

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO EXTRATO DE ILEX PARAGUARIENSIS ST. HILL¹

Micaela Ferreira Viana², Greice Franciele Feyh Dos Santos Montagner³, Guilherme Wildner⁴.

¹ Trabalho de conclusão de curso para o curso de Ciências Biológicas Modalidade Bacharel da Unijuí

² Acadêmica do curso de Ciências Biológicas Modalidade Bacharelado da Unijuí

³ Professora Doutora em Ciências Biológicas integrante do Departamento de Ciências da Vida da Unijuí

⁴ Bolsista PROBIC/FAPERGS e acadêmico do Curso de Ciências Biológicas Modalidade Bacharelado Unijuí

INTRODUÇÃO

Popularmente, a *Ilex paraguariensis* é consumida na forma de bebidas à base da infusão da folha. Estas infusões têm sido cada vez mais consumidas devido à presença de compostos bioativos que apresentam propriedades antioxidantes (Miranda et al., 2008) antiobesogênica (Colpo, 2012), antimutagênica (Arçari, 2009), potencial vasodilatador, analgésico e antibacteriano (Heck;Mejla, 2007). Entre os principais compostos bioativos da *I. paraguariensis* estão os polifenóis, saponinas e xantinas (Colpo, 2012) e estas substâncias são conhecidas por exercerem diversos efeitos benéficos ao organismo.

Experimentos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que estes compostos podem atuar como “sequestradores” de radicais livres e quelantes de metais agindo tanto na etapa de iniciação como na de propagação de processos oxidativos (Colpo, 2012). Desta forma, têm se associado a estas espécies a capacidade de proteger as biomoléculas do surgimento de danos, em especial o DNA. O surgimento de danos no DNA tem sido associado ao surgimento de diversas doenças crônicas, dentre elas o câncer.

Usualmente existem diversos ensaios que monitoram os danos no DNA, dentre estes podemos destacar o teste cometa (Ostling e Johansons, 1984; Collins, 2004). Esse teste permite o estudo quantitativo e qualitativo de danos no núcleo do DNA a partir de células isoladas, tendo como principal vantagem a utilização de um pequeno número de células que não necessariamente estejam em divisão (Silva, 2007; Ventura et al., 2013).

Embora hajam benefícios relacionados às infusões de *Ilex paraguariensis*, devem ser considerados também os estudos sobre sua toxicidade. Estudos revelam genotoxicidade para *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* através do teste do micronúcleo (Albas et al., 2014) e justificam altas taxas de mortalidade por câncer de bexiga observadas no Uruguai combinando o hábito de fumo e ingestão de mate (De Stefani et al., 1998).

Porém, alguns estudos sugerem que a alta temperatura em que a bebida é ingerida que pode atingir valores superiores a 60°C em algumas localidades no Sul do Brasil, seria o único fator de risco (Barros et al., 2000; Muñoz et al., 1987; Victoria et al., 1987; Bastos e Torres, 2003).

Contudo, ainda são escassos os estudos relacionados ao efeito do extrato de *Ilex paraguariensis* sobre o DNA de células humanas. Desta forma, neste estudo, através de um teste *in vitro* busca-se esclarecer o potencial genotóxico do extrato de *Ilex paraguariensis* sobre o DNA de leucócitos humanos obtidos de indivíduos adultos saudáveis.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

METODOLOGIA

Preparo do extrato

O extrato de *Ilex Paraguariensis* foi preparado através de infusões de folhas da espécie em água destilada a 80°C por 15 minutos. Após o extrato foi evaporado e liofilizado e armazenado a -20°C até a sua utilização. Para a utilização nos testes *in vitro*, o pó liofilizado foi diluído em água destilada na concentração de 200 mg/ml.

Preparo das amostras e teste *in vitro*

As coletas foram realizadas de novembro a dezembro de 2015 no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul- UNIJUÍ, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da mesma universidade. Foram coletadas amostras de 5 voluntários saudáveis, com idade entre 18 e 40 anos e não tabagistas.

Análise de danos no DNA pelo teste Cometa

Para a avaliação de danos no DNA foi utilizado o teste Cometa, com base no protocolo para detecção de danos em células eucarióticas em condições alcalinas, de acordo como descrito por Singh et al. (1988).

