

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE NUTRIÇÃO**

Fernanda Monte da Cunha

**EFEITO DE EXTRATOS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St.
Hil) SOBRE LINHAGEM CELULAR HUMANA DE TUMOR DE BEXIGA
T24.**

**Porto Alegre
2011**

Fernanda Monte da Cunha

EFEITO DE EXTRATOS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) SOBRE LINHAGEM CELULAR HUMANA DE TUMOR DE BEXIGA T24.

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Nutrição, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Curso de Nutrição.

Orientadora Prof^a Dr^a Ana Maria Oliveira Battastini

Co-orientadora Prof^a Dr^a Cristiane Matté

Porto Alegre

2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a minha família pela educação, carinho, apoio, presença e compreensão em todos os momentos.

Aos meus colegas de curso, com os quais compartilhei muitas angústias e alegrias. Amigos, que tornaram esses anos muito especiais, dos quais lembrarei sempre com carinho.

Aos colegas do laboratório 22, principalmente à Líliliana e à Fabrícia, pela amizade, companhia, incentivo, e contribuições, inclusive para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora, Ana, pela oportunidade e ensinamentos, durante o período de iniciação científica, muito importante para minha formação pessoal e profissional.

Ao Samuel Kaiser pela colaboração, junto ao professor George González Ortega, da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na preparação dos extratos da erva-mate, utilizados nos experimentos.

RESUMO

Conhecida popularmente como erva-mate, a *Ilex paraguariensis*, é uma espécie naturalmente distribuída em alguns países da América do Sul como Argentina, Brasil e Paraguai, onde seu cultivo desempenha importante papel econômico. Muito utilizada inicialmente pelos povos indígenas habitantes dessa região, seu consumo está bastante ligado a fatores culturais que envolvem o hábito da ingestão de bebidas como o chimarrão e o mate. Entre os efeitos atribuídos aos seus fitoquímicos, estão os potenciais antioxidantes, anticarcinogênico e antiobesogênico. Por outro lado, estudos epidemiológicos trazem a associação de seu consumo à incidência de tumores como os de esôfago, rins e bexiga. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi investigar o possível efeito citotóxico de extratos hidroalcoólicos do fruto e da folha de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil sobre a linhagem de câncer de bexiga humano T24. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI, suplementadas com 10% de soro fetal bovino e mantidas em incubadora a 37°C, 95% de umidade relativa do ar e 5% CO₂. Para a realização dos tratamentos, as células foram semeadas e, ao atingirem a semiconfluência, foram tratadas com extratos hidroalcoólicos do fruto imaturo (40% EtOH) e da folha (80%EtOH) da erva-mate. As concentrações utilizadas em ambos os tratamentos variaram de 5 a 1000µg/mL, pelo período de 48h. Após esse período, para o ensaio de contagem celular, as células foram lavadas, tripsinizadas e contadas em hemocitômetro. Para o ensaio de viabilidade celular, foi utilizado MTT 0,5mg/mL, e a densidade óptica do produto formado foi avaliada a 570nm e 630nm, em espectrofotômetro. Os resultados obtidos para o tratamento com o extrato da folha mostraram redução significativa das células tumorais nas concentrações de 300, 600, 800 e 1000µg/mL, o que se confirmou com o ensaio de viabilidade celular, que apresentou menor número de células viáveis inclusive na concentração de 150µg/mL. Quanto ao extrato do fruto, parece ocorrer um efeito citotóxico dose-dependente, mas significativo em ambos os testes apenas nas concentrações de 800 e 1000µg/mL. Os resultados confirmam o potencial citotóxico da erva-mate em células tumorais e trazem novas perspectivas de investigação da ação dessa planta nesse tipo de tumor.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, erva-mate, câncer de bexiga.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 CÂNCER.....	8
1.2 O CÂNCER DE BEXIGA.....	8
1.2.1 Aspectos gerais.....	8
1.2.2 Fatores de risco.....	9
1.2.3 Origem e classificação.....	10
1.2.4 Sintomas	12
1.2.5 Tratamento.....	12
1.3 <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.....	13
1.3.1 Aspectos gerais	13
1.3.2 Características e classificação botânica.....	14
1.3.3 Produção e economia	15
1.3.4 Processamento.....	15
1.3.5 Composição.....	16
1.3.6 Interações com a saúde.....	17
2. OBJETIVO.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	19
3.2 CULTURA CELULAR.....	20
3.3 TRATAMENTOS.....	20
3.4 CONTAGEM CELULAR.....	20
3.5 VIABILIDADE CELULAR.....	21
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
4.RESULTADOS.....	22
4.1 EFEITO DO EXTRATO DO FRUTO SOBRE A CITOTOXICIDADE.....	22
4.2 EFEITO DO EXTRATO DA FOLHA SOBRE A CITOTOXICIDADE.....	23
4.3 EFEITO DOS EXTRATOS DE SOBRE A VIABILIDADE CELULAR.....	25
4.3.1 Extrato do fruto.....	25
4.3.2 Extrato da folha.....	26
5. DISCUSSÃO.....	27

6. CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS.....	31
ANEXO - Procedência e preparo dos extratos.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cânceres mais frequentes em homens.....	9
Figura 2: Camadas da Bexiga e classificação tumoral.....	11
Figura 3: Distribuição natural de ocorrência da erva mate.....	14
Figura 4: <i>Ilex paraguariensis</i>	14
Figura 5: Processamento da erva-mate.....	16
Figura 6: Efeito citotóxico do extrato do fruto da erva-mate (5 a 150µg/mL) na linhagem T24.....	22
Figura 7: Efeito citotóxico do extrato do fruto da erva-mate (150 a 1000µg/mL) na linhagem T24.....	23
Figura 8: Efeito citotóxico do extrato do folha da erva mate (5 a 150µg/mL) na linhagem T24	24
Figura 9: Efeito citotóxico do extrato do folha da erva mate (150 a 1000µg/mL) na linhagem T24.....	25
Figura 10: Efeito do extrato do fruto da erva mate na viabilidade celular.....	26
Figura 11: Efeito do extrato do fruto da erva mate na viabilidade celular.....	27

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (1).

As células, após estímulo, podem sofrer alterações genéticas hereditárias que permitem uma proliferação excessiva e não regulada, formando neoplasias malignas, as quais, ao contrário das neoplasias benignas, são geralmente pouco diferenciadas, possuem alto índice mitótico e a frequente presença de metástases (2).

Os fatores de risco para essa doença podem ter origem ambiental e genética, sendo que cerca de 80% dos casos de câncer estão relacionados a fatores ambientais, como tabagismo, hábitos alimentares, alcoolismo, fatores ocupacionais e radiação solar (1).

De acordo com o Global Cancer Statistics (GLOBOCAN), realizado pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), em 2008, ocorreram 12,8 milhões de novos casos e 7,9 milhões de mortes por câncer no mundo, sendo uma das maiores causas de morte atuais (aproximadamente 13%). Estima-se que, em 2030, o número de mortes seja de 12 milhões (3).

1.2 CÂNCER DE BEXIGA

1.2.1 Aspectos gerais

O tumor de bexiga é a neoplasia mais comum do sistema urinário. É a sétima forma de câncer mais comum em homens no mundo (Figura1), acometendo, em

cerca de 80% dos casos, indivíduos idosos, com mais de 60 anos. Quanto a sua distribuição geográfica, há um predomínio na região ocidental, como nas Américas e na Europa Ocidental, em ambas, ocupando o quarto lugar em incidência. Também considerando a população masculina, ocupa ainda o segundo lugar em incidência na região leste mediterrânea (3).

