

ESTUDO DA GENOTOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA, *IN VITRO* E *IN VIVO* DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Ilex paraguariensis* St. Hill. OBTIDOS POR INFUSÃO

Joseane SAMPAIO¹, Roberta TREMÉA¹, Bruna RIGO¹, Jolcimara AMREIN TACCA¹,
Elisa ARTUSI¹, Melissa SCHWANZ², Vanusa MANFREDINI²

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

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

ESTUDO DA GENOTOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA, *IN VITRO* E *IN VIVO* DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Ilex paraguariensis* St. Hill. OBTIDOS POR INFUSÃO

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é uma árvore comum do sul do Brasil, Missões, Argentina, Leste do Paraguai e presente em algumas populações isoladas do Uruguai (1, 2, 3, 4). As folhas são obtidas de uma árvore perene, pertencente à família Aquifoliaceae (5, 2) e possuem atividades características já conhecidas, como estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC), diurética, anti-reumática e leve propriedade analgésica. Tradicionalmente é utilizada para dores de cabeça, enxaqueca, fadiga e depressão nervosa (6). Geralmente as pessoas fazem o uso de infusões da planta devido a essas propriedades (1, 7, 8). Essas atividades estão relacionadas com a composição química presente na planta, sendo que os compostos químicos de maior interesse e em proporção são cafeína, teobromina, teofilina, flavonoides e saponinas (8).

Acredita-se que estes compostos fitoquímicos presentes na planta estejam relacionados, juntamente com fatores ambientais, como o consumo de álcool e o tabagismo; a forma como o mate é ingerido, em infusões com a temperatura da água elevada; bem como a forma como as folhas são processadas pela indústria ervateira, do qual passa pela chamada de “sapeco” onde o contato das folhas da erva com a fumaça utilizada para inativar enzimas presentes na planta, impedindo a oxidação acelerada, produzindo o benzopireno, um composto altamente reativo, tóxico e mutagênico; ao aumento da incidência de câncer esofágico e na orofaringe (6, 2). Embora, o mecanismo exato da carcinogênese ainda seja desconhecido, as informações avaliadas sugerem que infusões de mate podem ser consideradas um fator de risco para câncer oral e da orofaringe (2).

Em contrapartida, estudos mostram que extratos de *Ilex paraguariensis* são potentes inibidores da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL) (5), bem como a literatura científica reporta como sendo hepatoprotetor e hipocolesterolêmico (9, 10). A ingestão de infusões de *Ilex paraguariensis* pode contribuir para o aumento das defesas antioxidantes contra a ação dos radicais livres no organismo humano (1).

Atualmente as áreas da genética toxicológica estão sendo intensamente pesquisadas, pois estão relacionadas com malformações, doenças congênitas, genéticas e degenerativas, envelhecimento celular e do corpo, e o câncer. Então, a genotoxicidade estuda, sob o aspecto genético, o que perturba a vida ou induz a morte tanto em nível de célula como de organismo (11).

Testes genotóxicos podem ser *in vitro* e *in vivo* e são designados para a detecção de compostos que induzem dano genético, como quebra da fita de ácido desoxirribonucléico (DNA), mutação genética, quebra cromossomal e alteração na capacidade de reparo de DNA (13, 12). O dano genético é causa inicial das mutações, evento crucial para o aparecimento de carcinomas e outros vários problemas, sendo que o principal método para resolução do mesmo é a prevenção (14).

Alterações genotóxicas são definidas como aquelas no qual um agente potencialmente tóxico causa algum prejuízo ao material genético celular (DNA) como quebra de fita simples ou dupla, formação de adutos de base, lesão cromossomal, entre outras. O teste cometa é um ensaio de genotoxicidade, portanto, detecta a fragmentação do núcleo através do arraste do DNA, que forma uma cauda quando o material genético é submetido a uma corrente elétrica em solução alcalina (15). Este teste possui um baixo custo, alta sensibilidade e pode ser realizado em pouco tempo, servindo não somente para a verificação de dano no material genético, mas também na monitorização de dano (16, 17, 13).

