



ARTIGO

**Estudo da genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*
após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos
de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão**

Joseane Sampaio¹, Roberta Treméa¹, Maria Gilda De Marco¹, Rosana B. Vieira¹, Jolcimara A. Tacca¹,
Deise J. Ströher², Bruna C. Pilar², Angélica A. C. Güllich², Melissa Schwanz³ e Vanusa Manfredini^{4*}

Recebido: 26 de agosto de 2012

Recebido após revisão: 13 de novembro de 2012

Aceito: 06 de dezembro de 2012

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2349>

RESUMO: (Estudo da genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão). *Ilex paraguariensis* (erva mate) é usada popularmente por suas inúmeras atividades terapêuticas, entre elas estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC), diurética, antireumática e leve propriedade analgésica. Entretanto, ainda hoje, convivemos com o escasso conhecimento sobre os efeitos tóxicos e colaterais, especialmente sobre o material genético. Assim, o estudo teve por objetivo investigar o possível efeito genotóxico *in vitro* e *in vivo* após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos obtidos por infusão de *Ilex paraguariensis*. Para o teste cometa *in vitro* foram testados extratos nas concentrações de 0,5%, 1%, 2%, 5% e 10%, em células do sangue periférico. Os resultados mostraram genotoxicidade dose dependente. Já o ensaio cometa *in vivo*, os resultados apontam que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* na concentração de 10%, induziu dano no ácido desoxirribonucléico (DNA) das células do cérebro, fígado, pulmão e rins, dos animais expostos ao extrato por 14 dias consecutivos, em relação ao grupo controle. Em nível cerebral e renal, a adição da vitamina C aos extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* não protegeu as células do dano, mostrando um efeito pró oxidante. Portanto, sugere-se que estudos de genotoxicidade são importantes para avaliar a relação risco-benefício da utilização de plantas medicinais de forma indiscriminada pela população, principalmente no que se refere às dosagens utilizadas, uma vez que podem ser letais para as células e o organismo como um todo.

Palavras-chave: Erva mate, ratos Wistar, ensaio Cometa.

ABSTRACT: (Genotoxicity study *in vivo* and *in vitro* after exposure acute and subchronic of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtained by infusion). *Ilex paraguariensis* (yerba mate) is popularly used for its numerous therapeutic activities, including stimulating the central nervous system (CNS), diuretic, antireumaticos and mild analgesic properties. However, today we live with the limited knowledge about toxicity and side effects, especially on genetic material. Thus, the study aimed to investigate the possible genotoxic effect *in vitro* and *in vivo* after acute and subchronic exposure of aqueous extracts obtained by infusion of *Ilex paraguariensis*. To test the comet extracts were tested *in vitro* at concentrations of 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10% in peripheral blood cells. The results showed dose-dependent genotoxicity. Since the comet assay *in vivo*, the results indicate that the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* in 10% concentration induced damage in deoxyribonucleic acid (DNA) of the cells of the brain, liver, lungs and kidneys of animals exposed to the extract for 14 days consecutive, in the control group. In brain and kidney, addition of vitamin C to the aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* did not protect cells from damage, showing a pro-oxidant effect. Therefore, it is suggested that genotoxicity studies are important to evaluate the risk-benefit from the use of herbal indiscriminately by the population, especially with regard to the dosages used, since it can be lethal for the cells and the organism as a whole.

Key words: Yerba mate, Wistar rats, Comet assay.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais encontra-se em plena ascensão e contribui significativamente para sanar as necessidades primárias de assistência à saúde. No Brasil, o uso de plantas medicinais é promovido pelo difícil acesso da população à assistência médica e farmacêutica, o custo dos medicamentos industrializados e uma tendência dos consumidores a utilizarem produtos de origem natural. De forma equivocada a população

utiliza plantas medicinais de forma indiscriminada, sem se preocupar com os efeitos colaterais e/ou tóxicos (Silva *et al.* 2006, Alexandre *et al.* 2008). Com base nesta realidade, verifica-se a relevância e torna-se indispensável o desenvolvimento de pesquisas, visando à investigação de plantas medicinais por meio de estudos químicos/farmacológicos da atuação dos princípios ativos responsáveis pela ação terapêutica e toxicológica relatada em estudos etnofarmacológicos (Elisabetsky 2001).

1. Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade Regional Integrada (URI), Campus de Erechim. Avenida Sete de Setembro, 1621, Erechim, RS, Brasil.

2. Mestranda pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguai. BR 472, Km 585, Uruguai, RS Brasil.

3. Docente do Curso de Farmácia da Universidade Regional Integrada (URI), Campus de Erechim. Avenida Sete de Setembro, 1621, Erechim, RS, Brasil.

4. Docente do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA). Campus Uruguai, BR 472, Km 585, Uruguai, RS, Brasil.

*Autor para contato. E-mail: vanusamanfredini@unipampa.edu.br

A erva mate (*Ilex paraguariensis* A. St. -Hil.) é uma árvore comum do sul do Brasil, Missões, Argentina, Leste do Paraguai e presente em algumas populações isoladas do Uruguai (Alves *et al.* 2008, Jacques *et al.* 2008, Pang *et al.* 2008). No Brasil, a população das regiões sul e centro oeste utilizam as folhas da *Ilex paraguariensis* para fazer uma bebida típica, o chimarrão. As folhas são obtidas de uma árvore perene, pertencente à família Aquifoliaceae (Jacques *et al.* 2007, Jacques *et al.* 2008) e possuem atividades características já conhecidas, como estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC), diurética, anti-reumática e leve propriedade analgésica (Bixby *et al.* 2005). Tradicionalmente é utilizada para cefaléia, enxaqueca, fadiga e depressão nervosa (Newall 1996). Geralmente a população faz uso de infusões da planta devido a essas propriedades (Deladino *et al.* 2008, Jacques *et al.* 2008). Assim, as atividades estão relacionadas com a composição química presente nesta planta, sendo que os compostos químicos de maior interesse e em proporção são cafeína, teobromina, teofilina, flavonoides e saponinas (Cardozo *et al.* 2007).

Acredita-se que estes compostos fitoquímicos presentes na *Ilex paraguariensis* juntamente com fatores ambientais, como o consumo de álcool, tabagismo, ingestão do mate com a temperatura da água elevada e o processamento das folhas pela indústria ervateira, estejam relacionados com a produção de um composto altamente reativo, tóxico e mutagênico, denominado benzopireno. Este metabólito está associado ao aumento da incidência de câncer esofágico e na orofaringe (Alves *et al.* 2008, Newall 1996), embora, o mecanismo exato da carcinogênese ainda seja desconhecido (Alves *et al.* 2008).

Em contrapartida, estudos mostram que extratos de *Ilex paraguariensis* são potentes inibidores da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e aumentam os níveis plasmáticos da lipoproteína de alta densidade (HDL), que possui ação cardioprotetora (Bixby *et al.* 2005), bem como atua como hepatoprotetor e hipocolesterolêmico (Filip *et al.* 2000, Gugliucci 1996). A ingestão de infusões de *Ilex paraguariensis* pode contribuir para aumento das defesas antioxidantes, neutralizando a ação dos radicais livres no organismo humano (Jacques *et al.* 2008).

A genotoxicidade é uma especialidade recente, e se situa na interface entre a toxicologia e a genética, por isto frequentemente denominada de genética toxicológica. Esta visa o estudo dos processos que alteram a base genética da vida, quer seja na sua estrutura físico-química, o ácido desoxirribonucleico (DNA), processo classificado como mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético a níveis celulares e orgânicos, identificados, respectivamente, como carcinogênese e teratogênese (Silva *et al.* 2003, Silva *et al.* 2007).

