

EFEITO CITOTÓXICO DIFERENCIAL DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE ERVA-MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) SOBRE ERITRÓCITOS E CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

L. C. MOCELIN¹, K. S. RODRIGUES², M. G. BRITO³, I. K. DA SILVA⁴, K. C. GRAMS⁵, A. L. ZAMBRA⁶, J. W. BORTOLOTTO⁷, G. BONFANTI-AZZOLIN⁸, M. M. PARISI⁹

Universidade de Cruz Alta

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2298-7809>
mariana_parisi@yahoo.com.br

Submetido 26/05/2020 - Aceito 29/03/2021

DOI: 10.15628/holos.2021.10257

RESUMO

Para a utilização da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) como planta medicinal, é necessário determinar concentrações e formas de utilização seguras e eficazes. Modelos *in vitro* de triagem de citotoxicidade fornecem dados preliminares para selecionar doses seguras potencialmente benéficas. O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade aguda de diferentes concentrações de um extrato hidroetanólico de folhas de erva-mate em dois modelos de células sanguíneas humanas. Para isso, eritrócitos e células mononucleares de sangue periférico de 10 indivíduos saudáveis foram incubadas com diferentes concentrações do extrato

hidroetanólico de erva-mate por 150 minutos a 37°C. Após a incubação, foram realizados testes bioquímicos de detecção de citotoxicidade. A concentração de 1000µg/mL de extrato aumentou a hemólise, a fragilidade osmótica e a peroxidação lipídica em eritrócitos, mas não teve efeito citotóxico em células mononucleares. Estes dados sugerem que altas concentrações de extrato podem ser tóxicas para alguns tipos celulares e, por isso, concentrações seguras de utilização são essenciais para a recomendação da erva-mate como planta medicinal.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas medicinais, citotoxicidade, células sanguíneas, estresse oxidativo.

DIFFERENTIAL CYTOTOXIC EFFECT OF HYDROETHANOLIC YERBA MATE EXTRACT (*ILEX PARAGUARIENSIS*) ON ERYTHROCYTES AND PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

ABSTRACT

For the use of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) as a medicinal plant, it is necessary to determine safe and effective concentrations and forms of use. In vitro cytotoxicity screening models provide preliminary data to select potentially beneficial safe doses. The aim of this study was to evaluate the acute cytotoxicity of different concentrations of a hydroethanolic extract of yerba mate leaves in two models of human blood cells. For this, erythrocytes and peripheral blood mononuclear cells from 10 healthy individuals were incubated with different concentrations of the hydroethanolic extract of yerba mate for 150 minutes at 37 ° C.

After incubation, biochemical tests for cytotoxicity detection were performed. The concentration of 1000µg/mL of extract increased hemolysis, osmotic fragility and lipid peroxidation in erythrocytes, but had no cytotoxic effect on mononuclear cells. These data suggest that high concentrations of extract can be toxic to some cell types and, therefore, safe concentrations of use are essential for the recommendation of yerba mate as a medicinal plant.

KEYWORDS: Medicinal plants, cytotoxicity, blood cells, oxidative stress.



1. INTRODUÇÃO

As ervas medicinais tem sido extensivamente utilizadas, ao longo dos anos, como terapia alternativa e/ou complementar devido aos seus compostos bioativos (Ekor, 2014). Neste contexto, a erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), uma planta nativa da região Sul da América do Sul que pertence à família *Aquifoliaceae*, vem sendo estudada em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*, devido ao seu potencial anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano e anti-mutagênico (Bains & Gugliucci, 2017; Bracesco, Sanchez, Contreras, Menini, & Gugliucci, 2011; Correa et al., 2019; Noureddine, El Husseini, Nehme, & Abdel Massih, 2018).

A fitoquímica da erva-mate inclui uma grande diversidade de moléculas bioativas, dentre os quais se destacam componentes fenólicos, xantinas, cafeína, taninos, saponinas, rutina, ácido ursólico, ácido clorogênico e componentes inorgânicos, como elementos essenciais (K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu) e elementos tóxicos (Cd, Pb, Al, F) (Baran, Gruszecka-Kosowska, Kolton, Jasiewicz, & Piwowar, 2018). No entanto, a atividade farmacológica da erva-mate pode variar de acordo com a parte e forma de utilização da planta (Heck & de Mejia, 2007). Tradicionalmente, é uma planta utilizada pelos indivíduos na forma de folhas secas para produção de chás ou chimarrão, no entanto, maiores benefícios terapêuticos são encontrados no extrato hidroetanólico das folhas (Gan, Zhang, Wang, & Corke, 2018), o qual tem sido utilizado na maioria dos estudos envolvendo suas propriedades farmacológicas (Piovezan-Borges, Valerio-Junior, Goncalves, Mielniczki-Pereira, & Valduga, 2016; Prediger et al., 2008; Rivelli, Almeida, Ropke, & Barros, 2011).

Apesar dos inúmeros efeitos benéficos, plantas medicinais em geral podem apresentar efeitos tóxicos, dependendo da concentração utilizada, do tempo de exposição e do modelo biológico testado. Neste contexto, são capazes de produzir uma ampla gama de reações indesejáveis ou adversas, que incluem hepatotoxicidade, hemotoxicidade e envenenamentos (Ekor, 2014). Além disso, podem possuir compostos tóxicos capazes de reagir com macromoléculas celulares, causando genotoxicidade e citotoxicidade (Ekor, 2014; Fonseca, Otto, Paumgarten, & Leitao, 2000; Lubin et al., 2014). Desta forma, além de estudar os efeitos benéficos de plantas medicinais, torna-se imprescindível avaliar os possíveis efeitos tóxicos em modelos celulares a fim de determinar as doses ideais não tóxicas para estudos *in vitro* e *in vivo*.