Atualmente, a vitamina C está sendo muito utilizada por apresentar propriedades antioxidantes e por possuir bom efeito protetor contra danos celulares. Entretanto, quando há deficiência desse nutriente no organismo, o mesmo pode induzir a morte celular programada (apoptose) ou necrose celular. Porém, ressalta-se a necessidade de estudos mais abrangentes para a compreensão deste mecanismo *in vivo* (19, 18, 20).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo principal investigar o efeito genotóxico de *Ilex paraguariensis*, *in vitro*, com extratos aquosos obtidos por infusão, pelo teste cometa, e também *in vivo*, sob avaliação de dano celular agudo e subcrônico, associados ou não a vitamina C. Também testou-se a eficiência da vitamina C na proteção celular como agente antioxidante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra vegetal

Foram utilizadas folhas de *Ilex paraguariensis* St. Hill, disponibilizadas pela empresa Indústria e Comércio de Erva-Mate Barão Ltda, no município de Barão de Cotegipe, RS, Brasil; coletadas com idade de poda de 12 meses e cultivadas em pleno sol. A secagem das

folhas foi realizada em estufa com circulação de ar, a uma temperatura de 30-35°C e após foram trituradas em moinho de facas.

2.2 Extrato Vegetal

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

Para a determinação do ensaio cometa *in vivo*, foi utilizado o extrato aquoso vegetal nas concentrações de 0,5% e 10%, associados ou não à vitamina C, em concentração definida para que a administração de 1 mL do extrato seja proporcional à dose de 200 mg/kg para a determinação *in vivo*.

2.3 Avaliação da Genotoxicidade aguda e subcrônica através do Teste Cometa

2.3.1 Teste Cometa *in vitro*

Foram coletadas amostras de sangue periférico de três (3) voluntários (aproximadamente 10 mL) por punção venosa. O sangue total foi acondicionado em um tubo com anticoagulante (EDTA) e em seguida armazenado a 4°C. Após a preparação dos extratos da planta nas diferentes concentrações e da solução de vitamina C (200mg/mL), o infuso da planta foi colocado em contato com o sangue periférico (1:1 v/v) por 24 horas em banho-maria a 37°C, para determinação de genotoxicidade aguda (15,21). Transcorrido o tempo, uma alíquota de 20 µL da suspensão de células foi adicionadas a 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LPM 0,75% - Low Point Melting) e espalhadas em lâminas de microscopia pré cobertas com agarose 1%. Estas lâminas foram colocadas em cuba de vidro apropriadas protegidas da luz a 4°C com solução de lise gelada (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0 com 1% triton X-100 e 10% DMSO), por no mínimo 1 hora, e no máximo, duas semanas. Por fim, a eletroforese foi realizada em condições alcalinas (pH 13) a 25V e uma corrente de 300 mA por 15 minutos.

Após eletroforese as amostras foram neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5) e colocadas sobre uma bandeja e levadas a estufa à 37°C, por 1h30min. Em seguida, procedeu-se a coloração com solução de prata (nitrato de prata 0,1%; ácido tungstosilícico 0,25%; formaldeído 0,15%) e analisadas em microscópio óptico no aumento de 100X. Foram analisadas para cada

amostra 100 células selecionadas ao acaso, em triplicata. As células foram classificadas visualmente em quatro classes, de acordo com o tamanho da cauda (do tamanho 0 - sem dano, ao tamanho 3 – máximo dano), onde foi calculado o ID (15).

2.3.2 Teste Cometa *in vivo*

2.3.2.1 Animais de experimentação

Para o desenvolvimento do estudo foram utilizados 36 ratos Wistar machos, pesando entre 180 – 200g, procedentes do Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI) – Campus de Erechim.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da URI. Os animais foram mantidos nas condições normais do biotério e os experimentos seguiram as normas éticas de experimentação animal determinadas pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais em Laboratório (SBCAL).

Foi feita administração de 1 mL das soluções por gavagem, sendo que cada grupo era composto por 6 animais:

Grupo 1: Solução salina 0,9%; Grupo 2: Extrato aquoso *Ilex paraguariensis* na concentração de 0,5%; Grupo 3: Extrato aquoso *Ilex paraguariensis* na concentração de 10%; Grupo 4: Solução aquosa de vitamina C na concentração de 40 mg/mL; Grupo 5: Extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* 0,5% mais solução aquosa de Vitamina C na concentração de 40mg/mL; Grupo 6: Extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* 10% mais solução aquosa de Vitamina C na concentração de 40mg/mL.

Os animais foram anestesiados e realizou-se uma coleta de sangue por punção plexo orbital após 24 horas da administração de uma única dose dos extratos, ou seja, 1 mL de cada extrato, via gavagem, para a determinação da genotoxicidade aguda (21). Após os 14 dias das administrações, os animais foram anestesiados novamente e foi realizada a coleta do sangue total, onde uma parte do sangue foi utilizada para a determinação da genotoxicidade subcrônica em células leucocitárias, e a outra porção do sangue total foi centrifugada, obtendo-se o soro, para a determinação do dano oxidativo em proteínas plasmáticas através da técnica do Carbonil, proposta por Levine et al. (1990) (22).