Inúmeras técnicas que detectam danos no DNA têm sido utilizadas para identificar substâncias com atividade genotóxica (Tice *et al.* 2000). Nas últimas décadas o teste cometa passou a ser muito utilizado, sendo que o princípio desta técnica é a migração do DNA em uma

matriz de agarose sob condições eletroforéticas. Quando observadas em microscópio, as células têm a aparência de um cometa, com cabeça (a região nuclear) e uma cauda contendo os fragmentos de DNA que migraram em direção ao pólo positivo (Hartmann *et al.* 2003, Hartmann *et al.* 2004).

O grau da lesão no DNA é verificado através de microscopia óptica, onde cem células são criteriosamente analisadas e classificadas em diferentes graus de lesão que variam de zero (células sem alteração morfológica) até quatro (DNA totalmente fragmentado) (Hartmann *et al.* 2003, Silva *et al.* 2003).

Lesões no DNA que podem ser observadas através do teste cometa, não são somente quebras de fita, as quais têm um papel relevante na formação de aberrações cromossômicas, mas também modificações nas bases do DNA, como sítios apurínicos e apirimidínicos, que são relevantes na indução de mutações. Nestes casos, os agentes genotóxicos não induzem quebras diretamente, mas atuam gerando tais sítios no DNA. Esses sítios são álcali-lábeis e provavelmente são convertidos em quebras em altos pH, como o utilizado no teste cometa alcalino. Contudo, essas lesões primárias são passíveis de reparo e podem não resultar em alterações genéticas (Brendler-Schwaab *et al.* 2005).

A versão *in vivo* do teste cometa tem sido amplamente utilizada em testes de genotoxicidade. As vantagens da realização em animais incluem a aplicabilidade a vários tecidos, ou seja, é possível verificar possíveis danos em diferentes órgãos do animal, ele é sensível para detecção de níveis muito baixos de lesões, requer pequeno número de células por amostra, é de fácil execução, requer curto período para conclusão dos experimentos, além de apresentar relativamente baixo custo (Tice *et al.* 2000).

O teste cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões gênicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Diferentes das mutações, as lesões detectadas pelo teste cometa são passíveis de correção, sendo assim, o teste necessita de controles muito bem estabelecidos por ser muito sensível, o tempo entre a exposição e a análise deve ser o mais curto possível, pois o dano pode ser reparado, por isto o tempo curto de detecção. Assim sendo, o teste cometa pode ser utilizado também para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possa inferir a fidedignidade do processo de reparo (Albertini *et al.* 2000).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo principal investigar o possível efeito genotóxico de *Ilex paraguariensis*, *in vitro* e *in vivo*, após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos desta planta, através do teste Cometa.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra vegetal

Foram utilizadas folhas de *Ilex paraguariensis*, dispo-

nibilizadas pela empresa Indústria e Comércio de Erva-Mate Barão Ltda, no município de Barão de Cotegipe, RS, Brasil. A secagem das folhas foi realizada em estufa com circulação de ar, a uma temperatura de 35 °C e após foram trituradas em moinho de facas.

Extrato Vegetal

O extrato vegetal foi obtido por infusão do pó das folhas de *Ilex paraguariensis*, nas concentrações de 0,5%, 1%, 2%, 5% e 10 %, utilizando água destilada como veículo extrator na temperatura de 85-95 °C, para a determinação do ensaio *in vitro*.

Para a determinação dos experimentos *in vivo*, foi utilizado o extrato aquoso vegetal nas concentrações de 0,5% e 10%. A escolha destas concentrações para os experimentos *in vivo* se justifica por serem a mínima e máxima utilizada pela população em geral. Para testar o poder antioxidante dos extratos, utilizou-se a vitamina C na concentração de 40 mg/kg (Biasi et al. 2008).

