

THELMA DA SILVA CONCEIÇÃO

**EFEITO ANTIPROLIFERATIVO, MUTAGÊNICO E ANTINEOPLÁSICO
DE PRODUTOS COMERCIAIS DA ERVA MATE (*Ilex paraguariensis*).**

Campo Grande

2010

THELMA DA SILVA CONCEIÇÃO

TÍTULO: Efeito antiproliferativo, mutagênico e antineoplásico de produtos comerciais da erva mate (*Ilex paraguariensis*).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos

Co-orientadora: Prof. Dra. Danielle Serra de Lima Moraes.

Campo Grande
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO
THELMA DA SILVA CONCEIÇÃO

TÍTULO: Efeito antiproliferativo, mutagênico e antineoplásico de produtos comerciais da erva mate (*Ilex paraguariensis*).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste.

Resultado: Aprovada

Campo Grande, MS, 29 de março de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos
Instituição: UFMS

Profa. Dra. Zaira Gueterres
Instituição: UEMS

Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez
Instituição: UFMS

Dedico este trabalho ao meu pai, Orlando da Conceição, que embora não esteja presente fisicamente, sempre o senti a meu lado dizendo “puxou ao pai”.

AGRADECIMENTOS

Se eu consegui terminar este mestrado é porque há um **Deus** que me guia e orienta meu coração e me dá a certeza de que minha cruz nunca será mais pesada do que a minha capacidade possa suportar, e que me fez ver que Ele, em Sua infinita Justiça e Sabedoria, jamais me mandaria onde seu amor não pudesse me proteger!

À minha mãe Lucila da Silva Conceição e minha irmã Tania da Silva Conceição Souza, pelo incentivo e pela confiança.

Aos meus filhos Wesley C. Santos Silva, Esly C. Santos Silva e Raphael Augusto S. C. Pinto, por entenderem que eu continuo plantando.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos, pela oportunidade, por ter aceitado o desafio de orientar alguém que já tem uma profissão e por isso, ter tido paciência quando eu não podia dedicar tempo integral ao mestrado; mas principalmente, por sua dedicação à vida acadêmica e à pesquisa.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Danielle Serra de Lima Moraes, pela oportunidade de realização desse trabalho, pela confiança, amizade e carinho dos quais tenho tido o privilégio de desfrutar desde a época da graduação.

Ao pesquisador Dr. Valdemir Antônio Laura pela dedicação e ensinamento no trabalho estatístico deste estudo.

À Fundect – Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso do Sul, pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Aos Professores do Mestrado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, que contribuíram para o aprimoramento dos meus conhecimentos.

Aos professores, Yvelise Maria Possiede, Sandra dos Santos Cereali, Andréa Luiza Cunha-Laura, Eliezer Jose Marques e Aline Lorenz, por todas as manifestações de carinho e incentivo.

Às doutorandas Danielle Bogo e Renata Trentin Perdomo, pela execução do Teste de Atividade Citotóxica em cultura de células, meu imenso obrigado.

À Lyara Meira Marinho Queiróz e Jayson Bueno Mendes Farias, pelo auxílio inestimável no desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos de Laboratório Rodenir (DBI-CCBS) e Regina (DFB-CCBS), pelo apoio logístico.

Aos dois anjos que Deus colocou no meu caminho para que eu conseguisse suportar a difícil tarefa de entender esta vida: Ana Maria Cesário e Demétrius Almeida Pereira Varandas – *“Se anjo é alguém que toca nossas vidas com seu coração amoroso e clemente, então, mesmo sem asas ou halo radiante, vocês são anjos, disfarçados de gente!”*

Aos meus amigos de turma da pós-graduação Flávia Renata da Silva Zuque, Débora Yamamoto, Massaco Satomi, Brunno Elias Ferreira, Gabriela Moraes e Silva e Patrícia de Oliveira Figueiredo, pelo companheirismo.

Ao amigo e companheiro de trabalho Biólogo e Perito Criminal Eduardo Carvalho de Almeida pelos momentos de conforto durante essa jornada. Sem você jamais suportaria o desafio!

À minha "chefe" Perita Criminal Josemirtes Socorro F. Prado da Silva e aos meus amigos de trabalho do IALF (Instituto de análises Laboratoriais Forenses), Peritos Criminais Melisa Porto Tronchini, Nelson Firmino Júnior, Rogério Pereira de Oliveira, Marianna Vicente Melo, Marina Pereira Ribeiro e Rafael Cezar Cavaretto, por terem aceitado pacientemente minha ausência e por todas as vezes que tiveram que fazer meu trabalho por mim.

Às amigas de trabalho Peritas Criminais Rosely de Miranda Bispo, Kalyne Miazato, Maria das Graças Vieira Mujol, Carmen Castilho, Glória Setsuko Suzuki e Adriana Valéria de Medeiros, que me apoiaram durante esta caminhada, sempre me incentivando e não deixando que eu esmorecesse.

À Roze Pinto Miranda, continuo pedindo desculpas por todas as vezes que deixei a responsabilidade da casa em suas mãos e continuo agradecendo pelos anos que me atura com paciência e carinho.

***Nasceste no lar que precisavas,
Vestiste o corpo físico que merecias,
Moras onde melhor Deus te proporcionou,
de acordo com teu adiantamento.
Possuis os recursos financeiros coerentes com as tuas
necessidades, nem mais, nem menos, mas o justo para as tuas
lutas terrenas.***

***Teu ambiente de trabalho é o que elegeste espontaneamente para a
tua realização. Teus parentes, amigos são as almas que atraístes,
com tua própria afinidade. Portanto, teu destino está
constantemente sob teu controle.***

***Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís, buscas, expulsas, modificas
tudo aquilo que te rodeia a existência.
Teus pensamentos e vontades são a chave de teus atos e
atitudes... São as fontes de atração e repulsão na tua jornada
vivência.***

***Não reclames nem te faças de vítima. Antes de tudo, analisa e
observa. A mudança está em tuas mãos. Reprograme tua meta,
busque o bem e viverás melhor.***

***Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.***

Francisco Cândido Xavier

EFEITO ANTIPROLIFERATIVO, MUTAGÊNCIO E ANTINEOPLÁSICO DE PRODUTOS COMERCIAIS DA ERVA MATE (*Ilex paraguariensis*)

RESUMO

Os efeitos da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na saúde humana têm sido amplamente investigados e os resultados têm-se mostrado divergentes, com alguns indicando um potencial antioxidativo ou protetor da erva-mate contra o aparecimento de células neoplásicas, enquanto outros sugerem sua influência em casos de diversos tipos de tumores. Os objetivos deste estudo foram avaliar o potencial mutagênico de produtos comerciais da erva-mate em ensaios biológicos utilizando *Allium cepa* e avaliar o potencial antineoplásico em cultura de células de carcinoma de laringe (HEp-2), carcinoma de cólon (HT-29), carcinoma de rim (786) e uma linhagem normal de rim de macaco (VERO). Foram avaliados seis produtos, três dos quais destinados a preparo com água fria (tereré) e três com água quente (chimarrão). Os resultados em *A. cepa* mostraram que nenhuma das marcas de tereré analisadas apresentou nível significativo de mutagenicidade em comparação com o controle negativo após os períodos de tratamento. Duas das três marcas de chimarrão (CH-2 e CH-3) mostraram-se citotóxicas e mutagênicas ($p < 0,01$) quando comparadas ao controle negativo após 72 h de tratamento. Os testes de citotoxicidade mostraram que os menores valores de IC_{50} foram obtidos com o extrato a quente de uma das amostras de chimarrão em células de carcinoma de rim. Os outros extratos apresentaram $IC_{50} > 1\ 000\ \mu\text{g/mL}$ nas linhagens HEp-2, HT-29 e VERO em ambos os tempos de incubação. Com base na inibição do crescimento (%) na dose de $500\ \mu\text{g/mL}$, verificou-se que o extrato a quente CH-1 foi 15,13 vezes mais seletivo contra células de carcinoma de rim do que contra células normais, seguido de CH-3 (6,75), CH-2 (4,07) e do extrato a frio TE-3 (4,03), indicando uma possível ação antineoplásica (citotóxica) para o extrato CH-1. Quando a extração da erva-mate CH-1 é feita com 20 min de incubação, há grande aumento na citotoxicidade para células normais, levando a uma diminuição na seletividade, de 15,13 para 5,43. Para o extrato a quente CH-2, esta seletividade é muito reduzida (de 4,07 para 2,18). Os extratos de erva-mate (*I. paraguariensis*) preparados com água quente apresentaram efeitos distintos entre as marcas comerciais testadas, as quais demonstraram potencial tanto para retirar células do seu ciclo normal (CH-2 e CH-3) quanto para agir sobre células neoplásicas (CH-1).

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, Mutagenicidade, *Allium cepa*, Citotoxicidade

ANTIPROLIFERATIVE, MUTAGENIC AND ANTINEOPLASIC EFFECT OF BRAZILIAN BRANDS OF MATE TEA (*Ilex paraguariensis*)

ABSTRACT

Although extensive, research into the effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on human health has yielded divergent results, either indicating an antioxidative, protective potential against the appearance of neoplastic cells or suggesting a role in the formation of several types of tumors. The purposes of this study were to evaluate the mutagenic potential of commercially available brands of mate tea using biological testing based on *Allium cepa* and to assess their antineoplastic potential using cultures of different cells—namely, larynx carcinoma (HEp-2), colon carcinoma (HT-29), kidney carcinoma (786), and a normal line of monkey kidney cells (VERO). Six Brazilian brands were evaluated, three of which are intended for preparation with cold water (yielding the beverage locally known as *tereré*) and three with hot water (yielding *chimarrão*). None of the *tereré* brands exhibited significant genotoxicity following the treatment period, as compared with controls. Two of the *chimarrão* brands (CH-2 e CH-3) exhibited cytotoxicity and genotoxicity ($p < 0.01$) at 72 h of treatment, as compared with controls. The lowest IC_{50} values determined in cytotoxicity testing were obtained for one *chimarrão* brand against kidney carcinoma cells. For all other brands, IC_{50} exceeded 1000 $\mu\text{g/mL}$ when tested against HEp-2, HT-29, and VERO cells, for both steeping times. Based on percent growth inhibition at 500 $\mu\text{g/mL}$, the CH-1 *chimarrão* brand was found to be more selective against kidney carcinoma cells than against normal cells, followed by the *chimarrão* brands CH-3 (6.75) and CH-2 (4.07) and by the *tereré* brand TE-3 (4.03), suggesting potential anticancer activity of the CH-1 brand. Longer steeping times (20 min) considerably increased the cytotoxicity of the CH-1 *chimarrão* preparation against normal cells, with decreased selectivity, from 15.13 to 5.43. For the CH-2 *chimarrão* preparation, selectivity was greatly reduced, from 4.07 to 2.18. The effects of *I. paraguariensis* extracts prepared in hot water varied by brand, revealing either the potential to disturb the normal cycle of cell development (CH-2 and CH-3) or to act against neoplastic cells (CH-1).

Keywords: *Ilex paraguariensis*, Genotoxicity, *Allium cepa*, Cytotoxicity

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Produtos comerciais da erva-mate <i>I. Paraguariensis</i>	30
Tabela 2 - Número total de células analisadas, número de células nas diferentes fases do ciclo celular e alterações de células meristemáticas radiculares de <i>Allium cepa</i> tratados com diferentes extratos de <i>I. paraguariensis</i> em diferentes tempos de exposição.....	38
Tabela 3 - Frequência relativa das alterações cromossômicas observadas em células tratadas com erva-mate preparada com água gelada (tereré) e no controle negativo, nos períodos de 20 e 72 horas.....	44
Tabela 4 - Frequência relativa das alterações cromossômicas observadas em células tratadas com erva-mate preparada com água quente (chimarrão) e no controle negativo, nos períodos de 20 e 72 horas.....	45
Tabela 5 - Atividade antineoplásica (IC ₅₀), µg/mL, dos extratos de seis produtos comerciais de erva-mate em células normais e neoplásicas em incubação de 10 e 20 minutos.....	46
Tabela 6 - Inibição (%) do crescimento de células normais (VERO) e linhagens neoplásicas (786, HEp-2 e HT), sob o efeito do extrato aquoso de produtos comerciais da erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>), em infusão de 10 e 20 minutos.....	47
Tabela 7 - Seletividade dos extratos de <i>I. paraguariensis</i> frente as linhagens testadas, em diferentes doses.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia de <i>Ilex paraguariensis</i>	22
Figura 2 - Demonstração do modelo experimental <i>A. cepa</i>	31
Figura 3 - Tamanho médio (cm) das raízes submetidas aos extratos de erva-mate para chimarrão e tereré em relação ao controle negativo.....	37
Figura 4 - Aspecto das raízes de <i>Allium cepa</i> após tratamento com <i>Ilex paraguariensis</i>	37
Figura 5 - Índice Mitótico (IM) das células meristemáticas de raízes de <i>A. cepa</i> tratadas por 20 e 72 horas com extratos preparados com água fria (tereré).....	38
Figura 6 - Índices Mitóticos (IM) das células meristemáticas de raízes de <i>A. cepa</i> tratadas por 20 e 72 horas com extratos preparados com água quente.....	39
Figura 7 - Índice de Fases (IF), A- prófase; B- metáfase; C- anáfase; D- telófase das células meristemáticas de raízes de <i>A. cepa</i> tratadas por 20 e 72 horas com extratos de <i>I. paraguariensis</i>	41
Figura 8 - Alterações cromossômicas (%) das células de raízes de <i>Allium cepa</i> tratadas por 20 e 72 horas com extratos de <i>I. paraguariesis</i>	42
Figura 9 - Aberrações induzidas pelos extratos de PA, GA e TM, em células de <i>Allium cepa</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HEp2	Linhagem celular de carcinoma de laringe
IC ₅₀	Dose que inibe 50% do crescimento celular
IF	Índice de Fase
IM	Índice Mitótico
HT-29	Carcinoma de laringe
IS	Índice de seletividade
NCI	National Cancer Institute
SRB	Sulforrodamina B
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
VERO	Linhagem celular de rim de macaco
786-0	Carcinoma celular de pulmão
DMEM	Meio Mínimo Essencial modificado por Dulbecco
RPMI	Instituto Roswell Park Memorial
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Considerações sobre a espécie <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil	19
2.1.1. História e importância sócio-econômica	19
2.1.2. Distribuição natural	21
2.1.3 Aspectos taxonômicos e botânicos	21
2.1.4 - Composição e propriedades funcionais	22
2.2 - Ensaios de citotoxicidade	24
2.2.1 – Uso do sistema teste de <i>Allium cepa</i>	24
2.2.2 – Teste de atividade antitumoral - uso de linhagens celulares	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 Geral	27
3.2 Específicos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Material	28
4.2 Avaliação dos Potenciais Mutagênico em <i>Allium cepa</i>	29
4.2.1 Preparo dos extratos para o bioensaio <i>A. cepa</i>	29
4.2.2 Avaliação do Potencial Antiproliferativo	30
4.2.3 Avaliação do Potencial Mutagênico	30
4.3 Avaliação da atividade anticâncer <i>in vitro</i>	32
4.3.1 Preparo dos extratos para cultura de células	32
4.3.2 Cultura de células	32
4.3.3 Teste de citotoxicidade	32
4.4 Análise de dados	33
5 RESULTADOS	35
5.1 Bioensaio <i>Allium cepa</i>	35
5.1.1 Efeito Antiproliferativo	35
5.1.1.1 Toxicidade	35
5.1.1.2 Citotoxicidade	36
5.1.2 Potencial Mutagênico	40
5.1.2.1 Genotoxicidade	40