Em seguida, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e os órgãos cérebro, fígado, pulmão e rins foram removidos e congelados à -20°C. Obtidos os homogeneizados dos

órgãos, com graal e pistilo, a 4°C, em banho de gelo, seguiu-se, à análise genotóxica com o ensaio cometa (15).

Os resultados referentes à genotoxicidade foram analisados segundo o teste de Kruskal-Wallis, seguido do método de Dunn. Para o ensaio da oxidação de proteínas plasmáticas (carbonil), foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Duncan. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Teste Cometa *in vitro*

Salienta-se que o objetivo da determinação da genotoxicidade *in vitro*, foi analisar a capacidade dos extratos aquosos da *Ilex paraguariensis*, obtidos por infusão, em causar dano mínimo e máximo no DNA das células leucocitárias, com e sem a adição da vitamina C na concentração de 200 mg/mL.

Conforme a figura 1, neste experimento foram testados extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* nas concentrações de 0,5%, 1%, 2%, 5% e 10% para a verificação de danos ao DNA em células leucocitárias, de humanos. Em seguida, realizou-se o teste da adição da vitamina C sobre os extratos, com a finalidade de verificar o potencial antioxidante sobre o DNA celular como pode ser observado na figura 2.

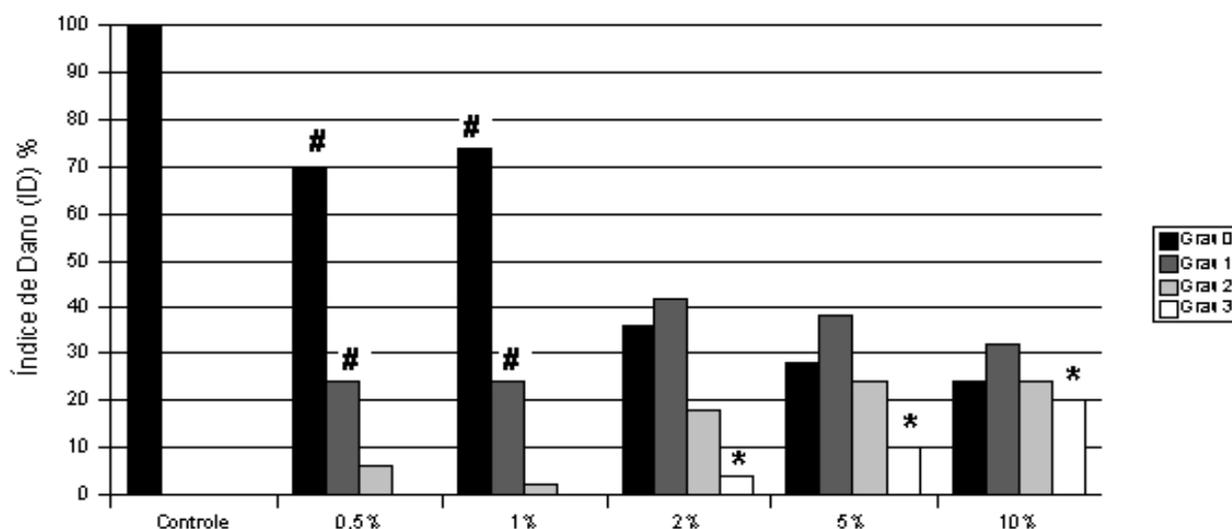


Figura 1. Ensaio cometa *in vitro*. Porcentagem de dano ao DNA em células leucocitárias do sangue periférico induzido pelo extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* nas concentrações de

0,5%, 1%, 2%, 5% e 10% ([#] p<0,05). Para o controle, foi utilizada solução salina 0,9%. (* p<0,05).