Ensaio cometa *in vitro*

O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões (URI), Campus de Erechim sob o número 107/TCH/08. Após a aprovação pelo comitê, foram coletadas amostras de sangue total (2 mL) de três ratos Wistar machos por punção venosa caudal. O sangue total foi acondicionado em um tubo com anticoagulante (EDTA) e em seguida armazenado a 4 °C. Após a preparação dos extratos da planta nas diferentes concentrações, o infuso da planta foi colocado em contato com o sangue total (1:1 v/v) por 6 horas em banho-maria a 37 °C, para determinação de genotoxicidade após exposição aguda (Singh et al. 1988). Transcorrido o tempo, uma alíquota de 20 µL da suspensão de células foi adicionadas a 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LPM 0,75% - Low Point Melting) e espalhadas em lâminas de microscopia pré cobertas com agarose 1%. Estas lâminas foram colocadas em cuba de vidro apropriadas protegidas da luz a 4°C com solução de lise gelada (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0 com 1% triton X-100 e 10% DMSO), por 3 horas. Por fim, a eletroforese foi realizada em condições alcalinas (pH 13) a 25 V e uma corrente de 300 mA por 15 minutos.

Após eletroforese as amostras foram neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5) e colocadas sobre uma bandeja e levadas a estufa à 37 °C, por 1 hora. Em seguida, procedeu-se a coloração com solução de nitrato de prata e analisadas em microscópio óptico, no aumento de 400X. Foram analisadas para cada amostra 100 leucócitos selecionados ao acaso, em triplicata. Os leucócitos foram classificados visualmente em quatro classes, de acordo com o tamanho da cauda (do tamanho 0, sem dano, ao tamanho 4, máximo dano), onde foi calculado o índice de dano (ID) (Hartmann et al. 2003, Tice 2003, Singh et al. 1988).

Teste Cometa *in vivo*

Quadro 1. Descrição dos grupos.

Grupos	Tratamento
Grupo 1	Solução salina 0,9%.
Grupo 2	Extrato aquoso <i>Ilex paraguariensis</i> na concentração de 0,5%.
Grupo 3	Extrato aquoso <i>Ilex paraguariensis</i> na concentração de 10%.
Grupo 4	Solução aquosa de vitamina C na concentração de 40 mg/kg.
Grupo 5	Extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> 0,5% adicionado de Vitamina C.
Grupo 6	Extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> 10% adicionado de Vitamina C.

Para o desenvolvimento do estudo foram utilizados 36 ratos Wistar machos, pesando entre 180-200 g, procedentes do Laboratório de Experimentação Animal da URI – Campus de Erechim.

Os animais foram mantidos nas condições normais do biotério e os experimentos seguiram as normas éticas de experimentação animal determinadas pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais em Laboratório (SBCAL).

Foi feita administração de 1 mL das soluções por gavage, sendo que cada grupo era composto por 6 animais, conforme o Quadro 1.

Os animais foram anestesiados e realizou-se uma coleta de sangue por punção plexo orbital após 24 horas da administração de uma única dose dos extratos. Após os 14 dias das administrações consecutivas, os animais foram anestesiados novamente e foi realizada a coleta do sangue total, onde uma parte do sangue foi utilizada para a determinação da genotoxicidade após exposição subcrônica em leucócitos do sangue periférico.

Em seguida, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e os órgãos cérebro, fígado, pulmão e rins foram removidos e congelados à -80 °C. Obtidos os homogeneizados dos órgãos, com gral e pistilo, a 4 °C, em banho de gelo, seguiu-se, à análise genotóxica através do ensaio cometa (Singh et al. 1988).

Os resultados referentes à genotoxicidade foram analisados segundo o teste de Kruskal-Wallis, seguido do método de Dunn. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para P<0,05.

RESULTADOS

Teste Cometa *in vitro*

Os resultados do teste cometa *in vitro* mostraram uma genotoxicidade dose dependente (Tab. 1), pois conforme o aumento da concentração do extrato (de 0,5% para 10%) o índice de dano ao DNA (ID) aumentou significativamente (P<0,05).

Teste Cometa *in vivo*

Para o ensaio *in vivo*, foram testadas duas concentrações extremas do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, ou seja, a mínima e a máxima (0,5% e 10%, respectivamente) e estes adicionados a uma dose de 40 mg/kg de vitamina C, potente antioxidante.