5.1.2.2 Tipos de Alterações.....	40
5.2 Teste de Citotoxicidade em cultura de células	41
6 DISCUSSÃO.....	44
6.1 Bioensaio <i>Allium cepa</i>.....	44
6.1.1 Potencial Antiproliferativo.....	44
6.1.1.1 Toxicidade.....	44
6.1.1.2 Citotoxicidade.....	45
6.1.2 Potencial Mutagênico.....	48
6.1.2.1 Genotoxicidade.....	48
6.1.2.2 Tipos de alterações.....	49
6.2 Bioensaio Cultura de Células.....	51
7 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins terapêuticos é uma prática milenar, construída na sabedoria do senso comum que articula cultura e saúde, uma vez que esses aspectos não ocorrem de maneira isolada, mas inseridos num contexto histórico determinado. Desde a Idade Média, as plantas já eram utilizadas com finalidades curativas. Muito antes da grande descoberta da química e dos medicamentos sintéticos, buscava-se para cada doença uma planta que a curasse.

Dessa forma, usuários de plantas medicinais mantêm a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos e que, atualmente, encontra-se em expansão por todo o mundo.

De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte de medicina natural, a flora mundial.

O Brasil é considerado o país detentor da maior biodiversidade mundial e em função da significativa variedade da sua flora, um grande número de espécies vegetais é empregado pela população para debelar diversos males, sendo utilizadas com as mais diversas finalidades e de diferentes formas (FUNARI; FERRO, 2005).

Nos últimos anos, no Brasil, várias pesquisas foram realizadas com contribuições relevantes sobre os efeitos farmacológicos de extratos e dos constituintes químicos isolados, não só quanto a aspectos fitoquímicos, mas também quanto à atividade biológica de plantas que ocorrem nos diferentes ecossistemas brasileiros (ALBUQUERQUE, 2006).

A comunidade leiga costuma ter em mente e propagar o conceito de que “tudo o que é natural não faz mal”. No entanto, o conceito de natural como sinônimo de saudável tem sido contestado por pesquisadores que investigam o potencial deletério de algumas plantas de uso popular, por exemplo, no que diz respeito ao efeito mutagênico de plantas medicinais (VARANDA, 2006).

Vicentini et al. (2001), relataram que os chás e infusões de plantas medicinais podem conter substâncias tóxicas com efeitos mutagênicos. Por outro lado, o consumo de chás pode suprimir os efeitos de agentes mutagênicos que estejam atuando sobre o organismo humano (SILVA et al., 2004).

Diversos extratos de plantas, tais como *Pneumus boldus* Mold., *Matricaria recutita* L., *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, *Baccharis trimera* (Less.) DC, *Camelia sinensis* (L) O. Kuntze (fermentado), *Camelia sinensis* (não-fermentado), *Lippia alba* N.E. Brown, *Mentha arvensis* L., e *Pyrus malus* L., têm sido estudados devido ao poder antioxidante, que pode ser atribuído ao seu conteúdo de compostos fenólicos (SELENE et al., 2009). O mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (ANGELO, 2007).

Dentre estas espécies está a erva-mate *Ilex paraguariensis*, cujo consumo pode ser considerado uma tradição em diversas regiões do Brasil e também em outros países da América do Sul.

A atividade ervateira sempre apresentou grande importância para as regiões Sul e Centro-oeste do Brasil (MACCARI JUNIOR, 2000), em especial para o estado de Mato Grosso do Sul, onde várias gerações cultivam o hábito da “roda de tereré” como forma de interação e integração, aumentando significativamente o consumo da bebida na região.

Os efeitos da erva-mate na saúde humana têm sido amplamente investigados e os resultados obtidos mostram-se divergentes, com alguns indicando um potencial antioxidativo ou protetor da erva contra o aparecimento de células neoplásicas, enquanto outros sugerem sua influência em casos de diversos tipos de tumores.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) tem chamado a atenção da comunidade científica nos últimos anos por seus efeitos benéficos à saúde humana, principalmente aqueles relacionados à atividade antioxidante e protetora frente a processos degenerativos, como os que levam ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e a danos ao DNA (MACHADO et al., 2007). Alguns destes resultados são apresentados a seguir.

A propriedade antioxidativa da *I. paraguariensis* foi avaliada por Bracesco et al. (2003), que utilizaram como sistema-teste levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores concluíram que essa espécie se assemelha ao chá-verde quanto ao potencial antioxidante, sendo importante fonte de polifenóis.

De maneira semelhante, resultados obtidos por Schinella et al. (2000), após estudo com bioensaio animal (microsomas de fígado de rato e membranas de

células vermelhas do sangue), sugerem que a ingestão do extrato de *I. paraguariensis* poderia contribuir com o aumento da defesa antioxidativa dos organismos contra ataques de radicais livres.

Também foi relatada a atividade citotóxica de erva-mate em linhagens de células tumorais *in vitro*, o que poderia evidenciar um papel na prevenção do câncer (RAMIREZ-MAREZ et al. 2004; MEIJA et al. 2005; BIXBY et al., 2005).

Por outro lado, algumas pesquisas vêm ressaltando os malefícios provocados à saúde humana pela ingestão da erva-mate. Nesse sentido, casos de cânceres de bexiga (DE STEFANI et al., 2007; BATES et al., 2007), de esôfago (RONCO et al., 2004) e de rim (DE STEFANI et al., 1998) têm sido relacionados com consumo da erva-mate por populações no Uruguai e Argentina. GOLDENBERG et al. (2004) relatam a influência do mate no desenvolvimento de cânceres de cavidade oral, faringe, laringe e esôfago.

De acordo com o INCA (2010), as estimativas de novos casos de câncer para o ano de 2010 serão válidas também para o ano de 2011, e apontam para a ocorrência de 489.270 novos casos.

No Brasil, pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (BARROS et al., 2000), e da Universidade Luterana do Brasil (ZETTLER et al., 2006) também sugerem que o consumo da erva-mate pode aumentar o risco de carcinoma epidermóide de esôfago e a indicam como agente etiológico de neoplasia do trato aérodigestivo, respectivamente.

Ressaltando o exposto por Houk (1992), resultados provenientes de bioensaios genéticos são relevantes à saúde humana porque o alvo toxicológico é o DNA, o qual existe em todas as formas celulares vivas. Portanto, pode ser extrapolado, pois compostos que se mostram reativos com DNA em uma espécie, têm o potencial para produzir efeitos similares em outras espécies. Em geral, perturbações do material genético são deletérias para o organismo e podem conduzir a consequências severas e irreversíveis à saúde (LEITÃO E BRAGA. 1994).

Há décadas, ensaios biológicos têm sido considerados meios adequados para avaliar misturas como entidades únicas (HOUK, 1992).

Para essa avaliação foi relevante a adequação do sistema-teste a ser utilizado. Com isso, foi considerado importante que esse sistema apresentasse boas condições cromossômicas e que sintetizasse importantes enzimas metabólicas,

conduzindo a resultados de grande repetibilidade e alta confiabilidade

A espécie *Allium cepa* tem sido utilizada como padrão em ensaios biológicos, para o estudo dos efeitos de extratos vegetais, visando a detecção de genotoxicidade (TEIXEIRA et al., 2003; FACHINETTO et al., 2007), cujas condições cromossômicas e enzimáticas conduzem a resultados de grande reprodutibilidade e alta confiabilidade.

O modelo de cultura de células tumorais humanas tem contribuído para revelar o potencial antitumoral de diversas substâncias isoladas a partir de espécies vegetais do Estado de Mato Grosso do Sul (SILVA et al. 2007; GARCEZ et al. 2006; GARCEZ et al. 2005; MATOS et al. 2006). Além da rapidez na obtenção dos resultados, o ensaio é uma alternativa ao uso indiscriminado de animais pelas indústrias farmacêuticas ou de biotecnologia.

Tendo em vista a ambiguidade dos resultados advindos dos trabalhos anteriores, o presente trabalho tem por finalidade avaliar os efeitos antiproliferativo, mutagênico e citotóxico de produtos comerciais da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), em sistemas-testes biológicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações sobre a espécie *Ilex paraguariensis* St. Hil.

2.1.1 História e importância sócio-econômica

A erva-mate era utilizada pelas tribos guaranis, que habitavam as regiões das bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, antes da colonização européia. Na época, comunidades indígenas do Chile, Peru e Bolívia atravessavam os Andes para comercializar as folhas secas da planta, através de permuta (LINHARES, 1969).

Os colonizadores incorporaram rapidamente o hábito dos indígenas de utilizar a infusão das folhas secas trituradas como bebida. Entretanto, esse costume passou a ser considerado um “vício” pelos eclesiásticos, que tentaram impedir o seu consumo, considerando repudiados e excomungados os que fizessem uso da bebida, resultando em um incentivo maior para a sua utilização, quando então a igreja resolveu suspender as punições, assegurando o consumo e o futuro econômico do produto (LINHARES, 1969; LESSA, 1986).

O impulso na economia ervateira surgiu com os jesuítas, no século XVII, pois além de intensificar o comércio, passaram a cultivar a espécie, contribuindo de forma significativa no manejo do cultivo. A expulsão dos jesuítas, em 1768, teve como consequência a decadência dos ervais e a perda da tradição de cultivo. Aproximadamente 100 anos depois, a Argentina voltou a plantar erva-mate, atingindo sua auto-suficiência por volta de 1940 (LINHARES, 1969).

Na legislação brasileira do século XIX, os ervais nativos eram considerados públicos e sua exploração econômica dependia de permissão. Diferentes relações de trabalho e grupos sociais estavam envolvidos nas atividades de coletar, secar, transportar e triturar as folhas e ramos da planta. Destaca-se, contudo, a importância da população tradicional, denominada de cabocla, que era pobre, móvel e resultante da combinação genética e cultural entre indígenas, luso-brasileiros, hispano-brasileiros ou negros (GERHARDT; NODARI, 2009).

Atualmente, a erva-mate ainda possui grande importância econômica, social e cultural para o Sul do Brasil, Nordeste da Argentina e grande parte do Paraguai. Integra um dos mais tradicionais sistemas agroflorestais, sendo uma das culturas que concorrem para a manutenção do pequeno produtor no meio rural (BERKAI; BRAGA, 2000).

No Brasil, é explorada economicamente em 596 municípios dos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul, com 180 mil propriedades rurais envolvidas, sendo na maioria, constituídas de pequenos e médios produtores. A erva-mate abastece 750 indústrias, gerando 710 mil empregos, com uma produção de aproximadamente 700 mil toneladas por ano do produto industrializado (WENDT, 2005).

Sua cultura desempenha importante papel sócio-econômico e ambiental, sobretudo, em pequenas propriedades agrícolas da região sul do Brasil (HEINRICHS; MALAVOLTA, 2001).

Apesar do ciclo da erva-mate (1883-1947) não possuir significado para a economia brasileira, para o Mato Grosso do Sul representa parte da sua história. Ao lado de sua importância econômica a erva-mate incorpora a valorização da cultura local, a sociabilidade e a criatividade da região pantaneira, principalmente pelo uso de bebidas à base da erva-mate (LINHARES, 1969).

Grande parte da produção brasileira é comercializada internamente (80%), ficando o restante para exportação. Dentre os países importadores, o Uruguai absorve quase integralmente a erva-mate exportada, restando pequenos volumes para Chile, Alemanha e Paraguai. (MACCARI JUNIOR, 2000).

Sua principal utilização é na produção de bebidas, principalmente na forma de chimarrão e chás, mas devido às suas propriedades fitoquímicas apresenta grande potencial para outras aplicações industriais, como corante, conservante alimentar, medicamentos, produtos de higiene e cosméticos. Devido à utilização medicinal, foi incorporada em várias farmacopéias como nas francesas em 1866 e 1884, na portuguesa em 1876, na argentina em 1898, na brasileira em 1929, nas venezuelanas em 1898, 1910, 1927 e 1939, as mexicanas em 1904, 1925 e 1952 e na paraguaia em 1944 (WENDT, 2005).

2.1.2 Distribuição natural

A distribuição natural da erva-mate compreende uma área de aproximadamente 540.000 km², sendo encontrada no Brasil, Paraguai e Argentina. Os maiores produtores da erva-mate na América do Sul são o Brasil, o Paraguai e a Argentina. No que se refere à produção, a Argentina lidera o mercado, seguida pelo Brasil (MILOCA et al., 2006).

No Brasil, o plantio ocorre principalmente nos estados de Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e pontos isolados no leste de São Paulo e sudeste de Minas Gerais (MILOCA et al., 2006).

Praticamente até hoje a atividade ervateira é extrativista, dependendo de ervais nativos, porém, o cultivo dessa espécie vem recebendo destaque nos últimos anos.

A erva-mate é tolerante a solos de baixa fertilidade natural, com baixo teor de nutrientes trocáveis e de alto teor de alumínio. Ocorre em solos com textura média (entre 15 e 35% de argila), sendo raramente encontrada em solos arenosos (menos de 15% de argila). Prefere solos com profundidade média, úmido e bem drenado. (CARVALHO, 2003).