Um dos principais mecanismos de citotoxicidade é a indução de estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre quando há a interrupção do equilíbrio redox celular devido ao aumento da geração espécies reativas de oxigênio (EROS) ou nitrogênio (ERN). Com isso, pode ocorrer dano macromolecular quando a produção de EROS/ERN é superior a capacidade antioxidante das células, podendo levar a lesão permanente e/ou morte celular (Lingabathula & Yellu, 2016; Pires et al., 2016).



Assim, apesar dos potenciais efeitos antioxidante e anti-inflamatório da erva-mate, é necessário determinar concentrações e formas de utilização seguras e eficazes. Para isso, modelos *in vitro* de triagem de citotoxicidade fornecem importantes dados preliminares para selecionar as doses seguras potencialmente benéficas para a saúde (Bonfanti-Azzolin et al., 2019). Neste contexto, as células sanguíneas representam um importante modelo, pois o sangue periférico é o principal local onde ocorre a exposição a substâncias exógenas no organismo, sendo que as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e eritrócitos tendem a representar o efeito sistêmico destes compostos (Pourahmad & Salimi, 2015). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade aguda de diferentes concentrações de um extrato hidroetanólico de folhas de erva-mate em dois modelos de células sanguíneas humanas: eritrócitos e células mononucleares.

2. METODOLOGIA

2.1 Preparo do extrato hidroetanólico

As folhas de erva-mate foram colhidas no município de Cruz Alta – RS, a espécie foi identificada e registrada no herbário da Universidade de Cruz Alta, sob número 1124. As folhas (514g) passaram por um processo de secagem em estufa com circulação de ar ($\pm 40^{\circ}\text{C}$), trituração em moinho de facas e maceração hidroetanólica (EtOH:H₂O 3:2, v/v), na proporção 1:6 (material vegetal:solvente). Durante sete dias, o macerado foi submetido a agitações manuais em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, o material foi filtrado em algodão e novamente recoberto com nova quantidade proporcional de solvente, por mais sete dias. Este segundo líquido extrativo foi reunido ao primeiro e concentrado em evaporador rotatório, a temperatura inferior a 40°C para eliminação do etanol. Então, o extrato concentrado foi submetido ao processo de secagem para obtenção do extrato hidroetanólico (EHM) na forma de pó, com rendimento final de 5,60% (Simões, Schenkel, Mello, Mentz, & Petrovick, 2016).

2.2 Amostras biológicas: células mononucleares de sangue periférico e eritrócitos

Este estudo incluiu 10 indivíduos saudáveis (6 homens e 4 mulheres), com idade entre 18 e 60 anos, não fumantes e não etilistas, recrutados entre trabalhadores da Universidade de Cruz Alta. Todos os indivíduos aceitaram participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O protocolo da Pesquisa foi Aprovado em Comitê de Ética Institucional sob parecer 3.085.361.

De cada indivíduo foram coletados, em dois momentos distintos, 20 mL de sangue venoso periférico em anticoagulante EDTA para isolamento de PBMC e 4 mL de sangue venoso periférico em anticoagulante heparina para enriquecimento dos eritrócitos. As PBMC foram isoladas em gradiente Ficoll Paque Plus ($d=1.077\text{ g/mL}$, GE HealthCare, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para enriquecimento dos eritrócitos, o sangue total foi centrifugado a 2.000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, o plasma foi descartado e o pellet de eritrócitos foi lavado três vezes com solução salina tamponada. Após as lavagens, os eritrócitos foram ressuspensas em solução salina tamponada ajustando-se o hematócrito em 10%.



2.3 Protocolo de exposição aguda ao extrato hidroetanólico de erva-mate

O extrato hidroetanólico de erva-mate em pó foi previamente diluído em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Aldrich, EUA) para incubação das PBMC e em solução salina tamponada para incubação dos eritrócitos, ambos em concentração final de 2.000 µg/mL, para posterior utilização nos protocolos de exposição.

As PBMC de cada indivíduo foram divididas em 5 grupos de 3×10^6 células e incubadas com (1) meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Aldrich, EUA) (controle), (2) RPMI 1640 +1µg/mL de extrato de erva-mate, (3) RPMI 1640 +10µg/mL de extrato de erva-mate, (4) RPMI 1640 +100µg/mL de extrato de erva-mate e (5) RPMI 1640 +1.000µg/mL de extrato de erva-mate, por 150 minutos, a 37°C.

Os eritrócitos de cada indivíduo foram divididos em 5 grupos de 200 µL de suspensão de eritrócitos a 10% de hematócrito e incubados com (1) solução salina tamponada (controle), (2) solução salina tamponada + 1µg/mL de extrato de erva-mate, (3) solução salina tamponada + 10µg/mL de extrato de erva-mate, (4) solução salina tamponada + 100µg/mL de extrato de erva-mate e (5) solução salina tamponada + 1.000µg/mL de extrato de erva-mate, por 150 minutos, a 37°C.

Após os protocolos de exposição, foi avaliada a citotoxicidade através dos ensaios de MTT e Incorporação de Vermelho Neutro nas PBMC e dos ensaios de hemólise e fragilidade osmótica nos eritrócitos. Além disso, em ambos modelos celulares, foram avaliados os marcadores de estresse oxidativo, substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e quantificação de Compostos Tiólicos Totais.

2.4 Ensaio de MTT

As PBMC previamente submetidas ao protocolo de exposição foram incubadas com 1mg/mL de brometo de 3-4,5 dimetiliazol-2, 5 difenil tetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich, EUA), por 120 minutos à 37°C. Após a incubação, os cristais de formazam formados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, EUA) e a absorbância foi lida em leitor de placas Biochrom EZ Read 400 no comprimento de onda de 570nm. Os resultados foram expressos em porcentagem da viabilidade celular em relação ao controle (Mosmann, 1983).

