



CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE ERVA-MATE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

Isadora Kottwitz da Silva¹, Luciani Cerutti Mocelin², Kelly Silva Rodrigues³, Morgane Goudinho Brito⁴, Gabriela Bonfanti Azzolin⁵, Mariana Migliorini Parisi⁶

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*. Viabilidade celular. Toxicidade. Exposição Aguda.

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A infusão de erva-mate (EM), produzida a partir de folhas da árvore *Ilex paraguariensis*, é uma bebida amplamente consumida em países da América do Sul, como Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, e o consumo médio anual atinge de 3 a 10kg de erva-mate em infusão por pessoa. A EM é uma planta rica em compostos bioativos, entre os quais se destacam os compostos fenólicos, saponinas, xantinas, minerais e vitaminas. Os bioativos estão presentes em toda a planta, mas apresentam-se em maior concentração nas folhas da EM, os quais, lhe garantem propriedades farmacológicas (GAN, et al., 2018). As propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênicas, anti-glicação e redução de peso desses compostos estão bem documentadas (GAN, et al., 2018, LIMA, et al., 2014). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o extrato de EM modula as vias de sinalização, possui atividades quimiopreventivas, melhora a propulsão intestinal, tem efeitos de vasodilatação, inibe a glicação, inibe o estresse oxidativo e tem efeitos anti-inflamatórios (KIM, et al., 2015).

Além dos compostos bioativos, componentes inorgânicos fazem parte da composição da EM, entre eles estão os elementos tóxicos (Cd, Pb, Al, F). Estes, quando consumidos em quantidades elevadas e em alta temperatura, estão associados a destruição celular e tecidual (BARAN, et al 2018). Neste âmbito, a EM tem capacidade de alterar o fuso mitótico dos linfócitos humanos, causando alterações cromossômicas na fase de divisão celular (ALBAS, et al 2014).

¹ Discente do curso de Biomedicina, da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: isadorakottwitz@gmail.com

² Discente do curso de Biomedicina, da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: ceruttiluciani@gmail.com

³ Discente do curso de Biomedicina, da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: kellyrodrigues2704@gmail.com

⁴ Discente do curso de Biomedicina, da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: britomorgane@gmail.com

⁵ Docente do Centro de Ciências da Saúde e Agrárias da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: gbonfanti@unicruz.edu.br

⁶ Docente do Centro de Ciências da Saúde e Agrárias da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: mparisi@unicruz.edu.br



Adicionalmente, concentrações de EM igual ou acima de 100 µg/mL induzem morte celular em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) *in vitro* (MUÑOZ, et al 2016).

Desta forma, para que a EM possa ser utilizada farmacologicamente, é necessário determinar as concentrações seguras de utilização. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar, em diferentes concentrações, a ação citotóxica aguda do extrato de EM em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC).

2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Foram selecionados, de forma simples e aleatória, para participar voluntariamente do estudo, 10 indivíduos saudáveis, que estudam ou trabalham na Universidade de Cruz Alta, com idade entre 18 e 40 anos, que não possuíam doenças não faziam uso de medicamentos.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cruz Alta sob o parecer 3.085.361. Todo protocolo de pesquisa foi realizado de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e com a Declaração de Helsinki. Os indivíduos que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram coletados 20 mL de sangue venoso periférico de cada indivíduo. Após a coleta do sangue, foram isoladas as PBMC através da metodologia de Gradiente de *FicollPaque Plus* (GE Healthcare, EUA). Para isso, as amostras de sangue foram gentilmente acrescentadas em tubos do Tipo *Falcon®* de 15 mL contendo o reagente *FicollPaque Plus* na proporção de 1:2, e, então, os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm por 20 minutos em função SOFT em temperatura ambiente (24°C). Após a centrifugação, as PBMC na interface entre o reagente e o plasma foram aspiradas com pipetas *Pauster*. Em um novo tubo, as PBMC foram ressuspensas e lavadas 2 vezes com solução salina tamponada de fosfato (PBS). Após a lavagem, a viabilidade celular foi determinada pela contagem em hemocitômetro.

Para realização do tratamento, as PBMC de cada indivíduos foram divididas em 5 grupos contendo 5×10^6 células e incubadas com meio de cultura RPMI suplementado ou não com diferentes concentrações de extrato de EM (Tabela 1) por 150 minutos a 37°C.