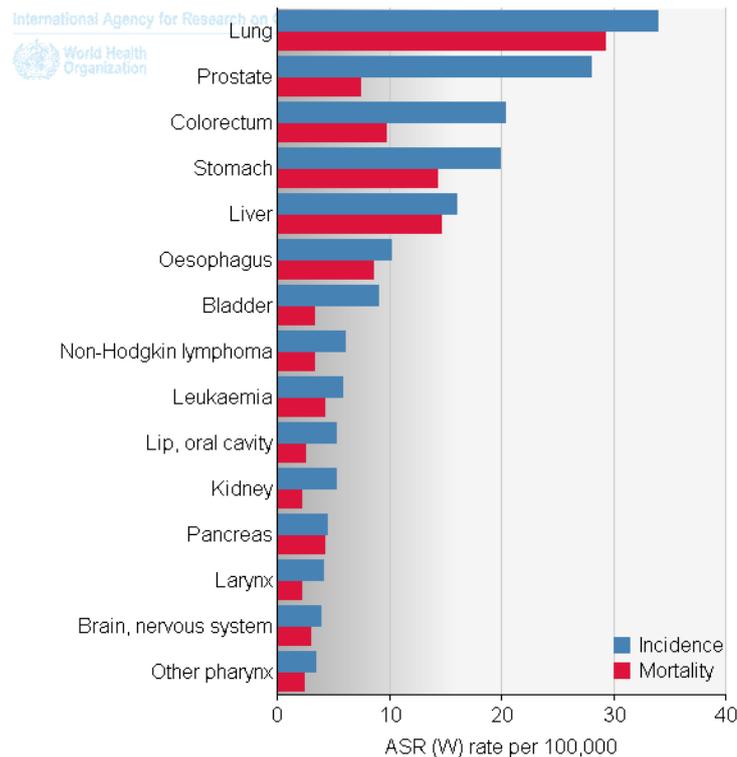


Figura 1: Cânceres mais frequentes em homens, GLOBOCAN,2008(3).

No Brasil, em 2009, a estimativa para novos casos de câncer de bexiga foi de 13.110, incidência maior que a de tumores como os de esôfago, de fígado, de laringe, leucemia, linfomas, entre outros. Já o número de mortes, em 2008, foi de 2.821, sendo 1.967 homens e 854 mulheres (1).

1.2.2 Fatores de Risco

O tabagismo possui uma importante influência na ocorrência desse tipo de câncer. Em homens, o fumo está associado em 50% a 80% dos casos (4). A

exposição ocupacional a aminas aromáticas e seus derivados, nas indústrias de borracha, têxtil e de tintas, também é um importante fator no desenvolvimento do câncer de bexiga (5). Outro fator é o longo período de utilização de analgésicos.

São descritas, também, neoplasias secundárias como consequência de radioterapia pélvica e quimioterapia com agentes irritantes à bexiga, como a ciclofosfamida, um imunossupressor que também está envolvido na indução de cistite hemorrágica (4, 5).

A associação entre o consumo total de líquidos e o desenvolvimento de câncer de bexiga vem sendo estudada, mas os resultados ainda não são conclusivos em populações caucasianas (6, 7). Recentemente, um estudo com população chinesa demonstrou que um aumento na ingestão de líquidos foi associado a uma diminuição do risco de câncer da bexiga (8).

1.2.3 Origem e classificação

Os tumores que surgem na bexiga urinária podem variar desde pequenos papilomas benignos até grandes tumores invasivos. Os papilomas benignos são muito raros e quase sempre não invasivos, raramente recidivam depois de removidos (2). A bexiga humana possui diferentes camadas, as quais são denominadas, em sequência, da parte mais interna para a mais externa: urotélio, lâmina própria, músculo e gordura perivisceral (Figura 2). Os carcinomas de células transicionais são originados no urotélio, camada mais interna da bexiga, e representam a maior parte dos casos (mais de 90%) (4, 9, 10). Apenas 5% dos tumores de bexiga são carcinomas de células escamosas (2) e 2%, adenocarcinomas (9).

A classificação desse tumor é feita conforme o grau de invasividade a essas camadas, considerando o envolvimento de linfonodos regionais e a presença de metástases (Figura 2 e Tabela 1).