2.5 Ensaio de Incorporação de Vermelho Neutro

As PBMC previamente submetidas ao protocolo de exposição foram incubadas com 50mg/mL do reagente Vermelho Neutro (Sigma Aldrich, EUA) por 180 minutos, ao abrigo da luz, à 37°C. Posteriormente, as células foram lavadas com salina tamponada de fosfato (PBS) e foi adicionado um revelador (1mL de ácido acético glacial, 50 mL de etanol PA, 49 mL de água) ao pellet celular. A absorbância foi lida em leitor de placas Biochrom EZ Read 400 no comprimento de onda de 540nm. Os resultados foram expressos em porcentagem da viabilidade celular em relação ao controle (Borenfreund & Puerner, 1984).



2.6 Ensaio de Hemólise

Os eritrócitos previamente submetidos ao protocolo de exposição foram centrifugados a 1.500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi removido. A presença de hemoglobina no sobrenadante, como consequência da indução de hemólise dos eritrócitos pelo extrato, foi quantificada em leitor de placas Biochrom EZ Read 400 no comprimento de onda de 542 nm. Um branco de cada concentração do extrato foi realizado para evitar interferências espectrais. A absorbância de hemólise completa (controle positivo: 100% de hemólise) foi obtida pela adição de 200µL da solução de eritrócitos com hematócrito a 10% de cada indivíduo a 1.000µL de água destilada. A hemólise foi determinada pela fórmula: % de hemólise = ((Absorbância do teste - absorbância do branco para cada concentração do extrato)/Absorbância do controle de hemólise completa) x 100 (Bonfanti et al., 2014).

2.7 Ensaio de Fragilidade Osmótica

Os eritrócitos previamente submetidos ao protocolo de exposição foram posteriormente incubados em 1.000µL de solução salina tamponada em diferentes concentrações de NaCl (75mM, 100mM e 150mM) durante 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas e o conteúdo de hemoglobina do sobrenadante foi determinado em leitor de placas Biochrom EZ Read 400 no comprimento de onda de 542 nm. A absorbância de hemólise completa (controle positivo: 100% de hemólise) foi obtida pela adição de 200µL da solução de eritrócitos com hematócrito a 10% de cada indivíduo a 1.000µL de água destilada. A taxa de hemólise de cada grupo foi determinada pela fórmula: % de hemólise = (Absorbância do teste/Absorbância do controle de hemólise completa) x 100 (Portela et al., 2017).

2.8 Ensaio de grupamentos tiólicos

Os grupamentos tiólicos não proteicos e totais foram quantificados nos eritrócitos e PBMCs, respectivamente, de acordo com Ellman (1972), através redução do ácido 5,5'-ditio (bis-nitrobenzóico) (DTNB) em pH 7,0. Posteriormente, a reação foi lida em leitor de placas Biochrom EZ Read 400 a 412 nm. Os resultados foram expressos em nmol GSH (glutathiona) /mL de suspensão de eritrócitos a 10% ou nmol GSH/mg de proteína. O nível de proteínas foi determinado pelo método de Peterson (1977), utilizando como padrão albumina de soro bovino (Peterson, 1977).

2.9 Ensaio de Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi analisada através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), com base no método descrito por Stocks e Dormandy (1971). A absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro, através da leitura em 532nm, utilizando como padrão a curva com diferentes concentrações de Malondialdeído (MDA). Os resultados



foram expressos por nmol MDA/mL de suspensão de eritrócitos a 10% ou nmol MDA/mg de proteína.

2.10 Análise dos dados

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para verificação da normalidade na distribuição das amostras para cada variável. Amostras paramétricas foram avaliadas pelo Teste de Anova de Uma Via, seguida de pós-teste Tukey e as não paramétricas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguida de pós-teste Dunn. Para todas as análises, foi considerado significativo $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$.

3. RESULTADOS

Inicialmente, foi avaliada a citotoxicidade de diferentes concentrações de extrato hidroetanólico de erva-mate em PBMC. No ensaio de incorporação de corante supravital Vermelho Neutro, não foi detectada citotoxicidade do extrato nas concentrações testadas, não sendo constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo (Figura 1A). No ensaio de MTT não foi constatada diminuição significativa da viabilidade, no entanto, houve aumento da atividade metabólica mitocondrial no grupo 10 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao controle e ao grupo 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1B), sugerindo a capacidade do extrato de erva-mate de modular a atividade celular. Juntos, estes resultados sugerem que o extrato de erva-mate nas doses e tempo testados não diminuíram a viabilidade celular em PBMC.

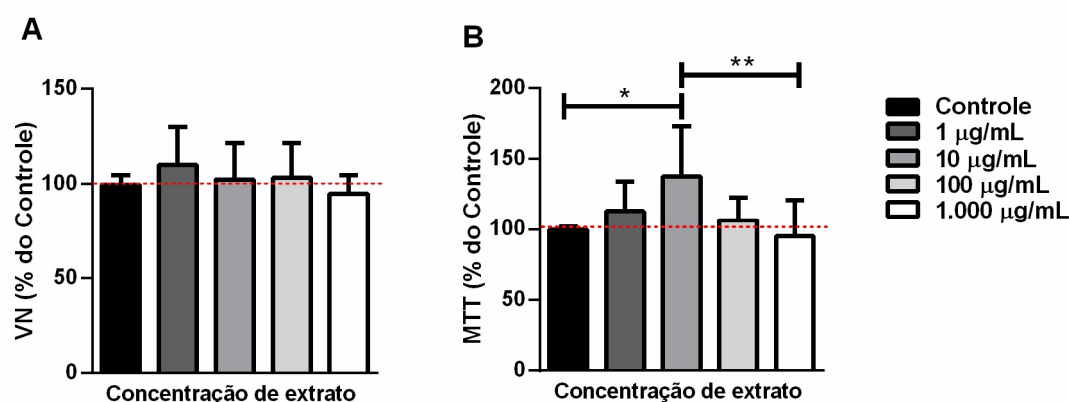


Figura 1: Efeito do extrato hidroetanólico de erva-mate sobre a viabilidade celular de PBMC. (A) Viabilidade Celular avaliada pelo Ensaio de Incorporação de Corante Supravital Vermelho Neutro. (B) Viabilidade Celular avaliada pelo Ensaio de MTT. VN: Vermelho Neutro, MTT: brometo de 3-4,5 dimetiltiazol-2, 5 difenil tetrazólio. Dados representados através de média e desvio padrão, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$. Diferenças estatisticamente significativas avaliadas pelo teste de Anova de Uma Via seguido de pós-teste Tukey, $n=10$.

