured by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay compared to that of the vehicle-treated control. The EAFs of *P. pluviosa*, *L. brasiliense* and *S. adstringens*, at concentrations of 125, 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectively, were cytotoxic to SH-SY5Y cells. The comparison of these results with the available literature is also difficult, once it is not possible to directly extrapolate or correlate results from distinct species, mainly due to the distinct extracts composition. For example, an aqueous extract of *T. catigua* reduced the metabolic activity of SH-SY5Y cells at concentrations above 500 $\mu\text{g/mL}$ [40], while a hydroethanolic extract from *Euterpe oleracea* caused changes in SH-SY5Y morphology at a concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ [19]. Thus, we evaluated the EAFs separately and chose common non-cytotoxic concentrations of EAFs (7.81 to 31.25 $\mu\text{g/mL}$) to perform this assay.

SH-SY5Y cells were pretreated with/without the non-cytotoxic concentrations of EAFs (7.81 to 31.25 $\mu\text{g/mL}$) for 2 h and incubated with 10 μM A β_{25-35} for 24 h. As shown in Fig 9, A β_{25-35} reduced cell viability by about 70%, which is consistent with other studies [9,11]. However, we observed that pretreatment with all the evaluated concentrations of EAFs of *L. brasiliense* and *S. adstringens* were able to attenuate the loss of cell viability compared with the A β_{25-35} group. Increased concentrations of these EAFs, from 7.81 to 15.62 $\mu\text{g/mL}$, exerted an additive protective effect ($p < 0.05$), indicating a

dose-dependent action that was not further observed after an increase in the concentration of both fractions to 31.25 $\mu\text{g/mL}$. The EAF of *P. pluviosa* protected SH-SY5Y cells from $\text{A}\beta$ -induced cytotoxicity only at a concentration of 15.62 $\mu\text{g/mL}$. However, the mechanisms by which these EAFs mediated their therapeutic effects against $\text{A}\beta_{25-35}$ *in vitro* were unclear.

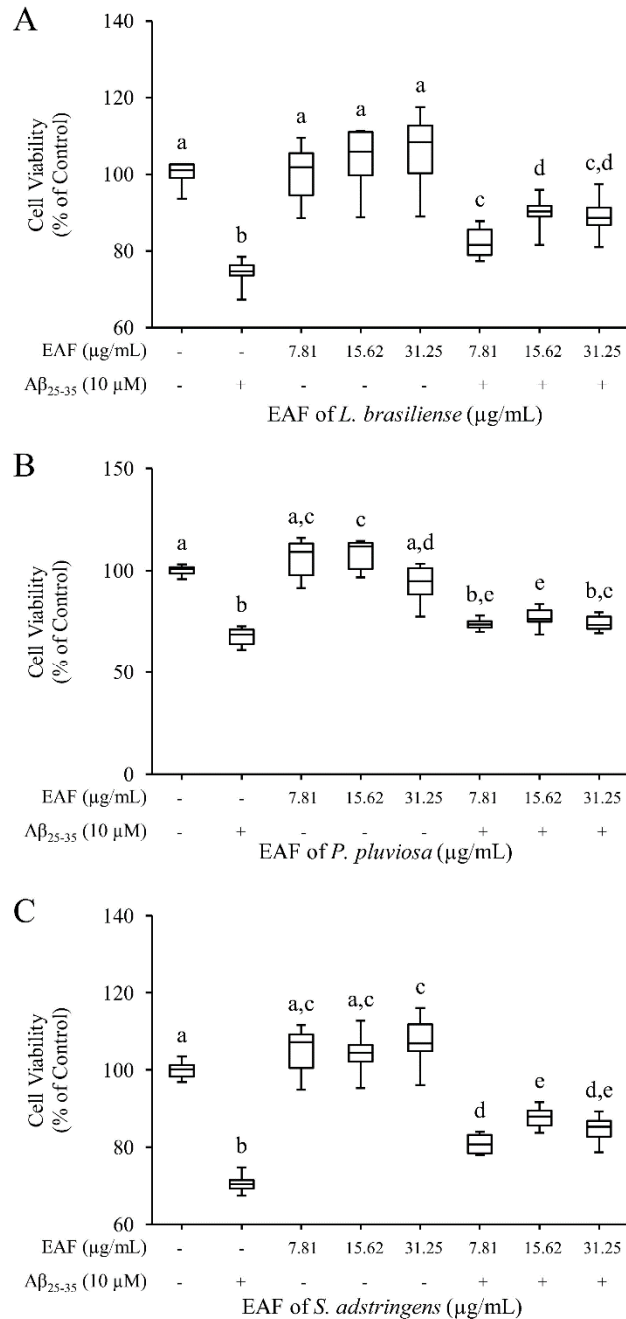


Fig 9. Effects of the EAFs of *Limonium brasiliense*, *Poincianella pluviosa* and *Stryphnodendron adstringens* on $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced cytotoxicity. SH-SY5Y neuroblastoma cells were pretreated with different concentrations (7.81, 15.62 and 31.25 $\mu\text{g/mL}$) of EAF of *L. brasiliense* (A), EAF of *P. pluviosa* (B) and EAF of *S. adstringens* (C) for 2 h, followed by subsequent treatment with 10 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ for 24 h. Cell viability was measured by MTT reduction assay. Data are presented as mean \pm SD of six replicates. ^{ab} Different superscript letters on the top of the bars indicates statistically significant differences between the multiple conditions comparison by ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$), conducted in GraphPad Prism 5 software.

Among the evaluated fractions, we chose treatment with 15.62 $\mu\text{g/mL}$ of the EAF of *S. adstringens* for the following studies.

4.2.4 Effects of the EAF of *S. adstringens* on mitochondrial membrane potential, ROS production and lipid peroxidation

It is known that exposure of SH-SY5Y cells to $\text{A}\beta_{25-35}$ may induce tau protein hyperphosphorylation and contribute to superoxide production, which can result in a free radical attack on membrane phospholipids, leading to a loss of mitochondrial membrane potential, modified proteins, damaged DNA and severe apoptosis [8,9,11-13,18]. Elevated ROS levels are also associated with oxidative damage, increased deposition of $\text{A}\beta$, the formation of senile plaques and cell death [14]. Neuronal cells are particularly susceptible to the actions of ROS and nitrogen species due to their high metabolic activity, low antioxidant capacity and non-replicative nature [19].

Dey et al. [5] showed that a number of herbal extracts, fractions, phytochemicals and herbal formulations may possess anti-AD properties via their antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-acetylcholinesterase activities, resulting in a reduction in $\text{A}\beta$ -induced toxicity. In animal AD models, they may also increase learning and memory and prevent dementia [1,5].

As previously shown, the EAFs of *L. brasiliense*, *P. pluviosa* and *S. adstringens* exhibit anti-AChE activity and considerable polyphenol content, as well as antioxidant activity, suggesting that these EAFs may protect neuroblastoma cells against $\text{A}\beta$ -induced oxidative damage, at least in part, by increasing the cellular redox potential.

Consistently, the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) assay showed that the pretreatment with EAF of *S. adstringens* at 15.62 $\mu\text{g/mL}$ protected cells against $\text{A}\beta$ -induced mitochondrial depolarization. As shown in Fig 10 and Table 3, $\text{A}\beta_{25-35}$ induced a significant (69%) decrease in total rhodamine 123 (Rh123) fluorescence intensity in the SH-SY5Y cells compared with the untreated control ($p < 0.05$), indicating mitochondrial depolarization, as previously reported by other authors [8,13]. The EAF of *S. adstringens* alone did not induce changes in $\Delta\Psi\text{m}$ compared with the control group and pretreatment for 2 h was able completely to inhibit $\text{A}\beta$ -induced mitochondrial membrane depolarization ($p < 0.05$).

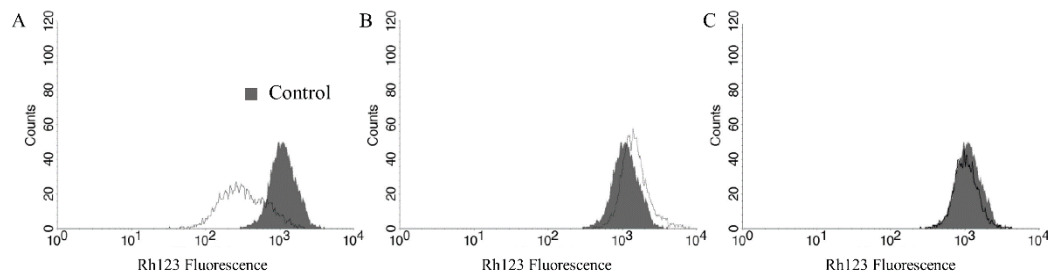


Fig 10. Effects of the EAF of *Stryphnodendron adstringens* on A β ₂₅₋₃₅-induced mitochondrial membrane depolarization in SH-SY5Y cells. Mitochondrial membrane potential was evaluated in treated SH-SY5Y cells using rhodamine 123 (Rh 123) staining, which accumulates within mitochondria. (A) 10 μ M A β ₂₅₋₃₅ impact control. (B) EAF of *S. adstringens* control at 15.62 μ g/mL. (C) Pretreatment with EAF of *S. adstringens* at 15.62 μ g/mL for 2 h followed by treatment with 10 μ M A β ₂₅₋₃₅ for 24 h. Control group (untreated cells) is also shown. Flow cytometric histograms for Rh123 fluorescence from at least three independent experiments are depicted.

Table 3. Mitochondrial membrane potential assay in treated SH-SY5Y cells stained with Rh123.

	Median	Index of variation (IV ^a)
Control	991.05	0.00
A β ₂₅₋₃₅ impact control	305.05*	-0.69
EAF of <i>S. adstringens</i> control	1,084.32	0.09
A β ₂₅₋₃₅ + EAF of <i>S. adstringens</i>	950.67	-0.04

IV^a = (M_T - M_C)/M_C, where M_T corresponds to the median of the fluorescence for treated cells and M_C to that for control cells. Asterisks indicate significant differences relative to the control group ($p < 0.05$).

The degree of ROS generation in cells was measured using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) labelling. This assay provides an index of cell cytosolic oxidation [11]. The oxidative effects of A β ₂₅₋₃₅ are widely known [8,9,11,13,18] and Fig 11A shows a significant 49% increase in total ROS after exposing SH-SY5Y cells to A β ₂₅₋₃₅ for 24 h compared with the untreated control ($p < 0.05$), indicating an increase in cellular ROS production. Cells treated with the EAF of *S. adstringens* alone or as a pretreatment for 2 h prior to A β ₂₅₋₃₅ treatment showed levels of total ROS similar to the control group (increase in total ROS of only 2% and 4%, respectively), indicating that EAF of *S. adstringens* at a concentration of 15.62 μ g/ml exerted significant inhibition of A β ₂₅₋₃₅-induced ROS accumulation. It is worth mentioning that the antiradical potential of phenolic compounds present in the EAF of *S. adstringens* is, undoubtedly, one of the most recognized properties of these compounds [40]. Taken together, these results corroborate the findings of other studies [11,13,18] and suggest that the EAF of *S. adstringens* may attenuate A β ₂₅₋₃₅-induced mitochondrial dysfunction, at least in part, by reducing ROS generation, as ROS can result in the free radical attack of membrane phospholipids, leading to mitochondrial depolarization.

Regarding lipid peroxidation, several authors have suggested that excessive ROS production can also lead to lipid peroxidation [19]. Indeed, Fig 11B shows that SH-SY5Y cells exposed to A β ₂₅₋₃₅ for 24 h exhibited a significant (35%) increase in lipid peroxidation compared with the control group ($p < 0.05$). Pretreatment with the EAF of *S. adstringens* for 2 h was able to inhibit this A β -induced lipid peroxidation, showing an increase in lipid peroxidation of only 5%, which was not a statistically significant difference compared to the control ($p > 0.05$).

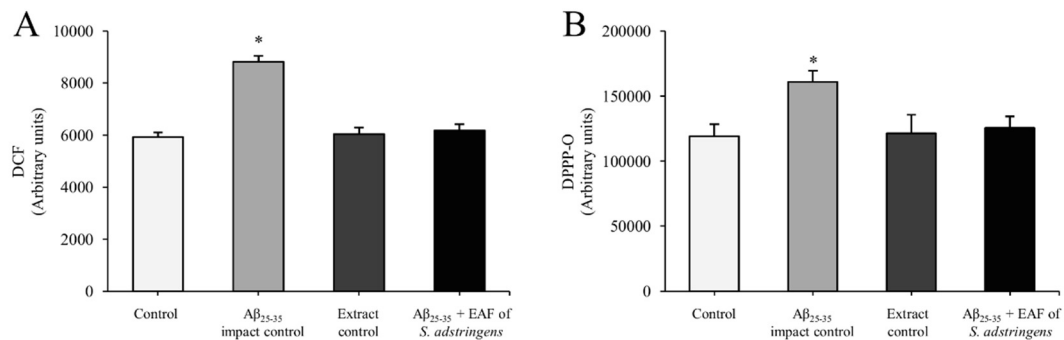


Fig 11. Effects of the EAF of *Stryphnodendron adstringens* on A β ₂₅₋₃₅-induced intracellular ROS accumulation and lipid peroxidation. (A) The degree of ROS generation in SH-SY5Y cells was evaluated using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) labelling. (B) The degree of lipid peroxidation in SH-SY5Y cells was evaluated using the diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) probe. Experimental treatment protocol was as the same as described in Fig 9. Results are expressed as mean fluorescence (in arbitrary units) \pm SD of at least three independent experiments. Asterisks indicate significant differences relative to the control group (untreated cells) by ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$), conducted in GraphPad Prism 5 software.

4.2.5 Effects of the EAF of *S. adstringens* on mRNA expression of AD-related genes

The mRNA expression of 10 genes related to AD was also evaluated to investigate the impact of this fraction on neuroprotection. The genes *A2M*, *ACHE*, *ADAM10*, *APOE*, *APP*, *GSK3 β* , *LRP1*, *MAPT*, *PSEN1* and *PSEN2* were evaluated. The data in Fig 12 show that exposure of SH-SY5Y cells to A β ₂₅₋₃₅ significantly ($p < 0.05$) increased the mRNA expression ratio of the microtubule-associated protein tau (*MAPT*) gene (expression ratio > 2.0) in comparison to the control. Pretreatment with 15.62 μ g/mL of the EAF of *S. adstringens* notably prevented overexpression of the *MAPT* mRNA gene (expression ratio of 2.387x).

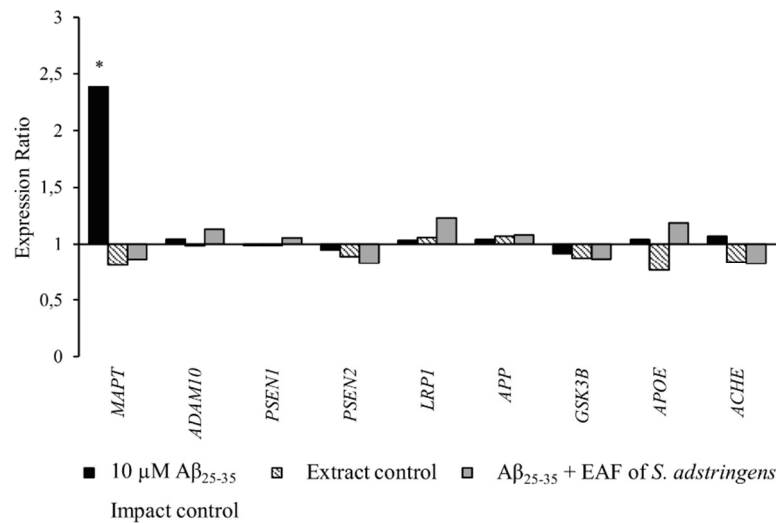


Fig 12. Effects of the EAF of *Stryphnodendron adstringens* on mRNA expression of AD-related genes. The quantification of mRNA was measured by RT-qPCR. Experimental treatment protocol was as the same as described in Fig 9. An $A\beta$ impact control and an extract control were also shown. Results are expressed as expression ratio relative to reference genes of three replicates. Asterisks indicate significant differences in relative expression compared to the control using *GAPDH* and *HPRT1* as reference genes. Statistical evaluation of reference gene and target expression levels was performed using the standalone software REST 2009, with efficiency correction. Statistical difference was defined as a two-fold change in expression with a p-value < 0.05 comparing each treatment with the control. All expression levels, standard errors, 95% confidence intervals and p-values are described in S1 Table.

The *MAPT* gene codes for the tau protein, a phosphorylated protein identified as the major component of neurofibrillary tangles that are known to be associated with the pathogenesis of AD [44]. The hyperphosphorylation of tau protein may play an important role in $A\beta$ -induced neurodegeneration [12]. Our results suggest that the EAF of *S. adstringens* may protect SH-SY5Y cells by inhibiting *MAPT* gene overexpression, which is related to the deposition of intra-neuronal neurofibrillary tangles, leading to oxidative stress, cell injury and consequently neurodegeneration [44]. However, more studies, for example of proteomics, should be carried out to confirm our findings.

4.2.6 Capillary electrophoresis fingerprint of the EAFs of *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa* and *S. adstringens*

It is known that the chemical composition of plant material can vary due to several factors, which can hamper the assessment of therapeutic claims [34]. Because of this, it is important to develop analytical methodologies that allow quality control of plant fractions. Previous studies have developed high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints to characterize the chemical constituents of the ethanol leaf extract of *G. ulmifolia* [37,45] and the EAFs of *L. brasiliense* [21], *P. cupana* [26], *S. adstringens* [46] and *T. catigua* [28]. Our research group also published a methodology using capillary electrophoresis to analyse the EAF of *T. catigua* [32].

This work shows for the first time the electropherogram fingerprints for the EAFs of *G.*

ulmifolia, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa* and *S. adstringens* obtained by capillary electrophoresis, which can be used for quality control of plant materials and their preparations. The chemical fingerprinting for EAF of *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa* and *S. adstringens* was performed following the steps previously described by our research group [32].