2.1.3 Aspectos taxonômicos e botânicos

A erva-mate é uma árvore da família Aquifoliaceae originária da região subtropical da América do Sul. A classificação botânica foi realizada pelo naturalista francês August de Saint Hillaire e foi registrada no Museu de História Natural de Paris, em 1822, com o nome de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (FERRARI, 2006).

O gênero *Ilex* pertence à família que apresenta cerca de 600 espécies, sendo 220 nativas da América do Sul, das quais 68 ocorrem no Brasil. A erva-mate (Figura 1) é uma espécie perene, com porte arbóreo e grande longevidade, podendo alcançar cem anos. Sua altura é variável, dependendo da idade e do tipo de sítio, podendo atingir até 30 m na floresta, porém, quando podada, geralmente não

ultrapassa os 7 m de altura. Possui o tronco cilíndrico, reto ou pouco tortuoso, geralmente com 20 a 40 cm de diâmetro (CARVALHO, 2003).



Figura 1 – A - Árvore adulta de *I. paraguariensis* em plantio (WENDT, 2005).
B- Folhas de *I. paraguariensis* (HECK et al. 2007).

2.1.4 Composição e propriedades funcionais

A erva-mate apresenta diversos compostos bioativos que já demonstraram importante atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (MATSUMOTO, 2008). Os

principais compostos bioativos presentes na erva-mate são os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas (CHANDRA; GONZALES, 2004).

Dentre os compostos fenólicos, destaca-se o elevado teor de ácido caféico, ácido clorogênico e outros derivados cafeoilquínicos, aos quais é atribuída a ação adstringente e antioxidante do produto (LARA-CARDOZO et al. 2007), além dos flavonóides rutina, quercetina, diglicosídeo de luteolina, taninos e cafeoilglicose. A atividade anticarcinogênica dos compostos fenólicos tem sido relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele.

Na classe das saponinas encontram-se as agliconas, ácidos ursólico e oleanólico, responsáveis pelo sabor amargo, pela atividade antiinflamatória e adstringente da erva-mate (GNOATTO et al., 2008).

Dentre as metilxantinas encontram-se a cafeína, a teobromina e a teofilina, componentes com comprovada ação no sistema nervoso central e no músculo cardíaco, sendo a eles atribuída a ação estimulante do mate, sendo considerados ainda como relaxantes da musculatura lisa, diurético, analgésicos e anestésicos (SCHUBERT et al., 2006).

Dentre os compostos voláteis da erva-mate estão, majoritariamente, terpenos e aldeídos, sendo observados, ainda, produtos de degradação de carotenóides (MACHADO et al., 2007).

2.2 Ensaios Biológicos

2.2.1 Uso do sistema teste de *Allium cepa*

De acordo com Bagatini et al. (2007), o sistema teste vegetal de *Allium cepa* apresenta-se como um bioindicador ideal para o primeiro *screening* da genotoxicidade de infusões de plantas, auxiliando os estudos de prevenção de danos à saúde humana.

O teste clássico de *Allium sp.* tem sido amplamente utilizado em estudos dos efeitos de agentes químicos (FERETTI et al., 2007), ambientais (MORAES; JORDÃO, 2001 e AMARAL et al., 2007) e de extratos de plantas (AKINBORO;

BAKARE, 2007) em cromossomos e na divisão celular. Trata-se de um dos sistemas de análise mais simples e de grande validade citogenética. Esse sistema-teste apresenta inúmeras vantagens, tais como facilidade de manuseio; baixo custo; realização e obtenção de resultados em curto espaço de tempo; boas condições cromossômicas para estudo de danos cromossômicos ou distúrbios da divisão celular, incluindo avaliação de riscos de aneuploidia, sensibilidade e confiabilidade, presença de importantes enzimas necessárias à ativação de certos pró-mutágenos (BAGATINI, 2007).

Os efeitos das infusões de plantas medicinais sobre o ciclo celular de *Allium cepa* foram relatados por Vicentini et al. (2001); Camparoto et al. (2002); Teixeira et al. (2003); Knoll et al. (2006); Fachinetto et al. (2007), os quais mostraram que os principais efeitos que ocorrem são mutagenicidade e anti-mutagenicidade, bem como aumento e diminuição da proliferação celular de pontas de raízes tratadas com diferentes espécies de plantas medicinais.

A análise de alterações cromossômicas é utilizada como teste de mutagenicidade sendo um método direto para mensurar danos em sistemas expostos a agentes mutagênicos ou carcinogênicos potenciais.

As alterações cromossômicas constituem uma fração relevante de danos causados por agentes físicos, químicos e biológicos ao material genético. Muitos compostos capazes de causar mutações gênicas também causam mutações cromossômicas. Entretanto, algumas substâncias atuam apenas ao nível cromossômico, não sendo, portanto, detectadas pelos testes que usam bactérias como sistema indicador. Assim, é imprescindível a inclusão dos testes citogenéticos na avaliação do potencial mutagênico de um composto (RABELLO-GAY, 1991 *apud* MORAES, 2001).

Os tipos de alterações cromossômicas mais freqüentes podem ser assim definidos: C-metáfase é descrita quando a formação do fuso foi prejudicada (EL-GHAMERY et al., 2000), o que significa que nenhuma placa equatorial torna-se organizada e que a divisão do centrômero é atrasada. No entanto, ela pode ser reversível, o que indica um fraco efeito tóxico (ODEIGAH et al. 1997).

Metáfase desorganizada é a disposição difusa dos cromossomos no plano equatorial da célula. Esta alteração é considerada sinal de malformação ou inativação parcial do fuso, todavia, pouco se sabe sobre como as atividades do fuso são diretamente reguladas (MARCANO et al. 2004).

A ocorrência de migrações precoces ou tardias, provavelmente, está relacionada a algum tipo de alteração ocorrida nos microtúbulos do fuso, uma vez que, por definição, estas estruturas são responsáveis em manter, por curto período de tempo, os cromossomos na região equatorial da célula.

2.2.2 – Teste de atividade antitumoral - uso de linhagens celulares

A metodologia mais utilizada para os testes de atividade antitumoral é a dos ensaios de citotoxicidade, usando linhagens celulares de células neoplásicas humanas.

A citotoxicidade das drogas pode ser avaliada em culturas de células tumorais de várias linhagens através de métodos como: variações da morfologia celular, viabilidade celular utilizando corantes como o azul de tripan e a eosina, que se baseiam na perda da integridade da membrana celular das células não viáveis causando a captação do corante (MACIEL et al., 2002).

O uso de testes *in vitro* tem sido amplamente utilizado para pesquisa de agentes anticâncer. Várias linhagens neoplásicas são utilizadas e, para se verificar a seletividade da droga em linhagens neoplásicas, utilizam-se linhagens normais (HOUGHTON et al., 2007).

Os ensaios de citotoxicidade podem ser desenvolvidos em várias metodologias, tais como contagem celular, ensaios clonogênicos, medida de incorporação de nucleotídeos radiativos ou métodos colorimétricos (HENRIKSSON et al., 2006). No caso dos métodos colorimétricos, a taxa de crescimento e multiplicação é medida indiretamente por algum indicador de crescimento através do aparecimento de coloração e a intensidade de cor é diretamente proporcional ao número de células presentes (HOUGHTON et al., 2007).

Existem diferentes tipos de ensaios colorimétricos, dentre os quais citam-se os que empregam:

- cristal violeta: corante violeta cuja função é detectar células vivas (HENRIKSSON et al., 2006).

- MTT: (sais de tetrazólio), Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Consiste no ensaio de proliferação celular que quantifica a habilidade das células viáveis reduzirem o sal amarelo de tetrazólio a cristais púrpuras de formazan, usando uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. O ensaio detecta células metabolicamente ativas e a leitura é feita em espectrofotômetro a 540 ou 570nm em leitor de ELISA (MOSMANN, 1983).
- XTT: (hidróxido de 2,3-bis (2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5-[fenilamina)carbonil] - 2H-tetrazólio). Ensaio de proliferação celular mais rápido e menos trabalhoso que MTT. As enzimas de células metabolicamente ativas das células dividem o sal XTT em derivados de formazan coloridos e solúveis em água. A absorbância é determinada a 450 nm em leitor de ELISA (SCUDIERO et al., 1988)
- Alamar blue: é um corante solúvel em água que é utilizado para quantificar a viabilidade das células, extremamente estável e não tóxico para as células, considerado teste superior ao MTT. A forma oxidada do alamar blue entra no citosol e é convertida por enzimas mitocondriais. A coloração do meio muda de azul índigo para rosa fluorescente nas células viáveis (HENRIKSSON et al., 2006). Este teste é disponível em kits comerciais.
- Sulforrodamina B (SRB): baseia-se no princípio de que o SRB cora proteínas dentro das células. Constitui-se em um método simples, sensível, reprodutível, rápido, e que permite armazenamento das placas, podendo-se fazer a leitura das células em espectrofotômetro depois do ensaio e não necessariamente imediatamente, como no ensaio do MTT (HOUGHTON et al., 2007). O princípio do ensaio da sulforrodamina B baseia-se na habilidade que tem este composto de se ligar a componentes protéicos das células, fixadas pelo ácido tricloroacético; ou seja, o método independe da atividade metabólica das células, ao contrário do MTT.

No método SRB, o corante utilizado é uma aminoxantina de cor rosa brilhante e com dois grupos sulfônicos que são capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos das células que foram fixadas com o ácido tricloroacético (SKEHAN et al., 1990).

Para a avaliação da atividade antineoplásica, os testes de citotoxicidade mais utilizados na rotina de triagem de drogas anticâncer pelo Instituto Nacional de

Câncer dos Estados Unidos (NCI) para uso em programas de avaliação de drogas anticâncer (FRESHNEY, 1994; RUBINSTEIN et al., 1990) são o Teste do sal de tetrazolium- MTT (MOSMANN,1983); e Teste da Sulforrodamina B (SRB) (SKEHAN et al., 1990).

A superioridade do método SRB em relação ao MTT foi descrita por Keepers et al. (1991).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Verificar os potenciais antiproliferativo, genotóxico e antineoplásico de produtos comerciais da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em ensaios biológicos.

3.2 Específicos:

- Determinar os índices mitóticos e os índices de fases de células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* após tratamento exclusivo com os produtos comerciais da erva-mate, preparados com água gelada (tereré) e quente (chimarrão);
- Investigar as frequências e tipos de alterações citogenéticas sofridas por células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* após tratamento exclusivo com os produtos comerciais da erva-mate, preparados com água gelada e quente;
- Avaliar o potencial citotóxico dos produtos comerciais da erva-mate em 3 linhagens de células neoplásicas em diferentes tempos de incubação;
- Determinar a seletividade dos extratos das ervas-mate em células neoplásicas;
- Avaliar o efeito do tempo de incubação dos extratos sobre a atividade antineoplásica (citotóxica) nas linhagens celulares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Biologia Geral do Departamento de Biologia-DBI e de Biologia molecular e cultura celulares do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, ambos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

O critério para escolha dos produtos comerciais da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) foi a pureza do produto (sem aditivos), segundo a definição da ANVISA (2005), e a indicação de uso, se para tereré ou para chimarrão.

Foram utilizados como meio de tratamento para os sistemas-teste *Allium cepa* e da cultura de células, seis produtos comerciais da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), que atendessem ao subitem 2.3 do Anexo da Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº. 277, de 22 de setembro de 2005 (ANVISA, 2005), dentre elas:

2.3. Erva-Mate: é o produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos de *Ilex paraguariensis* St. Hil., obtido por processo de secagem e fragmentação destinado ao preparo de "chimarrão" ou "tereré" podendo ser adicionado de açúcar.

Os produtos foram adquiridos em estabelecimentos comerciais locais e custeados por projeto de pesquisa.

Os extratos foram preparados conforme instruções contidas nas embalagens para obtenção de bebidas quente (chimarrão) e/ou gelada (tereré), totalizando seis amostras, sendo três preparações com água gelada e três por infusão (Tabela 1).

As linhagens celulares HEP-2 (ATCC CCL-23, carcinoma de laringe) e linhagem normal VERO (ATCC –CCL-81, rim de macaco) foram adquiridas do Instituto Adolpho Lutz. As linhagens de células neoplásicas: 786 (ATCC CRL-1932, carcinoma de rim), e HT-29 (ATCC HTB-38, carcinoma de cólon) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CPQBA-Unicamp.

O ensaio de citotoxicidade está padronizado no laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares da UFMS (MATOS et al., 2006, BOGO 2009, SIMIONATTO et al., 2009, BOGO et al., 2010).

Tabela 1 – Produtos comerciais da erva-mate *I. Paraguariensis*.

ABREVIATURAS	TIPO	ORIGEM	LOTE	VALIDADE
CH-1	Chimarrão	Abelardo Luz-SC	126	Out/10
CH-2	Chimarrão	Curitiba-PR	013	Set/10
CH-3	Chimarrão	Cascavel-PR	007	Jun/10
TE-1	Tereré	Tacuru-MS	117	Fev/10
TE-2	Tereré	Paulo Frontin-PR	201	Set/10
TE-3	Tereré	Cascavel-PR	005	Jun/10

4.1 Avaliação do Potencial Mutagênico em *Allium cepa*

4.1.1 Preparo dos extratos

Para o preparo do tereré os produtos comerciais da erva-mate foram pesados (100g) e colocados em 1000 mL de água gelada (5°C), onde permaneceram por 10 minutos sendo, em seguida, filtrados. Essa mesma forma de preparo foi utilizada para o chimarrão, sendo a água gelada substituída por infusão em água quente a temperatura inicial de 98°C por 10 minutos. Posteriormente, foi feito o resfriamento em temperatura ambiente.

Cada tratamento foi aplicado a uma série de cinco bulbos de *A. cepa*, os quais passaram por padronização e lavagem em água corrente por uma hora. As raízes foram cultivadas em condições controladas de temperatura (25°C) e aeração constantes, em câmara de crescimento do tipo BOD, sem fotoperíodo, inicialmente em água mineral (Pôr-do-sol, Campo Grande-MS) até atingirem aproximadamente 1,5 cm, quando foram transferidos para frascos de vidro de 80 mL, contendo os extratos que estavam em temperatura ambiente. Água mineral da mesma marca comercial foi utilizada como controle negativo em todos os ensaios (Figura 2).