A citotoxicidade do extrato hidroetanólico de erva-mate nos eritrócitos, por sua vez, foi avaliada pela indução direta de hemólise (Figura 2A), que demonstrou aumento significativo no

grupo 1.000 µg/mL em relação aos grupos 1µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL. Além disso, foi realizado o teste de Fragilidade Osmótica (Figura 2B), a fim de verificar se o extrato aumenta a propensão dos eritrócitos ao dano hemolítico. Este ensaio demonstrou aumento estatisticamente significativo da fragilidade osmótica de eritrócitos do grupo 1.000 µg/mL quando estes foram posteriormente incubados com soluções salinas de 75 mM e 100 mM em comparação ao controle. Estes dados demonstram que a concentração de 1.000 µg/mL de extrato de erva-mate é citotóxica para eritrócitos e sugere que os eritrócitos possuem maior sensibilidade a ação de moléculas exógenas em relação as PBMC.

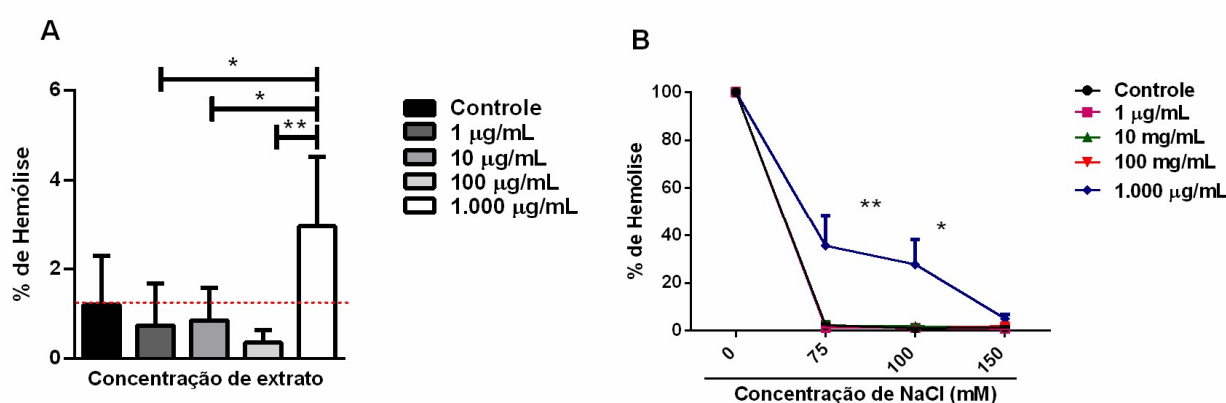


Figura 2. Efeito do extrato hidroetanólico de erva-mate sobre a viabilidade celular de eritrócitos. (A) Ensaio de Hemólise, dados representados através de média e desvio padrão. (B) Ensaio de Fragilidade Osmótica, dados representados através de média e erro padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Diferenças estatísticas avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn, $n=10$.

Posteriormente, foi quantificado o nível de peroxidação lipídica como marcador de dano a macromoléculas celulares. Nos eritrócitos, o nível de peroxidação lipídica foi de $1,98 \pm 0,53$ nmol de MDA/mL no grupo controle, de $2,40 \pm 0,78$ no grupo de 1 µg/mL de extrato, de $2,46 \pm 0,75$ no grupo de 10 µg/mL de extrato, de $2,40 \pm 0,93$ no grupo de 100 µg/mL de extrato e de $2,95 \pm 0,93$ nmol de MDA/mL no grupo de 1.000 µg/mL de extrato. A concentração de 1.000 µg/mL de extrato de erva-mate aumentou significativamente o nível de peroxidação lipídica em eritrócitos, quando comparados ao controle (Figura 3A).

Nas PBMC, o nível de peroxidação lipídica foi de $2,71 \pm 1,58$ nmol de MDA/mg de proteína no grupo controle, de $2,62 \pm 1,18$ no grupo de 1 µg/mL de extrato, de $3,02 \pm 1,50$ no grupo de 10 µg/mL de extrato, de $2,95 \pm 1,35$ no grupo de 100 µg/mL de extrato e de $3,32 \pm 1,41$ no grupo de 1.000 µg/mL de extrato. Diferente dos eritrócitos, nas PBMC não houve diferença estatisticamente significativa de peroxidação lipídica entre os grupos testados (Figura 3B).

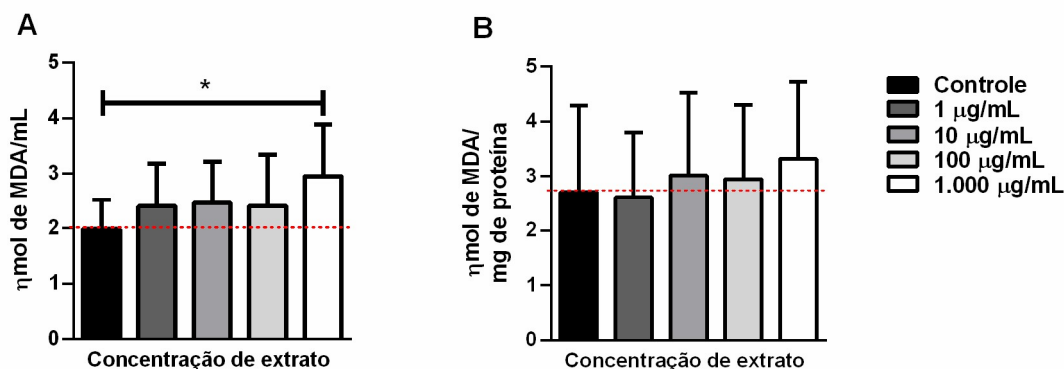


Figura 3. Efeito do extrato hidroetanólico de erva-mate sobre a peroxidação lipídica. (A) Avaliação da peroxidação lipídica em eritrócitos. (B) Avaliação da peroxidação lipídica em PBMC. * $p < 0,05$. Dados representados através de média e desvio padrão. Diferenças estatísticas avaliadas pelo teste de Anova de Uma Via seguido de pós-teste Tukey, $n=10$.