Optimization of the methods was done by selecting the best capillary electrophoresis mode (capillary zone electrophoresis) and adjusting electrophoretic parameters, such as the detection wavelength, background electrolyte (BGE) characteristics (buffer concentration and pH), modifier (type and concentration of cyclodextrin, organic solvent) and sample concentration. The effects of the borate buffer concentration and pH were studied over ranges from 60 to 100 mmol/L and 8.50 to 9.00, respectively, and cyclodextrin [β -cyclodextrin (β -CD), methyl- β -cyclodextrin (M- β -CD) and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD)] were screened at concentrations ranging from 10 to 20 mmol/L. Acetonitrile (10%) as an organic modifier and sample concentrations over the range from 250 to 500 μ g/mL were also evaluated. The experimental conditions established and fingerprints are presented in Table 4 and Fig 13, respectively.

Table 4. Capillary electrophoresis experimental conditions established for chemical fingerprint evaluation of the semipurified fractions.

Experimental conditions	<i>Guazuma ulmifolia</i>	<i>Limonium brasiliense</i>	<i>Paullinia cupana</i>	<i>Poincianella pluviosa</i>	<i>Stryphnodendron adstringens</i>
Sample concentration (μ g/mL)	250	250	500	500	250
Borate buffer concentration (mmol/L)	60	80	80	100	100
pH	8.80	8.80	8.80	8.50	8.50
Modifier	10% acetonitrile	10 mmol/L M- β -CD	10 mmol/L HP- β -CD	10 mmol/L HP- β -CD	10 mmol/L β -CD
Voltage (kV)	30	30	25	30	30
Injection	0.5 psi; 5 s	0.5 psi; 3 s	0.5 psi; 3 s	0.5 psi; 5 s	0.5 psi; 5 s
Run time (min)	8	9	9	14.5	7.5

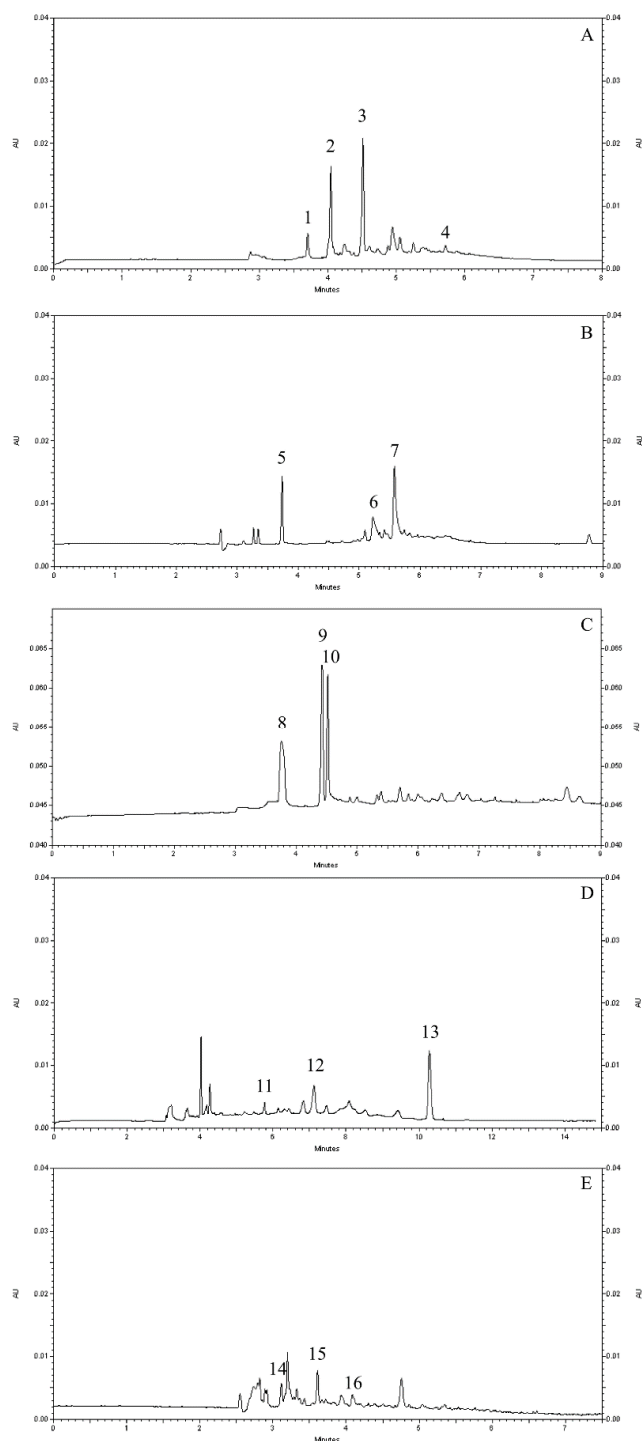


Fig 13. Electropherogram fingerprints of the EAFs of *Guazuma ulmifolia*, *Limonium brasiliense*, *Paullinia cupana*, *Poincianella pluviosa* and *Stryphnodendron adstringens*. The electropherograms were obtained by capillary electrophoresis under UV conditions. (A) Electropherogram of the EAF of *G. ulmifolia*. Peaks: 1) epiafzelechin-(4 β →8)-epicatechin, 2) mixture of epigallocatechin and epicatechin, 3) procyanidin B2 (PB2), 4) procyanidin B1 (PB1). (B) Electropherogram of the EAF of *L. brasiliense*. Peaks: 5) epigallocatechin-3-*O*-gallate, 6) samarangenin A, 7) samarangenin B. (C) Electropherogram of the EAF of *P. cupana*. Peaks: 8) caffeine, 9) catechin, 10) epicatechin. (D) Electropherogram of the EAF of *P. pluviosa*. Peaks: 11) pyrogallol, 12) ellagic acid, 13) gallic acid. (E) Electropherogram of the EAF of *S. adstringens*. Peaks: 14) galocatechin, 15) epigallocatechin, 16) PB2. Experimental conditions: uncoated fused-silica capillary, 60.2 cm (50.0 cm effective length) x 75 μ m i.d.; temperature 25 $^{\circ}$ C; hydrodynamic injection; UV detection at 214 nm. Detailed experimental conditions are described in Table 4. Electropherograms are shown separately in S3 to S7 Fig.

As we observed in another study [32], the capillary electrophoresis methodologies developed in this work were faster, less expensive and less polluting than the equivalent HPLC methods currently in use [21,26].

The chemical fingerprint qualitatively revealed a predominant amount of condensed tannins, flavonoids and phenolic acids. Some authors have suggested that polyphenols, such as astaxanthin, icariin, curcumin, resveratrol, epigallocatechin gallate, and quercetin, as well as extracts with antioxidant activity, can protect SH-SY5Y and PC12 cells against A β ₂₅₋₃₅-induced cytotoxicity by inhibiting oxidative stress, apoptosis and tau protein hyperphosphorylation; this has been shown to exert a protective effect on learning and memory abilities in rats [7,11,12,19]. The polyphenols are also recognized as potent antioxidants and are responsible for the *in vitro* anti-AChE effect [37,39,40,45]. Boasquívís et al. [42] showed that the synergic effect of the polyphenol constituents of a *P. cupana* extract, despite the high content of caffeine, may be responsible to reduce the A β aggregation and delay the A β -induced paralysis in *C. elegans* models of AD. The polyphenols are also related to a reduction in the cleavage of A β precursor protein and the production of A β [1], supporting our results suggesting the suitability of using these fractions in future studies related to AD.

4.2.7 Quality control of the EAF of *S. adstringens*

Plant biophenols are widely known as a natural weapon against neurodegenerative disorders [7,12,18]. In our previous reports, we described the isolation and identification of various flavanols [gallocatechin, epigallocatechin, 4'-*O*-methylgallocatechin, epigallocatechin-3-*O*-gallate, epigallocatechin-3-*O*-(3,5-dimethyl)-gallate, epigallocatechin-3-*O*-(3-methoxy-4-hydroxybenzoate)] [47], prodelphinidins (epigallocatechin-gallocatechin, epigallocatechin-epigallocatechin, epigallocatechin-epigallocatechin-3-*O*-gallate, epigallocatechin-epigallocatechin-3-*O*-*p*-hydroxybenzoate, epigallocatechin-3-*O*-*p*-hydroxybenzoate) [47], prorobinetinidins [robinetinidol-epigallocatechin, robinetinidol-epigallocatechin-3-*O*-gallate, robinetinidol-gallocatechin, 4'-*O*-methylrobinetinidol-4'-*O*-methylepigallocatechin, 4'-*O*-methylrobinetinidol-4'-*O*-methylgallocatechin)] [48,49] and proanthocyanidins [epigallocatechin-3-*O*-gallate-epigallocatechin-3-*O*-gallate, epigallocatechin-epigallocatechin-3-*O*-(3,5-dimethyl)-gallate, epigallocatechin-3-*O*-(3-methoxy-4-hydroxy)-benzoate, gallocatechin-epigallocatechin-3-*O*-gallate, 4'-*O*-methylgallocatechin-4'-*O*-methylgallocatechin] [47,50] from the EAF of *S. adstringens*.

To perform quality control on this fraction, the Brazilian pharmacopoeia [46] recommends the determination of two flavonoids: gallic acid and gallocatechin. In fact, the Brazilian pharmacopoeia guides the production and partition of the CE of *S. adstringens* in the same way as we prepared it. Thus, the determination of gallic acid and gallocatechin was performed on the EAF of *S. adstringens* and expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ of vegetal drug. Gallic acid has a retention time (RT) of 10.0 min; our sample presented a gallic acid content of $34.389 \pm 5.018 \mu\text{g}/\text{mg}$ of vegetal drug ($y = 217642x + 373564$, $r^2 =$

0.9919). Gallic acid has a retention time of 12.5 min; our sample presented a gallic acid content of 72.451 ± 7.185 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of vegetal drug ($y = 192381x + 304228$, $r^2 = 0.9922$).

In summary, our results suggest that possible synergy among the phytoconstituents present in the EAF of *S. adstringens* might be responsible for the *in vitro* protective effects described in the present study. Indeed, a study with an aqueous extract of *S. adstringens* with two times less TPC than our fraction (195.16 ± 0.94 mg GAE/g sample) showed that the extract increased the intracellular ROS levels, induced $\Delta\Psi\text{m}$ dysfunction and promoted apoptosis-induced cell death in B16F10Nex-2 melanoma cell [51], reinforcing our results.

With respect to toxicity, Costa et al. [52] showed that the EAF of *S. adstringens* had no genotoxic effect in mice in the range of 750 to 2.25×10^3 mg/kg and showed antimutagenic activity at the dose of 750 mg/kg. By the *Artemia salina* assay, the EAF of *S. adstringens* showed low toxicity in the range of 10 to 1.0×10^3 mg/L [52]. However, further rigorous assessments should investigate the biological effectiveness of appropriate dietary supplementation with the EAF of *S. adstringens*, as well as the potential toxicological aspects of these compounds in physiologically relevant AD models.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Chemicals

Ultrapure water was obtained using the Milli-Q water system (Millipore, Bedford, MA, USA). Analytical grade acetone and ethyl acetate were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and alcohol was obtained from Panreac AppliChem (Barcelona, Spain). HPLC-grade solvents were obtained from J.T. Baker. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), antibiotic-antimycotic solution and foetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco by Life Technologies Inc. MTT was purchased from Molecular Probes (Eugene, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was obtained from Synth (Labsynth, São Paulo, Brazil). A β ₂₅₋₃₅, the genes *A2M*, *ACHE*, *ADAM10*, *APOE*, *APP*, *GSK3 β* , *LRP1*, *MAPT*, *PSEN1*, *PSEN2*, *HPRT1* and *GAPDH*, β -CD, M- β -CD, HP- β -CD, DPPP, H₂DCFDA and Rh123 were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Analytical grade standards epicatechin, caffeine, catechin, ellagic acid, gallic acid (Sigma-Aldrich), pyrogallol (Fluka Analytical), gallic acid (MP Biomedicals), epiafzelechin-(4 β →8)-epicatechin, epigallocatechin, procyanidin B1 (PB1), procyanidin B2 (PB2), epigallocatechin-3-*O*-gallate, samarangenin A and samarangenin B, isolated by our research group [24,29,31], were used for peak identification. All other chemicals used were of the highest commercially available grade.

4.3.2 Plant materials

The plant materials were collected with permission from IBAMA-SISBIO (No. 11995-3, 2 November, 2010, authentication code 46367613) under the responsibility of J. C. P. Mello. All voucher species were deposited in the Herbarium of the Universidade Estadual de Maringá (HUEM). The bark of *G. ulmifolia* was collected in December 2004 in Ibiporã, Paraná, Brazil (23°18'15.2"S; 50°58'32.7"W). Rhizomes of *L. brasiliense* were collected in February 2013, in Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil (31°59'33"S; 52°10'43"W). Seeds of *P. cupana* were obtained from Alta Floresta, Mato Grosso, Brazil (9°51'25.7"S; 56°03'58.3"W) in November 2012. The bark of *P. pluviosa* was collected in Maringá, Paraná, Brazil (23°24'10"S; 51°56'28"W) in January 2015. The stem bark of *S. adstringens* was collected in São Jerônimo da Serra, Paraná, Brazil (23°42'28"S; 50°46'26"W) in March 2008. The bark of *T. catigua* was obtained in May 2011 in Caetité, Bahia, Brazil (14°05'35"S; 42°34'20"W). Voucher specimens were deposited at HUEM under the numbers 10491, 27725, 9065, 12492, 14321 and 19434, respectively. The species *G. ulmifolia*, *P. cupana*, *S. adstringens* and *T. catigua* were identified by Prof. Dr. Cássia Mônica Sakuragui (Universidade Federal do Rio de Janeiro). *L. brasiliense* and *P. pluviosa* were identified by Prof. Dr. Lilian Auler Mentz (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) and Prof. Dr. Maria Conceição de Souza (Universidade Estadual de Maringá), respectively. Access to the botanical material was registered by the Brazilian Biodiversity System – *SisGen - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado* under numbers ADA98FE, ACA171E, A06ADCB, A8B4204, 010252/2015-0 and A6DD2D2, respectively.

4.3.3 Preparation of crude extracts and semipurified fractions

The CEs and EAFs of *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa*, *S. adstringens* and *T. catigua* were prepared as previously described [22,23,25,27-29]. CEs and EAFs were concentrated and lyophilized before use.

4.3.4 Evaluation of antioxidant activity using in vitro tests

All analyses were performed at least in triplicate, in 96-well microplates, and read on a Bio-tek Power Wave XS or a luminometer (Spectra max L1-Channel; Molecular Devices).

4.3.4.1 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

CEs and EAFs were tested in relation to the reduction of the DPPH radical, as previously described [53]. The samples were diluted in methanol and prepared in the range of 0.78 to 25 µg/mL. Absorbance values were measured at 517 nm using a microplate spectrophotometer. Negative control, blank and positive control samples were used. A graph of the percentage of antioxidant activity versus

the concentration of the extracts/fractions tested, in $\mu\text{g/mL}$, was constructed. The IC_{50} value was calculated by linear regression.

4.3.4.2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The FRAP assay was performed according to previously published methods [54]. Ethanol was used for dilution of the Trolox standard and for the preparation of different concentrations of plant extracts/fractions (15 to 60 $\mu\text{g/mL}$). Absorbance values were measured using a microplate spectrophotometer at 595 nm. To determine the total antioxidant activity of the samples, the Trolox calibration curve (20 $\mu\text{mol/L}$ to 600 $\mu\text{mol/L}$, $y = 0.0027x + 0.0359$, $r^2 = 0.9981$) was determined and the equation of the straight line was obtained from the absorbances of the different dilutions of extracts/fractions. The results were expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC).

4.3.4.3 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) antioxidant assay

The ABTS antioxidant assay was performed according to previously published methods [55]. CEs and EAFs were evaluated at concentrations of 30 to 300 $\mu\text{g/mL}$ (in ethanol). The samples were read using a microplate spectrophotometer at 734 nm. The Trolox calibration curve (40 $\mu\text{mol/L}$ to 1.0×10^3 $\mu\text{mol/L}$; $y = -0.0005x + 0.6467$; $r^2 = 0.9961$) was used to determine the total antioxidant activity and the equation of the line obtained from the absorbance values of the dilutions of the CEs/EAFs. The results were expressed as TEAC.

4.3.4.4 Xanthine oxidase activity assay

CEs and EAFs of the plants were diluted in 50% ethanol serially, in the range of 4.24 to 0.07 $\mu\text{g/mL}$, using a total of six concentrations. The xanthine oxidase assay was performed according to previously published methods [56], with some modifications. The addition of xanthine oxidase was performed automatically by luminometer. Blank (50% ethanol), negative control and positive control (Trolox) samples were used. A graph of the percentage of antioxidant activity *versus* the concentration of the CEs/EAFs tested was constructed in concentrations of $\mu\text{g/mL}$. The IC_{50} was calculated by linear regression.

4.3.5 Determination of total phenol content using the Folin-Ciocalteu reagent method

Determination of the TPC of the CEs/EAFs was performed using Folin–Ciocalteu reagent according to previously described procedures [20,57], with a few modifications. The absorbance was read at 760 nm using a spectrophotometer (USB 2000+, Ocean Optics). Gallic acid (0.8 to 6.4 $\mu\text{g/mL}$) was used as the standard to obtain the calibration curve ($y = 0.1068x + 0.006$, $r^2 = 0.9985$). The TPC of the CEs/EAFs was expressed as mg of GAE/g sample.