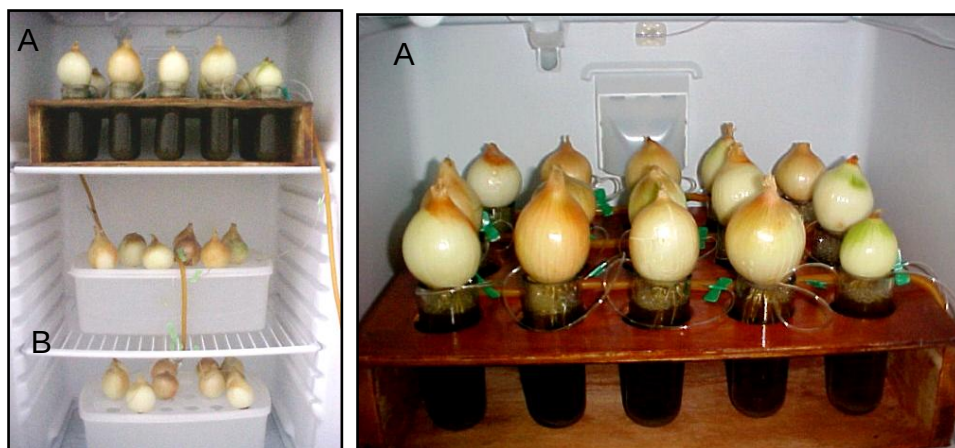


Figura 2 – Demonstração do modelo experimental *A. cepa*. A - Extratos de *I. paraguariensis*; B - Água (controle negativo).

4.1.2 Avaliação do Potencial Mutagênico

O ciclo celular em meristemas de raiz de *A. cepa*, crescendo a 25° C, é de 13,5 horas (12 h em interfase, 0,7 h em prófase, 0,2 h em metáfase, 0,1 h em anáfase e 0,5 h em telófase), segundo Giménez-Martín et al.(1977).

Neste estudo, os bulbos foram submetidos ao extrato da erva-mate, por períodos de 20 horas (tratamento em um único ciclo celular) e por 72 horas (tratamento durante vários ciclos celulares) e os seguintes parâmetros foram avaliados:

- a) Toxicidade: por meio de análise macroscópica do tamanho, morfologia, coloração e turgescência das raízes de *Allium cepa* após 20 horas e após 72 horas de tratamento;
- b) Citotoxicidade: para avaliação da ação da erva-mate sobre a divisão celular e suas fases, foram realizados os cálculos dos índices mitóticos (IM) e dos índices de fase (IF), por meio das seguintes fórmulas:

$$\text{IM} = \frac{\text{número de células em divisão}}{\text{número de células observadas}} \times 100;$$

IF= número de células em uma determinada fase mitótica / número de células em mitose X 100.

4.1.3 Avaliação do Potencial Mutagênico

- a) Genotoxicidade: as frequências de células aberrantes obtidas a partir do tratamento com o tereré e o chimarrão foram comparadas com as frequências de aberrações obtidas após exposição das células ao controle negativo, de acordo com as seguintes fórmulas:

FA (frequência absoluta): nº de células alteradas/ nº de células observadas X 100;

FR (frequência relativa): soma de cada um dos tipos de alteração/total de células alteradas X 100.

- b) Tipos de Alterações: foram calculadas as frequências relativas das seguintes aberrações (%): micronúcleos (MN); aderências cromossômicas; C-metáfases, cromossomos dispersos em metáfase e em anáfase, fragmentos cromossômicos, metáfases desorganizadas, migração cromossômica precoce ou tardia, pontes cromossômicas e células anucleadas.

Foram analisadas 1.000 células meristemáticas de ponta de raiz por bulbo de *Allium cepa*, sendo utilizado um total de cinco bulbos tratados com cada uma das amostras preparadas com a erva-mate.

Após cada tratamento as radículas coletadas foram fixadas em carnoy (3 etanol:1 ácido acético) por pelo menos 24 horas, reidratadas e coradas com orceína-aceto-clorídrica a 2%. As regiões meristemáticas dessas raízes foram separadas e esmagadas entre lâminas e lamínulas para observação e contagem de células em divisão e de aberrações cromossômicas em microscópio óptico com a objetiva 40X.

4.2 Avaliação da atividade antineoplásica (citotóxica) *in vitro*

4.2.1. Preparo dos extratos

Os produtos comerciais da erva-mate foram pesados (5g) e colocados em 20 mL de água gelada (tereré) durante 10 e 20 minutos de incubação. Para o chimarrão, a mesma medida foi colocada em água quente (temperatura inicial de 98°C) durante 10 e 20 minutos de incubação. Ambos foram filtrados em gaze estéril para retenção de partículas maiores, sendo posteriormente filtrados em membrana de polietersulfona (PES) de 0.22 µm.

4.2.2. Cultura de células

Todas as linhagens celulares foram mantidas em meio completo em incubadora de CO₂, até alcançarem o crescimento exponencial. Foram então divididas em alíquotas, mantidas durante 24h a -86°C para o congelamento gradual e transferidas para *container* de nitrogênio líquido (-196°C), para estocagem. Para os testes, foram descongeladas rapidamente a 37 °C até atingir crescimento exponencial (FRESHNEY, 2005).

4.2.3 Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade com o corante sulforrodamina B (SRB) foi utilizado para avaliação da atividade citotóxica e tem como princípio a coloração das proteínas de membrana celular (SKEHAN et al., 1990).

As células foram cultivadas em frascos estéreis na presença de meio de cultura, DMEM ou RPMI 1640, contendo 10 % de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina (meio

completo) e mantidas a 37 °C em atmosfera úmida contendo CO₂ (5%). Uma vez que estas células são aderentes, é necessário fazer a remoção dessas com a solução de tripsina (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4. Em seguida, foram transferidas para tubos cônicos contendo meio de cultura completo.

Após centrifugação à baixa rotação, o meio de cultura e tripsina foram desprezados e as células ressuspendidas em pequeno volume de meio completo. Foi feita a contagem com uma alíquota dessas células em uma câmara de Neubauer e coradas com Trypan Blue[®] para que em cada cavidade da placa de 96 poços fosse depositado um volume de 100 µL de meio contendo 12.000 células (120.000/mL).

Após 20 horas, foram adicionadas três concentrações de cada extrato em análise, (50, 500 e 1000 µg/mL), cada um em triplicata. Após exposição durante 48hs as células foram fixadas com ácido tricloroacético 40% por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado, a placa lavada em água e seca para adição de 50µL de SRB diluída em ácido acético por 30 minutos.

Após lavagem com ácido acético 1% para retirar excesso de corante e secagem foi adicionado o tampão Tris Base 10mM para solubilizar o corante ligado às proteínas de membrana das células fixadas. Em seguida elas foram submetidas a uma agitação de 15 minutos para a dissolução das proteínas coradas e a absorbância foi medida a 540 nm em leitor de microplacas.

Foram obtidas as absorbâncias: extrato (T), controle negativo (CN), branco dos extratos e a leitura do início da incubação, ou seja, antes da adição extratos (T0). Em todos os experimentos foi incluído um controle positivo, doxorrubicina nas concentrações de 0,25, 2,5e 25 mg/mL (Eurofarma).

4.3 Análise de dados

Os resultados obtidos por meio do bioensaio *Allium cepa* foram submetidos à análise estatística, sendo analisadas cinco repetições para cada tipo de tratamento (chimarrão e tereré).

Os resultados obtidos após cada tratamento do sistema-teste *Allium cepa* foram comparados estatisticamente com os do controle (água mineral), utilizando-se análise de variância (teste F) ou análise não paramétrica (teste de Kruskal-Wallis) ao

nível de 5 % de probabilidade, para avaliação dos potenciais mutagênicos das substâncias-teste em estudo.

Nos ensaios de cultura de células a inibição de crescimento - IC (%) de cada dose do extrato em triplicata, foi calculada em programa Excel 2007, utilizando-se as fórmulas segundo Monks et al. (1991).

A dose que inibe 50% do crescimento celular (IC_{50}) em microgramas/mL ($\mu\text{g/mL}$) foi determinada graficamente em programa para gráficos e análises de dados (Microcal Origin Versão 6.0). A citotoxicidade também foi expressa em porcentagem de inibição do crescimento (%) e os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (média $\pm$ dp). Os ensaios em cada linhagem foram reproduzidos pelo menos em dois experimentos independentes.

Também foi determinada a seletividade, obtida por meio da divisão entre a porcentagem de inibição de cada extrato nas linhagens de células neoplásicas e a porcentagem de inibição na linhagem de células normais VERO (Seletividade= células neoplásicas/ VERO) e encontra-se demonstrada na Tabela 7.

5. RESULTADOS

5.1 Bioensaio *Allium Cepa*

5.1.1 Potencial Antiproliferativo

5.1.1.1 Toxicidade

Os efeitos tóxicos dos extratos nas raízes analisadas foram evidenciados nos períodos de 20 e 72 horas, nos dois tratamentos (chimarrão e tereré).

Após 20 horas de tratamento, as raízes submetidas aos extratos de *I. paraguariensis* com água quente (chimarrão) apresentaram crescimento médio superior ao do controle. No mesmo período de tratamento, as raízes submetidas aos extratos obtidos com água gelada (tereré) mostraram crescimento igual ou inferior ao controle.

No tratamento de 72h, as raízes submetidas aos extratos de chimarrão e de tereré apresentaram crescimento igual ou inferior ao controle (Figura 3), havendo a diminuição do crescimento, principalmente, nos extratos obtidos com água quente CH-1 (56,8%), CH-2 (17,5%) e CH-3 (41,6%). Foi verificado ainda atrofiamento de raízes, escurecimento nas proximidades da coifa e facilidade de desprendimento do bulbo, neste mesmo período de tratamento (Figura 4).

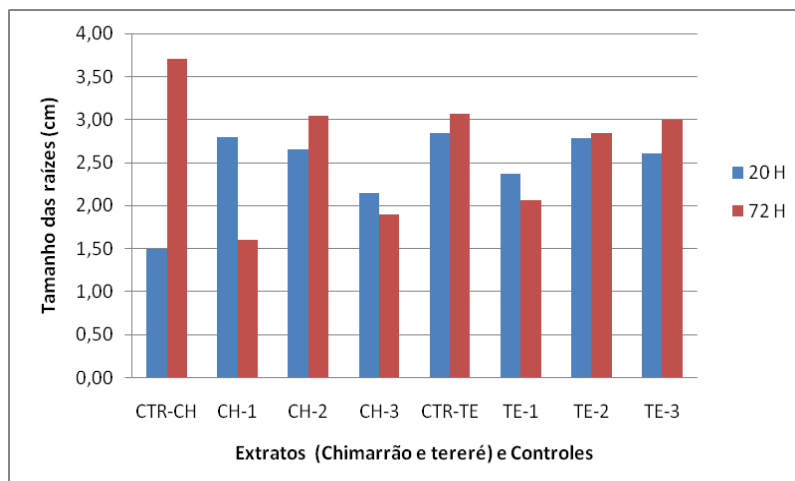


Figura 3 – Tamanho médio (cm) das raízes submetidas, por 20 h e 72 h, aos extratos de erva-mate preparadas para chimarrão (CH-1, CH-2, CH-3) e tereré (TE-1, TE-2, TE-3) e controle negativo (CTR).

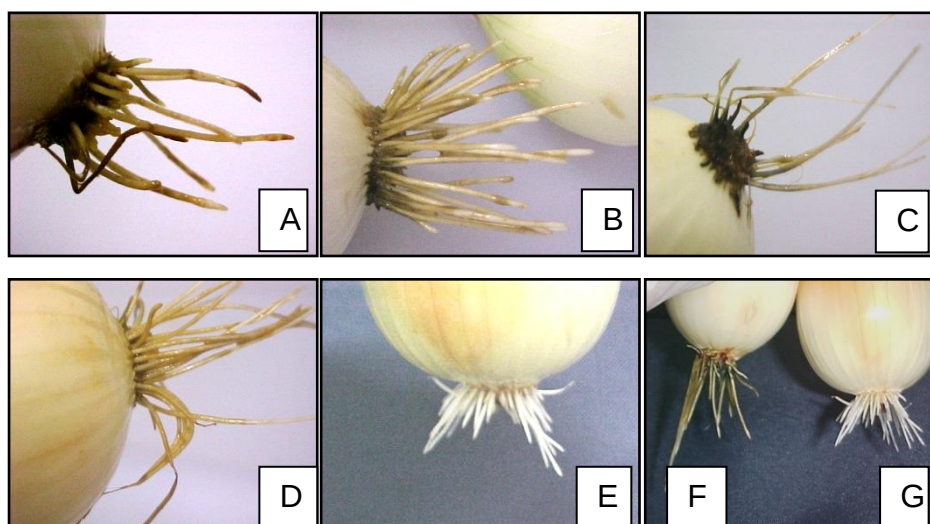


Figura 4– Aspecto das raízes de *Allium cepa* após tratamento com *Ilex paraguariensis*. A – Chimarrão 20h; B – Tereré 20h; C – Chimarrão 72h, D- tereré 72h; E – Controle chimarrão 72h; F – chimarrão 20h; G – controle chimarrão 20h.

5.1.1.2 Citotoxicidade

A- Índice Mitótico (IM)

O número total de células analisadas, tratadas com *I. paraguariensis*, bem como o número de células nas diversas fases do ciclo celular estão na Tabela 2.

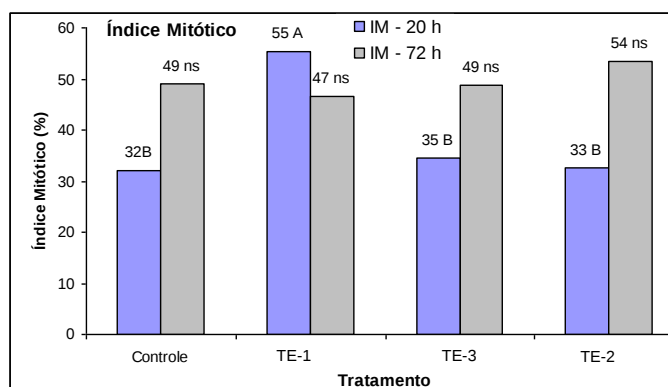
Tabela 2 - Número total de células analisadas, número de células nas diferentes fases do ciclo celular e alterações de células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* tratados com diferentes extratos de *I. paraguariensis* por 20 h e 72 h de exposição.