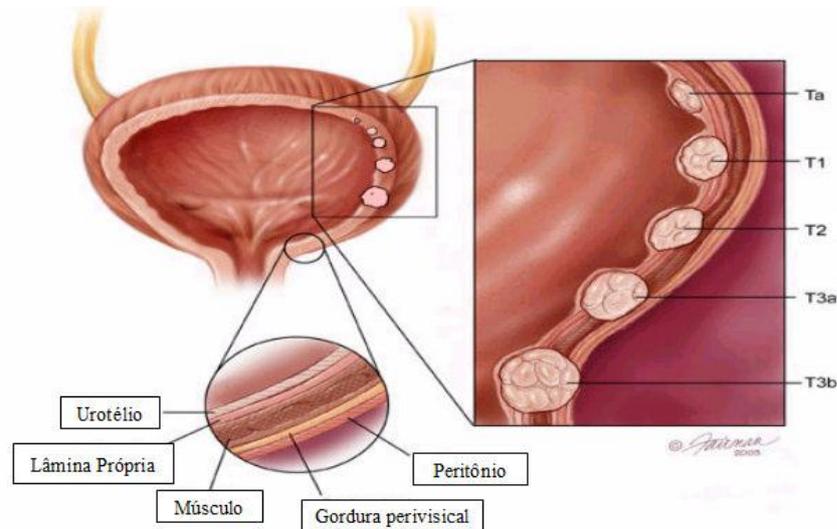


Figura 2: Camadas da bexiga e classificação tumoral (11).

O sistema desenvolvido e publicado pela União Internacional contra o Câncer – UICC, **TNM - Classification of Malignant Tumours**, é o mais utilizado para a classificação de tumores malignos e a descrição de sua extensão anatômica (12) (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação dos tumores de bexiga pelo sistema TNM.

Tumor primário (T)	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Ta	Carcinoma papilar não invasivo
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : “tumor plano”
T1	Invasão do tecido conjuntivo subepitelial
T2	Invasão do músculo
T2a	Invasão do músculo superficial (metade interna)
T2b	Invasão do músculo profundo (metade externa)
T3	Invasão do tecido perivisceral
T3a	Invasão do tecido perivisceral microscopicamente
T3b	Invasão do tecido perivisceral macroscopicamente
T4	Invasão de estruturas adjacentes
T4a	Invasão da próstata, do útero ou da vagina
T4b	Invasão da parede pélvica ou da parede abdominal

Linfonodos regionais (N)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	Metástases em um único linfonodo com dimensão máxima de 2 cm
N2	Metástases em um linfonodo com dimensão entre 2 e 5 cm; ou metástases em múltiplos linfonodos de até 5 cm
N3	Metástase em um ou mais linfonodos maiores de 5 cm
Metástases à distância	
MX	Metástases à distância não podem ser avaliadas
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Metástases à distância

1.2.4 Sintomas

As manifestações clínicas são dependentes do grau do tumor, em geral assemelham-se a afecções benignas, como infecção urinária, cistite intersticial e nefrolitíase (10). A hematúria indolor é a apresentação mais comum e, muitas vezes, é o único sintoma. O aumento da frequência e urgência urinária, assim como a disúria, ocasionalmente podem também ocorrer. Quando atingem os orifícios uretrais ou ureterais, causam obstrução do aparelho urinário por pielonefrite ou hidronefrose (2, 4).

1.2.5 Tratamento

Os tumores menos invasivos são a maioria dos casos diagnosticados (9), no entanto 50 a 75% desses casos progridem para formas mais severas, atingindo a camada muscular. O tratamento mais utilizado nesses casos é a ressecção do tumor, seguida de imunoterapia baseada na instilação intravesical com o bacillus Calmette-Guérin (BCG), o qual provoca uma reação inflamatória local que destrói o

tumor. No entanto, a administração de BCG está associada a muitos efeitos colaterais, incluindo efeitos graves, como a sepse (13).

Nos tumores mais avançados (cerca de 25% dos tumores uroteliais), quando há invasão da camada muscular, o tratamento mais utilizado é a cistectomia radical com a dissecação dos linfonodos pélvicos bilaterais (4, 9, 10). Com o objetivo de conseguir uma resposta terapêutica completa, a quimioterapia, também está associada a esse tratamento na forma neo-adjuvante e adjuvante, a fim de evitar a evolução de metástases (que ocorrem em cerca de 50% dos pacientes com doença músculo invasiva) (9, 10). Dentre os tratamentos quimioterápicos, o protocolo mais utilizado é o MVAC (metotrexato, vimblastina, doxorubicina e cisplatina). Na doença metastática, apesar de inúmeras combinações antigas mostrarem-se eficazes, o esquema MVAC parece ser o mais eficaz, no entanto é bastante tóxico. Outra associação com resultados promissores é a de gemcitabina e cisplatina, utilizada também na forma adjuvante (9, 14).