O efeito do extrato hidroetanólico de erva-mate sobre o nível de antioxidantes celulares foi avaliado através da análise dos grupamentos tiólicos. Nos eritrócitos, o nível de grupamentos tiólicos foi de $74,62 \pm 32,15$ µg de GSH/mL no grupo controle, de $67,02 \pm 7,37$ no grupo de 1 µg/mL de extrato, de $61,88 \pm 8,73$ no grupo de 10 µg/mL de extrato, de $73,61 \pm 8,44$ no grupo de 100 µg/mL de extrato e de $63,48 \pm 20,50$ no grupo de 1.000 µg/mL de extrato.

Nas PBMC, o nível de grupamentos tiólicos foi de $17,27 \pm 7,64$ µg de GSH/mg de proteína no grupo controle, de $18,89 \pm 10,11$ no grupo de 1 µg/mL de extrato, de $17,87 \pm 9,59$ no grupo de 10 µg/mL de extrato, de $12,37 \pm 7,82$ no grupo de 100 µg/mL de extrato e de $12,97 \pm 11,80$ no grupo de 1.000 µg/mL de extrato. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento na atividade antioxidante em eritrócitos (Figura 4A) e em PBMC (Figura 4B).

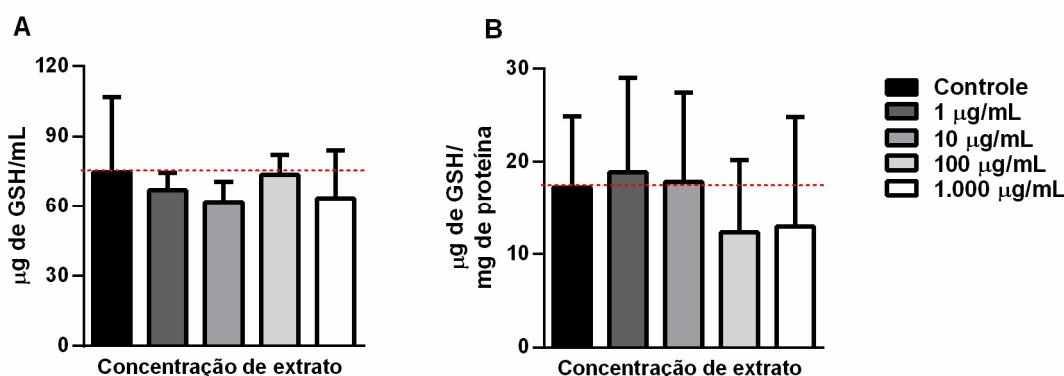


Figura 4. Efeito do extrato hidroetanólico de erva-mate sobre a atividade antioxidante. (A) Avaliação de grupamentos tiólicos não-proteicos em eritrócitos. (B) Avaliação de grupamentos tiólicos totais em PBMC. Dados representados através de média e desvio padrão. Diferenças estatísticas avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn, $n=10$.

4. DISCUSSÃO

A utilização de produtos naturais como fontes exógenas de compostos antioxidantes e anti-inflamatórios tem crescido como terapia alternativa e complementar. No entanto, é necessária uma completa avaliação dos riscos biológicos oferecidos por diferentes plantas para sua posterior utilização terapêutica (Bracesco et al., 2011). Desta forma, neste trabalho foi demonstrado o efeito citotóxico diferencial do extrato hidroetanólico de erva-mate em dois modelos de células sanguíneas humanas: eritrócitos e PBMC.

No modelo agudo de exposição, não foi constatada citotoxicidade ou dano oxidativo em PBMC. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que avalia a citotoxicidade aguda do extrato hidroetanólico de erva-mate neste modelo celular. Por outro lado, já foi demonstrado que a infusão das folhas de erva-mate em exposição crônica de 72 horas diminuiu significativamente a viabilidade celular de PBMC (Munoz-Culla, Saenz-Cuesta, Guereca-Barandiaran, Ribeiro, & Otaegui, 2016) sendo que baixas concentrações da infusão são capazes de induzir aumento significativo de morte celular por apoptose, enquanto que concentrações maiores induzem morte celular por necrose (Wnuk et al., 2009).

Apesar de não ter sido detectado efeito citotóxico do extrato de erva-mate sobre PBMC, na concentração de 10 µg/mL houve aumento da atividade celular, demonstrada pelo ensaio de MTT. Este ensaio avalia a viabilidade celular através da redução do MTT por enzimas mitocondriais e/ou citosólicas, como oxidoredutases, desidrogenases, oxidases e peroxidases, usando NADH, NADPH, succinato ou piruvato como doadores de elétrons. Desta forma, o aumento na capacidade celular de reduzir MTT pode ser vista como uma medida da taxa metabólica da célula (Prabst, Engelhardt, Ringgeler, & Hubner, 2017; Stockert, Horobin, Colombo, & Blazquez-Castro, 2018), indicando que apenas baixas concentrações do extrato de erva-mate podem modular positivamente o metabolismo energético celular. Estudo semelhante mostrou que o extrato de outra planta (*Syzygium jambos*) foi capaz de aumentar a capacidade de redução de MTT em linfócitos murinos (Bonfanti-Azzolin et al., 2019), podendo este ser um efeito causado por compostos em comum presentes em diferentes plantas.