Tratamentos	20 h						72 h					
	INT	PRO	MET	ANA	TEL	ALT	INT	PRO	MET	ANA	TEL	ALT
CH-1	694	4213	0	0	0	14	1406	3594	0	0	0	0
CH-2	1070	3909	10	7	4	8	3730	196	14	14	0	1046
CH-3	4679	263	17	24	10	22	3491	587	0	0	0	922
CTR	3328	1284	175	143	70	29	4069	590	194	94	37	8
TE-1	1619	3356	14	3	8	9	2362	2508	0	0	0	130
TE-2	3541	1393	42	11	1	0	1773	3227	0	0	0	0
TE-3	3370	1481	38	26	85	35	2203	2797	0	0	0	0
CTR	3494	1130	190	161	25	16	2144	2696	67	61	32	3

CTR= Controle, INT=Intérfase, PRO=Profase, MET=Metafase, ANA=Anafase, TEL= Telófase, ALT= Células com alterações.

A adequação das condições em que os experimentos foram conduzidos foi confirmada pela observação de ciclos celulares normais no controle negativo (água mineral).

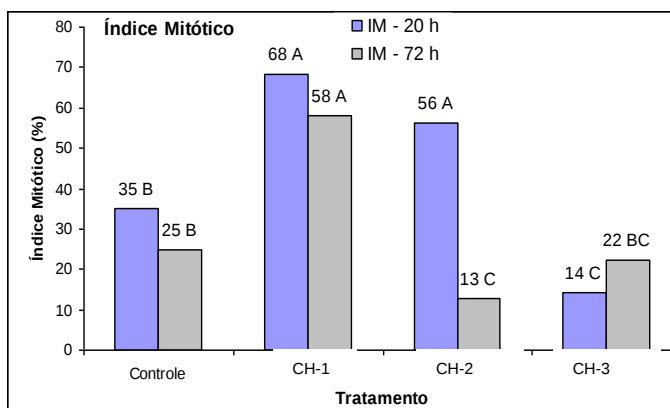
Os resultados obtidos a partir dos extratos preparados com água gelada (tereré) não apresentaram reduções significativas dos IM (Figura 5).



Figuras 5 – Índices Mitóticos (IM) das células meristemáticas de raízes de *A. cepa* tratadas por 20 e 72 horas com extratos preparados com água gelada (tereré).

Após 20 horas de tratamento, os IM das células expostas aos extratos de CH-1 e CH-2 foram semelhantes entre si e tiveram aumento significativo em relação ao controle e ao extrato de CH-3, que também apresentou IM significativamente inferior ao observado no controle. Com 72 horas de tratamento, o IM das células tratadas

com CH-1 foi significativamente maior, quando comparado ao controle e aos demais extratos, enquanto CH-2 apresentou diminuição significativa do seu IM (Figura 6).



Figuras 6 – Índices Mitóticos (IM), das células meristemáticas de raízes de *A. cepa* tratadas por 20 e 72 horas com extratos preparados com água quente (chimarrão).

B) Índice de Fases

As células das raízes expostas aos extratos de CH-1 e CH-2 por 20 e 72 horas apresentaram índice de prófase significativamente maior do que os verificados nas células expostas ao controle negativo. Os índices de prófase das células tratadas com os extratos de CH-3 somente diferiram significativamente dos índices do controle após tratamento de 72 horas. Não houve diferença significativa entre os índices de prófase dos tratamentos, exceto a redução obtida com os extratos de CH-3, em 20 horas.

Após 20 horas de tratamento com os extratos de CH-1 e CH-2, as células apresentaram inibição significativa dos índices de metáfase, anáfase e telófase, quando comparados ao controle. CH-3 não apresentou diferença significativa em relação ao controle em nenhuma dessas fases. Após 72 horas, constatou-se a redução dos índices de metáfase, anáfase e telófase das células tratadas com CH-1, quando comparados ao grupo controle. Com esse mesmo tempo de tratamento, as células tratadas com extratos de CH-2, apresentaram índices de metáfase e de telófase inferiores ao do controle, enquanto o tratamento com CH-3 conduziu à redução significativa também do índice de anáfase.

Os baixos índices de fases, exceto índices de prófase, observados após 72 horas de tratamento com todos os extratos, foram devidos à grande frequência de células anucleadas (Figura 7).

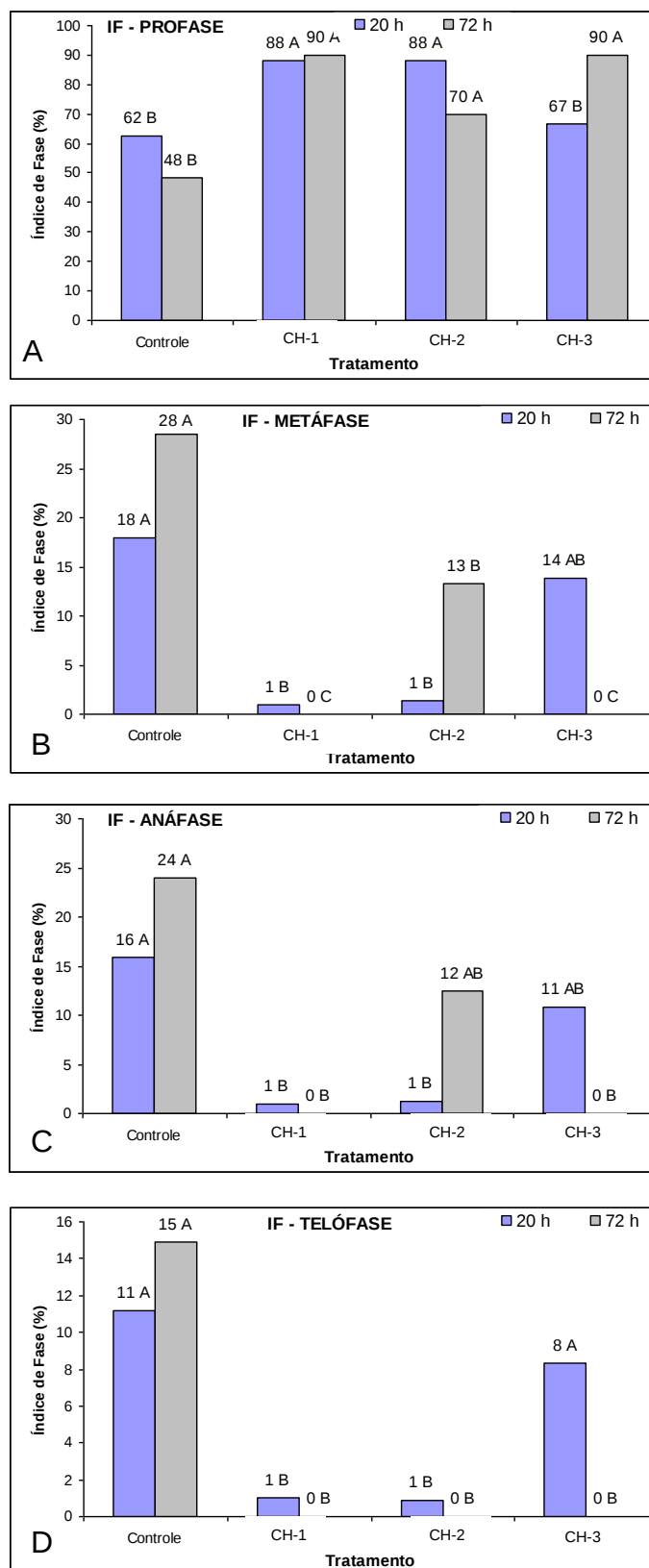


Figura 7 - Índice de Fases (IF), A- Prófase; B- Metáfase; C- Anáfase; D- Telófase das células meristemáticas de raízes de *A. cepa* tratadas por 20 e 72 horas com extratos de *I. paraguariensis*, preparados com água quente (chimarrão).

5.1.2 Potencial MUTAGÊNICO

5.1.2.1 Genotoxicidade

Não foi observada diferença significativa nas frequências de alterações cromossômicas de células tratadas com extratos preparados com água gelada (tereré).

As frequências de alterações observadas nas células tratadas por 20 horas com CH-1, CH-2 e CH-3, não diferiram significativamente entre si e nem do controle. Entretanto, as raízes tratadas com os extratos de CH-2 e CH-3, por 72 horas, apresentaram alterações estatisticamente significativas em relação às células do controle e as células tratadas com extrato de CH-1 (Figura 8).

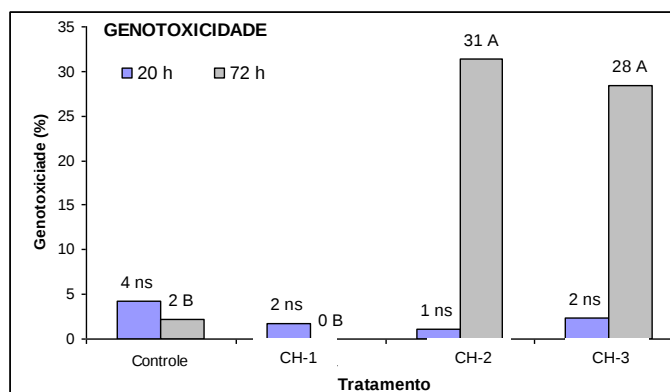


Figura 8 – Alterações cromossômicas (%) das células de raízes de *Allium cepa* tratadas por 20 e 72 horas com extratos de *I. paraguariensis*.

5.1.2.2 Tipos de Alterações

Dentre as alterações cromossômicas observadas, destacam-se: aderências, metáfases desorganizadas, C-metáfases, migrações precoces e tardias, pontes metafásicas e anafásicas, fragmentação da cromatina e, principalmente, células anucleadas (Figura 9).

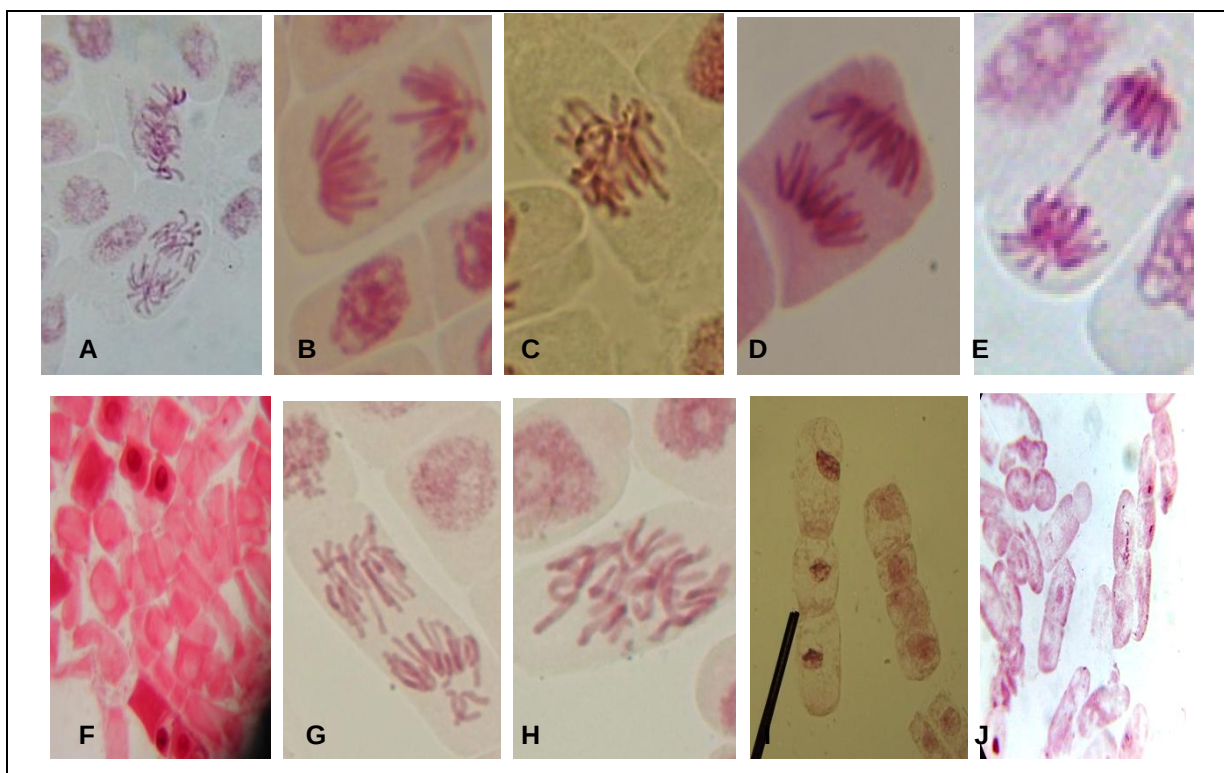


Figura 9 – Aberrações induzidas pelos extratos de CH-1, CH-2 e CH-3, em células de *Allium cepa*. A – metáfase e anáfase anormais, B- anáfase normal, C- aderência, D – ponte metafásica, E - ponte anafásica, F – células apoptóticas, G – migração precoce, H – C-metáfase, I – fragmentação da cromatina, J – células anucleadas.

As frequências relativas (%) das alterações estão na Tabela 3.

Tabela 3. Frequência relativa (%) das alterações cromossômicas observadas em células tratadas com erva-mate preparada com água gelada (tereré) e no controle negativo, nos períodos de 20 e 72 horas.

Tempos/ Tratamentos/ Alterações	20 h				72 h			
	TE-1	TE-2	TE-3	CTR	TE-1	TE-2	TE-3	CTR
SN	0	0	0	0	100	0	0	0
METÁFASE								
CM	44,5	0	5,8	0	0	0	0	0
CD	0	0	2,9	0	0	0	0	0
FRG	0	0	0	0	0	0	0	0
ADR	22,2	0	20,1	25,0	0	0	0	0
DES	33,3	0	20,1	12,5	0	0	0	33,4
ANÁFASE								
CD	0	0	2,8	0	0	0	0	0
FRG	0	0	0	0	0	0	0	33,3
MP	0	0	2,8	25,0	0	0	0	0
MT	0	0	2,8	0	0	0	0	0
PT	0	0	37,1	31,2	0	0	0	33,3
TELÓFASE								
MN	0	0	2,8	0	0	0	0	0
PT	0	0	0	6,3	0	0	0	0
FRG	0	0	2,8	0	0	0	0	0
Total de cél. aberrantes	9	0	35	16	130	0	0	3
Total de cél. observadas	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000

SN= Sem núcleo, CTR= Controle negativo, CM=C-Metáfase, CD=Cromossomo Disperso, FRG=Fragmento, ADR=Aderência, DES= Desorganizada, MP=Migração Precocce, MT=Migração Tardia, PT=Ponte, MN=Micronúcleo.