4.3.6 Evaluation of AChE inhibitory activity using a microplate AChE inhibition assay

CEs and EAFs were tested using a 96-well microplate assay based on previously published methods [15,16], with minor modifications. CE was evaluated in the range of 0.25 to 5 mg/mL and EAF at 0.05 to 1 mg/mL in ultrapure water. The reaction was started by the addition of the enzyme solution and the absorbance was monitored at 412 nm every 60 s for 10 min. The rates of reaction were calculated using appropriate software. The percentage of inhibition was calculated by comparing the rates of inhibition for the sample and the blank (ultrapure water). An inhibition curve was obtained by plotting the percentage of inhibition versus the logarithm of the inhibitor concentration in the assay solution. IC₅₀ was determined from the inhibition curve by linear regression analysis. Physostigmine (Sigma-Aldrich) was used as the positive control.

4.3.7 Neuroprotective effects of the EAFs of *L. brasiliense*, *P. pluviosa* and *S. adstringens*

4.3.7.1 EAF stock solution and working solution

The EAF stock solutions (4.0×10^4 µg/mL) of *L. brasiliense*, *P. pluviosa* and *S. adstringens* were solubilized in an alcohol/cell medium mixture (70/30, v/v), sterilized by filtration and stored at 4 °C. The stock solution was diluted to working concentration (4.0×10^3 µg/mL) in cell medium before use.

4.3.7.2 Aβ₂₅₋₃₅ stock solution and working solution

Aβ₂₅₋₃₅ was dissolved at 1 mM in sterile distilled water. Treatments were performed with a working solution at 100 µM in cell medium supplemented with 10% FBS, to achieve a final concentration of 10 µM in each well.

4.3.7.3 Cell culture

Human SH-SY5Y neuroblastoma cells were kindly provided by Prof. Dr. Catarina Satie Takahashi from Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, Brazil) and maintained in DMEM containing 10% FBS in a humidified atmosphere of 5.0% CO₂ in air at 37.0 °C, as previously described [58]. Experiments were performed at 80% confluence.

4.3.7.4 Determination of cell viability

Cell viability was assessed using a conventional MTT reduction assay as described previously [59], with some modifications. The assay was performed with six replicates. Cells at a density of 2.0×10^4 cells per well were placed in 96-well plates with 100 µL of fresh medium supplemented with 10% of FBS. After 24 h of stabilization, the cells were pretreated with three different concentrations of EAFs (7.81, 15.62 and 31.25 µg/mL, solubilized in DMEM plus 10% FBS) for 2 h. After 2 h, the treatment was combined with 10 µM Aβ₂₅₋₃₅ and incubated for another 24 h at 37.0 °C in 5.0% CO₂. A solvent control condition (DMEM + 10% FBS) was used as a control for the statistical analysis. An Aβ impact control (10 µM Aβ₂₅₋₃₅ solubilized in DMEM plus 10% FBS) and an extract control (each type of EAF

at each test concentration + DMEM + 10% FBS) were also included. After the treatment-associated period, the culture medium was discarded and 100 μL of MTT (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to all wells and the plates were incubated for 4 h. The MTT solution was then removed and 100 μL of DMSO was added to all wells to dissolve the dark blue crystals. The plates were shaken for a few minutes and read on a Thermo Plate reader (Thermo Plate, China) using a wavelength of 540 nm. Data were analysed and expressed as percentages relative to the control. The pretreatment and treatment were performed based on previous studies [11,18,58].

4.3.8 Evaluation of the protective effects of the EAF of *S. adstringens*

4.3.8.1 Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) assay

$\Delta\Psi\text{m}$ was evaluated during the exposure of SH-SY5Y cells to the EAF of *S. adstringens* at 15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 2 h, then combined with 10 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ for another 24 h, using the Rh123 probe. Afterward, the cells were incubated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rh123 for 15 min to verify $\Delta\Psi\text{m}$. A solvent control (DMEM + 10% FBS) was used as a control for the statistical analysis. An $\text{A}\beta$ impact control (10 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ solubilized in DMEM plus 10% FBS) and an extract control (EAF of *S. adstringens* at 15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + DMEM + 10% FBS) were also included. The data acquisition and analysis were performed using a FACSCalibur flow cytometer equipped with CellQuest software. A total of 1.0×10^4 events were acquired in the region corresponding to the cells. Alterations in Rh123 fluorescence were quantified using an index of variation (IV) obtained from the equation $(\text{MT} - \text{MC})/\text{MC}$, in which MT is the median fluorescence for the treated cells and MC is the median fluorescence for the control cells. Negative IV values correspond to depolarization of the mitochondrial membrane [60].

4.3.8.2 Fluorimetric detection of ROS production

The production of ROS was evaluated during the exposure of SH-SY5Y cells to the EAF of *S. adstringens* at 15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 2 h, then combined with 10 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ and incubated for another 24 h, using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) probe, measuring its oxidation to the fluorescent product 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). A solvent control, an $\text{A}\beta$ impact control and an extract control were also included. Cells were loaded with 10 μM H_2DCFDA and stored in the dark for 45 min and fluorescence was determined using a VICTOR X3 spectrofluorometer at $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ [61].

4.3.8.3 Lipid peroxidation assay

The extent of lipid peroxidation was evaluated during the exposure of SH-SY5Y cells to the EAF of *S. adstringens* at 15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 2 h, then combined with 10 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ and incubated for another 24 h, using the diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) probe. For this, cells were loaded with 50 μM DPPP for 15 min at 22 $^\circ\text{C}$ and fluorescence was determined in a fluorescence microplate reader (VICTOR X3, PerkinElmer) at $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$. DPPP is essentially non-fluorescent until

it is oxidized to a phosphine oxide (DPPP-O) by peroxides [62]. A solvent control condition, an A β impact control and an extract control were also included.

4.3.8.4 Quantification of mRNA using real-time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

3.0×10^5 cells were inoculated in a 24-well plate with 500 μ L of DMEM plus 10% FBS for 24 h at 37.0 °C with 5.0% CO₂ for stabilization. Then, the cells were pretreated with the EAF of *S. adstringens* at 15.62 μ g/mL for 2 h. After 2 h, the treatment was combined with 10 μ M A β ₂₅₋₃₅ and incubated for another 24 h at 37.0 °C in 5.0% CO₂. A solvent control condition, an A β impact control and an extract control were also included.

4.3.8.5 RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated using a Qiagen RNeasy Minikit (Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. The purity and concentration of isolated RNA were determined by a NanoDrop Lite spectrophotometer (Thermo Scientific) and RNA integrity and quality were verified by denaturing agarose gel electrophoresis according to previously published methods [63]. cDNA synthesis of each sample was performed in triplicate using a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) with 250 ng of total RNA diluted in a final volume of 16 μ L containing oligo dT (80 pmol), random primers (100 pmol) and dNTPs (0.5 mM). This first reaction mix was incubated for 10 min at 65 °C. Each reaction was then thermal shocked on ice and 4 μ L of a second reaction mix was added [1.3 μ L of DEPC-treated H₂O, 2 μ L of Buffer 10X, 0.6 μ L of MgCl₂ (50 mM), 0.05 μ L of RNase Out (Invitrogen), 0.05 μ L of SuperScript III enzyme (Invitrogen)]. The final solutions were submitted to incubation at 37.0 °C for 50 min to allow for cDNA synthesis and a final period of enzyme inactivation at 70.0 °C for 15 min.

4.3.8.6 Quantitative PCR (qPCR)

The qPCR reactions were also performed in triplicate on a CFX96 Real-Time System (Bio-Rad) using 5 μ L of SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 1 μ L of each oligonucleotide primer (10 pmol/ μ L) and 5 μ L of cDNA (50 ng/ μ L) (1:10 dilution of input RNA). The reaction conditions were: pre-incubation at 50 °C for 2 min (UDG incubation), initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles of 20 s at 95 °C, 30 s at 60 °C and 20 s at 72 °C. A melt curve analysis ranging from 50 °C to 98 °C was performed at the end of the reaction with 5 s of reading at every 0.5°C. The software CFX Manager 3.1 (Bio-Rad) was used to collect the data and the efficiency of the reactions was calculated in LinRegPCR software [64,65]. *HPRT1* and *GAPDH* were used as reference genes. The target genes were as follows: *A2M*, *ACHE*, *ADAM10*, *APOE*, *APP*, *GSK3 β* , *LRP1*, *MAPT*, *PSEN1* and *PSEN2*.

4.3.9 Development of the capillary electrophoresis fingerprint

4.3.9.1 Capillary electrophoresis under UV conditions

Analytical development was carried out using the Beckman P/ACE MDQ electrophoresis system (Beckman-Coulter) equipped with a filter-based UV/Vis detector and 32 Karat version 7.0 software.

Fused-silica capillaries (Beckman Coulter) were used with the following dimensions: 60.2 cm total length, 50.0 cm effective length, 363 μm o.d. and 75 μm i.d.. The samples were injected hydrodynamically and all electropherograms were recorded at 214 nm. The cartridge coolant was set at 25 °C. The BGE conditions were set for each sample.

4.3.9.2 Preparation of the solution for analysis

An appropriate amount of each EAF was weighed, dissolved in 10.0 mL of a 20% methanol solution and eluted through a solid-phase extraction (SPE) cartridge (Strata C18-E, Phenomenex), as described previously [32]. All solutions for analysis were filtered through a 0.45 μm Millipore filter.

4.3.10 Quality control of the EAF of S. adstringens

The gallic acid and gallocatechin content present in the EAF of *S. adstringens* was determined by HPLC, according to the methodology described by the Brazilian pharmacopoeia [46]. The analysis was performed with three replicates in a system consisting of a Thermo HPLC equipped with pumps and an integral degasser (Finnigan Surveyor LC Pump Plus), PDA spectrophotometric detector module (Finnigan Surveyor PDA Plus Detector), controller software (Chromquest) and autosampler (Finnigan Surveyor Autosampler Plus) equipped with a 10 μL loop for injection. For quantification, the standard curves of gallic acid and gallocatechin were constructed. The results are expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ of vegetal drug.

4.3.11 Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD) of three replicates for each experiment. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to detect significant differences between samples. Statistically significant differences were defined as a p-value < 0.05 . The chemometric tools used were PCA and HCA, implemented in Statistica v. 13.3 software (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). First, the dataset was autoscaled (transformation into z-scores) and PCA was applied to distinguish the samples according to the levels of DPPH, ABTS, FRAP, xanthine oxidase system, AChE inhibitory activity and TPC [37]. HCA was performed on the basis of Euclidean distance and Ward's method was used to cluster the samples. Levene's test was carried out to check for homogeneity of variance. ANOVA and the non-parametric multiple comparison Kruskal–Wallis test were used to identify noted differences among the clusters. Fisher's least significant difference (LSD) *post hoc* multiple comparison test was applied to identify the differences observed among clusters [37]. For the MTT, $\Delta\Psi\text{m}$, total ROS and lipid peroxidation assays described previously, the data were analysed using one- and two-way ANOVA with significant differences among means identified by the Tukey or Bonferroni *post hoc* tests, respectively. The statistical analyses were performed using Prism 5 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Statistical validation of reference gene and gene expression levels

was undertaken in the stand-alone software *REST* 2009 (*Relative Expression Software Tool*/Qiagen), with efficiency correction, using a previously described method [66]. Statistically significant differences were defined as a two-fold change and a p-value < 0.05, comparing each treatment with the control.

4.4 Conclusion

The present study provides information concerning the *in vitro* protective effects of *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa*, *S. adstringens* and *T. catigua* against neurodegenerative disease, specifically Alzheimer's disease (AD). PCA and HCA were found to be useful chemometric tools for rationalizing the choice of extracts/fractions with the greatest potential to be evaluated against AD, avoiding the use of animals and allowing the optimization of time and resources invested in the research. This is the first study to use SH-SY5Y cell culture assays showing that the EAFs of *S. adstringens*, *P. pluviosa* and *L. brasiliense* are able to protect human neuroblastoma cells against damage induced by A β ₂₅₋₃₅. The neuroprotective effect of the EAF of *S. adstringens* was due, at least in part, to protection against mitochondrial depolarization, superoxide production and A β -induced lipid peroxidation and inhibition of *MAPT* mRNA overexpression, which suggests a decrease in the hyperphosphorylation of tau protein. The synergy between the polyphenols present in this fraction may be responsible for the biological activity observed *in vitro*. However, further rigorous studies should be conducted to investigate the biological effectiveness and the potential toxicological aspects of the EAF of *S. adstringens* in physiologically relevant AD models with a view to confirming and expanding our findings. The neuroprotective potential of the EAFs of *L. brasiliense* and *P. pluviosa* should also be investigated in future studies. With respect to analytical development, the developed methodologies are faster, more economical and less polluting than the equivalent methods previously established by HPLC and can be adopted for quality control routine after adequate validation.

Acknowledgments

The authors are grateful to Prof. Dr. Catarina Satie Takahashi from Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, Brazil) for kindly providing the SH-SY5Y cells.

References

1. Park SY. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. *Arch Pharm Res.* 2010;33(10): 1589-1609.

2. Shakir T, Coulibaly AY, Kehoe PG. An exploration of the potential mechanisms and translational potential of five medicinal plants for applications in Alzheimer's disease. *Am J Neurodegener Dis.* 2013;2(2): 70-88.
3. Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M. *World Alzheimer Report 2016: Improving healthcare for people living with dementia.* London: Alzheimer's Disease International; 2016.
4. Castillo WO, Aristizabal-Pachon AF, Montaldi APL, Sakamoto-Hojo ET, Takahashi CS. Galanthamine decreases genotoxicity and cell death induced by β -amyloid peptide in SH-SY5Y cell line. *Neurotoxicology* 2016;57: 291-297.
5. Dey A, Bhattacharya R, Mukherjee A, Pandey DK. Natural products against Alzheimer's disease: pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnol Adv.* 2017;35: 178-216.
6. Fujihara K, Koike S, Ogasawara Y, Takahashi K, Koyama K, Kinoshita K. Inhibition of amyloid β aggregation and protective effect on SH-SY5Y cells by triterpenoid saponins from the cactus *Polaskia chichipe*. *Bioorg Med Chem.* 2017;25: 3377-3383.
7. Omar SH, Scott CJ, Hamlin AS, Obied HK. The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem.* 2017;47: 1-20.
8. Chen TF, Tang MC, Chou CH, Chiu MJ, Huang RFS. Dose-dependent folic acid and memantine treatments promote synergistic or additive protection against $A\beta_{(25-35)}$ peptide-induced apoptosis in SH-SY5Y cells mediated by mitochondria stress-associated death signals. *Food Chem Toxicol.* 2013;62: 538-547.
9. Hashimoto M, Katakura M, Hossain S, Rahman A, Shimada T, Shido O. Docosahexaenoic acid withstands the $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *J Nutr Biochem.* 2011;22: 22-29.
10. Lattanzio F, Carboni L, Carretta D, Candeletti S, Romualdi P. Treatment with the neurotoxic $A\beta$ (25-35) peptide modulates the expression of neuroprotective factors Pin1, Sirtuin 1, and brain-derived neurotrophic factor in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Exp Toxicol Pathol.* 2016;68: 271-276.
11. Wang HQ, Sun XB, Xu YX, Zhao H, Zhu QY, Zhu CQ. Astaxanthin upregulates heme oxygenase-1 expression through ERK1/2 pathway and its protective effect against beta-amyloid-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Brain Res.* 2010;1360: 159-167.
12. Zeng KW, Ko H, Yang HO, Wang XM. Icaritin attenuates β -amyloid-induced neurotoxicity by inhibition of tau protein hyperphosphorylation in PC12 cells. *Neuropharmacology* 2010;59: 542-550.
13. Zhang L, Yu H, Zhao X, Lin X, Tan C, Cao G, et al. Neuroprotective effects of salidroside against beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurochem Int.* 2010;577: 547-555.
14. Ali SK, Hamed AR, Soltan MM, Hegazy UM, Elgorashi EE, El-Garf IA, et al. In-vitro evaluation of selected Egyptian traditional herbal medicines for treatment of Alzheimer disease. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13(121): 1-10.
15. Rhee IK, Meent M, Ingkaninan K, Verpoorte R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J Chromatogr A* 2001;915: 217-223.