Tabela 1. Ensaio cometa *in vitro* após exposição aguda das células leucocitárias às diferentes concentrações do extrato de *Ilex paraguariensis*.

Concentração do Extrato	Índice de dano ao DNA (ID)
<i>Ilex paraguariensis</i> 0,5%	18
<i>Ilex paraguariensis</i> 1,0%	25*
<i>Ilex paraguariensis</i> 2,0%	32*
<i>Ilex paraguariensis</i> 5,0%	45*
<i>Ilex paraguariensis</i> 10 %	60*
Solução salina	Índice de dano ao DNA (ID)
Salina 0,9%	7

*P < 0,05 em relação à concentração de 0,5% e solução salina 0,9%.

Os resultados obtidos após exposição aguda dos extratos em ratos Wistar não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Após exposição subcrônica, ou seja, 14 dias de administrações consecutivas dos extratos, houve um aumento estatisticamente significativo no ID em relação à exposição aguda em todos os grupos estudados (P<0,01) (Tab. 2). Também foi observado um aumento estatisticamente significativo no ID do grupo que recebeu durante 14 dias o extrato de *Ilex paraguariensis* a 10% em relação ao grupo que recebeu apenas solução salina 0,9% (P<0,05) (Tab. 3).

Em relação ao ensaio cometa dos órgãos (Tab. 4), os resultados mostraram um aumento estatisticamente significativo do ID nas células nervosas do grupo que recebeu o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* 10%, extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* 0,5% adicionado de Vitamina C (40 mg/Kg) e extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* 10% adicionado de Vitamina C (40 mg/Kg) em relação ao grupo controle (salina 0,9%) (P<0,05).

Em relação ao dano no DNA dos hepatócitos, observou-se um aumento estatisticamente significativo do ID das células do grupo que recebeu o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* tanto a 5% quanto a 10% em relação ao grupo salina 0,9% (P<0,05).

Em nível pulmonar, foi observado um aumento estatisticamente significativo do ID das células do grupo que recebeu o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* a 10% em relação ao grupo controle (salina 0,9%) (P<0,05).

Tabela 3. Ensaio cometa *in vivo* em leucócitos do sangue periférico de ratos Wistar após exposição subcrônica dos diferentes extratos aquosos de *Ilex paraguariensis*.

Grupos	Valor de p
Grupos 1-2	n.s
Grupos 1-3	<0,05*
Grupos 1-4	n.s
Grupos 1-5	n.s
Grupos 1-6	n.s
Grupos 2-3	n.s
Grupos 2-4	n.s
Grupos 2-5	n.s
Grupos 2-6	n.s
Grupos 3-4	n.s
Grupos 3-5	n.s
Grupos 3-6	n.s
Grupos 4-5	n.s
Grupos 4-6	n.s
Grupos 5-6	n.s

*Valor estatisticamente significativo (P<0,05); n.s, não significativo.

Tabela 2. Ensaio cometa *in vivo* em leucócitos do sangue periférico de ratos Wistar após exposição aguda e subcrônica dos diferentes extratos aquosos de *Ilex paraguariensis*.

Ensaio Cometa <i>in vivo</i>	Valor de H – Teste de Kruskal-Wallis	Valor de p
Após exposição aguda	7,2230	0,2046
Após exposição subcrônica	14,7595	0,0114*

*Valor estatisticamente significativo em relação à exposição aguda (P<0,01).

Já nas células renais, foi observado um aumento estatisticamente significativo do ID nos grupos: que recebeu o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* 10%, extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* 0,5% adicionado de Vitamina C (40 mg/Kg) e extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* 10% adicionado de Vitamina C (40 mg/Kg) em relação ao grupo controle (salina 0,9%) (P<0,05).

Diante dos resultados expostos acima, pode-se sugerir que em nível cerebral e renal, a adição da vitamina C aos extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* não protegeu as células do dano, portanto, teve um efeito como pró-oxidante.