Quanto aos custos, o tratamento do câncer de bexiga possui os mais altos entre diversas malignidades, sendo que cerca de 60% desses custos são associados com a vigilância e com o tratamento de recidivas (15).

1.3 *Ilex paraguariensis* A. St. Hil

1.3.1 Aspectos gerais

Conhecida popularmente como erva-mate, a *Ilex paraguariensis* é uma espécie distribuída em alguns países na América do sul. Sua área de abrangência natural é de 540.000 km², contemplando os estados Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, no Brasil, e parte da Argentina e do Paraguai, onde ocupa a área entre os rios Paraná e Paraguai (16).

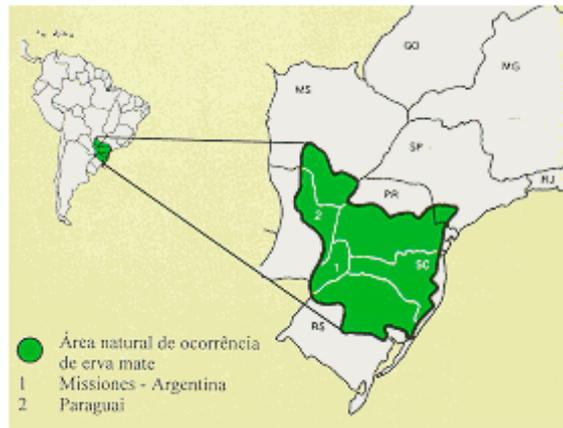


Figura 3: Distribuição natural de ocorrência da erva mate. (16)

Muito utilizada inicialmente pelos povos indígenas habitantes dessa região, seu consumo está bastante ligado a fatores culturais que envolvem o hábito da ingestão de bebidas como o chimarrão, o mate e o tererê, nas quais são utilizados folhas e talos processados em infusão.

1.3.2 Características e classificação botânica

A erva-mate é uma árvore perene, de crescimento lento e de médio porte, que floresce entre os meses de setembro e dezembro, tendo a maturação de seus frutos de janeiro a abril. Seus frutos são globulares, com tamanho variável de 4 a 8 mm, sua coloração, quando madura, é vermelho-arroxeadada. Suas folhas, de coloração verde, são alternadas e com bordas denteadas, medindo de 8 a 10 cm de comprimento e de 4 a 5 cm de largura (17).



Figura 4: *Ilex paraguariensis*. Adaptada de HECK e MEJIA, 2007.

Coletada no Paraná, em 1822, pelo botânico francês Augusto de Saint-Hilaire, seu nome científico foi publicado em 1825 (18). De acordo com o sistema de classificação de Engler, a taxonomia de *Ilex paraguariensis* obedece à seguinte hierarquia:

Tabela 2: Classificação taxonômica da erva-mate.

Divisão	Angiospermae
Classe	Dicotyledoneae
Subclasse	Archichalmydae
Ordem	Celestrales
Família	Aquifoliaceae
Gênero	<i>Ilex</i> L.
Espécie	<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil

1.3.3 Produção e economia

Em 2009, a colheita nos ervais nativos do Brasil foi de 443.126 toneladas de folhas (19). O maior produtor do país é o estado do Paraná, com uma produção de 70,4% do total nacional. Em seguida estão Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul (20). Essa produção mostra-se importante para o país, abrangendo aspectos ambientais, visto que seu plantio pode auxiliar no combate à erosão; sociais, como geradora de empregos; e econômicos, sendo a principal atividade econômica de muitos produtores e municípios, rendendo anualmente R\$ 175 milhões (16).