Ao contrário do efeito observado em PBMC, o extrato hidroetanólico de erva-mate na concentração de 1.000 µg/mL apresentou efeitos citotóxicos em eritrócitos. Neste contexto, além de ser capaz de induzir hemólise direta, deixou os eritrócitos mais propensos ao dano hemolítico (aumento da fragilidade osmótica) e induziu dano oxidativo. Estudos prévios na literatura utilizando modelos de exposição aguda em eritrócitos demonstraram que infusão de folhas de erva-mate em concentrações de até 2.000 µg/mL não foram capazes de induzir hemólise (Peralta, Cogoi, Filip, & Anesini, 2013; Portela et al., 2017). Embora os modelos de incubação sejam semelhantes aos utilizados neste trabalho, a forma de obtenção do extrato foi diferente. De fato, apesar do grande potencial da erva-mate como planta medicinal, sua eficácia varia de acordo com a concentração e a extração dos compostos, sendo eles em menor quantidade quando solúveis em água e em maiores quantidades quando solúveis em solventes alcoólicos (Pilatti-Riccio et al., 2019; PRÁ et al., 2006). Desta forma, nos extratos etanólicos, a maior concentração de compostos da planta pode induzir maior toxicidade, mesmo em tempos de exposição menores.



Além da hemólise, a maior concentração do extrato induziu peroxidação lipídica em eritrócitos. A peroxidação lipídica é um fenômeno que ocorre principalmente nos lipídios das membranas celulares, sendo que em eritrócitos pode levar a diminuição da fluidez da membrana, aumentando a capacidade de hemólise (Hermann, Pianovski, Henneberg, Nascimento, & Leonart, 2016). Assim, a maior concentração de extrato testada apresentou ação pró-oxidante, e o dano causado na membrana celular parece ter propiciado maior fragilidade osmótica às células e, como consequência, hemólise. Apesar de termos constatado que uma dose alta de extrato hidroetanólico de erva-mate induz peroxidação lipídica, estudos prévios também já demonstraram que o extrato de erva-mate possui atividade antioxidante frente ao dano oxidativo (Becker et al., 2019; Pereira et al., 2017; Petrilli et al., 2016). Assim, é necessário o ajuste da dose do extrato para que seu uso como antioxidante seja eficaz e seguro.

Em nenhum dos modelos celulares utilizados, foi constatada a modulação do nível de grupamentos tiólicos, evidenciando que os efeitos encontrados não decorrem do consumo desse tipo de antioxidantes.

As diferentes respostas celulares a exposição ao extrato de erva-mate observadas nos dois modelos estudados pode ter ocorrido como consequência da diferença na estrutura das células. Os eritrócitos são células mais sensíveis que possuem uma membrana plasmática com estrutura flexível, composta por 42% de lipídeos, 52% de proteínas e 6% de carboidratos. Sua camada fosfolipídica lhe garante facilidade no transporte e na permeabilidade celular, permitindo a passagem de substâncias do meio extracelular para o intracelular e vice-versa, o que lhe confere maior fragilidade osmótica que outras células (Maheshwari, Khan, & Mahmood, 2019). Além disso, por não produzir proteínas e enzimas, é um tipo celular mais vulnerável ao estresse oxidativo (Caulier, Guyonneau Harmand, & Garcon, 2017). Já as PBMC são células que vem sendo amplamente utilizadas em estudos de citotoxicidade e genotoxicidade devido a sua resistência, que confere maior reprodutibilidade das condições dos testes (Alves et al., 2019). Nesse sentido, o uso conjunto de diferentes modelos experimentais permite avaliação de biomarcadores complementares que auxiliem na interpretação e garantem maior fidedignidade e segurança na leitura dos resultados.

5. CONCLUSÃO

Constatou-se que o extrato hidroetanólico de erva-mate induziu efeito diferencial em PBMC e eritrócitos. Em PBMC, não houve citotoxicidade em nenhuma concentração testada. No entanto, ocorreu uma modulação metabólica na dose de 10µg/mL, sugerindo benefícios do extrato que poderão ser explorados em novos estudos.

Em eritrócitos, a concentração de 1.000 µg/mL induziu citotoxicidade, aumentando a taxa de hemólise, a fragilidade osmótica e a dano oxidativo, sugerindo que, mesmo em exposições agudas, o extrato hidroetanólico pode apresentar efeito pró-oxidante. Assim, apesar de conhecida popularmente, uma maior investigação dos efeitos encontrados nesse estudo, assim como dos



componentes do extrato responsáveis por tais atividade, são essenciais para a recomendação segura e eficaz da erva-mate como planta medicinal.

6. REFERÊNCIAS

- Alves, A. O., Weis, G. C. C., Unfer, T. C., Assmann, C. E., Barbisan, F., Azzolin, V. F., . . . da Cruz, I. B. M. (2019). Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells. *Food Chem Toxicol*, *134*, 110809. doi: 10.1016/j.fct.2019.110809
- Bains, Y., & Gugliucci, A. (2017). Ilex paraguariensis and its main component chlorogenic acid inhibit fructose formation of advanced glycation endproducts with amino acids at conditions compatible with those in the digestive system. *Fitoterapia*, *117*, 6-10. doi: 10.1016/j.fitote.2016.12.006
- Baran, A., Gruszecka-Kosowska, A., Kolton, A., Jasiewicz, C., & Piwowar, P. (2018). Content and health risk assessment of selected elements in the Yerba mate (Ilex paraguariensis, St. hillaire). *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, *24*(4), 1092-1114.
- Becker, A. M., Cunha, H. P., Lindenberg, A. C., de Andrade, F., de Carvalho, T., Boaventura, B. C. B., & da Silva, E. L. (2019). Spray-Dried Yerba Mate Extract Capsules: Clinical Evaluation and Antioxidant Potential in Healthy Individuals. *Plant Foods Hum Nutr*, *74*(4), 495-500. doi: 10.1007/s11130-019-00764-4
- Bonfanti-Azzolin, G., Zambra, A. L., Silva, B. M. d., Bona, K. S. D., Bitencourt, P. E. R., Cargnelutti, L., . . . Gonçalves, T. d. L. (2019). Toxicity assessment of Syzygium jambos and Solanum guaraniticum hydroethanolic leaf extracts thru Artemia salina lethality and spleen lymphocyte cytotoxicity tests. *International Educative Research Foundation and Publisher*, *7*(10), 133.
- Bonfanti, G., Bona, K. S., Lucca, L., Jantsch, L., Pigatto, A. S., Boligon, A. A., . . . Goncalves Tde, L. (2014). Delta-ALA-D inhibitory potential and protective action of Syzygium jambos and Solanum guaraniticum leaf extracts on oxidatively stressed erythrocytes. *Redox Rep*, *19*(5), 206-213. doi: 10.1179/1351000214Y.0000000092
- Borenfreund, E., & Puerner, J. A. (1984). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of tissue culture methods*, *9*, 7-9.
- Boyne, A. F., & Ellman, G. L. (1972). A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal Biochem*, *46*(2), 639-653. doi: 10.1016/0003-2697(72)90335-1
- Bracesco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T., & Gugliucci, A. (2011). Recent advances on Ilex paraguariensis research: minireview. *J Ethnopharmacol*, *136*(3), 378-384. doi: 10.1016/j.jep.2010.06.032