Tabela 1. Tratamento com extrato de EM em PBMC

po	imento
	II (Controle)



- II +1 µg/mL de EM
- II +10 µg/mL de EM
- II +100 µg/mL de EM
- II +1000 µg/mL de EM

Após a incubação, a viabilidade celular das PBMC foi determinada através dos ensaios de Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2-5-difeniltetrazólio (MTT) e Vermelho Neutro, de acordo com Costa, 2019. Os dados foram expressos através de média e desvio padrão e a comparação entre grupos foi realizada através do Teste de Anova de Uma Via seguida de Teste de Tukey, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O ensaio de captação de vermelho neutro (VN) fornece uma estimativa do número de células viáveis em uma cultura, avaliando a capacidade das células viáveis de incorporar e ligar o corante supravital vermelho neutro nos seus lisossomos, enquanto que, o ensaio colorimétrico de redução de MTT quantifica a taxa respiratória mitocondrial das células (GARCIA-NINO, et al., 2017, REPETTO; DEL PESO e ZURITA, 2008). Por essas particularidades, foram realizados os dois testes de viabilidade para avaliar a citotoxicidade da EM. O resultado dos dois testes está representado nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

Figura 1. Citotoxicidade do extrato de EM avaliada pelo ensaio de Vermelho Neutro

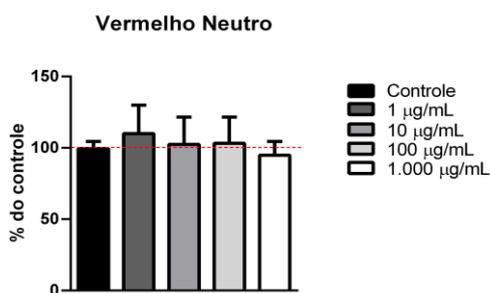
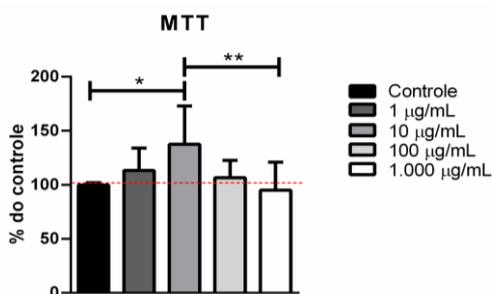


Figura 2. Citotoxicidade do extrato de EM avaliada pelo ensaio de MTT





A avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de VN não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de PBMC expostas a EM e o controle. Estes dados sugerem que o tratamento agudo de 150 minutos de PBMC com extrato de EM não apresenta efeito citotóxico.

No ensaio de MTT também não foi constatada diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular nos grupos tratados com extrato de EM, corroborando os dados obtidos pelo ensaio de VN. No entanto, a concentração de 10µg/mL de extrato de EM aumentou significativamente a respiração mitocondrial das PBMC em relação ao controle e a concentração de 1000 µg/mL. Desta forma, doses menores de extrato de EM, além de não serem citotóxicas, podem ser benéficas por aumentarem a capacidade de respiração celular.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatou-se que o extrato de EM, nas doses estudadas, não apresentou efeito citotóxico em PBMC em tratamento agudo. No entanto, é necessário confirmar estes dados em tratamentos a longo prazo.

Além disso, foi possível descrever que doses de 10µg/mL de extrato de EM possuem efeitos moduladores sobre a atividade mitocondrial, sendo necessário elucidar e detalhar melhor estes efeitos sobre a mitocôndria e se seriam benéficos as células.

REFERÊNCIAS

COSTA, Thais dos Santos da. Efeito citotóxico do Paraquat sobre células mononucleares de sangue periférico humano: Papel protetor da Erva mate.

GAN, R. Y., et al. Health Benefits of Bioactive Compounds from the Genus Ilex, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 2018.

GARCIA-NINO, W. R., et al. Cytogenetic effects of Jacareubin from *Calophyllum brasiliense* on human peripheral blood mononucleated cells in vitro and on mouse polychromatic erythrocytes in vivo. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 335, n. p. 6-15, 2017.

KIM, S. Y., et al. Anti-obesity effects of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*): a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, n. p. 338, 2015.

LIMA, M. E., et al. *Ilex paraguariensis* Extract Increases Lifespan and Protects Against the Toxic Effects Caused by Paraquat in *Caenorhabditis elegans*. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 10, p. 10091-10104, 2014.

REPETTO, G.; DEL PESO, A. e ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nat Protoc**, v. 3, n. 7, p. 1125-1131, 2008.