1.3.4 Processamento

Atualmente a erva-mate não costuma ser consumida em sua forma bruta; assim como é pouco difundido o consumo de seus frutos. Antes de chegar ao

consumidor, as folhas e talos passam por diversas etapas de processamento. As condições de tratamento podem variar dependendo do produtor e do perfil de características organolépticas desejado (21). No entanto, em geral, seu processamento após a colheita até a embalagem e comercialização segue as etapas descritas na figura 5 (16, 21), nas quais o fruto não está incluído.

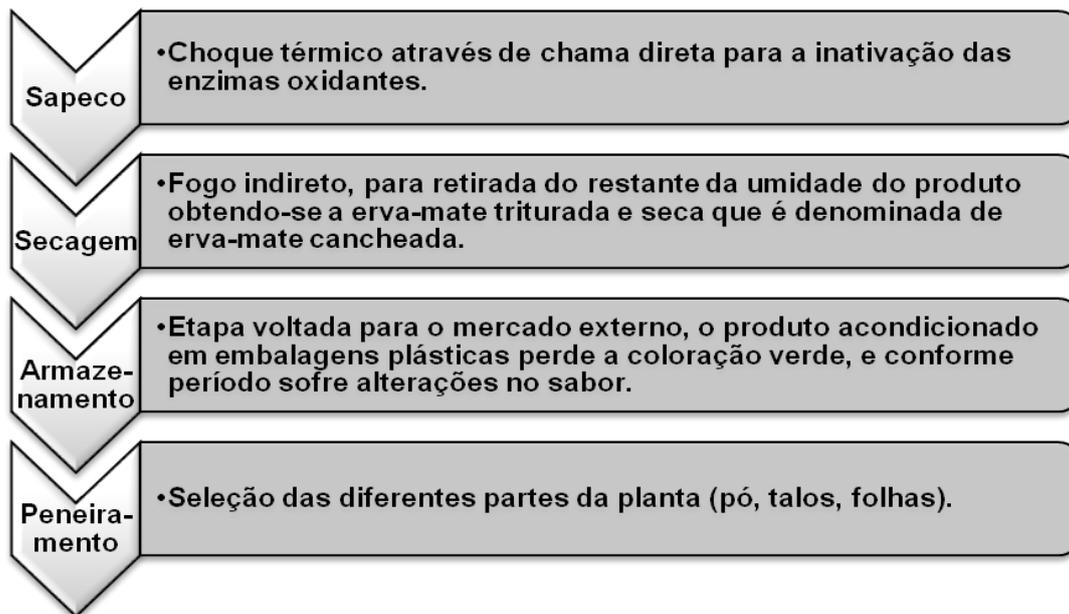


Figura 5: Processamento da erva-mate.

1.3.5 Composição

A erva-mate pode ter variações em sua composição dependendo de alguns fatores que envolvem seu cultivo, como as condições de solo, a posição e a idade das folhas, o clima e a época de colheita (22). Apesar da existência dessas variações, a presença de certos fitoquímicos na composição da *Ilex Paraguariensis* já é descrita por diversos autores. Entre eles estão: alcaloides, esteroides e/ou triterpenos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos (22, 23, 24).

Muitos desses compostos são amplamente estudados, por seus benefícios à saúde, alguns deles são:

Saponinas: encontradas em maiores quantidades nos frutos verdes (25), foram inicialmente consideradas um fator antinutricional em alimentos e apresentavam uso restrito, devido ao seu gosto amargo. Mais recentemente, foram confirmadas evidências de seus benefícios para a saúde, como a redução de níveis de colesterol e propriedades anticancerígenas (26).

Metilxantinas: dentre as mais abundantes estão a cafeína, a teobromina e a teofilina, as quais são constituintes importantes de várias bebidas alimentícias e estimulantes como mate, chás, guaraná e café, consumidas mundialmente (27). Os efeitos biológicos depurativo, diurético e estimulante atribuídos à erva-mate devem-se ao seu alto conteúdo desses compostos, podendo ser, inclusive, a fonte primária de metilxantinas da dieta (28), em regiões de alto consumo dessa erva.

Compostos fenólicos: também presentes na erva-mate (29), são conhecidos como polifenóis. Encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo os flavonóides um grupo muito disseminado na dieta humana. Possuem seus efeitos antioxidante, anti-inflamatório e anticarcinogênico, bastante estudados e descritos.