Tabela 4. Frequência relativa (%) das alterações cromossômicas observadas em células tratadas com erva-mate preparada com água quente (chimarrão) e no controle negativo, nos períodos de 20 e 72 horas.

Tempos/ Tratamentos/ Alterações	20 h				72 h			
	CH-1	CH-2	CH-3	CTR	CH-1	CH-2	CH-3	CTR
SN						98,8	100,0	
METÁFASE								
CM	0	0	0	0	0	0	0	12,5
CD	0	0	0	0	0	0	0	12,5
FRG	0	0	0	3,4	0	0	0	0
ADR	28,5	50,0	40,9	7,0	0	0,5	0	0
DES	0	37,5	18,1	31,0	0	0,3	0	12,5
ANÁFASE								
CD	0	0	0	6,9	0	0	0	0
FRG	0	0	0	0	0	0	0	0
MP	7,1	12,5	0	6,9	0	0	0	25,0
MT	7,1	0	0	3,4	0	0	0	0
PT	35,7	0	40,9	41,4	0	0,4	0	37,5
TELÓFASE								
MN	0	0	0	0	0	0	0	0
PT	0	0	0	0	0	0	0	0
FRG	0	0	0	0	0	0	0	0
Total de cél. aberrantes	14	8	22	29	0	1061	922	8
Total de cél. observadas	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000

SN= Sem núcleo, CTR= Controle negativo, CM=C-Metáfase, CD=Cromossomo Disperso, FRG=Fragmento, ADR=Aderência, DES= Desorganizada, MP=Migração Precoce, MT=Migração Tardia, PT=Ponte, MN=Micronúcleo.

5.2 Teste de Citotoxicidade em Cultura de Células

A atividade citotóxica de seis produtos comerciais da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) foi avaliada pelo método da SRB em período de incubação de 48 horas em três linhagens de células neoplásicas (HEp-2, 786-0 e HT-29). A citotoxicidade dos extratos da erva-mate em uma linhagem de células normais (VERO), foi utilizada para a determinação da seletividade das células neoplásicas em relação as células normais.

Os valores de IC₅₀ para os extratos da erva-mate em cultura de células, expressos em µg/mL, estão representados na Tabela 2.

Tabela 5- Atividade citotóxica (IC_{50}), $\mu g/mL$, dos extratos de seis produtos comerciais de erva-mate em células normais e neoplásicas em incubação de 10 e 20 minutos.

ERVAS	VERO	786		HEp-2	HT-29
	10/20 MIN	10 MIN	20 MIN	10 MIN-NR/ 20 MIN	10/20 MIN
CH-1	>1000	344,0	160,0	>1000	>1000
CH-2	>1000	603,0	533,20	>1000	>1000
CH-3	>1000	514,0	362,0	>1000	>1000
TE-1	>1000	>1000	NR	>1000	>1000
TE-2	>1000	>1000	624,0	>1000	>1000
TE-3	>1000	979,0	>1000	>1000	>1000
DOXO	2,92	0,32	0,32	0,81	1,34

VERO- células normais, 786- Carcinoma de Rim, HEp-2- Carcinoma de Laringe, HT-29- Carcinoma de Cólon, DOXO- Doxorrubicina (controle positivo), NR- Não realizado.

Na análise por tempo de incubação (10 e 20 minutos) frente a linhagem de células de carcinoma de rim, verifica-se que em 10 minutos o extrato a quente da erva-mate CH-1 ($IC_{50}=344 \mu g/mL$) foi mais ativo do que os extratos a quente CH-3 ($IC_{50}=514 \mu g/mL$) e CH-2 ($IC_{50}=603 \mu g/mL$). Os extratos a frio, TE-1, TE-2 e TE-3 foram menos ativos ($IC_{50} >1000$). Com 20 minutos de incubação CH-1 continuou sendo o extrato mais ativo. Entretanto, neste tempo de exposição CH-2, CH-3 e TE-2 também foram mais ativos quando comparados ao tempo de incubação de 10 minutos.

Considerando que todos os extratos apresentaram $IC_{50}>1000 \mu g/mL$ na linhagem de células normais (VERO), bem como nas linhagens HEp-2 e HT-29, não foi possível calcular a seletividade baseado na IC_{50} (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991).

Na Tabela 6 estão os resultados da porcentagem de inibição nas doses de $500 \mu g/mL$ e $1000 \mu g/mL$. Os resultados na dose de $50 \mu g/mL$ (tempo de incubação de 10 e 20 min), foram próximos a zero e não estão apresentados.

Tabela 6. Inibição (%) do crescimento de células normais (VERO) e linhagens neoplásicas (786, HEp-2 e HT), sob o efeito do extrato aquoso de produtos comerciais da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), em infusão de 10 e 20 minutos.

ERVAS	TEMPO	786		HEp-2		HT-29		VERO	
		500µg/mL	1000µg/mL	500µg/mL	1000µg/mL	500µg/mL	1000µg/mL	500µg/mL	1000µg/mL
CH-1	10	75,66±2,51	99,3±0,57	0,33 ± 0,57	2,33 ± 3,21	NR		5 ± 3	15,66 ± 1,52
	20	99,66 ± 0,57	100 ± 0	5 ± 0	4,33 ± 1,52	3,33 ± 2,51	18 ± 0	18,33 ± 2,51	20,66 ± 2,30
CH-2	10	19 ± 1	98,33 ± 1,52	0 ± 0	1 ± 0,73	NR		4,66 ± 2,08	10,66 ± 0,57
	20	39,33 ± 0,57	100 ± 0	3,33 ± 2,30	4,33 ± 1,52	0 ± 0	6,33 ± 2,51	18 ± 2,64	21,66 ± 1,52
CH-3	10	49 ± 2	98,33 ± 2,08	0 ± 0	2,3 ± 2	NR		7,25 ± 2,62	17,75 ± 4,34
	20	72 ± 4	91,33 ± 4,72	0 ± 0	11,66 ± 2,08	5 ± 4,35	15 ± 3,46	11 ± 1,73	18 ± 1
TE-1	10	1 ± 1	1,33 ± 2,30	0,33 ± 0,57	3,33 ± 2,30	NR		1,66 ± 0,57	8 ± 3
	20	NR		2 ± 1,73	2,33 ± 1,15	2,33 ± 0,57	1,33 ± 1,52	11,33 ± 1,52	22 ± 2,64
TE-2	10	0,66 ± 1,15	1,66 ± 1,52	1,33 ± 1,15	0,33 ± 0,57	NR		0 ± 0	1 ± 1
	20	2,33 ± 2,30	12 ± 3,46	10,66 ± 3,21	8,66 ± 1,52	0 ± 0	0,66 ± 1,15	8,33 ± 3,51	18,33 ± 1,52
TE-3	10	2,66 ± 1,52	52 ± 4	3,66 ± 2,88	2 ± 2	NR		0,66 ± 0,57	15,33 ± 4,50
	20	7,33 ± 0,57	74,33 ± 1,52	7 ± 1,73	8,33 ± 1,15	2,66 ± 3,05	0,66 ± 1,15	15,66 ± 2,51	23 ± 1

VERO-células normais, 786-carcinoma de rim, HEp-2- carcinoma de laringe e HT-29- carcinoma de cólon. NR= Não realizado;

Assim, foi calculada a média e desvio padrão da porcentagem de inibição do crescimento (doses de 500µg/mL e 1000µg/mL) para todas as linhagens visando a utilização destes dados no cálculo da seletividade das células neoplásicas em relação às células normais nos tempos de incubação de 10 e 20 minutos.

Tabela 7. Seletividade dos extratos de *I. paraguariensis* frente as linhagens testadas, em diferentes doses.

ERVAS	TEMPO	786		HEp-2		HT-29	
		500µg/mL	1000µg/mL	500µg/mL	1000µg/mL	500µg/mL	1000µg/mL
CH-1	10	15,13	6,34	0,06	0,14	NR	
	20	5,43	4,84	0,27	0,20	0,18	0,87
CH-2	10	4,07	9,22	*	0,09	NR	
	20	2,18	4,61	0,18	0,19	*	0,29
CH-3	10	6,75	5,53	*	0,12	NR	
	20	6,54	5,07	*	0,64	0,45	0,83
TE-1	10	0,60	0,16	0,19	0,41	NR	
	20	NR	NR	0,17	0,10	0,20	0,06
TE-2	10	*	1,66	*	0,33	NR	
	20	NR	NR	1,27	0,47	*	0,03
TE-3	10	4,03	3,39	5,54	0,13	NR	
	20	NR	NR	0,44	0,36	0,16	0,02

786-carcinoma de rim, HEp-2- carcinoma de laringe e HT-29- carcinoma de cólon. NR= Não realizado;

6. DISCUSSÃO

6.1 Bioensaio *Allium cepa*

6.1.1 Potencial Antiproliferativo

6.1.1.1 Toxicidade

Alterações morfológicas ou inibição do crescimento das raízes foram parâmetros adotados para avaliar a toxicidade dos extratos testados. Este efeito pôde ser observado na forma intumescida das raízes, na coloração, no aspecto pegajoso e escurecido e, ainda no tamanho das raízes, contrapondo-se às do controle, indicando que alguns dos extratos tiveram ação tóxica sobre as raízes. No período de 20 horas, não houve redução do crescimento radicular em relação ao controle, para todos os extratos testados, permitindo inferir que, para este tempo de exposição, o extrato não afetou o ciclo celular.

A redução do crescimento das raízes em todos os tratamentos após 72 horas de tratamento, notadamente naqueles cujos extratos foram preparados com água quente (CH-1, CH-2 E CH-3), indicam que o efeito tóxico dos extratos não é imediato.

Sabe-se que o crescimento das raízes se dá pela formação de novas células, por meio do ciclo de divisão, que ocorre na zona meristemática e pela extensão das células já formadas, que ocorre tanto na zona meristemática como na zona de alongamento da raiz (López-Sáez *et al.*, 1969; Carmona e Cuadrado, 1986). A correlação observada no presente trabalho indica que a divisão celular foi um componente determinante para a extensão das raízes, exceto para as raízes expostas ao extrato de CH-2 por 72 h. A ação do tempo de exposição e da água quente parecem potencializar o efeito da erva-mate.

O efeito de infusão de plantas utilizadas com fins medicinais sobre o ciclo celular de *Allium cepa* têm sido utilizado por vários autores (CAMPAROTO *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2003; KNOLL *et al.*, 2006; FACHINETTO *et al.*, 2007, BAGATINI *et al.*, 2007), os quais mostraram que os principais efeitos observados foram aumento ou diminuição da proliferação celular de pontas de raízes tratadas. A

inibição do crescimento da raiz é resultado da inibição da divisão celular levando à diminuição do índice mitótico (LIU et al., 1992).

A interferência na divisão celular causada pela ação do extrato com efeito sobre o desenvolvimento do sistema radicular, provavelmente representa um dos mecanismos de ação do extrato sobre o desenvolvimento da planta teste (PIRES et al., 2001). Neste trabalho, a redução do crescimento das raízes após 72 horas de tratamento com os extratos a quente, indica um provável potencial tóxico em decorrência do tempo de exposição. Vale ressaltar que, embora o extrato tenha sido preparado de acordo com as orientações dos fabricantes, ou seja, por infusão em água quente, o tratamento das raízes foi feito, em todos os casos, com a solução em temperatura ambiente, o que descarta a ação da temperatura elevada como causa dos resultados observados, conforme relatam autores, dentre eles, Candreva et al. (1993), Barros, et al. (2000), De Stefani et al. (2002), Sewram (2003).

6.1.1.2 Citotoxicidade

A) Índice Mitótico

O índice mitótico e índice de replicação são usados como indicadores de proliferação adequada das células (GADANO et al., 2002), o que pode ser medido através do sistema teste vegetal de *Allium cepa*.

Levando em consideração os dados constantes em estudos anteriores, e em confronto com o controle, os resultados obtidos neste trabalho mostram que em 20 horas, houve estímulo à divisão celular das células submetidas aos extratos CH-1 e CH-2, o que levou ao aumento do índice mitótico. Entretanto, em 72 horas, quando comparada ao controle e à CH-1, os extratos da erva-mate CH-3 e CH-2 inibiram a divisão celular, causando declínio do índice mitótico das células expostas.

O nível de citotoxicidade pode ser determinado pela taxa de diminuição do índice mitótico. A redução do índice mitótico para valores inferiores a 22% do valor do controle negativo causa efeitos letais nos organismos teste (ANTONISIEWICZ, *apud* SMAKA-KINCL et al., 1996), enquanto uma diminuição até 50%, usualmente

tem efeitos sub-letais. O nível de 50% é chamado de valor limite de citotoxicidade (SMAKA-KINC et al., 1996).

Neste estudo, as células tratadas com extrato da erva-mate CH-3, por 20 h, apresentaram redução do índice mitótico em 40% e CH-2 redução de 52%, no tratamento de 72 h, ambas em relação ao controle. Portanto, conforme os valores anteriormente citados, extrato de CH-3 demonstrou ser citotóxico sob as condições utilizadas no presente estudo e baseando-se nos dados estatísticos. O percentual de citotoxicidade observado após tratamento com CH-2, demonstrou que o mesmo apresentou seu efeito muito próximo do limite de citotoxicidade.

Para possibilitar a avaliação dos efeitos ou danos que agentes mutagênicos podem causar, faz-se necessário que a célula esteja em constante divisão mitótica, objetivando identificar os efeitos tóxicos e alterações ocorridas ao longo de um ciclo celular (SILVA et al., 2003).

Estudos citogenéticos de espécies vegetais informam a respeito de possíveis alterações cromossômicas decorrentes do próprio metabolismo ou devido à presença de agentes mutagênicos (BAGATINI et al., 2007; FONSECA et al., 2000), que podem ser detectados, citologicamente, pela inibição do ciclo celular.