DISCUSSÃO

O Mate (*Ilex paraguariensis*) possui propriedades estimulantes devido a elevada concentração de um de seus compostos, a cafeína, assim como também apresenta, taninos, vitaminas B₁ e B₂ (riboflavina), ácidos clorogênicos, vitamina C, E e β- caroteno (Bixby *et al.* 2005). Embora a presença de metilxantinas contribua para muitas atividades farmacológicas da erva-mate, muitas outras interessantes e importantes propriedades têm sido descobertas independente da presença desses compostos. Extratos de mate com níveis elevados de polifenóis são encontrados também no chá verde e no vinho tinto (Pang *et al.* 2008).

Os antioxidantes podem proteger o organismo contra danos causados pelos radicais livres, prevenindo o aparecimento de inúmeras doenças. (Deladino *et al.* 2008, Hallwell e Gutteridge, 2007). O mate contém teores de muitos compostos bioativos, dentre eles, os ácidos fenólicos, que são responsáveis também, pela atividade

Tabela 4. Ensaio cometa *in vivo* das células nervosas, hepáticas, pulmonares e renais de ratos Wistar após exposição subcrônica dos diferentes extratos aquosos de *Ilex paraguariensis*.

Órgão	Grupos	Valor de p
Cérebro	Grupos 1-3	<0,05*
	Grupos 1-5	<0,05*
	Grupos 1-6	<0,05*
Fígado	Grupos 1-2	<0,05*
	Grupos 1-3	<0,05*
Pulmão	Grupos 1-3	<0,05*
	Grupos 1-5	<0,05*
Rim	Grupos 1-3	<0,05*
	Grupos 1-6	<0,05*

*Valor estatisticamente significativo (P<0,05); n.s, não significativo.

antioxidante de infusões do chá verde, *in vivo* e *in vitro* (Cardozo et al. 2007).

Estudos em humanos mostram que as xantinas, em particular a cafeína, desempenha as principais atividades do mate. As atividades farmacológicas da cafeína são comumente documentadas e incluem estimulação do SNC, respiração e da musculatura esquelética, em adição a isso, ocorre estimulação cardíaca, dilatação coronariana, relaxamento dos músculos lisos e diurese. Também é reportada a diminuição do apetite e auxiliar na perda de peso como agente anti-obesidade (Sugimoto et al. 2009, Cardozo et al. 2007, Newall 1996). Entretanto, ainda hoje, existe escasso conhecimento sobre o uso do infuso da erva mate, seus efeitos tóxicos e colaterais, especialmente sobre o material genético, o DNA.

Alterações genotóxicas são definidas como aquelas que causam algum prejuízo ao material genético celular como quebra de fita simples ou dupla, formação de adutos de base, lesão cromossomal, entre outras. O teste cometa é um ensaio de genotoxicidade, portanto, detecta a fragmentação do núcleo através do arraste do DNA, que forma uma cauda quando o material genético é submetido a uma corrente elétrica em solução alcalina (Singh et al. 1988, Hallwell e Gutteridge, 2007).

Neste estudo os resultados do teste cometa *in vitro* mostraram uma genotoxicidade dose dependente dos extratos de *Ilex paraguariensis*. Para o ensaio *in vivo*, foram testadas duas concentrações extremas do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, ou seja, a mínima e a máxima (0,5% e 10%, respectivamente). Os resultados obtidos após exposição aguda (24 horas) dos extratos em ratos Wistar não mostraram diferença entre os grupos estudados. Após exposição subcrônica, ou seja, 14 dias de administrações consecutivas dos extratos, houve um aumento no ID em relação à exposição aguda em todos os grupos estudados. Também foi observado um aumento no ID do grupo que recebeu durante 14 dias o extrato de *Ilex paraguariensis* a 10% em relação ao grupo que recebeu apenas solução salina 0,9%.