Após tratamento, as suspensões celulares foram misturadas com agarose e dispostas em lâminas de microscopia pré-cobertas com agarose, e logo após imersas em solução de lise. Após a lise, as lâminas foram submetidas ao tratamento alcalino e em seguida à eletroforese. Posteriormente foi realizada a neutralização, fixação e coloração das lâminas. As células foram analisadas em microscópio óptico e o dano classificado visualmente de zero a quatro (conforme a extensão da migração) e calculado o índice de danos (multiplicando o número de células pela classe do dano) obtendo-se o índice de danos de 0-200. (Tice et al., 2000). Todas as amostras foram analisadas em quadruplicata.

Análise estatística

Os dados obtidos foram registrados em uma planilha eletrônica Excel e posteriormente foram transferidos e analisados pelo programa estatístico SPSS versão 12.0. Variáveis quantitativas foram analisadas pelos testes Student t, análise de variância One-way. Foram consideradas significativas as comparações com $p < 0,05$.

Aspectos éticos

O estudo é registrado sob o número 48113115.3.0000.5350 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (UNIJUÍ) sob o número 1.314.273. Todos os voluntários que participaram do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

Resultados e discussão

Durante a pesquisa foram coletadas amostras de sangue para tratamento de cinco voluntários que atendiam os requisitos de inclusão nesse trabalho, porém só foi possível realizar a contagem celular e análise estatística de danos de um paciente, pois as demais amostras apresentaram quantidades insuficientes de células, não sendo viáveis à significação de resultados. No entanto, as análises foram realizadas em quadruplicata e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

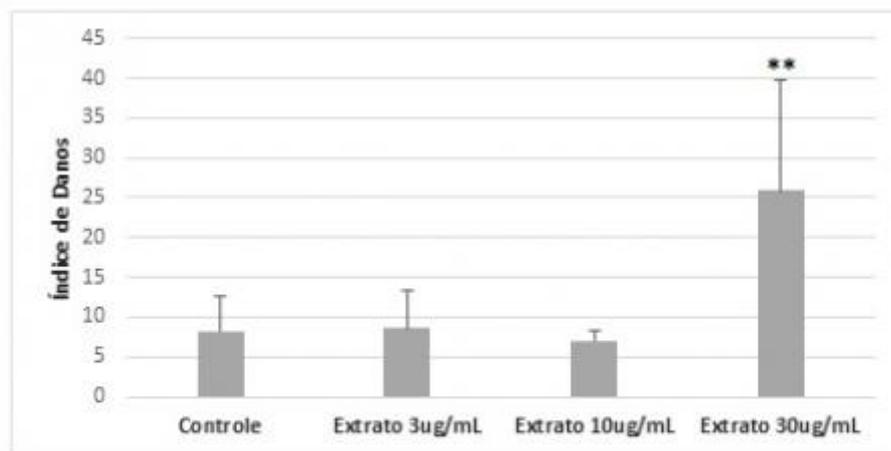


Figura 1. Avaliação do efeito genotóxico do extrato de *Ilex paraguariensis*. ** $P < 0,01$ em relação ao controle.

Figura 01 Tabela de resultados

De acordo com os resultados obtidos, o controle apresentou índice de dano médio de $8,23 \pm 4,43$. As amostras tratadas com $3\mu\text{g/ml}$ e $10\mu\text{g/ml}$ apresentaram índice de dano médio de $8,60 \pm 4,80$ e $7,07 \pm 1,32$ respectivamente, não sendo significativamente diferente do controle e indicando que possivelmente nestas concentrações o extrato não apresentou efeito tóxico. Já na amostra tratada com $30\mu\text{g/ml}$ o índice de danos médio foi de $25,89 \pm 13,94$, sendo significativamente maior que o apresentado no controle, o que sugere que nesta concentração o extrato apresentou efeito tóxico.

Observou-se que em baixas concentrações o extrato de *Ilex paraguariensis* não apresentou efeito genotóxico. No entanto, não foi avaliado seu efeito genoprotetor, o qual poderia estar associado à presença de compostos bioativos como xantinas, saponinas, ácido clorogênico, cafeína e outros compostos fenólicos já bem caracterizados na literatura. Quando estes compostos estão presentes em excesso, podem surgir danos celulares.

Sampaio (2012) aponta que muitas plantas possuem substâncias potencialmente tóxicas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cautela, respeitando seus riscos e além disso, estudos experimentais têm prestado provas de que as atividades farmacológicas atribuídas à *Ilex paraguariensis* comprovam-se cientificamente, no entanto, para a extrapolação destes resultados para humanos é imprescindível a realização de estudos complementares que determinem a ausência de toxicidade, considerando a restrição dos parâmetros analisados.