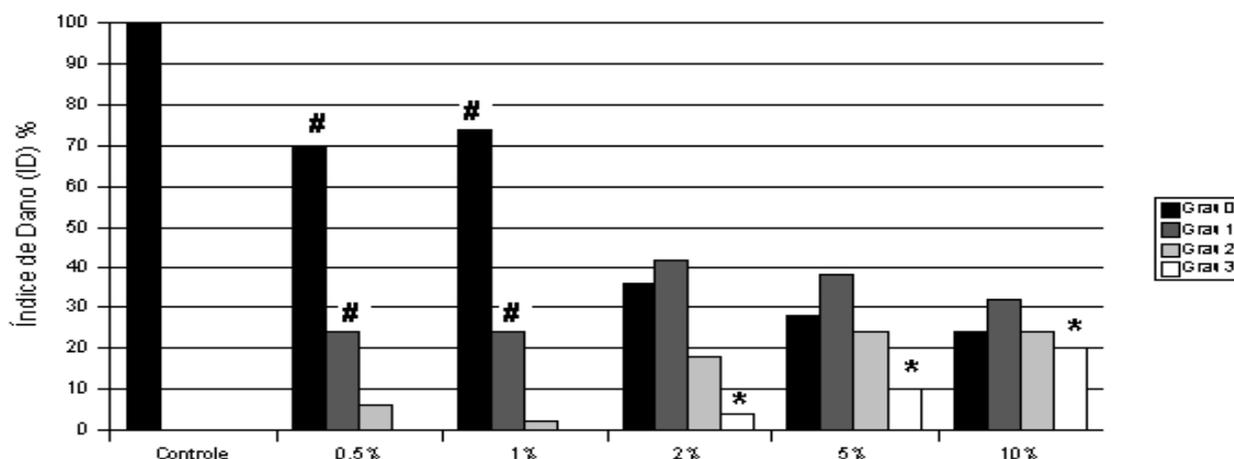


Figura 2. Ensaio cometa *in vitro*. Porcentagem de dano ao DNA em células leucocitárias do sangue periférico induzido pelo extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* após a adição de 200mg/mL de vitamina C, nas concentrações de 0,5%, 1%, 2%, 5% e 10% ([#] p<0,05). Para o controle, foi utilizada solução salina 0,9%. (* p<0,05).

Os antioxidantes, como a vitamina C, atuam no organismo através de diferentes mecanismos, sendo capazes de interceptar radicais livres produzidos pelo metabolismo ou por fontes exógenas ou reparar lesões causadas por estes radicais. Este processo está relacionado com a remoção de danos na molécula do DNA e reconstituição de membranas celulares danificadas (23).

3.2 Teste Cometa *in vivo*

De acordo com a RDC nº 90 de 16 de março de 2004, da ANVISA, para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, são necessários estudos *in vivo*. Este estudo *in vivo* do ensaio cometa de células leucocitárias do sangue periférico, avaliou a genotoxicidade aguda, ou seja, efeito de dose única, 24 horas após a administração dos extratos; e após 14 dias consecutivos de administração, avaliando-se assim, a genotoxicidade subcrônica.

Os resultados obtidos não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos dos animais analisados para o ensaio de 24 horas após a administração dos extratos.

Os dados referentes ao estudo do ensaio cometa *in vivo* de células leucocitárias do sangue periférico dos animais, sob avaliação da genotoxicidade aguda e subcrônica são demonstrados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1- Resultado do teste de genotoxicidade aguda e subcrônica *in vivo*, realizado com células leucocitárias do sangue periférico.

Ensaio Cometa	Grupos (G)	Valor de H – Estatística do Teste de Kruskal-Wallis	Valor de p
24 horas	G1	7.2230	0.2046
	G2		
	G3		
	G4		
	G5		
	G6		
Após 14 dias	G1	14.7595	0.0114*
	G2		
	G3		
	G4		
	G5		
	G6		

Nota: *Indica diferença estatisticamente significativa pela aplicação do teste de kruskal-wallis ao nível de significância de 5%.

Tabela 2 – Resultados do teste de Dunn.

Ensaio Cometa	Comparação entre os Grupos	p
Após 14 dias	Grupos 1-2	n.s.
	Grupos 1-3	< 0.05
	Grupos 1-4	n.s.
	Grupos 1-5	n.s.
	Grupos 1-6	n.s.
	Grupos 2-3	n.s.
	Grupos 2-4	n.s.
	Grupos 2-5	n.s.
	Grupos 2-6	n.s.
	Grupos 3-4	n.s.
	Grupos 3-5	n.s.
	Grupos 3-6	n.s.
	Grupos 4-5	n.s.
	Grupos 4-6	n.s.
Grupos 5-6	n.s.	

Após as análises do ensaio cometa de todos os órgãos, todos estes apresentaram diferenças estatisticamente significativas, sendo estes resultados apresentados na tabelas 3, 4, 5 e 6.