O cérebro é um órgão vital e composto por células ricas em lipídeos polinsaturados, principalmente fosfolipídeos, localizados na camada de mielina dos neurônios (Junqueira & Carneiro 1999). O ensaio cometa das células nervosas mostrou que a vitamina C não foi capaz de proteger as células do dano ao DNA, neste caso, ela atuou como pró-oxidante. A vitamina C é um potente antioxidante hidrofílico, portanto não consegue atravessar livremente a barreira hematoencefálica (BHE). Portanto, este efeito poderia ser obtido utilizando antioxidantes lipofílicos como a vitamina E ou tocoferol (Hallwell & Gutteridge 2007).

No fígado é onde ocorre a maioria das reações de biotransformação e metabolização de agentes tóxicos pela presença de importantes complexos enzimáticos. Outros órgãos como pulmão e rins também tem participação significativa (De Flora & Ferguson 2005). Em relação ao dano no DNA dos hepatócitos, observou-se um aumento do ID das células do grupo que recebeu o

extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* tanto a 5% quanto a 10% em relação ao grupo salina 0,9%. A concentração de compostos polifenóis e ácidos clorogênicos no mate indica uma grande correlação com a capacidade antioxidante pela similaridade com enzimas antioxidantes naturais presentes no nosso organismo (Heck & Mejia 2007, Schinella et al. 2005), assim atuando como potente inibidor do estresse oxidativo, agindo sobre espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente sobre o fígado, e este sendo um importante órgão de metabolização e depuração de compostos e xenobióticos (Gugliucci et al. 1995, Schinella et al. 2005, Hallwell & Gutteridge 2007, Heck & Mejia 2007).

O pulmão atua como importante órgão de excreção, juntamente com o fígado e rins, principalmente para compostos com características de volatilidade. Os resultados do ensaio de genotoxicidade deste órgão mostram uma diferença estatística significativa somente entre a comparação entre os grupos controle e extrato de *Ilex paraguariensis* na concentração máxima, ou seja, de 10%. Neste caso, a associação de vitamina C aos extratos foi promissora, pois a vitamina agiu como antioxidante efetivo. O ascorbato é um antioxidante hidrossolúvel importante para os fluidos extracelulares, atuando de forma importante sob o fluido intersticial do pulmão (Hallwell & Gutteridge 2007, Oga 2003).

Os rins exercem importante papel depurador do sangue, excretando substâncias polares e hidrossolúveis na urina (Oga 2003). Os resultados encontrados nas células renais mostraram que a vitamina C não foi capaz de proteger as células do dano ao DNA; neste caso, ela atuou como pró oxidante.

Assim, do ponto de vista científico, as pesquisas mostram que muitas plantas possuem substâncias potencialmente agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cautela, respeitando seus riscos toxicológicos. Além disso, estudos experimentais têm prestado provas de que as atividades farmacológicas atribuídas a *Ilex paraguariensis* comprovam-se cientificamente, no entanto, para a extrapolação destes resultados para humanos é imprescindível a realização de estudos complementares que determinem a ausência de toxicidade, considerando a restrição dos parâmetros analisados.

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, R. J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G. R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A. T., NORPPA, H., SHUKER, D. E., TICE, R., WATERS, M. D. & AITIO, A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, 463: 111-172.
- ALEXANDRE, R. F., BAGATINI, F. & SIMÕES, C. M. O. 2008. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18: 455-463.
- ALVES, V., JOTZ, G. P., DO AMARAL, V. S., MONTES, T. M., MENEZES, H. S. & DE ANDRADE, H. H. 2008. The evaluation of maté (*Ilex paraguariensis*) genetic toxicity in human lymphocytes by the cytokinesis-block in the micronucleus assay. *Toxicology in Vitro*, 22: 69.
- BRENDLER-SCHWAAB, S., HARTMANN, A., PFUHLER, S. &