- Caulier, A., Guyonneau Harmand, L., & Garcon, L. (2017). [Immortalization of erythroid progenitors for in vitro large-scale red cell production]. *Transfus Clin Biol*, 24(3), 263-267. doi: 10.1016/j.tracli.2017.06.030
- Correa, V. G., de Sa-Nakanishi, A. B., Goncalves, G. A., Barros, L., Ferreira, I., Bracht, A., & Peralta, R. M. (2019). Yerba mate aqueous extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. *Food Funct*, 10(9), 5682-5696. doi: 10.1039/c9fo00491b
- Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, 4, 177.
- Fonseca, C. A., Otto, S. S., Paumgarten, F. J., & Leitao, A. C. (2000). Nontoxic, mutagenic, and clastogenic activities of Mate-Chimarrao (*Ilex paraguariensis*). *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 19(4), 333-346.
- Gan, R. Y., Zhang, D., Wang, M., & Corke, H. (2018). Health Benefits of Bioactive Compounds from the Genus *Ilex*, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. *Nutrients*, 10(11). doi: 10.3390/nu10111682
- Heck, C. I., & de Mejia, E. G. (2007). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci*, 72(9), R138-151. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x
- Hermann, P. B., Pianovski, M. A. D., Henneberg, R., Nascimento, A. J., & Leonart, M. S. S. (2016). Marcadores de estresse oxidativo em eritrócitos de crianças com doença falciforme. *Jornal de Pediatria*, 92(4), 394-399.
- Lingabathula, H., & Yellu, N. (2016). Cytotoxicity, oxidative stress, and inflammation in human Hep G2 liver epithelial cells following exposure to gold nanorods. *Toxicol Mech Methods*, 26(5), 340-347. doi: 10.3109/15376516.2016.1164268
- Lubin, J. H., De Stefani, E., Abnet, C. C., Acosta, G., Boffetta, P., Victora, C., . . . Dawsey, S. M. (2014). Mate drinking and esophageal squamous cell carcinoma in South America: pooled results from two large multicenter case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23(1), 107-116. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0796
- Maheshwari, N., Khan, F. H., & Mahmood, R. (2019). Pentachlorophenol-induced cytotoxicity in human erythrocytes: enhanced generation of ROS and RNS, lowered antioxidant power, inhibition of glucose metabolism, and morphological changes. *Environ Sci Pollut Res Int*, 26(13), 12985-13001. doi: 10.1007/s11356-019-04736-8
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4



- Munoz-Culla, M., Saenz-Cuesta, M., Guereca-Barandiaran, M. J., Ribeiro, M. L., & Otaegui, D. (2016). Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) inhibits lymphocyte activation in vitro. *Food Funct*, 7(11), 4556-4563. doi: 10.1039/c6fo01061j
- Noureddine, T., El Hussein, Z., Nehme, A., & Abdel Massih, R. (2018). Antibacterial activity of *Ilex paraguariensis* (Yerba Mate) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Infect Dev Ctries*, 12(9), 712-719. doi: 10.3855/jidc.10380
- Peralta, I. N., Cogoi, L., Filip, R., & Anesini, C. (2013). Prevention of hydrogen peroxide-induced red blood cells lysis by *Ilex paraguariensis* aqueous extract: participation of phenolic and xanthine compounds. *Phytother Res*, 27(2), 192-198. doi: 10.1002/ptr.4700
- Pereira, A. A. F., Tirapeli, K. G., Chaves-Neto, A. H., da Silva Brasilino, M., da Rocha, C. Q., Bello-Klein, A., . . . Nakamune, A. (2017). *Ilex paraguariensis* supplementation may be an effective nutritional approach to modulate oxidative stress during perimenopause. *Exp Gerontol*, 90, 14-18. doi: 10.1016/j.exger.2017.01.011
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, 83(2), 346-356. doi: 10.1016/0003-2697(77)90043-4
- Petrilli, A. A., Souza, S. J., Teixeira, A. M., Pontilho, P. M., Souza, J. M., Luzia, L. A., & Rondo, P. H. (2016). Effect of Chocolate and Yerba Mate Phenolic Compounds on Inflammatory and Oxidative Biomarkers in HIV/AIDS Individuals. *Nutrients*, 8(5). doi: 10.3390/nu8050132
- Pilatti-Riccio, D., Santos, D. F. d., DillenburgMeinhart, A., AntonioKnapp, M., Hackbart, H. C. d. S., & ZanellaPinto, V. (2019). Impact of the use of saccharides in the encapsulation of *Ilex paraguariensis* extract. *Food Research International*, 125, 108-600.
- Piovezan-Borges, A. C., Valerio-Junior, C., Goncalves, I. L., Mielniczki-Pereira, A. A., & Valduga, A. T. (2016). Antioxidant potential of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) extracts in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in oxidant defense genes. *Braz J Biol*, 76(2), 539-544. doi: 10.1590/1519-6984.01115
- Pires, C. W., Botton, G., Cadona, F. C., Machado, A. K., Azzolin, V. F., da Cruz, I. B., . . . Praetzel, J. R. (2016). Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. *Int Endod J*, 49(8), 737-745. doi: 10.1111/iej.12502
- Portela, J. L., Soares, D., Rosa, H., Roos, D. H., Pinton, S., Avila, D. S., & Puntel, R. L. (2017). *Ilex paraguariensis* crude extract acts on protection and reversion from damage induced by t-butyl hydroperoxide in human erythrocytes: a comparative study with isolated caffeic and/or chlorogenic acids. *J Sci Food Agric*, 97(7), 2007-2014. doi: 10.1002/jsfa.8001
- Pourahmad, J., & Salimi, A. (2015). Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iran J Pharm Res*, 14(4), 979.