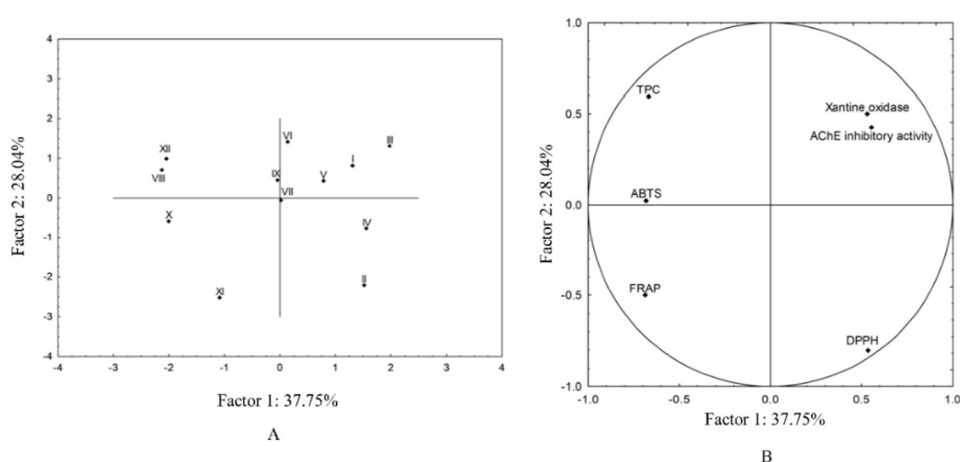
16. Seidl C, Correia BL, Stinghen AEM, Santos CAM. Acetylcholinesterase inhibitory activity of uleine from *Himatanthus lancifolius*. *Z Naturforsch.* 2010;65: 440-444.
17. Montenegro JMF, Argyriou V. Cognitive evaluation for the diagnosis of Alzheimer's disease based on Turing Test and Virtual Environments. *Physiol Behav.* 2017;173: 42-51.
18. Yu H, Yao L, Zhou H, Qu S, Zeng X, Zhou D, et al. Neuroprotection against A β ₂₅₋₃₅-induced apoptosis by *Salvia miltiorrhiza* extract in SH-SY5Y cells. *Neurochem Int.* 2014;75: 89-95.
19. Torma PCMR, Brasil AVS, Carvalho AV, Jablonski A, Rabelo TK, Moreira JCF, et al. Hydroethanolic extracts from different genotypes of açai (*Euterpe oleracea*) presented antioxidant potential and protected human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Food Chem.* 2017;222: 94-104.
20. Blainski A, Lopes GC, Mello JCP. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 2013;18: 6852-6865.
21. Blainski A, Antonelli-Ushirobira TM, Godoy G, Leite-Mello EVS, Mello JCP. Pharmacognostic evaluation, and development and validation of a HPLC-DAD technique for galocatechin and epigallocatechin in rhizomes from *Limonium brasiliense*. *Braz J Pharmacog.* 2017;27: 162-169.
22. Blainski A, Gionco B, Oliveira AG, Andrade G, Scarminio IS, Silva DB, et al. Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrugresistant bacteria using a statistical mixture design. *J Ethnopharmacol.* 2017;198: 313-323.
23. Bueno FG, Panizzon GP, Mello EVSL, Lechtenberg M, Petereit F, Mello JCP, et al. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Fitoterapia* 2014;99: 252-260.
24. Caleare AO, Hensel A, Mello JCP, Pinha AB, Panizzon GP, Lechtenberg M, et al. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. *Fitoterapia* 2017;118: 87-93.
25. Ishida K, Mello JCP, Cortez DAG, Dias-Filho BP, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58: 942-949.
26. Klein T, Longhini R, Mello JCP. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. sorbilis (guaraná). *Talanta* 2012;88: 502-506.
27. Klein T, Longhini R, Bruschi ML, Mello JCP. Development of tablets containing semipurified extract of guaraná (*Paullinia cupana*). *Braz J Pharmacog.* 2013;23(1): 186-193.
28. Longhini R, Klein T, Bruschi ML, Silva-Junior WV, Rodrigues J, Lopes NP, et al. Development and validation studies for determination of phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J Sep Sci.* 2013;36: 1247-1254.
29. Lopes GC, Rocha JCB, Almeida GC, Mello JCP. Condensed tannins from the bark of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae). *J Braz Chem Soc.* 2009;20(6): 1103-1109.

30. Marques LL, Panizzon GP, Aguiar BA, Simionato AS, Cardozo-Filho L, Andrade G, et al. Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: selective supercritical extraction of phenolic compounds. *Food Chem.* 2016;1(212): 703-711.
31. Resende FO, Rodrigues-Filho E, Luftmann H, Petereit F, Mello JCP. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their *in vitro* antioxidative activity. *J Braz Chem Soc.* 2011;22: 2087-2093.
32. Sereia AL, Longhini R, Lopes GC, Mello JCP. Capillary electrophoresis as tool for diastereomeric separation in a *Trichilia catigua* fraction. *Phytochem Anal.* 2017;28(3): 144-150.
33. Godinho J, Oliveira RMW, Sa-Nakanishi AB, Bacarin CC, Huzita CH, Longhini R, et al. Ethyl-acetate fraction of *Trichilia catigua* restores long-term retrograde memory and reduces oxidative stress and inflammation after global cerebral ischemia in rats. *Behav Brain Res.* 2018;337: 173-182.
34. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnol Adv.* 2015;33(8): 1582-1614.
35. Alam, MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J.* 2013;21: 143-152.
36. Hwang YJ, Lee EJ, Kim HR, Hwang KA. In vitro antioxidant and anticancer effects of solvent fractions from *Prunella vulgaris* var. lilacina. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13: 310.
37. Zielinski AAF, Haminiuk CWI, Alberti A, Nogueira A, Demiate IM, Granato D. A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *Food Res Int.* 2014;60: 246-254.
38. Morais SM, Calixto-Júnior JT, Ribeiro LM, Sousa HA, Silva AAS, Figueiredo FG, et al. Phenolic composition and antioxidant, anticholinesterase and antibiotic-modulating antifungal activities of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) ethanol extract. *S Afr J Bot.* 2017;110: 251-257.
39. Rodrigues MJ, Oliveira M, Neves V, Ovelheiro A, Pereira CA, Neng NR, et al. Coupling sea lavender (*Limonium algarvense* Erben) and green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) to produce an innovative herbal beverage with enhanced enzymatic inhibitory properties. *S Afr J Bot.* 2017;doi: 10.1016/j.sajb.2017.12.003.
40. Bernardo J, Ferreres F, Gil-Izquierdo Á, Videira RA, Valentão P, Veiga F, et al. *In vitro* multimodal-effect of *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae) bark aqueous extract in CNS targets. *J Ethnopharmacol.* 2018;211: 247-255.
41. Ruchel JB, Braun JBS, Adefegha SA, Manzoni AG, Abdalla FH, Oliveira JS, et al. Guarana (*Paullinia cupana*) ameliorates memory impairment and modulates acetylcholinesterase activity in Poloxamer-407-induced hyperlipidemia in rat brain. *Physiol Behav.* 2017;168: 11-19.
42. Boasquívivis PF, Silva GMM, Paiva FA, Cavalcanti RM, Nunez CV, Oliveira RP. Guarana (*Paullinia cupana*) extract protects *Caenorhabditis elegans* models for Alzheimer disease and Huntington disease through activation of antioxidant and protein degradation pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018: 1-16.
43. Chen Y, Zhang J, Zhang L, Chen G. Separation of dipeptides with two chiral centers using 2-hydroxypropyl- β -CD modified MEKC. *Electrophoresis* 2010;31: 1493-1497.

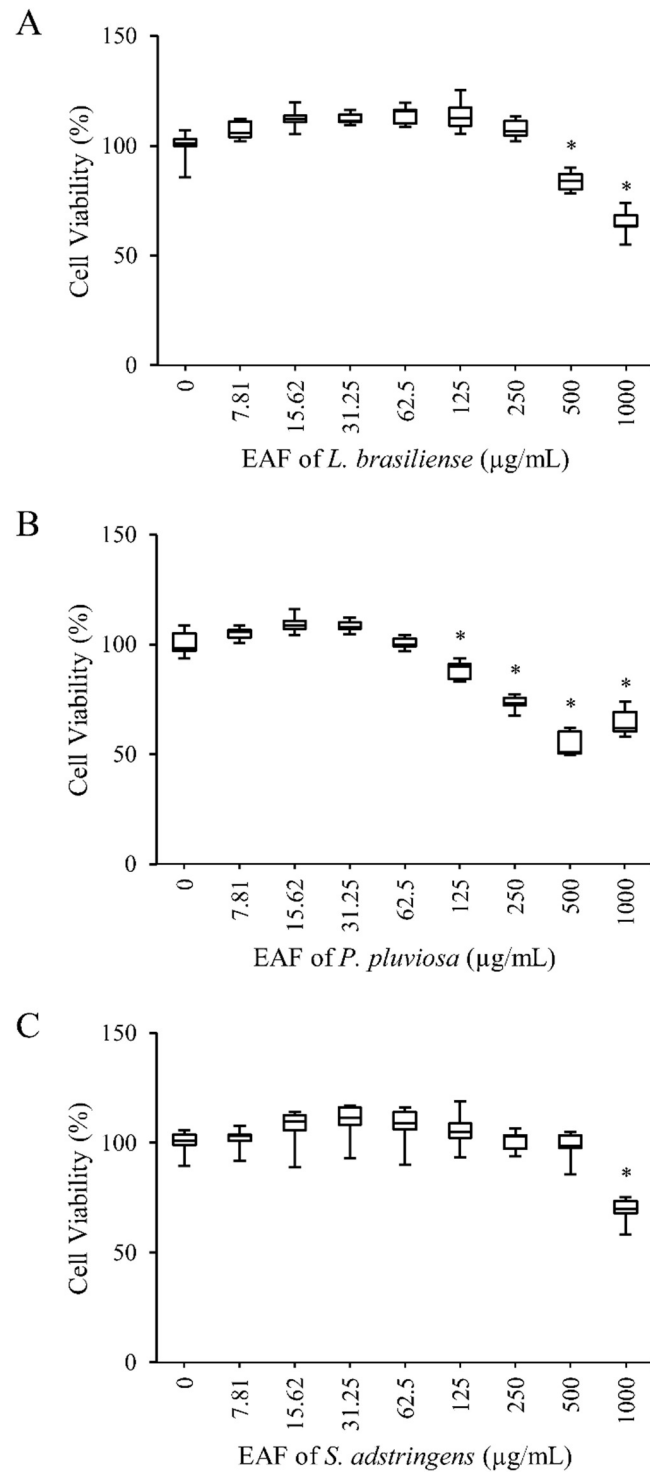
44. Sun W, Jia J. The +347 C promoter allele up-regulates MAPT expression and is associated with Alzheimer's disease among the Chinese Han. *Neurosci Lett*. 2009;450: 340-343.
45. Calixto-Júnior JT, Morais SM, Gomez CV, Molas CC, Rolon M, Boligon AA, et al. Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from the Brazilian Northeast "Cerrado". *Saudi J Biol Sci*. 2016;23: 434-440.
46. Brasil. Barbatimão: Barbadetimoni cortex. In: *Farmacopeia Brasileira*. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA; 2010. Vol. 2, pp. 671-675.
47. Mello JP, Petereit F, Nahrstedt A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* 1996;41(3): 807-813.
48. Lopes GC, Machado FAV, Toledo CEM, Sakuragui CM, Mello JCP. Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species. *Biochem Syst Ecol*. 2009;36: 925-931.
49. Mello JP, Petereit F, Nahrstedt A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* 1996;42(3): 857-862.
50. Mello JCP, Petereit F, Nahrstedt A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* 1999;51: 1105-1107.
51. Santos EL, Baldivia DS, Leite DF, Castro DTH, Campos JF, Oliveira CFR, et al. Antioxidant and anticancer activities from *Stryphnodendron adstringens*. *Free Radic Biol Med*. 2018;128(S1): S66.
52. Costa MA, Ishida K, Kaplum V, Koslyk EDA, Mello JCP, Ueda-Nakamura T, et al. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) for use as a pharmacological agent. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2010;58: 330-335.
53. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol*. 1995;28(1): 25-30.
54. Campanini MZ, Custódio DL, Ivan ALM, Martins SM, Paranzini MJR, Martinez RM, et al. Topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract: *in vitro* antioxidant activity and *in vivo* efficacy against UV-B-induced oxidative stress. *AAPS PharmSciTech*. 2014;15(1): 86-95.
55. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;29(9/10): 1231-1237.
56. Marquele FD, Mambro VMD, Georgetti SR, Casagrande R, Valim YML, Fonseca MJV. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;39: 455-462.
57. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1999;299: 152-178.
58. Lee C, Park GH, Kim CY, Jang JH. [6]-Gingerol attenuates β -amyloid-induced oxidative cell death via fortifying cellular antioxidant defense system. *Food Chem Toxicol*. 2011;49: 1261-1269.

59. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65: 55-63.
60. Lazarin-Bidóia D, Desoti VC, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Nakamura CV, Silva SO. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5: confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. *Free Radic Biol Med.* 2013;60: 17-28.
61. Shukla AK, Patra S, Dubey VK. Iridoid glucosides from *Nyctanthes arbortristis* result in increased reactive oxygen species and cellular redox homeostasis imbalance in *Leishmania* parasite. *Eur J Med Chem.* 2012;54: 49-58.
62. Okimoto Y, Watanabe A, Niki E, Yamashita T, Noguchi N. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett* 2000;474: 137-140.
63. Aranda PS, Lajoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 2012;33: 366-369.
64. Ruijter JM, Pfaffl MW, Zhao S. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods* 2013;59: 32-46.
65. Ruijter JM, Ramarkeers C, Hoogars WM, Karlen Y, Bakker O, Van-Den-Hoff MJ, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009;37: e45.
66. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30 (9): e36.

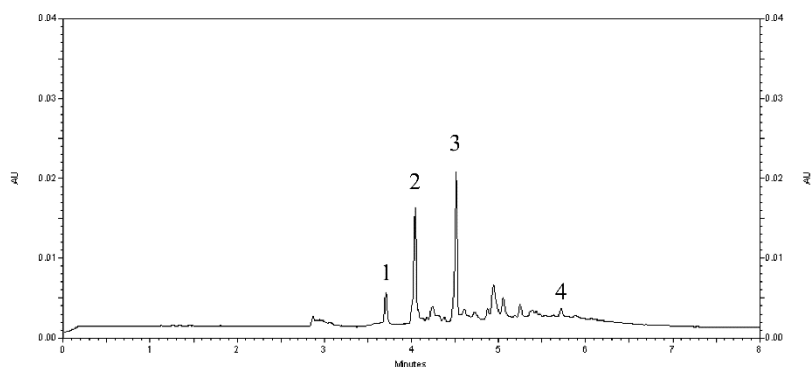
Supplementary material



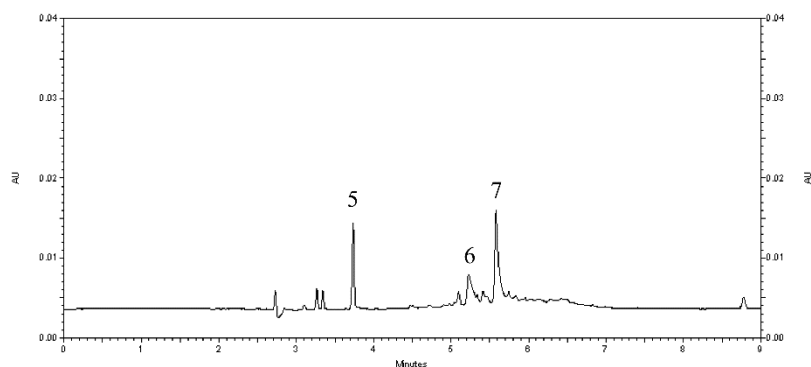
S1 Fig. Principal component analysis scatter plots on the main sources of variability between the evaluated CEs/EAFs. (A) *Scores* plot (PC1 versus PC2) and (B) *loading* plot (PC1 versus PC2). Principal component analysis (PCA) was applied to distinguish the samples according to the levels of DPPH, ABTS, FRAP, xanthine oxidase system, AChE inhibitory activity and TPC. Dataset was autoscaled (transformation into z-scores) and PCA was conducted in Statistica v. 13.3 software. Note: I (CE of *Guazuma ulmifolia*); II (CE of *Limonium brasiliense*); III (CE of *Paullinia cupana*); IV (CE of *Poincianella pluviosa*); V (CE of *Stryphnodendron adstringens*); VI (CE of *Trichilia catigua*); VII (EAF of *Guazuma ulmifolia*); VIII (EAF of *Limonium brasiliense*); IX (EAF of *Paullinia cupana*); X (EAF of *Poincianella pluviosa*); XI (EAF of *Stryphnodendron adstringens*); XII (EAF of *Trichilia catigua*).



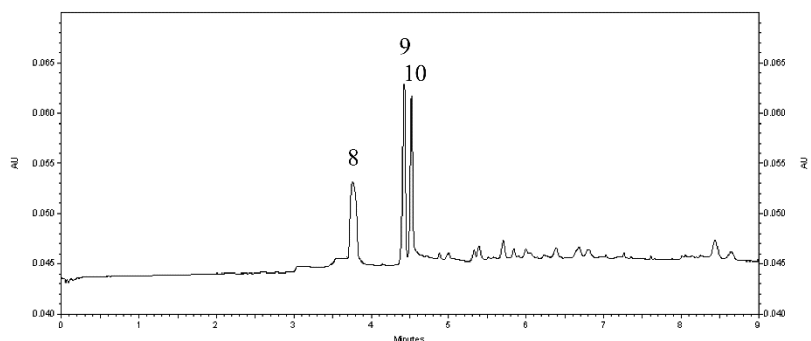
S2 Fig. Effects of the EAFs of *Limonium brasiliense*, *Poincianella pluviosa* and *Stryphnodendron adstringens* on SH-SY5Y cells viability. SH-SY5Y neuroblastoma cells were pretreated with different concentrations (7.81 to 1000 µg/mL) of EAF of *L. brasiliense* (A), EAF of *P. pluviosa* (B) and EAF of *S. adstringens* (C) for 24 h. Cell viability was measured by MTT reduction assay. Data are presented as mean \pm SD of six replicates. Asterisks indicates statistically significant differences between the multiple conditions comparison by ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$), conducted in GraphPad Prism 5 software.



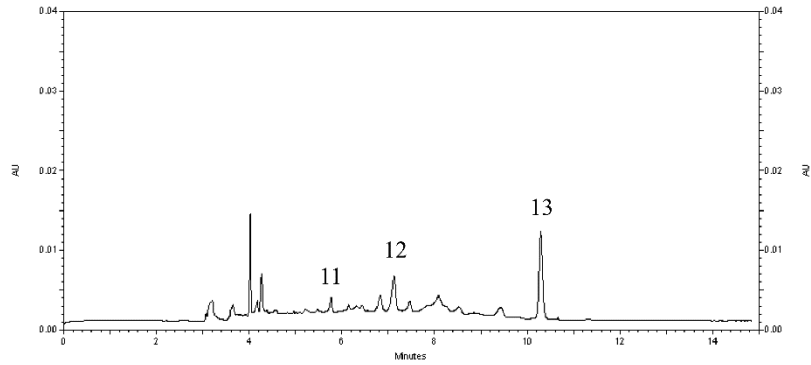
S3 Fig. Electropherogram fingerprint of the EAF of *Guazuma ulmifolia*. Peaks: 1) epiafzelechin-(4 β →8)-epicatechin, 2) mixture of epigallocatechin and epicatechin, 3) procyanidin B2 (PB2), 4) procyanidin B1 (PB1). Experimental conditions: 60 mmol/L borate buffer at pH 8.80 with 10% acetonitrile; uncoated fused-silica capillary, 60.2 cm (50.0 cm effective length) x 75 μ m i.d.; temperature 25 °C; hydrodynamic injection 0.5 psi x 5 s; voltage 30 kV; UV detection at 214 nm; EAF of *G. ulmifolia* 250 μ g/mL.