- SPEIT, G. 2005. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 20: 245-254.
- BIASI, L., SERAFIN, P. M., TREMÉA, R., SESSE, S., VIEIRA, R. B., ORO, J., SBARDELOTTO, F., MOT-TIN, E., SCHWANZ, M. & MANFREDINI, V. 2008. Avaliação da genotoxicidade *in vitro* de extratos aquosos de *Achyrocline satureioides* E *Matricaria recutita*. *Perspectiva*, 32: 7-14.
- BIXBY, M., SPIELER, L., MENINI, T. & GUGLIUCCI, A. 2005. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. *Life Sciences*, 77: 345-358.
- CARDOZO, E. L., FERRARESE-FILHO, O., CARDOZO-FILHO, L., FERRARESE, M. L. L., DONADUZZI, C. M. & STURION, J. A. 2007. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) progenies grown in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 553-58.
- DE FLORA, S. & FERGUSON, L. R. 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research*, 591: 8-15.
- DELADINO, L., ANBINDER, P. S., NAVARRO, A. S. & MARTINO, M. N. 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71: 126-34.
- ELISABETSKY, E. 2001. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENCKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L. A. & PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3ª ed. Porto Alegre: Editora UFRGS/UFSC RS. 833 p.
- FILIP, R., LOTITO, S. B., FERRARO, G. & FRAGA, C. G. 2000. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*, 20: 1437-1446.
- GUGLIUCCI, A. 1996. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224: 338-344.
- GUGLIUCCI, A. & STAHL, A.J. 1995. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 35: 47-56.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. 2007. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: *Free Radical Biology and Medicine*. 3ª ed. New York: Oxford University Press. p. 187-267.
- HARTMANN, A., AGURELL, E., BEEVERS, C., BRENDLER-SCHWAAB, S., BURLINSON, B., CLAY, P., COLLINS, A., SMITH, A., SPEIT, G., THYBAUD, V. & TICE, R.R. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18: 45-51.
- HARTMANN, A., SCHUMACHER, M., PLAPPERT-HELBIG, U., LOWE, P., SUTER, W. & MUELLER, L. 2004. Use of the alkaline *in vivo* comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*, 19: 51-59.
- HECK, C. I. & DE MEJIA, E. G. 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *Journal of Food Science*, 72: 133-140.
- JACQUES, R. A., DARIVA, C., DE OLIVEIRA, J. V. & CARAMÃO, E. B. 2008. Pressurized liquid extraction of mate tea leaves. *Analytica Chimica Acta*, 8: 264-269.
- JACQUES, R. A., FREITAS, L. S., PÉREZ, V. F., DARIVA, C., DE OLIVEIRA, A.P., DE OLIVEIRA, J. V. & CARAMÃO, E. B. 2007. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14: 6-12.
- JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. 1999. *Histologia Básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 634 p.
- NEWALL, C. A., ANDERSON, L. A. & PHILLIPSON, J. D. 1996. *Herbal Medicines. A guide for health-care professionals*. London: Pharmaceutical Press. 1831 p.
- OGA, S. 2003. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Atheneu. 2ª ed. 474 p.
- PANG, J., CHOY, Y. & PARK, T. 2008. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 15: 115-119.
- SCHINELLA, G. R., FANTINELLI, J. C. & MOSCA, S. M. 2005. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. *Clinical Nutrition*, 24: 360-366.
- SILVA, J., ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J.A.P. 2003. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance. 344 p.
- SILVA, G. N., DE CAMARGO, E. A., SALVADORI, D. M. & RIBEIRO, D. A. 2007. Genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to antimicrobial endodontic agents. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endontology*, 104: 58-61.
- SILVA, M. I. G., GONDIM, A. P. S., NUNES, I. F. S. & SOUSA, F. C. F. 2006. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 455-462.
- SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R. & SCHNEIDER, E. L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191.
- SUGIMOTO, S., NAKAMURA, S., YAMAMOTO, S., YAMASHITA, C., ODA, Y., MATSUDA, H. & YOSHIKAWA, M. 2009. Structures of Triterpene Oligoglycosides and Lipase Inhibitors from Mate, Leaves of *Ilex paraguariensis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 57: 257-261.
- TICE, R. R., AGUREL, E., ANDERSON, D., BRULINSON, B., HARTMANN, A., KABAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C. & SASAKI, Y.F. 2000. The single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221.