1.3.6 Interações com a saúde

Devido à ampla utilização da erva-mate e aos seus possíveis potenciais terapêuticos atribuídos a sua composição química, essa planta vem sendo cada vez mais estudada quanto ao seu impacto na saúde, principalmente nas últimas duas décadas (21). Seus efeitos têm sido associados à perda de peso, à carcinogênese e à capacidade antioxidante.

A capacidade antioxidante de extratos de *Ilex paraguariensis* é amplamente descrita (21, 30 - 33). Esse efeito, atribuído à ação de seus compostos fitoquímicos, como os polifenóis, pode ser observado na inibição do estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ROS) (33), demonstrando inclusive efeito cardioprotetor (34); assim como na inibição da propagação da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (31).

A erva-mate também se mostrou eficiente na inibição da geração de produtos de glicação avançada (AGEs) (35, 36), os quais são um dos principais mecanismos desencadeadores das doenças associadas ao diabetes mellitus, que incluem

cardiopatia, retinopatia, neuropatia e nefropatia (37). Essa inibição ainda possuiu maior efetividade quando comparada ao chá verde (36).

Recentes estudos trazem um potencial efeito contra a obesidade, sendo que a ingestão da erva-mate induziu a perda de peso em animais, reduzindo gordura visceral, assim como os níveis séricos de glicose, colesterol total, LDL- colesterol e triglicerídeos (38, 39, 40). Além disso, provocou um efeito modulatório sobre a expressão de vários genes relacionados à obesidade (39). Ainda, foi observada uma redução na atividade da lipase pancreática humana *in vitro* (40). A redução de peso, retardo do esvaziamento gástrico e maior sensação de saciedade foram demonstradas em indivíduos que ingeriram um suplemento à base de erva-mate, guaraná e damiana (41).

Ramirez et al. (42) analisaram o efeito quimiopreventivo da *Ilex paraguariensis* sobre a linhagem de células HepG2 de fígado, observando a redução da atividade de ornitina descarboxilase, marcador e promotor de crescimento tumoral, e inibindo a ação da topoisomerase II, que também apresenta-se elevada em tumores, devido à alta taxa de divisão celular. Em diferentes linhagens de tumor da cavidade oral, a erva-mate também foi capaz de inibir a topoisomerase II e a proliferação celular significativamente (43). Em um estudo *in vivo*, no qual foi comparada a histologia do trato aerodigestivo de ratos submetidos ao consumo de erva-mate com outros que não tiveram esse consumo, não foi evidenciada a relação entre a ingestão da bebida e carcinogênese. No entanto, o trato aerodigestivo foi afetado com o aparecimento de traqueíte e bronquiolite (44). Adicionalmente, quanto ao câncer de língua, ratos submetidos à ingestão de erva-mate na forma de infusão não possuíram alterações nos exames anatomopatológicos ou imuno-histoquímico, compatíveis com processo neoplásico (45).

É crescente o número de estudos epidemiológicos que buscam investigar uma possível associação entre o consumo de erva-mate e alguns tipos de câncer, como os do trato aerodigestivo superior, bexiga e renal.

Estudos de caso-controle no Uruguai mostraram uma associação positiva entre o consumo de mate em câncer renal (46) e de bexiga (47). Confirmando esse achado, um estudo argentino mostrou a associação entre câncer de bexiga e ingestão de mate em fumantes, contudo, essa relação não se mostrou significativa em indivíduos não fumantes. Considerando que o tabagismo é um importante fator

de risco para esse tipo de tumor, é possível que essa relação esteja atribuída ao fumo ou aumentada por ele, e não apenas ao consumo de erva-mate (48).

A associação entre o consumo de mate e câncer de esôfago foi relatada em casos-controle, na Argentina, entretanto não ocorreu a mesma associação em outros cânceres do trato aerodigestivo superior estudados (cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, laringe) (49). Sewram et al. (50) também mostraram essa relação com o câncer de esôfago no Uruguai, sendo que o risco aumenta quase três vezes quando a ingestão ultrapassa um litro. Embora haja essa associação, as altas temperaturas nas quais o mate é consumido, podem ser um fator de confusão, visto que muitos estudos têm relacionado o consumo de bebidas quentes com a incidência de tumores do trato aerodigestivo (51). No sul do Brasil, a temperatura média na qual o chimarrão é consumido é de 69,5°C. Essas altas temperaturas podem causar lesão térmica crônica à mucosa do esôfago (52).