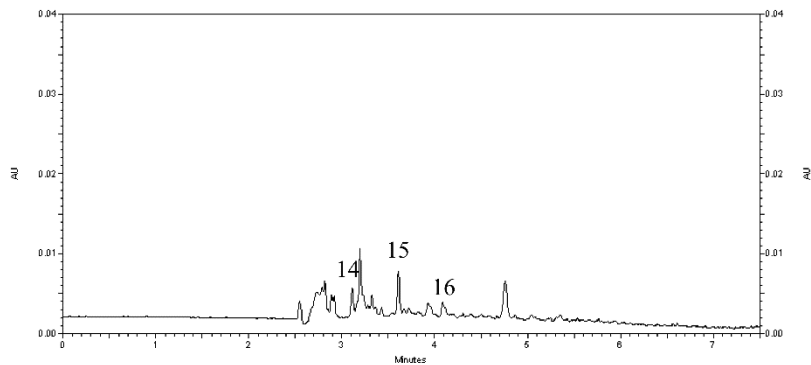
S4 Fig. Electropherogram fingerprint of the EAF of *Limonium brasiliense*. Peaks: 5) epigallocatechin-3-*O*-gallate, 6) samarangenin A, 7) samarangenin B. Experimental conditions: 80 mmol/L borate buffer at pH 8.80 with 10 mmol/L M- β -CD; uncoated fused-silica capillary, 60.2 cm (50.0 cm effective length) x 75 μ m i.d.; temperature 25 °C; hydrodynamic injection 0.5 psi x 3 s; voltage 30 kV; UV detection at 214 nm; EAF of *L. brasiliense* 250 μ g/mL.



S5 Fig. Electropherogram fingerprint of the EAF of *Paullinia cupana*. Peaks: 8) caffeine, 9) catechin, 10) epicatechin. Experimental conditions: 80 mmol/L borate buffer at pH 8.80 with 10 mmol/L HP- β -CD; uncoated fused-silica capillary, 60.2 cm (50.0 cm effective length) x 75 μ m i.d.; temperature 25 °C; hydrodynamic injection 0.5 psi x 3 s; voltage 25 kV; UV detection at 214 nm; EAF of *P. cupana* 500 μ g/mL.



S6 Fig. Electropherogram fingerprint of the EAF of *Poincianella pluviosa*. Peaks: 11) pyrogallol, 12) ellagic acid, 13) gallic acid. Experimental conditions: 100 mmol/L borate buffer at pH 8.50 with 10 mmol/L HP- β -CD; uncoated fused-silica capillary, 60.2 cm (50.0 cm effective length) x 75 μ m i.d.; temperature 25 $^{\circ}$ C; hydrodynamic injection 0.5 psi x 5 s; voltage 30 kV; UV detection at 214 nm; EAF of *P. pluviosa* 500 μ g/mL.



S7 Fig. Electropherogram fingerprint of the EAF of *Stryphnodendron adstringens*. Peaks: 14) gallo catechin, 15) epigallocatechin, 16) PB2. Experimental conditions: 100 mmol/L borate buffer at pH 8.50 with 10 mmol/L β -CD; uncoated fused-silica capillary, 60.2 cm (50.0 cm effective length) x 75 μ m i.d.; temperature 25 $^{\circ}$ C; hydrodynamic injection 0.5 psi x 5 s; voltage 30 kV; UV detection at 214 nm; EAF of *S. adstringens* 250 μ g/mL.

S1 Table. Data analysis of mRNA expression of Alzheimer's disease related-genes using the standalone software REST 2009 with efficiency correction.

Gene	Condition	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	p(H1)	Result (p < 0.05)
<i>MAPT</i>	10 μ M A β ₂₅₋₃₅	TRG	1	2.387	1.239 - 5.194	0.683 - 9.669	0.024	UP
	Control	TRG	1	0.807	0.383 - 1.666	0.244 - 2.625	0.484	
	A β ₂₅₋₃₅ + <i>Stryphnodendron adstringens</i>	TRG	1	0.865	0.295 - 3.416	0.018 - 4.966	0.95	
<i>ADAM10</i>	10 μ M A β ₂₅₋₃₅	TRG	1	1.045	0.804 - 1.348	0.638 - 1.606	0.706	
	Control	TRG	1	0.983	0.770 - 1.222	0.670 - 1.460	0.861	
	A β ₂₅₋₃₅ + <i>Stryphnodendron adstringens</i>	TRG	1	1.13	0.936 - 1.378	0.884 - 1.499	0.119	
<i>PSENI</i>	10 μ M A β ₂₅₋₃₅	TRG	0.956	0.988	0.710 - 1.303	0.592 - 1.406	0.929	
	Control	TRG	0.956	0.987	0.686 - 1.366	0.524 - 1.708	0.931	
	A β ₂₅₋₃₅ + <i>Stryphnodendron adstringens</i>	TRG	0.956	1.054	0.774 - 1.366	0.622 - 1.522	0.691	
<i>PSEN2</i>	10 μ M A β ₂₅₋₃₅	TRG	0.979	0.947	0.751 - 1.169	0.603 - 1.325	0.629	
	Control	TRG	0.979	0.89	0.698 - 1.097	0.550 - 1.370	0.317	
	A β ₂₅₋₃₅ + <i>Stryphnodendron adstringens</i>	TRG	0.979	0.825	0.653 - 1.008	0.548 - 1.077	0.044	
<i>LRP1</i>	10 μ M A β ₂₅₋₃₅	TRG	1	1.031	0.561 - 2.039	0.402 - 2.374	0.903	
	Control	TRG	1	1.058	0.627 - 1.807	0.475 - 2.120	0.802	
	A β ₂₅₋₃₅ + <i>Stryphnodendron adstringens</i>	TRG	1	1.231	0.700 - 1.988	0.586 - 2.296	0.361	
<i>APP</i>	10 μ M A β ₂₅₋₃₅	TRG	1	1.039	0.852 - 1.291	0.696 - 1.451	0.695	
	Control	TRG	1	1.069	0.912 - 1.367	0.718 - 1.471	0.5	
	A β ₂₅₋₃₅ + <i>Stryphnodendron adstringens</i>	TRG	1	1.079	0.915 - 1.387	0.732 - 1.474	0.427	
<i>GSK3β</i>	10 μ M A β ₂₅₋₃₅	TRG	1	0.915	0.616 - 1.359	0.456 - 1.609	0.592	
	Control	TRG	1	0.875	0.582 - 1.259	0.455 - 1.587	0.43	
	A β ₂₅₋₃₅ + <i>Stryphnodendron adstringens</i>	TRG	1	0.866	0.587 - 1.233	0.484 - 1.410	0.39	
<i>APOE</i>	10 μ M A β ₂₅₋₃₅	TRG	0.807	1.039	0.848 - 1.318	0.604 - 1.551	0.766	DOWN
	Control	TRG	0.807	0.766	0.618 - 0.995	0.426 - 1.179	0.042	
	A β ₂₅₋₃₅ + <i>Stryphnodendron adstringens</i>	TRG	0.807	1.188	0.920 - 1.467	0.641 - 1.828	0.159	

S1 Table. Data analysis of mRNA expression of Alzheimer's disease-related genes using the standalone software REST 2009 with efficiency correction (continuation).

Gene	Condition	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	p(H1)	Result (p < 0.05)
<i>ACHE</i>	10 μ M A β ₂₅₋₃₅	TRG	0.985	1.07	0.756 - 1.539	0.683 - 1.642	0.56	
	Control	TRG	0.985	0.837	0.613 - 1.194	0.371 - 1.382	0.29	
	A β ₂₅₋₃₅ + <i>Stryphnodendron adstringens</i>	TRG	0.985	0.822	0.646 - 1.138	0.506 - 1.179	0.13	
<i>A2M</i>	10 μ M A β ₂₅₋₃₅	TRG	0.667	1.341	1.104 - 1.649	0.918 - 2.016	0.007	UP
	Control	TRG	0.667	0.947	0.716 - 1.188	0.674 - 1.609	0.596	
	A β ₂₅₋₃₅ + <i>Stryphnodendron adstringens</i>	TRG	0.667	1.147	0.922 - 1.426	0.783 - 1.809	0.199	

All expression levels, standard errors, 95% confidence intervals and p-values are described.

A DA é uma doença extremamente complexa e multifatorial. Estudos sugerem que a busca por novas estratégias terapêuticas para a DA deve fundamentar-se em compostos que além de inibirem a AChE, possam inibir a produção ou agregação da proteína β A e atuar como antioxidantes (ALI et al., 2013; NAGELE et al., 2004; OBULESU; RAO, 2011; PARK, 2010; PRASANSUKLAB; TENCOMNAO, 2013; RODRIGUES et al., 2019; SELKOE, 2001; ZHAO; TANG, 2002), dentre outros mecanismos. Sendo assim, extratos/frações vegetais ricos em polifenóis (como flavonoides e fenilpropanoides) despertam grande interesse científico, já que podem apresentar múltiplas propriedades biológicas (GAO et al., 2013).

As espécies *G. ulmifolia* (Mutamba), *L. brasiliense* (Baicuru), *P. cupana* (Guaraná), *P. pluviosa* (Sibipiruna), *S. adstringens* (Barbatimão) e *T. catigua* (Catuaba) têm sido alvo de diversos estudos em nosso laboratório de pesquisa (PALAFITO). Apesar de, comprovadamente, possuírem composição química e atividades biológicas que evidenciam uma possível atividade neuroprotetora contra a DA, até o momento, esta atividade não havia sido avaliada em células SH-SY5Y.

Atualmente, existe um clamor ético para que a triagem de extratos/frações vegetais ou substâncias derivadas inicie com bioensaios *in vitro*, seguidos por modelos *in vivo*, com o objetivo principal de reduzir o número de animais utilizados em testes de laboratório e validar os resultados obtidos (ATANASOV et al., 2015; MAHLKE, 2007). Desta forma, optamos por utilizar ensaios *in vitro* para triagem preliminar desses EBs e FAEs. Considerando que teores elevados de EROs estão associados com dano oxidativo, aumento dos depósitos de β A, formação de placas senis e morte celular (ALI et al., 2013), a atividade antioxidante dos extratos e frações foi determinada. Alguns autores recomendam a utilização de diferentes ensaios de atividade antioxidante, uma vez que estes testes variam em vários aspectos (ALAM et al., 2013). Neste estudo, quatro métodos foram utilizados: DPPH, ABTS, FRAP e xantina oxidase. O TPT também foi determinado, haja vista estar diretamente envolvido com a atividade antioxidante (ALI et al., 2013). Em adição, a atividade anticolinesterásica foi avaliada, posto que a maior parte dos medicamentos disponíveis para o tratamento da DA são inibidores da AChE, com reconhecida ação de melhora da função cognitiva (ADI, 2018; ALI et al., 2013; BHANDARI, 2013; FISH et al., 2019).

De modo geral, nossos resultados mostraram que a maioria das FAEs apresentaram melhor atividade antioxidante, maior TPT e melhor atividade anticolinesterásica quando comparados aos EBs de origem, corroborando com outros estudos (BLAINSKI et al., 2017a; HWANG et al., 2013; SEIDL et al., 2010; TORMA et al., 2017; ZIELINSKI et al., 2014), e sugerindo uma correlação sinérgica entre a presença de polifenóis e as atividades antioxidantes e anti-AChE *in vitro* (BERNARDO et al., 2018; MORAIS et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019).

Ainda assim, tendo em vista as diferenças entre os testes (ALAM et al., 2013) e a natureza distinta dos extratos (BERNARDO et al., 2018), não é recomendável que se realize uma comparação direta entre os resultados obtidos para determinar quais extratos e/ou frações apresentam melhor potencial biológico. Uma melhor análise desse conjunto de dados é capaz de contribuir com esta tarefa

(ADI, 2018). Ferramentas estatísticas multivariadas têm sido utilizadas com o objetivo de racionalizar a escolha de amostras para investigação (BLAINSKI et al., 2017b; MARQUES et al., 2016; ZIELINSKI et al., 2014). Neste sentido, optou-se por aplicar ferramentas quimiométricas para orientar a seleção dos extratos/frações com maior potencial para utilização em ensaios posteriores.

Como previsto, a ACP comprovou que as FAEs apresentaram maior teor de compostos fenólicos e, conseqüentemente, melhores atividades antioxidante e anti-AChE (ATANASOV et al., 2015; BLAINSKI et al., 2017a; HWANG et al., 2013; ZIELINSKI et al., 2014). A AAH permitiu o agrupamento das amostras em quatro grupos distintos, confirmando a separação entre FAEs (clusters 1 e 2) e EBs (clusters 3 e 4) observada na ACP. Diversos estudos reforçam que frações com alto TPT e com potencial de inibir a AChE possuem efeitos neuroprotetores e, portanto, podem ser capazes de prevenir ou adiar o aparecimento de doenças degenerativas, como a DA (ALAM et al., 2013; DEY et al., 2017; PARK, 2010; RODRIGUES et al., 2019; SHAKIR; COULIBALY; KEHOE, 2013). Sendo assim, as FAEs agrupadas nos clusters 1 (*S. adstringens*, *P. pluviosa* e *L. brasiliense*) e 2 (*G. ulmifolia*, *P. cupana* e *T. catigua*) foram consideradas como as mais promissoras para avaliações futuras. Pesquisas recentes têm sugerido a atividade neuroprotetora de extratos de *T. catigua* e *P. cupana* ricos em polifenóis em modelos animais (BERNARDO et al., 2018; BOASQUÍVIS et al., 2018; RUCHEL et al., 2017), o que reiteram nossos resultados.

As espécies vegetais agrupadas no cluster 1 foram as selecionadas para dar continuidade a este estudo. Pela primeira vez na literatura, células de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram utilizadas como modelo *in vitro* para a avaliação dos efeitos protetores das FAEs de *L. brasiliense*, *P. pluviosa* e *S. adstringens*. O peptídeo βA_{25-35} foi utilizado como indutor de lesão neuronal por ser o fragmento mais neurotóxico derivado da proteína βA_{1-42} e mimetizar muitas das propriedades oxidativas da proteína nativa, sendo, assim, útil para a análise do potencial protetor e dos mecanismos moduladores, com as vantagens de rápida agregação, formação de fibrilas estáveis e neurotoxicidade imediata após a dissolução (CHEN et al., 2013; LATTANZIO et al., 2016; YU et al., 2014; ZENG et al., 2010).

Os ensaios em cultura de células SH-SY5Y mostraram que o pré-tratamento com as três concentrações testadas das FAEs de *L. brasiliense* e *S. adstringens* (7,81; 15,62 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$) e com a FAE de *P. pluviosa* a 15,62 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de proteger os neuroblastomas humanos contra os danos induzidos pelo fragmento βA_{25-35} . No caso das FAEs de *L. brasiliense* e *S. adstringens*, constatou-se que o aumento na concentração de 7,81 para 15,62 $\mu\text{g/mL}$ exerceu um efeito protetor aditivo ($p < 0,05$), indicando uma ação dose-dependente, o que não foi observado com o aumento para 31,25 $\mu\text{g/mL}$, em ambas as frações. Contudo, os mecanismos pelos quais estas frações mediam os efeitos protetores contra o fragmento βA *in vitro* não são conhecidos. Desta forma, optou-se por prosseguir o estudo com a FAE de *S. adstringens* a 15,62 $\mu\text{g/mL}$.

É sabido que a exposição de células SH-SY5Y a βA_{25-35} pode induzir a hiperfosforilação da proteína tau e contribuir para a produção de radicais livres, o que resulta em peroxidação lipídica, perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), modificação de proteínas, danos ao DNA, aumento na

deposição de β A e formação de placas senis, e morte celular severa (ALI et al., 2013; CHEN et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2011; PENÃ-BAUTISTA et al., 2019; TORMA et al., 2017; WANG et al., 2010; YU et al., 2014; ZENG et al., 2010; ZHANG et al., 2010). Células neuronais são particularmente suscetíveis às ações das EROs e de nitrogênio devido à sua alta atividade metabólica, baixa capacidade antioxidante e natureza não replicativa (TORMA et al., 2017).

Consistentemente, os ensaios de $\Delta\Psi_m$, H2DCFDA e peroxidação lipídica foram realizados e mostraram que o pré-tratamento com a FAE de *S. adstringens* na concentração de 15,62 μ g/mL protegeu as células contra a despolarização mitocondrial, inibiu o acúmulo de EROs e diminuiu a peroxidação de lipídios induzidas pela β A₂₅₋₃₅. É importante salientar que o potencial antirradical dos compostos fenólicos presentes na FAE de *S. adstringens* é, sem dúvida, uma das propriedades mais reconhecidas desses compostos, o que indica uma potencial aplicação desta espécie para o tratamento e/ou prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (BERNARDO et al., 2018; SANTOS et al., 2018). Em conjunto, esses resultados corroboram com outros estudos (WANG et al., 2010; YU et al., 2014; ZHANG et al., 2010) e sugerem que a FAE de *S. adstringens* pode atenuar a disfunção mitocondrial induzida pelo fragmento de β A, pelo menos em parte, por diminuir a geração de EROs e a peroxidação de lipídios da membrana.