Silva, 2008 relata que existem muitos dados controversos a respeito da mutagenicidade da *Ilex paraguariensis*, em seu estudo cita que segundo Leitão & Braga, 1994, infusões de *I. paraguariensis* apresentaram efeito citotóxico e clastogênico em cultura de células de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* e que outro estudo do mesmo grupo mostrou efeito genotóxico e mutagênico do mate em cultura de linfócitos humanos (Fonseca et al., 2000) utilizando concentrações de 20 à 50 mg/placa bacteriana (fator mutagênico 3,5- 5,6).

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

Sampaio (2012) em estudos semelhantes a esse trabalho sobre a *Ilex paraguariensis*, analisou a genotoxicidade aguda em diferentes concentrações de extrato e mostrou que a administração dos extratos em dose única não é capaz de desenvolver um efeito de dano agudo significativo no DNA das células analisadas.

Arçari, 2009 sugere que a ingestão de chá- mate poderia contribuir para diminuir o risco de desenvolvimento de doenças crônicas relacionadas a processos oxidativos, tais como a aterosclerose e câncer, assim como de doenças associadas à síndrome metabólica.

Desta forma, a literatura apresenta dados controversos sobre o uso de *Ilex paraguariensis* e são necessários estudos adicionais para melhor elucidar o efeito do extrato de *Ilex paraguariensis* sobre o DNA humano. Apesar de uma amostra pequena, este estudo pode dar indicativos de como o extrato de comporta em relação ao DNA humano, sendo assim, para melhor afirmar seu efeito, necessário coletar amostras de mais voluntários.

Conclusão

O extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* não apresentou atividade tóxica em concentrações menores (3 e 10µg/ml) quando comparado ao grupo controle, já na concentração de 30µg/ml ele apresentou toxicidade ao DNA leucocitário. O consumo de bebidas à base de *Ilex paraguariensis* pode trazer muitos benefícios à saúde, porém com base nos resultados apresentados, há indícios que deva ser consumido com teor moderado.

Palavras- chave: Erva mate, ensaio cometa, genotoxicidade

Agradecimentos: Agradeço, em especial à professora Dra. Greice F. S. Montagner pela orientação e dedicação à esse trabalho, ao acadêmico Guilherme Wildner e equipe do Laboratório de Ensaios Biológicos por toda ajuda durante os experimentos, à toda minha família pelo apoio sempre presente, o carinho e a compreensão comigo e aos amigos, pela paciência e a amizade, mesmo quando estamos longe.

REFERÊNCIAS:

ALBAS, C. S. et al. Avaliação da genotoxicidade da *Ilex paraguariensis* (erva mate) pelo teste do micronúcleo. *Rev. bras. plantas med*, v. 16, n. 2, supl. 1, p. 345-349, 2014.

ARÇARI, D. P. Efeitos biológicos do consumo de chá-mate (*Ilex paraguariensis*) frente à obesidade em camundongos. Pós Graduação em Nutrição em Saúde Pública Universidade de São Paulo, 2009.

COLLIN, A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, application and limitations. *Mol. Biotech.* 26: 249-261.

COLPO, A. Z. C. Perfil fitoquímico e capacidade antioxidante de extratos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2012.

DE STEFANI, Eduardo et al. Black tobacco, mate, and bladder cancer. A case-control study from Uruguay. *Cancer*, v. 67, n. 2, p. 536-540, 1991.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

HECK, Caleb I.; DE MEJIA, E. Gonzalez. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

MIRANDA, Daniel DC et al. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*, v. 23, n. 4, p. 261-265, 2008.

SAMPAIO, Joseane et al. Estudo da genotoxicidade in vitro e in vivo após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hill. obtidos por infusão. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 10, n. 4, 2012.

SILVA, Juliana Ferreira da. Efeitos da temperatura e do mate (*Ilex paraguariensis*) sobre o processo de carcinogênese de esôfago em ratos wistar machos. Pós graduação em Biologia Geral e Aplicada Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2008.

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L., A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experim Cell Res.* Vol. 175 (1988), pp. 184-191.

VENTURA, Lorenzo et al. Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *Chemosphere*, v. 92, n. 1, p. 1-9, 2013.