Tabela 3 – Resultado do teste de genotoxicidade subcrônica *in vivo*, realizado com células de diferentes órgãos.

Ensaio Cometa	Grupos (G)	Valor de H – Estatística do Teste de Kruskal-Wallis	Valor de p
Cérebro	G1	25.4037	0.0001*
	G2		
	G3		
	G4		
	G5		
	G6		
Fígado	G1	23.0643	0.0003*
	G2		
	G3		
	G4		
	G5		
	G6		
Pulmão	G1	21.5365	0.0006*
	G2		
	G3		
	G4		
	G5		
	G6		
Rim	G1	23.3446	0.0003*
	G2		
	G3		
	G4		
	G5		
	G6		

Nota: *Indica diferença estatisticamente significativa pela aplicação do teste de kruskal-wallis ao nível de significância de 5%.

Tabela 4 – Resultados do teste de Dunn.

Ensaio Cometa	Comparação entre os Grupos	p
Cérebro	Grupos 1-2	n.s.
	Grupos 1-3	<0.005
	Grupos 1-4	n.s.
	Grupos 1-5	<0.005
	Grupos 1-6	<0.005
	Grupos 2-3	n.s.
	Grupos 2-4	n.s.
	Grupos 2-5	<0.005
	Grupos 2-6	<0.005
	Grupos 3-4	n.s.
	Grupos 3-5	n.s.
	Grupos 3-6	n.s.
	Grupos 4-5	n.s.
	Grupos 4-6	n.s.
	Grupos 5-6	n.s.
Fígado	Grupos 1-2	<0.005
	Grupos 1-3	<0.005
	Grupos 1-4	n.s.
	Grupos 1-5	n.s.
	Grupos 1-6	n.s.
	Grupos 2-3	n.s.
	Grupos 2-4	n.s.
	Grupos 2-5	n.s.
	Grupos 2-6	n.s.
	Grupos 3-4	n.s.
	Grupos 3-5	n.s.
	Grupos 3-6	n.s.
	Grupos 4-5	n.s.
	Grupos 4-6	n.s.
	Grupos 5-6	n.s.

Tabela 5 – Resultados do teste de Dunn.

Ensaio Cometa	Comparação entre os Grupos	p
Pulmão	Grupos 1-2	n.s.
	Grupos 1-3	<0.005
	Grupos 1-4	n.s.
	Grupos 1-5	n.s.
	Grupos 1-6	n.s.
	Grupos 2-3	n.s.
	Grupos 2-4	n.s.
	Grupos 2-5	n.s.
	Grupos 2-6	n.s.
	Grupos 3-4	n.s.
	Grupos 3-5	n.s.
	Grupos 3-6	n.s.
	Grupos 4-5	n.s.
	Grupos 4-6	n.s.
Grupos 5-6	n.s.	

Tabela 6 – Resultados do teste de Dunn.

Ensaio Cometa	Comparação entre os Grupos	p
Rim	Grupos 1-2	n.s.
	Grupos 1-3	<0.005
	Grupos 1-4	n.s.
	Grupos 1-5	<0.005
	Grupos 1-6	<0.005
	Grupos 2-3	n.s.
	Grupos 2-4	n.s.
	Grupos 2-5	n.s.
	Grupos 2-6	n.s.
	Grupos 3-4	n.s.
	Grupos 3-5	n.s.
	Grupos 3-6	n.s.
	Grupos 4-5	n.s.
	Grupos 4-6	n.s.
Grupos 5-6	n.s.	

As proteínas estão entre os principais alvos da oxidação, sendo a reação de carbonilação um importante indicativo de estresse oxidativo. A presença do grupamento carbonil é um indicativo de oxidação. A geração de ERO pode danificar não apenas lipídios de membrana, DNA, como também proteínas plasmáticas (22, 25). Os resultados do conteúdo de carbonil estão apresentados na figura 3.