A expressão do mRNA de 10 genes relacionados à DA também foi avaliada e mostrou que a FAE de *S. adstringens* é capaz de inibir completamente a superexpressão do mRNA do gene da proteína tau associada aos microtúbulos (MAPT, razão de expressão de 2,387x) induzida pela β A₂₅₋₃₅. Este gene está envolvido com a formação dos emaranhados neurofibrilares resultante da hiperfosforilação da proteína tau, e um aumento em sua expressão pode contribuir para o stress oxidativo, dano celular e consequente neurodegeneração (SUN; JIA, 2009; ZENG et al., 2010). Considerando que a β A e a tau são, até o momento, os alvos centrais no processo da DA, é de se esperar que as terapias que modulem ambas as proteínas acabem por ser mais eficazes (FISH et al., 2019). Desta forma, a inibição da expressão deste gene pela FAE de *S. adstringens* seria de grande interesse para o tratamento da doença. No entanto, outros estudos, como os proteômicos, devem ser realizados para confirmar este achado.

Com relação ao desenvolvimento analítico, observa-se que a CLAE ainda é a ferramenta analítica mais frequentemente utilizada para o desenvolvimento de perfis e quantificação de marcadores em frações vegetais, apesar das vantagens apresentadas pela EC. Estudos anteriores utilizaram a CLAE acoplada ao UV ou a EM para avaliar extratos e/ou frações semipurificadas de *G. ulmifolia* (CALIXTO-JÚNIOR et al., 2016; LOPES et al., 2009b; MAGOS et al., 2008; MORAIS et al., 2017), *L. brasiliense* (BLAINSKI et al., 2017a,b; CALEARE et al., 2017), *P. cupana* (KLEIN; LONGHINI; MELLO, 2012; MACHADO et al., 2015; MACHADO et al., 2018; MARQUES et al., 2016; SILVA et al., 2017), *S. adstringens* (BRASIL, 2010) e *T. catigua* (BERNARDO et al., 2018; LONGHINI et al., 2013). Este estudo é o primeiro a estabelecer os parâmetros eletroforéticos e viabilizar a análise das FAEs de *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. pluviosa* e *S. adstringens* por EC. Também é o primeiro a desenvolver uma metodologia para análise de FAE de *P. cupana* por ECZ. Como observamos anteriormente (ITO, 2011;

SEREIA et al., 2017), as metodologias desenvolvidas foram mais rápidas, menos dispendiosas e menos poluentes que os métodos equivalentes por CLAE, e podem ser adotadas na rotina de controle de qualidade dessas frações vegetais após adequada validação.

Os perfis estabelecidos qualitativamente demonstraram que as frações avaliadas são compostas majoritariamente por taninos condensados, flavonoides e ácidos fenólicos. Estudos indicam que polifenóis, como astaxantina, icariina, curcumina, resveratrol, epigallocatequina galato e quercetina podem proteger modelos celulares contra a toxicidade induzida pela βA_{25-35} por reduzir o estresse oxidativo, a agregação da βA , a hiperfosforilação da proteína tau e a apoptose (BOASQUÍVIS et al., 2018; OMAR et al., 2017; TORMA et al., 2017; WANG et al., 2010; YU et al., 2014; ZENG et al., 2010), o que evidencia uma potencial ação dessa classe de substâncias na prevenção ou no alívio da DA. Provavelmente, os efeitos benéficos apresentados pelos extratos advêm da sinergia entre os fitoconstituintes presentes, e não de um composto isolado (BOASQUÍVIS et al., 2018).

Da mesma forma, sugerimos que o sinergismo entre os fitoconstituintes presentes na FAE de *S. adstringens* seja o responsável pelos efeitos protetores *in vitro* descritos no presente estudo. No entanto, outros estudos devem ser realizados com o objetivo de investigar a eficácia biológica bem como os potenciais aspectos toxicológicos da FAE de *S. adstringens* em modelos de DA fisiologicamente relevantes antes de se fazer a indicação formal do uso desta espécie para o tratamento ou prevenção da DA.

O presente estudo amplia as informações à cerca dos efeitos protetores *in vitro* das espécies *G. ulmifolia* (Mutamba), *L. brasiliense* (Baicuru), *P. cupana* (Guaraná), *P. pluviosa* (Sibipiruna), *S. adstringens* (Barbatimão) e *T. catigua* (Catuaba) contra a toxicidade induzida por um fragmento da proteína β A, importante marcador da doença de Alzheimer (DA). Extratos bruto (EBs) e suas respectivas frações acetato de etila (FAEs) foram triados preliminarmente utilizando bioensaios *in vitro* relacionados à DA. Pela primeira vez, a atividade anti-AChE de extratos/frações de *L. brasiliense*, *P. pluviosa*, *S. adstringens* e cascas de *G. ulmifolia* foi determinada.

Análise de componentes principais (ACP) e análise de agrupamento hierárquico (AAH) mostraram ser ferramentas quimiométricas úteis para racionalizar a escolha de extratos/frações com maior potencial para serem avaliados contra DA, evitando o uso de animais e permitindo a otimização de tempo e recursos (financeiros e humanos) investidos na pesquisa.

Pela primeira vez na literatura, ensaios em cultura de células SH-SY5Y comprovaram que as FAEs agrupadas no cluster 1 (*S. adstringens*, *P. pluviosa* e *L. brasiliense*) são capazes de proteger neuroblastomas humanos contra os danos induzidos pela β A₂₅₋₃₅. O efeito neuroprotetor da FAE de *S. adstringens* deve-se, pelo menos em parte, à proteção contra a despolarização da membrana mitocondrial, produção de superóxidos e peroxidação lipídica induzidas pelo fragmento β A, além da inibição da superexpressão do mRNA do gene *MAPT*, o que sugere uma redução na hiperfosforilação da proteína tau. A sinergia entre os polifenóis presentes nesta fração pode ser a responsável pela atividade biológica observada *in vitro*. No entanto, novos estudos devem ser conduzidos para investigar a eficácia biológica e os aspectos toxicológicos da FAE de *S. adstringens* em modelos de DA fisiologicamente relevantes, com vista a confirmar e expandir os resultados apresentados. Os mecanismos de neuroproteção das FAEs de *L. brasiliense* e *P. pluviosa* também devem ser investigados em trabalhos futuros.

Em relação às metodologias analíticas, pela primeira vez foram estabelecidos os parâmetros eletroforéticos para a avaliação das FAEs de *G. ulmifolia*, *L. brasiliense*, *P. cupana*, *P. pluviosa* e *S. adstringens* por ECZ. As metodologias desenvolvidas são mais rápidas, mais econômicas e menos poluentes que os métodos equivalentes previamente estabelecidos por CLAE, e podem ser adotadas na rotina de controle de qualidade dessas frações após validação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHOLME, L.; LINDSTRÖM, T.; KÅGEDAL, K.; MARCUSSON, J.; HALLBECK, M. An *in vitro* model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis*, v. 20, n. 4, p. 1069-1082, 2010.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*, v. 21, p. 143-152, 2013.

ALI, S. K.; HAMED, A. R.; SOLTAN, M. M.; HEGAZY, U. M.; ELGORASHI, E. E.; EL-GARF, I. A.; HUSSEIN, A. A. In-vitro evaluation of selected Egyptian traditional herbal medicines for treatment of Alzheimer disease. *BMC Complement Altern Med*, v. 13, p. 1-10, 2013.

ALONSO-CASTRO, A. J.; SALAZAR-OLIVO, L. A. The anti-diabetic properties of *Guazuma ulmifolia* Lam are mediated by the stimulation of glucose uptake in normal and diabetic adipocytes without inducing adipogenesis. *J Ethnopharmacol*, v. 118, p. 252–256, 2008.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL (ADI). *World Alzheimer report 2018*. The state of the art of dementia research: new frontiers. London: Alzheimer's Disease International, 2018. 48p.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; BLAINSKI, A.; FERNANDES, H. G.; MOURA-COSTA, G. F.; COSTA, M. A.; CAMPOS, L. B.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C. L.; KANESHIMA, E. N.; BECKER, T. C. A.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. *J Ethnopharmacol*, v. 174, p. 293-298, 2015a.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; BLAINSKI, A.; GANCEDO, N. C.; GABURO, F.; CARDOSO, K. A. K.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*. *Braz J Pharmacog*, v. 25, p. 320–327, 2015b.

ANTUNES, E.; GORDO, W. M.; OLIVEIRA, J. F.; TEIXEIRA, C. E.; HYSLOP, S.; NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama® and its constituents. *Phytother Res*, v. 15, p. 416-421, 2001.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSC, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plantderived natural products: A review. *Biotechnol Adv*, v. 33, p. 1582–1614, 2015.

AUDI, E. A.; TOLEDO, D. P.; PERES, P. G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W. K. V.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C.; ALVES-DO-PRADO, W.; CUMAN, R. K. N.; BERSANI-AMADO, C. A. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. *Phytother Res*, v. 13, p. 264–266, 1999.

BAKER, D. R. *Capillary Electrophoresis*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995.

BARBOSA, G. D. A. F.; MELLO, J. C. P. Avaliação clínica do extrato de guaraná no controle da placa bacteriana dentária. *Rev Paul Odontol*, v. 26, p. 28-30, 2004.

BARBOSA, N. R.; FISCHMANN, L.; TALIB, L. L.; GATTAZ, W. F. Inhibition of platelet phospholipase A2 activity by catuaba extract suggests antiinflammatory properties. *Phytother Res*, v. 18, p. 942-944, 2004.

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

BELTRAME, F. L.; CASS, Q. B.; RODRIGUES-FILHO, E.; BARROS, F.; CORTEZ, D. A. G. Análisis de productos fitoterapéuticos comerciales de “Catuaba” por LC-UV-MS. *Not Tec Labor*, v. 3, p. 14-16, 2004.

BELTRAME, F. L.; RODRIGUES-FILHO, E.; BARROS, F. A. P.; CORTEZ, D. A. G.; CASS, Q. B. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba. *J Chromatogr A*, v. 1119, p. 257-263, 2006.

BERNARDO, J.; FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, Á.; VIDEIRA, R. A.; VALENTÃO, P.; VEIGA, F.; ANDRADE, P. B. *In vitro* multimodal-effect of *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae) bark aqueous extract in CNS targets. *J Ethnopharmacol*, v. 211, p. 247-255, 2018.

BERENGUER, B.; TRABADELA, C.; SANCHEZ-FIDALGO, S.; QUÍLEZ, A.; MINO, P.; PUERTA, R. D.; MARTÍN-CALERO, M. J. The aerial parts of *Guazuma ulmifolia* Lam. protect against NSAID-induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol*, v. 114, p. 153–160, 2007.

BERNHARDI, R. V. Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease. *Neurotox Res*, v. 12, p. 215-232, 2007.

BHANDARI, P. R. A comment on effect of plant extracts on Alzheimer’s disease: an insight into therapeutic avenues. *J Neurosci Rural Pract*, v. 4, p. 236-237, 2013.

BITTENCOURT, L. S.; MACHADO, D. C.; MACHADO, M. M.; SANTOS, G. F. F. D.; ALGARVE, T. D.; MARINOWIC, D. R.; RIBEIRO, E. E.; SOARES, F. A. A.; BARBISAN, F.; ATHAYDE, M. L.; CRUZ, I. B. M. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Food Chem Toxicol*, v. 53, p. 119–125, 2013.

BLAINSKI, A.; ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; GODOY, G.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. Pharmacognostic evaluation, and development and validation of a HPLC-DAD technique for gallocatechin and epigallocatechin in rhizomes from *Limonium brasiliense*. *Braz J Pharmacog*, v. 27, p. 162–169, 2017a.

BLAINSKI, A.; GIONCO, B.; OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, G.; SCARMINIO, I. S.; SILVA, D. B.; LOPES, N. P.; MELLO, J. C. P. Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrugresistant bacteria using a statistical mixture design. *J Ethnopharmacol*, v. 198, p. 313–323, 2017b.

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, v. 18, p. 6852-6865, 2013.

BOASQUÍVIS, P. F.; SILVA, G. M. M.; PAIVA, F. A.; CAVALCANTI, R. M.; NUNEZ, C. V.; OLIVEIRA, R. P. Guarana (*Paullinia cupana*) extract protects *Caenorhabditis elegans* models for Alzheimer disease and Huntington disease through activation of antioxidant and protein degradation pathways. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2018, p. 1-16, 2018.

BONADIMAN, B. S. R.; CADONÁ, F. C.; ASSMANN, C. E.; WEIS, G. C. C.; ALVES, A. O.; DUARTE, M. F.; CHAVES, C. M.; CHAVES, C. C.; MOTTA, K. M. S.; RIBEIRO, E. E.; BAGATINI, M. D.; CRUZ, I. B. M. Guarana (*Paullinia cupana*): cytoprotective effects on age-related eye dysfunction. *J Funct Foods*, v. 36, p. 375–386, 2017.

BONASSOLI, V. T.; CHASSOT, J. M.; LONGHINI, R.; MILANI, H. M.; MELLO, J. C. P.; OLIVEIRA, R. M. W. Subchronic administration of *Tichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes

antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice. *J Ethnopharmacol*, v. 143, n. 1, p. 179-184, 2012.

BRASIL. *Monografia da espécie Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville (Barbatimão)*. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. *Farmacopeia Brasileira*. v. 2, 5ª ed., Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BRIGHENTE, I. M. C.; DIAS, M.; VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G. Antioxidante activity and total phenolic content of some brazilian species. *Pharm Biol*, v. 45, p. 156-161, 2007.

BUENO, F. G. *Poincianella pluviosa: estudo da viabilidade celular e proliferação de fibroblastos e queratinócitos in vitro, e avaliação da atividade cicatrizante em ratos diabéticos e normoglicêmicos*. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

BUENO, F. G.; MOREIRA, E. A.; MORAIS, G. R.; PACHECO, I. A.; BAESSO, M. L.; LEITE-MELLO; MELLO, J. C. P. Enhanced cutaneous wound healing in vivo by standardized crude extract of *Poincianella pluviosa*. *PLoS ONE*, v. 11, n. 3, p. 1-13, 2016.

BUENO, F. G.; PANIZZON, G. P.; MELLO, E. V. S. L.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; MELLO, J. C. P.; HENSEL, A. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Fitoterapia*, v. 99, p. 252–260, 2014.

BYDLOOWSKI, S. P.; YUNKER, R. L.; SUBBIAH, M. T. R. A novel property of an aqueous guarana extract (*Paullinia cupana*): inhibition of platelet aggregation *in vitro* and *in vivo*. *Braz J Med Biol Res*, v. 21, p. 535-538, 1988.

CALEARE, A. O.; HENSEL, A.; MELLO, J. C. P.; PINHA, A. B.; PANIZZON, G. P.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; NAKAMURA, C. V. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. *Fitoterapia*, v. 118, p. 87–93, 2017.

CALIXTO-JÚNIOR, J. T.; MORAIS, S. M.; GOMEZ, C. V.; MOLAS, C. C.; ROLON, M.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; OLIVEIRA, C. D. M.; TINTINO, S. R.; COUTINHO, H. D. M. Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from the Brazilian Northeast “Cerrado”. *Saudi J Biol Sci*, v. 23, p. 434–440, 2016.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A. Herbal medicine Catuama induces endothelium-dependent and – independent vasorelaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. *Phytother Res*, v. 11, p. 32-38, 1997.

CAMPORESE, A.; BALICK, M. J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R. G.; MORSELLINO, N.; DE-SIMONE, F.; TURARO, A. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *J Ethnopharmacol*, v. 87, p. 103-107, 2003.

CAMPOS, A. R.; BARROS, A. I. S.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; LEAL, L. K. A.; RAO, V. S. N. Acute effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. *Phytother Res*, v. 19, p. 441-443, 2005a.

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

- CAMPOS, M. M.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Antidepressant-like effects of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms. *Psychopharmacol*, v. 182, p. 45-53, 2005b.
- CARLSON, M.; THOMPSON, R. D. Liquid chromatographic determination of methylxantines and catechins in herbal preparations containing guarana. *J Assoc Off Anal Chem*, v. 81, p. 691-701, 1998.
- CARVALHO, P. E. R. Mutamba: *Guazuma ulmifolia*. *Circular Técnica Embrapa*, v. 141, p. 1-13, 2007.
- CASTELLANO, J. M.; KIM, J.; STEWART, F. R.; JIANG, H.; DEMATTOS, R. B.; PATTERSON, B. W.; FAGAN, A. M.; MORRIS, J. C.; MAWUENYEGA, K. G.; CRUCHAGA, C.; GOATE, A. M.; BALES, K. R.; PAUL, S. M.; BATEMAN, R. J.; HOLTZMAN, D. M. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med*, v. 3, n. 89, p. 89ra57, 2011.
- CASTLEMAN, M. *The healing herbs*. Pensilvania: Rodale Press, 1991.
- CHASSOT, J. M.; LONGHINI, R.; GAZARINI, L.; MELLO, J. C. P.; OLIVEIRA, R. M. W. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. *J Ethnopharmacol*, v. 137, p. 1143-1148, 2011.
- CHEN, T. F.; TANG, M. C.; CHOU, C. H.; CHIU, M. J.; HUANG, R. F. S. Dose-dependent folic acid and memantine treatments promote synergistic or additive protection against A β ₍₂₅₋₃₅₎ peptide-induced apoptosis in SH-SY5Y cells mediated by mitochondria stress-associated death signals. *Food Chem Toxicol*, v. 62, p. 538-547, 2013.
- CHEUNG, H.; ZHANG, Q. Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris* L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers. *J Chromatogr A*, v. 1213, p. 231-238, 2008.
- CHU, Q.; LIN, M.; YU, X.; YE, J. Study on extraction efficiency of natural antioxidant in coffee by capillary electrophoresis with amperometric detection. *Eur Food Res Technol*, v. 226, p. 1373-1378, 2008.
- CORRÊA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.
- COSTA, G. M.; GAZOLA, A. C.; ZUCOLOTTI, S. M.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F. A.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P. Chemical profiles of traditional preparations of four South American *Passiflora* species by chromatographic and capillary electrophoretic techniques. *Rev Bras Farmacogn*, v. 26, n. 4, p. 451-458, 2016.
- COSTA, M. A.; ISHIDA, K.; KAPLUM, V.; KOSLYK, É. D. A.; MELLO, J. C. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO) for use as a pharmacological agent. *Regul Toxicol Pharmacol*, v. 58, p. 330-335, 2010.
- DAOLIO, C.; BELTRAME, F. L.; FERREIRA, A. G.; CASS, Q. B.; CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, M. M. C. Classification of commercial catuaba samples by NMR, HPLC and chemometrics. *Phytochem Anal*, v. 19, p. 218-228, 2008.
- DEY, A.; BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, A.; PANDEY, D. K. Natural products against Alzheimer's disease: pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnol Adv*, v. 35, p. 178-216, 2017.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, v. 2, p. 303-336, 2012.