- PRÁ, D., GUECHEVA, T., FRANKE, S. I. R., KNAKIEVICZ, T., ERDTMANN, B., & HENRIQUES, J. A. P. (2006). Toxicidade e Genotoxicidade do Sulfato de Cobre em Planárias de Água Doce e Camundongos. *Revista da Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia*, 2(2), 171-175.
- Prabst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hubner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol*, 1601, 1-17. doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9_1
- Prediger, R. D., Fernandes, M. S., Rial, D., Wopereis, S., Pereira, V. S., Bosse, T. S., . . . Costa-Campos, L. (2008). Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *J Ethnopharmacol*, 120(3), 465-473. doi: 10.1016/j.jep.2008.09.018
- Rivelli, D. P., Almeida, R. L., Ropke, C. D., & Barros, S. B. (2011). Hydrolysis influence on phytochemical composition, antioxidant activity, plasma concentration, and tissue distribution of hydroethanolic *Ilex paraguariensis* extract components. *J Agric Food Chem*, 59(16), 8901-8907. doi: 10.1021/jf201665t
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Mello, J. C. P. d., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (2016). *Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento* (G. A Ed. 1 ed.).
- Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blazquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*, 120(3), 159-167. doi: 10.1016/j.acthis.2018.02.005
- Wnuk, M., Lewinska, A., Oklejewicz, B., Bugno, M., Slota, E., & Bartosz, G. (2009). Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res*, 679(1-2), 18-23. doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.07.017

COMO CITAR ESTE ARTIGO:

Mocelin L. C., K. S. Rodrigues, M. G. Brito, I. K. Da Silva, K. C. Grams, A. L. Zambra, J. W. Bortolotto, G. Bonfanti-Azzolin, M. M. Parisi (2021). Efeito citotóxico diferencial do extrato hidroetanólico de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre eritrócitos e células mononucleares de sangue periférico. *Holos*. 37(1), 1-16.

SOBRE OS AUTORES

L. C. MOCELIN

Biomédica egressa do curso de Biomedicina da Universidade de Cruz Alta, atualmente trabalha em Laboratório de Análises Clínicas. E-mail cerutiluciani@gmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2821-6519>

K. S. RODRIGUES

Aluna do curso de Biomedicina da Universidade de Cruz Alta, atualmente é Bolsista PIBIC/CNPQ do Laboratório de Experimentação e Pesquisa em Saúde da Universidade. E-mail: kellyrodrigues2704@gmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8040-2805>



M. G. BRITO

Aluna do curso de Biomedicina da Universidade de Cruz Alta, atualmente é Bolsista PIBIC/CNPQ do Laboratório de Experimentação e Pesquisa em Saúde da Universidade. E-mail: m-dof2010@hotmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4975-1089>

I. K. DA SILVA

Aluna do curso de Biomedicina da Universidade de Cruz Alta, atualmente é Bolsista PAPCT/UNICRUZ do Laboratório de Experimentação e Pesquisa em Saúde da Universidade. E-mail: isadorakottwitz@gmail.com .
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5052-9875>

K. C. GRAMS

Aluna do curso de Biomedicina da Universidade de Cruz Alta, atualmente é Bolsista PIBIC/UNICRUZ do Laboratório de Experimentação e Pesquisa em Saúde da Universidade. E-mail: kendra_grams@hotmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1676-5943>

A. L. ZAMBRA

Egressa do Curso de Farmácia da Universidade de Cruz Alta, atualmente é aluna de mestrado do Programa de Pós Graduação em Atenção Integral a Saúde. E-mail: andressazambra@gmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1607-2741>

J. W. BORTOLOTTO

Professora dos cursos de Farmacia e Biomedicina da Universidade de Cruz Alta. Pesquisadora do Laboratório de Experimentação e Pesquisa em Saúde, Grupo de Pesquisa em Atenção Integral à Saúde. Atua na área de biologia molecular e bioquímica. E-mail: bortolotto@unicruz.edu.br
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0271-1685>

G. BONFANTI-AZZOLIN

Professora dos cursos de Farmacia e Biomedicina da Universidade de Cruz Alta. Professora permanente do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde. Pesquisadora do Laboratório de Experimentação e Pesquisa em Saúde, Grupo de Pesquisa em Atenção Integral à Saúde. Atua nas áreas de farmacologia e bioquímica. E-mail: gbonfanti@unicruz.edu.br
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2602-6092>

M. M. PARISI

Professora dos cursos de Farmacia e Biomedicina da Universidade de Cruz Alta. Professora colaboradora do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde. Pesquisadora do Laboratório de Experimentação e Pesquisa em Saúde, Grupo de Pesquisa em Atenção Integral à Saúde. Atua nas áreas de imunologia, biologia molecular e bioquímica. E-mail: mariana_parisi@yahoo.com.br
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2298-7809>

Editor(a) Responsável: Francinaide de Lima Silva Nascimento

Pareceristas Ad Hoc: MARIANA COSTA E CINTHIA TELLES