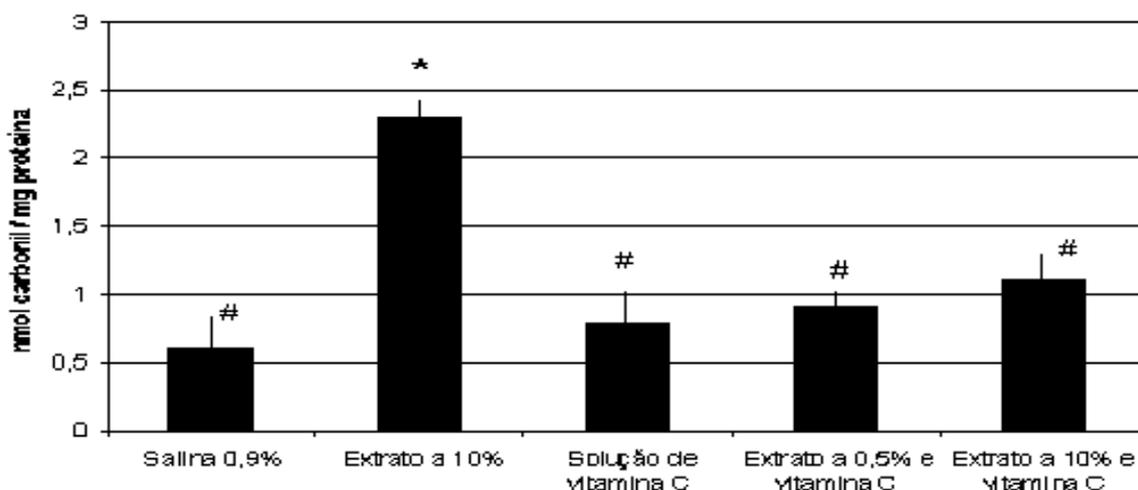


Figura 3. Conteúdo de carbonil (nmol carbonil / mg proteína) nos diferentes tratamentos. * $p < 0,05$ em relação ao controle (salina 0,9%); # $p < 0,05$ quando comparada o controle e o tratamento com vitamina C (200 mg/mL).

4 DISCUSSÃO

O presente estudo teve o objetivo majoritário de verificar o potencial genotóxico da erva-mate, e esta é ingerida pela população na forma de chimarrão, por isso, utilizou-se um extrato aquoso, obtido por infusão, com a finalidade de mimetizar ao máximo a forma como esta planta é utilizada.

Os resultados apontam menor dano oxidativo nas células leucocitárias na concentração de 0,5% do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* e maior dano oxidativo no DNA na concentração de 10%, em relação ao controle. Já no teste de adição de vitamina C, na concentração de 200 mg/mL, observou-se que a vitamina C conferiu certo grau de efeito protetor nas células leucocitárias como antioxidante, se mostrou ser significativo na concentração de 0,5% e 1% do extrato de *Ilex paraguariensis*. Já nas concentrações de 2%, 5% e 10%, a vitamina C se mostrou pró-oxidante.

Entende-se por agente tóxico a entidade química capaz de causar dano a um sistema biológico, alterando seriamente uma função ou levando-o à morte. A toxicidade aguda é definida como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após a administração de uma dose única ou doses múltiplas dentro de 24 horas (13). Após a análise da genotoxicidade aguda, esta nos 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.

Em relação aos dados obtidos após 14 dias, observamos diferenças significativamente estatísticas entre o grupo 1 e o grupo 3, com isso, podemos interpretar que houve um maior dano oxidativo no DNA das células na concentração máxima do extrato em relação ao grupo controle, indicando que um efeito subcrônico foi desenvolvido nos animais quando administrada uma dose máxima, potencialmente letal. Os resultados obtidos a partir dos estudos de toxicidade aguda são empregados para o delineamento dos estudos de toxicidade subcrônica, ou seja, de curta duração, particularmente no que se refere à escolha das doses (13).

Os resultados obtidos do ensaio cometa utilizando as células do cérebro dos ratos Wistar submetidos à avaliação da genotoxicidade subcrônica mostraram-se significativo entre os grupos controle e dose máxima, e entre os grupos dose mínima em comparação com os grupos dose mínima e máxima associados à vitamina C, na concentração de 40mg/mL. Esta, por sua vez, não mostrou ser antioxidante, ou seja, não protegeu as células da injúria. Este órgão vital é composto por células ricas em lipídeos polinsaturados, principalmente fosfolipídeos, localizados na camada de mielina dos neurônios (26, 27).

A vitamina C é um antioxidante hidrofílico, portanto, não consegue atravessar com eficiência a barreira hematoencefálica, não protegendo de forma efetiva os neurônios da lipoperoxidação causada pela concentração máxima do extrato de *Ilex paraguariensis*. Sugere-se, portanto o uso de outro antioxidante, neste caso de caráter lipofílico, como por exemplo, a vitamina E ou tocoferol.