De acordo com Amaral (2007), misturas complexas apresentam componentes que podem interagir entre si e com os organismos, causando efeitos genotóxicos e citotóxicos. Assim, seja analisando misturas complexas ou determinada substância, as alterações no índice mitótico são consideradas parâmetros citotóxicos que permitem estimar o nível de citotoxicidade na amostra estudada.

B) Índice de Fases

Sabe-se que a duração do ciclo celular é diferente em diferentes temperaturas de crescimento e que a proporção relativa de células em cada fase da mitose mantém-se constante em qualquer temperatura.

Neste trabalho, os bulbos de *A. cepa* submetidos aos extratos obtidos por infusão (CH-1, CH-2 e CH-3) permaneceram em temperatura controlada (25°C) e a análise das diferentes fases do ciclo celular evidencia que, tanto em 20 horas quanto

em 72 horas, houve prolongamento da prófase nos três tratamentos, indicando uma possível influência do extrato na formação do fuso mitótico.

De acordo com Chandra et al.,(2005), efeitos altamente tóxicos promovem atraso nos *checkpoints* do ciclo celular ou ainda morte celular, se as lesões no DNA não são reparadas. O prolongamento da prófase pode ter sido resultado de toxicidade nas fibras do fuso mitótico.

Nas fases seguintes, em 20 horas, houve compensação do tempo dispensado em prófase, fazendo com que as células apresentassem inibição à divisão celular. Apenas o extrato CH-3 apresentou aumento significativo da atividade proliferativa, em relação às demais, mas não em relação ao controle, com o qual manteve a média.

Após 72 horas, constatou-se a redução do índice de fase das células tratadas com CH-2 (46% no índice de metáfase e 50% no índice de anáfase), quando comparado ao grupo controle. Porém, esses resultados foram superiores aos obtidos após tratamento das raízes com os extratos das duas outras marcas comerciais (CH-1 e CH-3).

Para telófase 20 horas, apenas o resultado das células do tratamento CH-3 foram superiores quando comparada às demais, mas não em relação ao controle. Após 72 horas, verificou-se aumento significativo de células em morte celular, para todos os tratamentos, comparados ao controle.

É interessante considerar sempre que, nas células estudadas, como em todas as células, o desenvolvimento do ciclo celular é menos plástico e mais dependente de um estreito controle genético, mediado por reações de fosforilações e desfosforilações de proteínas específicas, muitas delas envolvidas nestes mesmos eventos da mitose. Nesse sentido, somente estudos moleculares de detecção da diversidade genética ou da expressão gênica poderiam revelar se o controle genético é ou não modificado em cada condição de estudo.

6.1.2 Potencial Mutagênico

6.1.2.1 Mutagenicidade

Aberrações cromossômicas são parâmetros utilizados para avaliar a genotoxicidade de produtos químicos (TOPASHKA-ANCHEVA et al, 2003) e o ensaio com *A. cepa* apresenta-se como um bioindicador ideal para o primeiro *screening* da genotoxicidade de infusões de plantas (BAGATINI et al., 2007), sendo um sensor para a detecção de genotoxicidade em *I. paraguariensis* no presente estudo.

Nos três extratos preparados com água gelada (tereré) não foram observadas frequências de alterações cromossômicas significativamente diferentes em relação ao controle, nos dois períodos de tratamento (20 e 72 horas).

Nos extratos obtidos com água quente (chimarrão), com tempo de exposição de 20 horas, foram observadas alterações cromossômicas, tais como aderência, migração precoce, migração tardia, metáfase desorganizada, ponte anafásica, nos três tratamentos, as quais não foram significativas quando comparadas entre si e com o controle. Entretanto, com 72 horas de exposição, as raízes tratadas com os extratos de CH-2 e CH-3 apresentaram alterações significativas em relação ao controle e a CH-1.

O efeito genotóxico de várias espécies de plantas medicinais tem sido analisado, utilizando-se do teste de *Allium cepa*, tais como: *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* L. Skeels, *Cissus sicyoides* L. (VICENTINI et al., 2001); *Maytenus ilicifolia* Mart., *Bauhinia candicans* Benth (CAMPAROTO et al., 2002) *Psidium guajava* L., *Achillea millefolium* L. (TEIXEIRA et al., 2003). Nestes trabalhos, as raízes de *A. cepa* foram expostas aos extratos respectivos por período de 24 horas e em concentrações diferentes. Estes autores observaram efeito antiproliferativo em todas as plantas testadas. Entretanto, nenhuma destas plantas apresentou potencial mutagênico, conforme observado no presente trabalho.

6.1.2.2 Tipos de alterações

Neste estudo, C-metáfases, metáfases desorganizadas, migrações precoces ou tardias, pontes metafásicas ou anafásicas e aderências, foram observadas nos três tratamentos com água gelada (tereré) cuja frequência não foram estatisticamente significativos quando comparado com o controle negativo.

Segundo Fiskesjö (1993b), quebras cromossômicas podem causar fragmentos e pontes anafásicas. Dessa forma, a porção da cromatina entre os dois centrômeros estende-se até o outro lado da célula entre os pólos, impedindo ou atrasando a separação das duas células-filhas. Este tipo de aberração ocorre em células humanas e é essencialmente sempre letal. É possível que as pontes resultem, também, de aderências cromossômicas, podendo, neste caso, serem múltiplas e persistirem até a telófase.

De acordo com MARCANO et al. (1998), aderência cromossômica é um sinal comum da ação tóxica sobre o material genético e decorre, provavelmente, em um efeito irreversível para a célula. A manifestação da aderência pode ser bastante variável, envolvendo poucos cromossomos ou todo o genoma. Em casos de total aderência, a impossibilidade da separação cromossômica provoca a formação de núcleos picnóticos, que resultam na degeneração total da cromatina (GIACOMELLI, 1999). Apesar de inúmeros estudos descreverem a ocorrência de aderência cromossômica, a causa primária e a base bioquímica do fenômeno permanecem desconhecidas.

Dentre os compostos químicos apontados como causadores de aderências cromossômicas estão o Mg e o Al (LEME; MARIN-MORALES, 2009). A alta concentração de Mg e a presença de Al na infusão da erva-mate (HEINRICHS et al., 2001), permitem inferir que as aderências cromossômicas observadas neste estudo estejam relacionadas com a presença destes compostos nos extratos de *I. paraguariensis*.

Nos extratos obtidos com água quente (chimarrão), as frequências de aberrações cromossômicas observadas após 20 horas, não apresentaram diferença estatística significativa entre os três tratamentos (CH-1, CH-2 e CH-3), quando comparados entre si e mesmo quando comparados ao controle, exceto para CH-1. Após 72 horas de tratamento, o número de células anormais aumentou consideravelmente, apontando para uma ação mutagênica em *Allium cepa*. Este resultado foi estatisticamente significativo quando comparado com o controle.

A alteração mais evidenciada neste trabalho foi fragmentação da cromatina, principalmente nas células tratadas com CH-2 e CH-3, demonstrando que estes extratos inibiram a divisão celular, em 72 h e 20 h, respectivamente, o que indica sua atividade citotóxica.

O aumento expressivo no número de células em apoptose e a inibição do ciclo celular, foram as alterações observadas por Vieira et al. (2009), que fizeram com que os autores apontassem efeito genotóxico do extrato de *Matricaria recutita*, no sistema teste *A. cepa*.

A eliminação completa de genoma, aberrações cromossômicas e aumento de micronúcleos, são alterações celulares observadas em estudos utilizando agentes antimitóticos. Esses trabalhos evidenciaram que quanto maior o tempo de exposição ao tratamento, maior o número de células com alterações (ABREU, 2006).

As células represadas em prófase indicam o efeito antiproliferativo (citotóxico) do extrato de *I. paraguariensis* e, embora metáfase e telófase tenham sido bastante curtas, não foi possível recuperar o ritmo normal de divisões celulares.

A redução do IM possivelmente está relacionado com a elevada frequência de alteração cromossômica, sobretudo, das células anucleadas que impossibilitaram, de maneira irreversível, a permanência das células no ciclo normal.

6.2 Bioensaio Cultura de Células

A potencial atividade antineoplásica (citotóxica) dos extratos foi avaliada em três linhagens de células neoplásicas (HEp-2, 786-0 e HT-29) e uma linhagem de células normais (VERO). Na busca de agentes anticâncer, extratos obtidos a partir de produtos naturais são considerados ativos quando apresentam $IC_{50} \leq 30\mu\text{g/mL}$ (ITARATH et al., 2004).

No presente trabalho os menores valores de IC_{50} (Tabela 2), foram para CH-1, 344 $\mu\text{g/mL}$ (10min) e 160 $\mu\text{g/mL}$ (20 minutos) em células de câncer de rim. Da mesma forma, Ramirez-Mares et al. (2004) realizando experimentos de citotoxicidade pelo método MTT, em células HEpG2 (carcinoma de fígado), com extrato de *I. paraguariensis* obtido por infusão por 10 minutos, também evidenciaram atividade citotóxica para o extrato.

A grande maioria das pesquisas refere-se a erva mate beneficiada para chimarrão, ou seja, erva mate, verde, seca e cancheada. A torrefação promove mudanças na composição química da erva mate, como a degradação da cafeína e

de ácidos fenólicos e a formação de melanoidinas, pirazinas e piriminas, assim como altera a cinética de extração dos compostos bioativos, o que pode levar a modificações na biodisponibilidade em atividades biológicas, como a atividade antioxidante (BASTOS et al., 2006)

Na avaliação de extratos com atividade anticâncer é utilizado o índice de seletividade (IS), sendo considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991). Este índice possibilita inferir que, se um extrato é mais citotóxico (seletivo) para a linhagem neoplásica do que para a linhagem normal, o extrato tem uma ação anticâncer.

Na dose de 500µg/mL e em tempo de 10 minutos de infusão, o extrato a quente CH-1, foi 15,13 vezes mais potente (seletivo) em células de carcinoma de rim (786) do que na linhagem normal (VERO), seguido de CH-3 (6,75) e CH-2 (4,07) indicando uma possível ação anticâncer principalmente para as duas primeiras marcas (Tabela 6). Entretanto a ação da erva-mate CH-1 no sistema-teste é drasticamente reduzida quando a extração é feita com 20 minutos de incubação, uma vez que houve um grande aumento na citotoxicidade em células normais, levando a uma diminuição na seletividade (de 15,13 para 5,43).

Verifica-se que o aumento da dose para (1000µg/mL) em células 786 e no tempo de incubação de 20 minutos, causa condição semelhante para vários extratos, ou seja, aumento da citotoxicidade para a célula normal. Além disso, a seletividade foi menor em todos os extratos nesta concentração e nos dois tempos de incubação, com exceção de CH-2. Nas outras duas linhagens testadas a seletividade foi menor que 2,0, portanto com atividade citotóxica semelhante.

Ressalta-se que nos experimentos cujos extratos foram obtidos com água gelada apenas o produto TE-3 apresentou inibição de crescimento em células 786 principalmente na concentração de 1000 µg/mL, na qual apresentou seletividade maior que 2,0.

Ramirez-Mares et al. (2004) observaram a capacidade de extratos de erva-mate inibir a proliferação celular através do seu teor de flavonóides. Os flavonóides são o mais importantes em extratos de erva-mate e foram capazes de inibir a proliferação de carcinoma bucal através da inibição da topoisomerase II (MEJIA et al. 2005).

Nesse último estudo, também foram utilizados extratos de diversos produtos comerciais de *I. paraguariensis*, obtidos com água quente em infusão de 10 minutos,

para verificar sua ação na proliferação de células de carcinoma bucal, através da inibição da topoisomerase. O teor total de flavonóides variou entre as marcas comerciais estudadas, e nenhuma correlação foi encontrada entre a sua quantidade e o grau de inibição da topoisomerase em culturas de células. Estes autores concluíram que os extratos de *I. paraguariensis* inibem a proliferação das células de câncer oral, além de não ser citotóxico para as células normais e pré-cancerígenas tendo, portanto, resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo.

O extrato potencialmente mais ativo em células neoplásicas foi CH-1, o que poderia indicar alguma atividade anticâncer, além de não ser citotóxico para a linhagem de células normais de mamíferos testadas. Corroborando os benefícios deste produto comercial, no sistema *A. cepa* ele também não foi citotóxico. Por outro lado, embora CH-2 e CH-3 tenham apresentado IC_{50} próximo na dose de 500µg/mL em células de carcinoma de rim e alguma seletividade para as células neoplásicas, CH-3 foi citotóxico no ensaio *A. cepa*.

Embora fosse esperado que as marcas dos produtos comerciais de chimarrão e tereré apresentassem o mesmo comportamento em relação aos efeitos antiproliferativo, mutagênico e antineoplásico, uma vez que se tratava da mesma espécie (*I. paraguariensis*), os resultados do presente estudo, podem estar relacionados ao local do plantio, à idade da planta, bem como a data da colheita e a sazonalidade, uma vez que estes fatores podem causar modificações nos teores dos constituintes químicos das espécies vegetais, conforme exposto por Maciel et al. (2002), Mejia et al. (2005), Rakocevic et al. (2006) e Schubert et al. (2006).

7 CONCLUSÕES

- Os extratos dos produtos comerciais da erva-mate (*I. paraguariensis*) preparados com água gelada não apresentaram efeitos mutagênicos no ensaio *Allium cepa*.

- Dois dos extratos preparados com água quente (CH-2 e CH-3) foram considerados citotóxicos no ensaio de *Allium cepa*, apresentando efeito antiproliferativo em um único ciclo celular (CH-3) e após vários ciclos celulares (CH-2). Estes dois extratos também apresentaram potencial mutagênico elevado, com alta frequência de células anucleadas.

- O Teste de *Allium cepa* mostrou ser um bioensaio adequado para as análises propostas no presente estudo, tendo sido observada a convergência dos parâmetros analisados na obtenção do resultado final.

- O extrato da amostra de erva-mate (*I. paraguariensis*) preparado a quente (CH-1) foi mais citotóxico em células de carcinoma de rim (HEp-2) do que em células normais (maior seletividade), seguido de CH-3 e CH-2.

- O aumento do tempo de incubação de 10 para 20 min. nos extratos preparados com água quente, aumentou a citotoxicidade nas células normais (VERO), reduzindo drasticamente a seletividade em células de carcinoma de rim.

- O produto comercial CH-1 não foi citotóxico para células normais (VERO e células meristemáticas de *Allium cepa*), sendo citotóxico para células de carcinoma de rim, o que poderia indicar uma ação anticâncer.