DORNELES, I. M. P.; FUCKS, M. B.; FONTELA, P. C.; FRIZZO, M. V.; WINKELMANN, E. R. Guarana (*Paullinia cupana*) presents a safe and effective anti-fatigue profile in patients with chronic kidney disease: A randomized, double-blind, threearm, controlled clinical trial. *J Funct Foods*, v. 51, p. 1-7, 2018.

DUCKE, A. A catuaba na botânica sistemática, científica e pseudo-científica. *Rev Bras Farm*, v. 47, p. 267-272, 1966.

DUKE, J. A. *Handbook of medicinal herbs*. Florida: CRC, 1985.

ESPÍNOLA, E. B.; DIAS, R. F.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. *J Ethnopharmacol*, v. 55, p. 223-229, 1997.

EVANS, C. E.; STALCUP, A. M. Comprehensive strategy for chiral separations using sulfated cyclodextrins in capillary electrophoresis. *Chirality*, v. 15, p. 709-723, 2003.

FARFARA, D.; LIFSHITZ, V.; FRENKEL, D. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, v. 12, p. 762-780, 2008.

FISH, P. V.; STEADMAN, D.; BAYLE, E. D.; WHITING, P. New approaches for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic Med Chem Lett*, v. 29, n. 2, p. 125-133, 2019.

FORSTER, J. I.; KÖGLSBERGER, S.; TREFOIS, C.; BOYD, O.; BAUMURATOV, A. S.; BUCK, L.; BALLING, R.; ANTONY, P. M. A. Characterization of differentiated SH-SY5Y as neuronal screening model reveals increased oxidative vulnerability. *J Biomol Screen*, v. 21, n. 5, p. 496-509, 2016.

FREITAS, A. L. D.; KAPLUM, V.; ROSSI, D. C. P.; SILVA, L. B. R.; MELHEM, M. S. C.; TABORDA, C. P.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; ISHIDA, K. Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringens* are effective against fluconazole-resistant *Candida* spp. and treat vaginal candidiasis. *J Ethnopharmacol*, v. 216, p. 184-190, 2018.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; HEIDOR, R.; SILVA, T. D.; ATROCH, A.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. Protective effects of guaraná (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. *Food Chem Toxicol*, v. 44, p. 862-867, 2006a.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; BARBUTO, J. A.; RAO, K. V.; DAGLI, M. L. Z. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. *Braz J Med Biol Res*, v. 41, p. 305-310, 2008.

FUKUMASU, H.; SILVA, T. C.; AVANZO, J. L.; LIMA, C. E.; MACKOWIAK, I. I.; ATROCH, A.; SPINOSA, H. S.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*, v. 233, p. 158-164, 2006b.

GAO, J.; INAGAKI, Y.; LI, X.; KOKUDO, N.; TANG, W. Research progress on natural products from traditional Chinese medicine in treatment of Alzheimer's disease. *Drug Discov Ther*, v. 7, p. 46-57, 2013.

GODINHO, J.; OLIVEIRA, R. M. W.; SA-NAKANISHI, A. B.; BACARIN, C. C.; HUZITA, C. H.; LONGHINI, R.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; PREVIDELLI, I. S.; RIBEIRO, M. H. D. M.; MILANI, H. Ethyl-acetate fraction of *Trichilia catigua* restores long-term retrograde memory and reduces oxidative stress and inflammation after global cerebral ischemia in rats. *Behav Brain Res*, v. 337, p. 173-182, 2018.

GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. *Estudos Avançados*, v. 27, p. 61-84, 2013.

- GOMES, M. L. M. *Morfometria testicular de ratos wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba (Trichilia catigua A. Juss. Meliaceae)*. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- GRIEVE, M. A. *Modern Herbal*. New York: Hafner, 1967.
- GUERREIRO, R. J.; GUSTAFSON, D. R.; HARDY, J. The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. *Neurobiol Aging*, v. 33, n. 3, p. 437-456, 2012.
- GUFLER, V.; NGOC, H. N.; STUPPNER, H.; GANZERA, M. Capillary electrophoresis as a fast and efficient alternative for the analysis of *Urceola rosea* leaf extracts. *Fitoterapia*, v. 125, p. 1-5, 2018.
- GUTERRES, S. B. *Estudo dos extratos dos frutos de Sapindus saponaria enriquecidos em saponinas e outros glicosídeos e sua aplicação em eletroforese capilar*. 2005. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- HARTMAN, R. E.; SHAH, A.; FAGAN, A. M.; SCHWETYE, K. E.; PARSADANIAN, M.; SCHULMAN, R. N.; FINN, M. B.; HOLTZMAN, D. M. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, v. 24, p. 506-515, 2006.
- HASHIMOTO, M.; KATAKURA, M.; HOSSAIN, S.; RAHMAN, A.; SHIMADA, T.; SHIDO, O. Docosahexaenoic acid withstands the A β ₂₅₋₃₅-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *J Nutr Biochem*, v. 22, p. 22-29, 2011.
- HEEGAARD, N. H. H.; NILSSON, S.; GUZMAN, N. A. Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments. *J Chromatogr B*, v. 715, p. 29-54, 1998.
- HENMAN, A. R. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin. *J Ethnopharmacol*, v. 6, p. 311-338, 1982.
- HÖR, M.; HEINRICH, M.; RIMPLER, H. Proanthocyanidin polymers with antisecretory activity and proanthocyanidin oligomers from *Guazuma ulmifolia* bark. *Phytochemistry*, v. 42, n. 1, p. 109-119, 1996.
- HU, B.; MARTIN, L. M. Capillary electrophoresis of peptides and proteins. In: MILLNER, P. A. (Ed.). *High resolution chromatography: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 1999. p. 77-116.
- HWANG, Y. J.; LEE, E. J.; KIM, H. R.; HWANG, K. A. In vitro antioxidant and anticancer effects of solvent fractions from *Prunella vulgaris* var. *lilacina*. *BMC Complement Altern Med*, v. 13, p. 310, 2013.
- ISHIDA, K.; MELLO, J. C. P.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS-FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*, v. 58, p. 942-949, 2006.
- ISWANTINI, D.; SILITONGA, R. F.; MARTATILOFA, E.; DARUSMAN, L. K. *Zingiber cassumunar*, *Guazuma ulmifolia*, and *Murraya paniculata* extracts as antiobesity: *in vitro* inhibitory effect on pancreatic lipase activity. *HAYATI J Biosci*, v. 18, n. 1, p. 6-10, 2011.
- ITO, L. A. *Desenvolvimento de metodologia analítica por eletroforese capilar para separação e identificação de cafeína e flavan-3-ol em extrato de Paullinia cupana var. sorbilis (Mart.) Ducke - Sapindaceae*. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

JANA, A.; PAHAN, K. Fibrillar amyloid- β -activated human astroglia kill primary human neurons via neutral sphingomyelinase: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci*, v. 30, p. 12676–12689, 2010.

KARTHIKA, V.; ARUMUGAM, A.; GOPINATH, K.; KALEESWARRAN, P.; GOVINDARAJAN, M.; ALHARBI, N. S.; KADAIKUNNAN, S.; KHALED, J. M.; BENELLI, G. *Guazuma ulmifolia* bark-synthesized Ag, Au and Ag/Au alloy nanoparticles: photocatalytic potential, DNA/protein interactions, anticancer activity and toxicity against 14 species of microbial pathogens. *J Photochem Photobiol B*, v. 167, p. 189-199, 2017.

KAWAMURA, Y.; TAKAHASHI, M.; ARIMURA, G.; ISAYAMA, T.; IRIFUNE, K.; GOSHIMA, N.; MORIKAWA, H. Determination of levels of NO_3^- , NO_2^- and NH_4^+ ions in leaves of various plants by capillary electrophoresis. *Plant Cell Physiol*, v. 37, p. 878-880, 1996.

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

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

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Development of tablets containing semipurified extract of guaraná (*Paullinia cupana*). *Braz J Pharmacog*, v. 23, p. 186-193, 2013.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; MELLO, J.C.P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). *Talanta*, v. 88, p. 502–506, 2012.

KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol*, v. 1078, p. 9-21, 2013.

LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C.; FERREIRA, M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. *Rev Med*, v. 90, n. 1, p. 47-51, 2011.

LAGOS, J. B. *Estudo comparativo da composição química das folhas e cascas da Trichilia catigua A. Juss., Meliaceae*. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LATTANZIO, F.; CARBONI, L.; CARRETTA, D.; CANDELETTI, S.; ROMUALDI, P. Treatment with the neurotoxic A β (25-35) peptide modulates the expression of neuroprotective factors Pin1, Sirtuin 1, and brain-derived neurotrophic factor in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Exp Toxicol Pathol*, v. 68, p. 271-276, 2016.

LEWIS, G. P. Poincianella. *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SOUZA-JÚNIOR, P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phytother Res*, v. 12, p. 218–220, 1998.

LINDEBOOMA, J.; WEINSTEIN, H. Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment. *Eur J Pharmacol*, v. 490, p. 83-86, 2004.

- LINHARDT, R. J.; TOIDA, T. Ultra-high resolution separation comes of age. *Science*, v. 298, p. 1441-1442, 2002.
- LONGHINI, R.; KLEIN, T.; BRUSCHI, M. L.; SILVA-JUNIOR, W. V.; RODRIGUES, J.; LOPES, N. P.; MELLO, J. C. P. Development and validation studies for determination of phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J Sep Sci*, v. 36, p. 1247–1254, 2013.
- LONGHINI, R.; LONNI, A. A. S. G.; SEREIA, A. L.; KRZYZANIAK, L. M.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. *Trichilia catigua*: therapeutic and cosmetic values. *Braz J Pharmacog*, v. 27, p. 254–271, 2017.
- LONNI, A. A. S. G.; LONGHINI, R.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Anal Chim Acta*, v. 719, p. 57-60, 2012.
- LOPES, G. C.; MACHADO, F. A. V.; TOLEDO, C. E. M.; SAKURAGUI, C. M.; MELLO, J. C. P. Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species. *Biochem Syst Ecol*, v. 36, p. 925-931, 2009a.
- LOPES, G. C.; ROCHA, J. C. B.; ALMEIDA, G. C.; MELLO, J. C. P. Condensed tannins from the bark of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae). *J Braz Chem Soc*, v. 20, n. 1103-1109, 2009b.
- LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz J Pharm Sci*, v. 41, p. 85-94, 2005.
- LUNTE, S. M.; MARTIN, R. S.; LUNTE, C. E. Capillary Electrophoresis/Electrochemistry. In: BRAJTER-TOTH, A.; CHAMBERS, J. Q. (Ed.). *Electroanalytical methods for biological materials*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002. p. 461-490.
- MACHADO, A. K.; CADONÁ, F. C.; AZZOLIN, V. F.; DORNELLES, E. B.; BARBISAN, F.; RIBEIRO, E. E.; MÂNICA-CATTANI, M. F.; DUARTE, M. M. M. F.; SALDANHA, J. R. P.; CRUZ, I. B. M. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. *Food Res Int*, v. 67, p. 426-433, 2015.
- MACHADO, K. N.; FREITAS, A. A.; CUNHA, L. H.; FARACO, A. A. G.; PÁDUA, R. M.; BRAGA, F. C.; VIANNA-SOARES, C. D.; CASTILHO, R. O. A rapid simultaneous determination of methylxantines and proanthocyanidins in Brazilian guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.). *Food Chem*, v. 239, p. 180-188, 2018.
- MAGOS, G. A.; MATEOS, J. C.; PAEZ, E.; FERNANDEZ, G.; LOBATO, C.; MARQUEZ, C.; ENRÍQUEZ, R. G. Hypotensive and vasorelaxant effects of the procyanidin fraction from *Guazuma ulmifolia* bark in normotensive and hypertensive rats. *J Ethnopharmacol*, v. 117, p. 58–68, 2008.
- MAHLKE, J.D. *Buddleja thyrsoides* Lam.: *Estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico*. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chem*, v. 104, p. 1258-1268, 2007.
- MALDINI, M.; MICCO, S. D.; MONTORO, P.; DARRA, E.; MARIOTTO, S.; BIFULCO, G.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Flavanocoumarins from *Guazuma ulmifolia* bark and evaluation of their affinity for STAT1. *Phytochemistry*, v. 86, p. 64-71, 2013.

- MANI, V.; RAMASAMY, K.; AHMAD, A.; PARLE, M.; SHAH, S. A. A.; MAJEED, A. B. A. Protective effects of total alkaloidal extract from *Murraya koenigii* leaves on experimentally induced dementia. *Food Chem Toxicol*, v. 50, p. 1036–1044, 2012.
- MANZINE, P. R.; ETTCHETO, M.; CANO, A.; BUSQUETS, O.; MARCELLO, E.; PELUCCHI, S.; LUCA, M. D.; ENDRES, K.; OLLOQUEQUI, J.; CAMINS, A.; COMINETTI, M. R. ADAM10 in Alzheimer's disease: pharmacological modulation by natural compounds and its role as a peripheral marker. *Biomed Pharmacother*, v. 113, p. 108661, 2019.
- MARQUES, L. C. Contribuição ao esclarecimento da identidade botânica da droga vegetal Catuaba. *Rev Racine*, v. 8, p. 8-11, 1998;
- MARQUES, L. L. M. *Investigações fitoquímica e biológicas de extratos obtidos por tecnologia supercrítica de sementes de Paullinia cupana (guaraná)*. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- MARQUES, L. L. M.; FERREIRA, E. D. F.; PAULA, M. N.; KLEIN, T.; MELLO, J. C. P. *Paullinia cupana*: a multipurpose plant – a review. *Rev Bras Farmacogn*, in press, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.08.007>
- MARQUES, L. L.; PANIZZON, G. P.; AGUIAR, B. A.; SIMIONATO, A. S.; CARDOZO-FILHO, L.; ANDRADE, G.; DE OLIVEIRA, A. G.; GUEDES, T. A.; MELLO, J. C. Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: selective supercritical extraction of phenolic compounds. *Food Chem*, v. 1, p. 703-711, 2016.
- MARTINELLI, F. R. *Cinchonainas – método cromatográfico e produção de padrões para controle de qualidade de extratos polares de catuaba (Trichilia catigua ADR. Juss.)*. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- MARX, F. Analysis of guaraná seeds. II. Studies on the composition of the tannin fraction. *Z Lebensm Unters Forsch*, v. 190, p. 429-431, 1990.
- MATOS, A. P. *Busca de compostos inseticidas: estudo de espécies do gênero Trichilia (Meliaceae)*. 2006. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- MATOS, A. P.; NEBO, L.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA-SILVA, M. F. G. F. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (Meliaceae). *Quim Nova*, v. 32, p. 1553-1556, 2009.
- MATSUURA, E.; GODOY, J. S. R.; BONFIM-MENDONÇA, P. S.; MELLO, J. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; GASPARETTO, A.; MACIEL, S. M. *In vitro* effect of *Paullinia cupana* (guaraná) on hydrophobicity, biofilm formation, and adhesion of *Candida albicans* to polystyrene, composites, and buccal epithelial cells. *Arch Oral Biol*, v. 60, p. 471-478, 2015.
- MATTEI, R.; DIAS, R. F.; ESPÍNOLA, E. B.; CARLINI, E. A.; BARROS, S. B. M. Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. *J Ethnopharmacol*, v. 60, p. 111-116, 1998.
- MATTSON, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, v. 430, p. 631–639, 2004.
- MEDINA, M.; AVILA, J. New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy. *Biochem Pharmacol*, v. 88, p. 540-547, 2014.

- MEIRA, G. R. N.; TEXEIRA, G. G. M.; VENTURIN, P. R. F.; GOTTSTEIN, P.; CAXAMBU, M. G. Avaliação quali-quantitativa de espécies arbóreas no perímetro urbano da cidade de Corumbataí do Sul – PR. *REVSBAU*, v. 10, p. 36-49, 2015.
- MELLO, J. C. P.; ITO, L. A. Aplicação da eletroforese capilar na análise de produtos naturais. In: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. (Org.). *Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais*. Ouro Preto: Editora UFOP, 2011. p. 209-242.
- MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, v. 51, p. 1105-1107, 1999.
- MELLO, J. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, v. 41, p. 807-813, 1996a.
- MELLO, J. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, v. 42, p. 857-862, 1996b.
- MELO, J. G.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Native medicinal plants commercialized in Brazil – priorities for conservation. *Environ Monit Assess*, v. 156, p. 567-580, 2009.
- MENEZES-JÚNIOR, J. B. F. Do exame microscópico do guaraná em bromatologia. *Rev Inst Adolfo Lutz*, v. 2, p. 45-68, 1942.
- MING, L. C.; CORREA-JUNIOR, C. Geographic distribution and associated environments characterization of *Trichilia catigua* A. Juss. – Meliaceae in Santa Catarina State – Brazil. *Acta Horti*, v. 569, p. 91-94, 2002.
- MORAIS, S. M.; CALIXTO-JÚNIOR, J. T.; RIBEIRO, L. M.; SOUSA, H. A.; SILVA, A. A. S.; FIGUEIREDO, F. G.; MATIAS, E. F. F.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; COUTINHO, H. D. M. Phenolic composition and antioxidant, anticholinesterase and antibiotic-modulating antifungal activities of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) ethanol extract. *S Afr J Bot*, v. 110, p. 251-257, 2017.
- MOURA, T. F. A. L.; SCHENKEL, E. P.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SIMÕES, C. M. O.; SANTOS, R. I. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze – Plumbaginaceae (Baicuru). *Caderno de Farmácia*, v. 1, n. 1, p. 45-54, 1985.
- MURRAY, A. P.; RODRIGUEZ, S.; FRONTERA, M. A.; TOMAS, M. A.; MULET, M. C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z Naturforsch*, v. 59c, p. 477-480, 2004.
- NAAZ, H.; SINGH, S.; PANDEY, V. P.; SINGH, P.; DWIVEDI, U. N. Anti-cholinergic alkaloids as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease: an *in silico* approach. *Indian J Biochem Biophys*, v. 50, p. 120-125, 2013.
- NAGELE, R. G.; WEGIEL, J.; VENKATARAMAN, V.; IMAKI, H.; WANG, K. C.; WEGIEL, J. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, v. 25, p. 663-674, 2004.
- NALIVAEVA, N. N.; TURNER, A. J. AChE and the amyloid precursor protein (APP) - Cross-talk in Alzheimer's disease. *Chem Biol Interact*, v. 259, part B, p. 301-306, 2016.
- NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. *Rev Bras Med*, v. 67, p. 7-19, 2010.