É no fígado que ocorre a maioria das reações de biotransformação e metabolização de agentes tóxicos pela presença de importantes complexos enzimáticos. É o órgão que encerra maior concentração de enzimas, e onde grande número de substâncias é metabolizada. Outros órgãos como pulmão e rins também tem participação significativa (13).

Os resultados obtidos na determinação genotóxica deste órgão apontam diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e dose mínima (0,5%) e dose

máxima (10%), ou seja, uma dose sem capacidade antioxidante pela sua concentração e uma dose superior, que ao invés de atuar como antioxidante atuou como pró-oxidante. Isso pode ser interpretado também, pelo fato do fígado ser um órgão extremamente suscetível ao ataque oxidativo devido a sua função, indicando, portanto, que a vitamina C atuou de forma efetiva como antioxidante pela sua característica hidrossolúvel, protegendo o fígado.

Os efeitos citotóxicos e genotóxicos dos extratos de plantas têm sido estudados durante vários anos, envolvendo o uso indiscriminado desses produtos, assim como os seus compostos químicos. Os metabólitos secundários presente nessas plantas são de grande interesse na atualidade, envolvendo pesquisas acerca dos aspectos farmacológicos, químicos, medicinais ou tóxicos (28).

A concentração de compostos polifenóis e ácidos clorogênicos no mate indica uma grande correlação com a capacidade antioxidante pela similaridade com enzimas antioxidantes naturais presentes no nosso organismo (29, 30), assim atuando como potente inibidor do estresse oxidativo, agindo sobre espécies reativas de oxigênio, principalmente sobre o fígado, este sendo um importante órgão de metabolização e depuração de compostos e xenobióticos (31, 9, 29, 30).

O pulmão atua como importante órgão de excreção, juntamente com o fígado e rins, principalmente para compostos com características de volatilidade. Os resultados do ensaio de genotoxicidade deste órgão mostram uma diferença estatística significativa somente entre a comparação entre os grupos controle e extrato de *Ilex paraguariensis* na concentração máxima, ou seja, de 10%. Neste caso, a associação de vitamina C aos extratos foi promissora, pois a vitamina agiu como antioxidante efetivo. O ascorbato é um antioxidante hidrossolúvel importante para os fluidos extracelulares, atuando de forma importante sob o fluido intersticial do pulmão (13).

Os rins exercem importante papel depurador do sangue, excretando substâncias polares e hidrossolúveis na urina (13). Estes nos mostram que houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e dose máxima e entre os grupos controle e dose mínima e máxima associados à vitamina C. Neste caso, a vitamina C não conferiu proteção aos néfrons, além disso, pode ter causado efeito pró-oxidante neste órgão.

Com base em todos estes resultados, podemos observar que houve de fato o dano no DNA das células dos órgãos cérebro, fígado, pulmão e rins; considerando, pois, a genotoxicidade subcrônica. Devemos levar em conta tanto as características físico-químicas dos compostos fitoquímicos presentes nos extratos administrados nos animais, como por exemplo, solubilidade em água quente, correspondente a infusão, assim como os

grupamentos químicos característicos que os formam, bem como as características fisiológicas dos órgãos testados.

Quando avaliado o dano oxidativo em proteínas plasmáticas através do teste Carbonil, os dados mostram um aumento estatisticamente significativo do dano oxidativo em proteínas plasmáticas quando administrado o extrato a 10% ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (salina 0,9%). Com a administração do extrato de *Ilex paraguariensis* associada à vitamina C, obtivemos uma tendência à dose-dependência, ou seja, a vitamina C atua como um potente antioxidante hidrofílico, porém, não previne a carbonilação das proteínas plasmáticas.

Alteração na estrutura de proteínas causadas por oxidantes, e modificações que incluem a cadeia lateral do aminoácido, ligações covalente cruzadas, e clivagem enzimática pode resultar em uma perda parcial ou total da funcionabilidade da proteína. A formação de grupos carbonil é considerada um marcador precoce e estável para a oxidação de proteínas medida por EROs (22, 24).

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* St. Hill. obtido por infusão, na concentração de 10% causa danos no DNA das células dos órgão cérebro, fígado, pulmão e rins, quando administrados em uma dosagem subcrônica em ratos Wistar. Em contrapartida, quando são administrados os extratos na concentração de dose mínima de 0,5%, não observa-se efeito genotóxico subcrônico significativo para os órgãos testados. Além disso, na avaliação da genotoxicidade aguda de células leucocitárias dos animais, esta não se mostrou significativa, ao contrário da análise do teste cometa dessa mesma linhagem de células sob avaliação do efeito genotóxico subcrônico, onde este se tornou significativo. Os estudos de genotoxicidade são importantes para avaliar a relação risco-benefício da utilização de plantas medicinais de forma indiscriminada pela população, principalmente no que se refere às dosagens utilizadas, que muitas vezes podem ser letais para as células e o organismo como um todo.