- Os extratos de erva-mate (*I. paraguariensis*) preparados com água quente apresentaram efeitos distintos entre as marcas comerciais testadas, as quais demonstraram potencial tanto para retirar células do seu ciclo normal (CH2 e CH3) quanto para agir sobre células neoplásicas (CH1).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu JC, Davide LC, Pereira AV, Barbosa S. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos. *Pesq. agropec. bras.* 2006; 41:1629-1635.

Albuquerque UP, Hanazaki N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2006; 16:678-689.

Akinboro A, Bakare AA. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *J. Ethnopharmacol.* 2007;112: 470–475.

Amaral AM, Barbério A, Voltolini JC, Barros L. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do Rio Tapanhon (SP- Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). *Rev. Bras. Toxicol.* 2007; 20:65-72.

Angelo P M, Jorge N. Phenolic compounds in foods – A brief review. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 2007; 66:1-9.

Antonsiewicz D. Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of Ledakrin. *Folia Histochem Cyto.* 1990; 28:79-96.

Bagatini MD, Silva AC F, Tedesco SB. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Braz J. Pharmacogn.* 2007; 17:444-447.

Barros SGS, Ghisolfi ES, Luz LP, Barlem GG, Vidal RM, Wolff FH, Magno VA, Breyer HP, Dietz J, Bruber AC, Kruel CDP, Prolla JC. Mate (chimarrão) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. Arq. Gastroenterol. 2000; 37(1):25-30.

Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Torres EAFS. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. Braz. Arch. Biol. Technol. 2006; 49:399-404.

Bates MN, Hopenhaynb C, Rey OA, Moore LE. Bladder cancer and mate consumption in Argentina: A case-control study. Cancer Letters. 2007; 246: 268-273.
Berkal D, Braga CA. 500 Anos de Historia da Erva-mate. Porto Alegre: Editora Cone Sul; 2000.

Bixby M; Spieler L, Menini T; Gugliucci A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. Life Sci. 2005; 77: 345-35.

Bogo D, Matos MFC, Honda NK, Pontes,ERJC, Oguma PM, Santos, EC, Carvalho JE, Nomizo A. In vitro Antitumour Activity of Orsellinates. Z Naturforsch C. 2010; 65c: 43 - 48.

Bracesco N, Dell M, Rocha A, Behtash S, Menini T, Gugliucci A, Nunes E. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. J Altern. Complement. Med. 2003; 9: 379-387.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada n° 277, de 23 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. Diário Oficial da União, 2005.

Camparoto ML, Teixeira RO, Mantovani MS, Vicentini VEP. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. And *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion roottip and rat bone-marrow cells. Genet Mol Biol. 2002; 25:85-89.

Candrea, EC, Keszenman, DJ, Barrios, E, Gelos U, Nunes E. Mutagenicity induced by hyperthermia, hot mate infusion, and hot caffeine in *Saccharomyces cerevisiae*. Cancer Res. 1993; 53:5750–5753.

Carmona MJ, Cuadrado A. Analysis of Growth Components in *Allium cepa*. Planta. 1968:183-189.

Carvalho PER. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003-2006. 2 v. (Coleção espécies arbóreas brasileiras, v. 1-2).

Chandra S, Gonzalez EM. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. J Agr Food Chem. 2004; 52: 3583-3589.

De Stefani E, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Correa P, Ronco AL, Brennan P, Ferro G, Acosta G, Mendilaharsu M. Non-alcoholic beverages and risk of bladder cancer in Uruguay. BMC Cancer. 2007; 29: 7- 57.

De Stefani E, Fierro L, Mendilaharsu M, Ronco A, Larrinaga MT, Balbi JC, Alonso S, Deneo-Pellegrini H. Meat intake, 'mate' drinking and renal cell cancer in Uruguay: a case-control study. *Br. J. Cancer.* 1998; 78:1239-1243.

De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Boffetta P, Brennan P, Muñoz N et al. Food groups and risk of squamous cell carcinoma of the esophagus: a case-control study in Uruguay. *British J Cancer.* 2002; 89: 1209–1214.

El-Ghamery AA, El-Nahas AI, Mansour MM. The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cytologia.* 2000; 65:277-287.

Ferrari E. Os potenciais da cadeia produtiva da erva-mate como fator de desenvolvimento regional sustentável do Médio Alto Uruguai do Rio Grande do Sul, Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2006.

Feretti D, Zerbini I, Zani C, Ceretti E, Moretti M, Monarca S. *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. *Food Addit Contam.* 2007; 24:561-572.

Fiskesjö G. *Allium cepa* II: Assessment of a Chemical's Genotoxic Potencial by Recording Aberrations in Chromosomes and Cell Divisions in Root Tips of *Allium cepa* L. *Environ Toxic Water.* 1994; 9:235-241.

Freshney IR. Culture of animal cells. A manual of Basic Technique. 3º ed. New York, Wiley-Liss. 1994.

Fonseca CA, Otto SS, Paumgarten FJ, Leitão AC. Nontoxic, mutagenic, and clastogenic activities of Mate-Chimarrão (*Ilex paraguariensis*). J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2000;19: 333-346.

Funari CS, Ferro VO. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. Rev Bras Farmacogn. 2005;15(2).

Gadano A, Gurni A, López P, Ferraro G, Carballo M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*.L. J Ethnopharmacol. 2002; 8:11-16.

Garcez FR, Garcez WS, Martins M, Matos MFC, Gutierrez ZR, Mantovani MS, Misu CK, Nakashita ST. Cytotoxic and Genotoxic Butanolides and Lignans from *Aiouea trinervis*. Planta Medica. 2005; 71(10): 923-927.

Garcez FR, Garcez WS, Santana ALBD, Alves MM, Matos MFC. Bioactive Flavonoids and Triterpenes from *Teminalia fagifolia*. J Braz Chem Soc. 2006; 17:1223-1228.

Gerhardt M, Nodar, ES. A Produção da Erva-Mate na Perspectiva da História Ambiental. Rev Bras de Agroecologia. 2009; 4.

Giacomelli FRB. Avaliação do Comportamento Meótico em Variedades de Aveia (*Avena sativa*) Recomendadas para a Região Sul. Dissertação. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 1999.

Gnoatto SCB. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. Eur J Med Chem. 2008; 43:1865-1877.

Goldenberg D, Juna Lee BS, Koch WM, Kim MM, Trink B, Sidransky D, Chul-So M. Habitual risk factors for head and neck cancer. Otolaryng Head Neck. 2004; 131:986-993.

Gonzalez ME, Song YS, Ramirez-Mares MV, Kobayashi H. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. J Agric Food Chem. 2005; 53:1966–1973.

Heinrichs R, Malavolta E. Composição Mineral do Produto Comercial da Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Cienc. Rural. 2001; 31.

Heck CI, Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. J Food Sci. 2007; 72.

Henriksson E, Kjellén E, Wahlberg P, Wennerberg J, Kjellstrom JH. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. In Vitro Cell. Dev. Biol. 2006; 42: 320-323.

Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*. 2007; 42:377-387.

Houk V. The genotoxicity of industrial wastes and effluents - a review. *Mutat Res*. 1992; 277: 91-138.

Instituto Brasileiro do Câncer. Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil. [acessado em 14/02/10]. Disponível em: www.inca.gov.br/estimativa/2010/

Keepers YP, Pizao EP, Peters G J, Van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo, HM. Comparison of the sulphorhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur J Câncer*. 1991; 27(7): 897-900.

Lara Cardozo E, Ferrarese-Filho O, Cardozo-Filho L, Ferrarese MLL, Donaduzzi CM, Sturion JA. Methlxantines and fenolic compounds contents in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) progenies grown in brazil. *J Food Compost. Anal*; 2007; 20: 1-10.

Leitão AC, Braga, RS. Mutagenic and genotoxic effects of mate (*Ilex paraguariensis*) in prokaryotic organisms. *Braz J Me. Biol Res*. 1994; 27:1517-1525.

Leme DM, Marin-Morales MA. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat Res.* 2009; 682(1):71-81.

Lessa LCB. História do chimarrão. 3 ed. Porto Alegre: Ed. Sulina, 1986.

Linhares T. História econômica do mate. Rio de Janeiro: Ed. José Olympio. Coleção Documentos Brasileiros, 1969.

Liu D, Jiang W, Li M. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Hereditas.* 1992; 117: 23-29.

López-Sáez JF, González-Bernáldez F, González-Fernández A, García-Ferrero G. Effect of Temperature and Oxygen Tension on Root Growth, Cell Cycle and Cell Elongation. *Protoplasma.* 1969; 67: 213-221.

Maccari Junior, A. Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. Curitiba: Câmara Setorial de Cadeia Produtiva da erva-mate. 2000.

Maciel MMA, Pinto AC, Veiga VE, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova.* 2002; 25: 429-438.

Machado CCB, Bastos DHM, Janzantti NS, Facanali R, Marques MOM, Franco, MRB. Determinação do perfil de compostos voláteis e avaliação do sabor e aroma de bebidas produzidas a partir da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Quím Nova. 2007; 30:513-518.

Marcano L, Carruyo I, Campo AD, Montiel X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L.. Environ. Res. 2004; 94:221-226.

Marcano L, Bracho M, Montiel X, Carruyo I, Atentico L. Efecto mitotxico y genotxico del cadmio en células meristematicas de *Allium cepa* L. (cebolla). Ciencia. 1998; 6: 93-99.

Matos MFC, Leite LISP, Brustolim D, Siqueira JM, Carollo CA, Hoellman AR, Pereira NFG, Silva DB. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. Fitoterapia. 2006; 77:227-2292.

Matsumoto RLT. Atividade antioxidante do chá mate (*Ilex paraguariensis*). [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo; 2009.

Meija, E. G.; Song, Y. S.; Ramirez-Mares, M. V.; Kobayashi, H. Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea on Topoisomerase Inhibition and Oral Carcinoma Cell Prolifertion. J Agric Food Chem. 2005; 53:1966-1973.

Miloca MM, Lobo DS, Martins RS. Determinação dos principais atributos da logística de suprimentos na Agroindústria ervateira do Paraná. Anais do IX Simpósio de Administração da Produção, logística e Operações internacionais. IX SIMPOI, 2006.

Moraes DSL, Jordão BQ. Evaluation of the genotoxic potential of municipal waste water discharged into the Paraguay river during periods of flood and drought. Environ Toxicol. 2001; 16:113-116.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65:55-63.

Odeigah PGC, Nurudeen O, Amund OO. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. Hereditas; 1997.

Pires NM, Souza IRP, Prates HT, Faria TCL, Filho IAP, Magalhães PC. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. Rev Bras Fisiol Veg. 2001; 13:55-65.

Rakocevic M, Medrado MJS, Lucambio F, Valduga TA. Caracterização de crescimento do caule da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivada em dois ambientes luminosos contrastantes. 4º Congresso Sudamericano de la Yerba Mate - In: 4º Reunión Técnica de la Yerba Mate; 2º Exposición de Agronegocios de la Yerba Mate. Posadas, Argentina, 2006.

Ramirez-Marez MV, Chandra S, De Meija EG. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutat Res.* 2004; 554:53-65.

Rodrigues, ERV. Efeito antioxidante da erva mate (*Ilex paraguariensis*) em voluntários sadios. [Dissertação]. Bragança Paulista: Universidade São Francisco-SP; 2009.

Ronco AL, Barrios E, Fierro L, Balbi J, Larrinaga MT, De Stéfani E. Risk factors for esophageal cancer in non-smokers and non-drinkers: a case-control study in Uruguay. *Rev Bras Epidemiol.* 2004; 7:383-391.

Rubinstein LV, Shoemaker KD, Paull RM. *In Vitro* Anticancer-Drug-Screening. *J Natl Cancer I.* 1990; 82:1113-1118.

Schinella GR, Troiani G, Dávila V, De Buschiazzi PM, Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 269: 357-360.

Schubert A, Zanin FF, Pereira DF, Athayde ML. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Quím Nova.* 2006; 29:1233-1236.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988; 48(17):4827-33.

Selene, MM, Cavalcanti, ESB, Costa, SMO, Aguiar, LA. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1B): 315-320, 2009.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. *J Natl Cancer I.* 1990; 82: 1107-1112.

Smaka-Kincl V, Stegnar P, Lovka M, Toman MJ. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. *Mutat Res.* 1996; 368: 171-179.

Silva DB, Matos MFC, Nakashita SN, Misu CK, Yoshida NC, Carollo CA, Fabri JR, Miglio HS, Siqueira JM. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. *Quím Nova.* 2007; 30(8).

Silva CR, Monteiro MR, Caldeira-De-Araujo A, Bezerra RJAC. Absence of mutagenic and cytotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia Vahl.*) evaluated by microbiological tests. *Rev Bras farmacogn.* 2004; 14:1-3.

Simionatto E, Cancido ACS, Poppi NR, Peres MTLP, Oguma PM, Santos EC. Matos MFC, Hess SC, Bonani VFL, Carvalho JE, Diraimo DL. Bioactivity and Chemical Composition of the Essential Oils of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *J Essential Oil-Bearing Plants*. 2009; 12:250-261.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. *J Natl Cancer I*. 1990; 82: 1107-1112.

Suffness M. ; Pezzuto. *Methods in Plant Biochemoistry, Assays for Bioactivity*. London: Academic Press; 1991.

Topashka-Ancheva, M.; Metcheva, R.; Teodorova, S. A comparative analysis of the heavy metal loading of small mammals in different regions of Bulgaria II: Chromosomal aberrations and blood pathology. *Ecotoxicol Environ Saf* . 2003; 54:188-193.

Varanda, EA. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2006; 27(1):1-7.

Vicentini VEP, Camparoto ML, Teixeira RO, Mantovani MS. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. *Acta Scientiarum*. 2001; 23:593-598.

Vieira A, Guimarães MA, David GQ, Karsburg IV, Campos AR. Efeito genotóxico da infusão de capítulos florais de camomila. Rev Tróp Ciênc Agr Biol. 2009;3(1):8.

Wendt SN. Genética de Populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil. [Tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.

Zettler CG, Jotz PG, Menezes HS, Alves RJV, Buzzatti C, Oliveira MD, MontesTHM. (2006): Estudo experimental da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) como agente etiológico de neoplasia do trato aero-digestivo: Inter Arch of Otorhi. 2006; 10:306-311.