- NEBO, L. Atividade inseticida de espécies de *Trichilia* frente à lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). *Biotechnologia cienc desenvolv*, n. 33, p. 10-13, 2004.
- OBULESU, M.; RAO, D. M. Effect of plant extracts on Alzheimer's disease: an insight into therapeutic avenues. *J Neurosci Rural Pract*, v. 2, p. 56-61, 2011.
- OKADA, Y.; OKADA, M.. Protective effects of plant seed extracts against amyloid β -induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *J Pharm Bioallied Sci*, v. 5, p. 141-147, 2013.
- OMAR, S. H.; SCOTT, C. J.; HAMLIN, A. S.; OBIED, H. K. The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*, v. 47, p. 1-20, 2017.
- OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C.; NAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; OBICI, S.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of crude extract and its semi purified constituents from guaraná seeds (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Lucke) on cognitive performance in morris water maze in rats. *Braz Arch Biol Technol*, v. 48, p. 723-728, 2005.
- OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C. C.; MAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; SELA, V. R.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. *Phytother Res*, v. 21, p. 531-535, 2007.
- PARK, S. Y. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. *Arch Pharm Res*, v. 33, p. 1589-1609, 2010.
- PATRÍCIO, P. C.; CERVI, A. C. O gênero *Trichilia* P. Browne (Meliaceae) no estado do Paraná, Brasil. *Acta Biol Parana*, v. 34, p. 27-71, 2005.
- PEÑA-BAUTISTA, C.; BAQUERO, M.; VENTO, M.; CHÁFER-PERICÁS, C. Free radicals in Alzheimer's disease: lipid peroxidation biomarkers. *Clin Chim Acta*, v. 491, p. 85-90, 2019.
- PEREIRA, G. A.; SILVA, E. K.; PEIXOTO-ARAÚJO, N. M.; ARRUDA, H. S.; MEIRELES, M. A. A.; PASTORE, G. M. Obtaining a novel mucilage from mutamba seeds exploring different high-intensity ultrasound process conditions. *Ultrason Sonochem*, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.01.010>
- PIVETTA, M. Na raiz do Alzheimer. *Pesquisa FAPESP*, p. 17-21, 2008.
- PIZZOLATTI, M. G.; KOGA, A. H.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from brazilian atlantic rain forest plant species. *Phytomedicine*, v. 9, p. 422-426, 2002.
- PLÁTENÍK, J.; FIŠAR, Z.; BUCHAL, R.; JIRÁK, R.; KITZLEROVÁ, E.; ZVĚŘOVÁ, M.; RABOCH, J. GSK3 β , CREB, and BDNF in peripheral blood of patients with Alzheimer's disease and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 50, p. 83-93, 2014.
- PONTIERI, V.; SCALABRINI-NETO, A.; CAMARGO, A. F. F.; KOIKE, M. K.; VELASCO, I. T. The herbal drug Catuama reverts and prevents ventricular fibrillation in the isolated rabbit heart. *J Electrocardiol*, v. 40, p. 534.e531-534.e538, 2007.
- PRASANSUKLAB, A.; TENCOMNAO, T.. Amyloidosis in Alzheimer's disease: the toxicity of amyloid beta (A β), mechanisms of its accumulation and implications of medicinal plants for therapy. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2013, p. 1-10, 2013.

PRINCE, M.; COMAS-HERRERA, A.; KNAPP, M.; GUERCHET, M.; KARAGIANNIDOU, M. *World Alzheimer report 2016*. Improving healthcare for people living with dementia. London: Alzheimer's Disease International, 2016. 140 p.

QUINTÃO, N. L. M.; FERREIRA, J.; BEIRITH, A.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Evaluation of the effects of the herbal product Catuama in inflammatory and neuropathic models of nociception in rats. *Phytomedicine*, v. 15, p. 245-252, 2008.

RANGEL, M. P.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Evaluation of neurotransmitters involved in the anxiolytic and panicolytic effect of the aqueous fraction of *Paullinia cupana* (guaraná) in elevated T maze. *Braz J Pharmacog*, v. 23, p. 358-365, 2013.

RASKIND, M. A.; BARNES, R. F. Alzheimer disease: treatment of noncognitive behavioral abnormalities. In: DAVIS, K. L.; CHARNEY, D.; COYLE, J. T.; NEMEROFF, C. (Ed.). *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*. Philadelphia: Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, 2002. p. 1253-1265.

RESENDE, F.O. *Trichilia catigua: avaliação farmacognóstica, fitoquímica e biológica in vitro*. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

RESENDE, F. O.; RODRIGUES-FILHO, E.; LUFTMANN, H.; PETEREIT, F.; MELLO, J. C. P. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their *in vitro* antioxidative activity. *J Braz Chem Soc*, v. 22, p. 2087-2093, 2011.

RIBEIRO, R. V.; BIESKI, I. G. C.; BALOGUN, S. O.; MARTINS, D. T. O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. *J Ethnopharmacol*, v. 205, p. 69-102, 2017.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E. L. A. A importância dos levantamentos etnofarmacológicos no desenvolvimento de fitomedicamentos. *Rev Racine*, p. 30-35, 2002.

RODRIGUES, M. J.; OLIVEIRA, M.; NEVES, V.; OVELHEIRO, A.; PEREIRA, C. A.; NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M. F.; VARELA, J.; BARREIRA, L.; CUSTÓDIO, L. Coupling sea lavender (*Limonium algarvense* Erben) and green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) to produce an innovative herbal beverage with enhanced enzymatic inhibitory properties. *S Afr J Bot*, v. 120, p. 87-94, 2019.

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

ROSS, R. A.; SPENGLER, B. A.; BIEDLER, J. L. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst*, v. 71, n. 4, p. 741-747, 1983.

RUCHEL, J. B.; BRAUN, J. B. S.; ADEFEGHA, S. A.; MANZONI, A. G.; ABDALLA, F. H.; OLIVEIRA, J. S.; TRELLES, K.; SIGNOR, C.; LOPES, S. T. A.; SILVA, C. B.; CASTILHOS, L. G.; RUBIN, M. A.; LEAL, D. B. R. Guarana (*Paullinia cupana*) ameliorates memory impairment and modulates acetylcholinesterase activity in Poloxamer-407-induced hyperlipidemia in rat brain. *Physiol Behav*, v. 168, p. 11-19, 2017.

RUTHS, J. A.; MACEDO, L. M.; NASCIMENTO, M. M. F. Reação de polimerase (PCR) em cadeia. In: ARAÚJO, A. L.; MARINHO, R. L. S.; BITTENCOURT, J. V. M. (Org.). *Gestão da inovação agroindustrial: diagnóstico molecular*. Curitiba: EDUTFPR, 2017. p. 11-21.

- SANTOS, E. L.; BALDIVIA, D. S.; LEITE, D. F.; CASTRO, D. T. H.; CAMPOS, J. F.; OLIVEIRA, C. F. R.; CARVALHO, J. T. G.; SANTOS, U; P.; SOUZA, K. P. Antioxidant and anticancer activities from *Stryphnodendron adstringens*. *Free Radic Biol Med*, v. 128, n. S1, p. S66, 2018.
- SANTOS, S. C.; COSTA, W. F.; RIBEIRO, J. P.; GUIMARAES, D. O.; FERRIA, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Tannin composition of barbatimao species. *Fitoterapia*, v. 73, p. 292-299, 2002.
- SEIDL, C.; CORREIA, B. L.; STINGHEN, A. E. M.; SANTOS, C. A. M. Acetylcholinesterase inhibitory activity of uleine from *Himatanthus lancifolius*. *Z Naturforsch*, v. 65, p. 440-444, 2010.
- SEIGLER, D. S.; PAULI, G. F.; FRÖHLICH, R.; WEGELIUS, E.; NAHRSTEDT, A.; GLANDER, K. E.; EBINGER, J. E. Cyanogenic glycosides and menisdaurin from *Guazuma ulmifolia*, *Ostrya virginiana*, *Tiquilia plicata*, and *Tiquilia canescens*. *Phytochemistry*, v. 66, p. 1567-1580, 2005.
- SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, v. 81, p. 741-766, 2001.
- SEREIA, A. L. *Desenvolvimento de metodologia analítica por eletroforese capilar para identificação e quantificação de polifenóis de fração semipurificada de Trichilia catigua A. Juss (Meliaceae)*. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- SEREIA, A. L.; LONGHINI, R.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. Capillary electrophoresis as tool for diastereomeric separation in a *Trichilia catigua* fraction. *Phytochem Anal*, v. 28, p. 144-150, 2017.
- SERENIKI, A., VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. *Rev Psiquiatr Rio Gd Sul*, v. 30, supl. 1, 2008.
- SHAKIR, T.; COULIBALY, A. Y.; KEHOE, P. G. An exploration of the potential mechanisms and translational potential of five medicinal plants for applications in Alzheimer's disease. *Am J Neurodegener Dis*, v. 2, p. 70-88, 2013.
- SHIPLEY, M. M.; MANGOLD, C. A.; SZPARA, M. L. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J Vis Exp*, v. 108, n. e53193, p. 1-11, 2016.
- SILVA, A. J. Estudo botânico e químico da catuaba (Erythroxylaceae Catuaba do Norte): PARTE I – Histórico, habitat, sinonímia e botânica da catuaba. *Rev Bras Farmacogn*, v. 14, p. 67-77, 2004a.
- SILVA, A. J. Estudo botânico e químico da catuaba (Erythroxylaceae Catuaba do Norte): PARTE II – Histórico, habitat, sinonímia e botânica da catuaba. *Rev Bras Farmacogn*, v. 14, p. 145-151, 2004b.
- SILVA, A. J. Estudo botânico e químico da catuaba (Erythroxylaceae Catuaba do Norte): PARTE III – Estudo químico da catuaba. *Rev Bras Farmacogn*, v. 15, p. 77-81, 2005.
- SILVA, G. S.; CANUTO, K. M.; RIBEIRO, P. R. V.; BRITO, E. S.; NASCIMENTO, M. M.; ZOCCOLO, G. J.; COUTINHO, J. P.; JESUS, R. M. Chemical profiling of guarana seeds (*Paullinia cupana*) from different geographical origins using UPLC-QTOF-MS combined with chemometrics. *Food Res Int*, v. 102, p. 700-709, 2017.
- SUN, W.; JIA, J. The +347 C promoter allele up-regulates MAPT expression and is associated with Alzheimer's disease among the Chinese Han. *Neurosci Lett*, v. 450, p. 340-343, 2009.
- TAGLIARO, F.; MANETTO, G.; CRIVELLENTI, F.; SMITH, F. P. A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Sci Int*, v. 92, p. 75-88, 1998.

TANG, W.; HIOKI, H.; HARADA, K.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. *J Nat Prod*, v. 70, p. 2010-2013, 2007.

TORMA, P. C. M. R.; BRASIL, A. V. S.; CARVALHO, A. V.; JABLONSKI, A.; RABELO, T. K.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P.; FLÔRES, S. H.; AUGUSTI, P. R.; RIOS, A. O. Hydroethanolic extracts from different genotypes of açai (*Euterpe oleracea*) presented antioxidant potential and protected human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Food Chem*, v. 222, p. 94-104, 2017.

TOZZI, A. M. G. A. Subfamília Caesalpinioideae. In: TOZZI, A. M. G. A.; MELHEM, T. S.; FORERO, E.; FORTUNA-PEREZ, A. P.; WANDERLEY, M. G. L.; MARTINS, S. E.; ROMANINI, R. P.; PIRANI, J. R.; MELO, M. M. R. F.; KIRIZAWA, M.; YANO, O.; CORDEIRO, I. (Org.). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. São Paulo: Instituto de Botânica, 2016. p. 22-83.

TRABZUNI, D.; WRAY, S.; VANDROVCOVA, J.; RAMASAMY, A.; WALKER, R.; SMITH, C.; LUK, C.; GIBBS, R.; DILLMAN, A.; HERNANDEZ, D. G.; AREPALLI, S.; SINGLETON, A. B.; COOKSON, M. R.; PITTMAN, A. M.; SILVA, R.; WEALE, M. E.; HARDY, J.; RYTEN, M. MAPT expression and splicing is differentially regulated by brain region: relation to genotype and implication for tauopathies. *Hum Mol Genet*, v. 21, n. 18, p. 4094-4103, 2012.

TRUITI, M. T.; SOARES, L. M.; LONGHINI, R.; MILANI, H.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P.; OLIVEIRA, R. M. W. *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction protects against cognitive impairments and hippocampal cell death induced by bilateral common carotid occlusion in mice. *J Ethnopharmacol*, v. 172, p. 232-237, 2015.

USHIROBIRA, T. M. A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Chemical and microbiological study of extract from seeds of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). *Acta Farm Bon*, v. 26, p. 5-9, 2007.

VALMORBIDA, J. *Propagação da espécie Trichilia catigua A. Juss (Catigua)*. 2007. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

VASUDEVAN, M.; PARLE, M. Pharmacological evidence for the potential of *Daucus carota* in the management of cognitive dysfunctions. *Biol Pharm Bull*, v. 29, p. 1154-1161, 2006.

VAZ, Z. R.; MATA, L. V.; CALIXTO, J. B. Analgesic effect of the herbal medicine Catuama in thermal and chemical models of nociception in mice. *Phytother Res*, v. 11, p. 101-106, 1997.

VENKATRAGHAVAN, V.; BRON, E. E.; NIESSEN, W. J.; KLEIN, S. Disease progression timeline estimation for Alzheimer's disease using discriminative event based modeling. *Neuroimage*, v. 186, p. 528-532, 2019.

VIANA, A. F.; MACIEL, I. S.; MOTTA, E. M.; LEAL, P. C.; PIANOWSKI, L.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* hydroalcoholic extract: new evidence on its dopaminergic effects. *Evid Based Complement Alternat Med*, p. 1-8, 2011.

VICENTINI, F. A.; BARBOSA, M. M. C.; FORTUNATO, M. C.; AMADO, C. A. B.; COMAR, J. F.; LONGHINI, R.; MELLO, J. C. P.; NATALI, M. R. M. Treatment with *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction improves healing and reduces oxidative stress in TNBS-induced colitis in rats. *Biomed Pharmacother*, v. 107, p. 194-202, 2018.

WANG, J. *Analytical Electrochemistry*. 2ª ed. New York: Wiley-VCH, 2000.

WANG, J.; CHEN, D.; CHEN, Z.; FAN, G.; WU, Y. Fast separation and determination of coumarins in *Fructus cnidii* extracts by CEC using poly(butyl-methacrylate-co-ethylene-dimethacrylate-co)-[2-

(methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium chloride) monolithic columns. *J Sep Sci*, v. 33, p. 1099-1108, 2010.

WEINBERGER, R. *Practical Capillary Electrophoresis*. San Diego: Academic Press, Inc., 1993.

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

YOO, K. Y.; PARK, S. Y. Terpenoids as potential anti-Alzheimer's disease therapeutics. *Molecules*, v. 17, p. 3524-3538, 2012.

YU, H.; YAO, L.; ZHOU, H.; QU, S.; ZENG, X.; ZHOU, D.; ZHOU, Y.; LI, X.; LIU, Z. Neuroprotection against A β ₂₅₋₃₅-induced apoptosis by *Salvia miltiorrhiza* extract in SH-SY5Y cells. *Neurochem Int*, v. 75, p. 89-95, 2014.

YUAN, Q.; WANG, F.; XUE, S.; JIA, J. Association of polymorphisms in the LRP1 and A2M genes with Alzheimer's disease in the Northern Chinese Han population. *J Clin Neurosci*, v. 20, p. 253-256, 2013.

YUNES, R. A., CECHINEL-FILHO, V. *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*. 3. ed. Itajaí: Editora da Universidade do Vale do Itajaí, 2012.

ZENG, K. W.; KO, H.; YANG, H. O.; WANG, X.M. Icariin attenuates β -amyloid-induced neurotoxicity by inhibition of tau protein hyperphosphorylation in PC12 cells. *Neuropharmacol*, v.59, p. 542-550, 2010.

ZHANG, L.; YU, H.; ZHAO, X.; LIN, X.; TAN, C.; CAO, G.; WANG, Z. Neuroprotective effects of salidroside against beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurochem Int*, v. 577, p. 547-555, 2010.

ZHAO, Q.; TANG, X. C. Effects of huperzine A on acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. *Eur J Pharmacol*, v. 455, p. 101-107, 2002.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *Food Res Int*, v. 60, p. 246-254, 2014.