AGRADECIMENTOS

Suporte financeiro URI – Campus de Erechim.

REFERÊNCIAS

1. JACQUES, R.A.; et al. Pressurized liquid extraction of mate tea leaves. *Anal. Chem.*, v. 8, p. 264-269, 2008.
2. ALVES, V.; et al. The evaluation of maté (*Ilex paraguariensis*) genetic toxicity in human lymphocytes by the cytokinesis-block in the micronucleus assay. *Toxicol. in Vitro*, v. 22, p. 695–698, 2008.
3. PANG, J.; CHOY, Y.; PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Arch. of Biochem. and Bioph.*, v. 15, p. 115-119, 2008.
4. JACQUES, R.A. ; et al. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. *Ultrason Sonochem.*, v. 14, p. 6–12, 2007.
5. BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. 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 Sciences*, v. 77, p. 345–358, 2005.
6. NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. *Herbal Medicines. A guide for health-care professionals*. London: Pharmaceutical Press; 1996. 1831p.
7. Deladino L et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydr Polymers* 2008; 71: 126–34.
8. CARDOZO, J.E.L.; et al. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) progenies grown in Brazil. *J. of Food Composit. and Anal.*, v. 20, p. 553–558, 2007.
9. GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. *Biochem. Biophys. Research Commun.*, v. 224, p. 338–344, 1996.
10. FILIP, R.; LOTITO, S.B.; FERRARO, G.; FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrit. Research*, v. 20, p. 1437–1446, 2000.
11. SILVA, J. ; ERDTMANN, B. ; HENRIQUES, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance; 2003. 344p.

12. SILVA, G.N. ; et al. Genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to antimicrobial endodontic agents. *Oral Surg., Oral Med., Oral Path., Oral Radio., and Endont.*, v. 104, p.58-61, 2007.
13. OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. *Fundamentos de Toxicologia*. 3ed. São Paulo: Atheneu Editora; 2003. 677p.
14. DE FLORA, S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mut. Research*, v. 591, p. 8–15, 2005.
15. SINGH, N.; et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. *Experiment. Cell Research*, v. 175, p. 184-191, 1988.
16. SILVA, J.; FREITAS, T.R.O.; MARINHO, J.R.; SPEIT, G. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environment biomonitoring with native rodents. *Genetic. Molec. Bio.*, v. 23, p. 241-245, 2000.
17. HARTMANN, A.; et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagen.*, v. 18, p. 45-51, 2003.
18. LEMOS, N.G.; et al. Avaliação do efeito genotóxico do Prozac (fluoxetina), sem e com adição de vitamina A e C, através do teste cometa e cultura de células CHO-K1. *Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 26, p. 95-100, 2005.
19. ODIN, A.P. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutat. Research*, v. 386, p. 39-67, 1997.
20. PADH, H. Vitamin C: never insights into its biochemical functions. *Nutrit. Rev.*, v. 49, p. 65-70, 1991.
21. ANVISA. Resolução nº 90, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, Brasília, DF, 2004.
22. LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.*, v. 86, p. 464-478, 1990.
23. BIANCHI, M.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. de Nut.*, v. 12, p. 123-130, 1990.
24. BEAL, M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Rad. in Bio. and Med.*, v. 32, p. 797-803, 2002.
25. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death*. 3rd. ed., New York: Oxford University Press; 2007. p.187-267.

26. GOODMAN, L.S. *The pharmacological basis of therapeutics*. 2nd. ed. New York: Macmillan; 1955. 1831p.
27. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 9 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999. 634p.
28. MACEDO, M.F.S; et al. Determining the genotoxicity of an aqueous infusion of *Bauhinia monandra* leaves. *Brazil. J. of Pharmacog.*, v. 18, p. 509-516, 2008.
29. SCHINELLA, G.R.; et al. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitricoxide-dependent mechanism. *Clin. Nut.*, v. 24, p. 360–366, 2005.
30. HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *J. of food science*, v. 72, p. 133-140, 2007.
31. GUGLIUCCI, A.; STAHL, A.J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochem. Bioph. Research Comm.*, v. 35, p. 47–56, 1995.