2. OBJETIVO

Considerando os dados expostos, principalmente a ampla utilização da erva mate, os efeitos atribuídos aos seus compostos e a controversa interação com diferentes tipos de tumores, incluindo o câncer de bexiga, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito de extratos da folha e do fruto de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil sobre a proliferação celular na linhagem humana de câncer de bexiga T24.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos liofilizados utilizados nesse estudo foram obtidos no Laboratório do professor George González Ortega, da Faculdade de Farmácia da Universidade

Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). (ANEXO).

3.2 CULTURA CELULAR

A linhagem humana de câncer de bexiga T24, derivada de um tumor T3 de grau III, foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC). Essas células foram cultivadas em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em incubadora a 37°C, com umidade relativa do ar de 95% e atmosfera de 5% CO₂. Para a realização dos tratamentos, as células foram semeadas em placas de 24 poços com densidade de 6×10^3 células/poço em 500µL de meio de cultura ou em placas de 96 poços, com densidade de 3×10^3 células/poço em 100µL de meio de cultura.

3.3 TRATAMENTOS

Para o tratamento com o extrato hidroalcoólico do fruto da *Ilex paraguariensis*, o extrato liofilizado foi dissolvido em água estéril e, ao atingirem a semi-confluência, as células foram tratadas com as concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 150, 300, 600, 800 e 1000 µg/mL. Para a preparação do tratamento com o extrato hidroalcoólico da folha, foi feita a dissolução com o solvente dimetilsulfóxido (DMSO), e as células, ao atingirem a semi-confluência, foram tratadas nas concentrações de 5; 10; 25; 50; 100 e 150, 300, 600, 800 e 1000µg/mL por 48 horas. A concentração final máxima de DMSO nos tratamentos foi 0,5%.

3.4 CONTAGEM CELULAR

Ao atingirem a semiconfluência na placa de 24 poços, as células foram tratadas como acima descrito. Ao final dos tratamentos, o meio de cultura foi

removido e as células lavadas duas vezes com CMF (“calcium and magnesium free buffer”). Em seguida, foram adicionados 150 μL / poço de tripsina a fim de soltá-las. Para inativar da ação da tripsina, foi acrescentado meio de cultura RPMI (300 μL /poço). Após cuidadosa homogeneização e dissociação mecânica, as células foram contadas em hemocitômetro.

3.5 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT, onde as mitocôndrias das células viáveis reduzem o composto brometo de 3- (4,5-dimetil), -2,5 difeniltetrazólio (MTT) e formam um produto de coloração azul formazam. Após o período de tratamento, as células foram lavadas duas vezes com CMF e a solução de MTT (5mg/mL) foi adicionada junto ao meio de incubação celular (RPMI) em uma concentração final de 0,5mg/mL. As células foram incubadas por 2 horas, a 37°C, em atmosfera com umidade relativa do ar de 95% e 5% CO_2 para que ocorresse a reação. Logo, o meio foi removido e após a secagem da placa, DMSO foi adicionado aos poços re-suspendendo o produto formado. A densidade óptica de cada amostra foi avaliada em 570nm e 630nm, em espectrofotômetro.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram apresentados como média \pm DP (desvio padrão). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas para valores de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DO EXTRATO DO FRUTO SOBRE A CITOTOXICIDADE

Para verificar o efeito do extrato hidroalcoólico do fruto da *Ilex* sobre a citotoxicidade, as células da linhagem humana de câncer de bexiga T24 foram tratadas primeiramente com o extrato nas concentrações 5, 10, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$ pelo período de 48 horas. Esse efeito foi analisado por contagem em hemocítômetro. Como pode ser observado na Figura 6, apenas a concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de inibir significativamente o número de células T24 após 48h de tratamento.

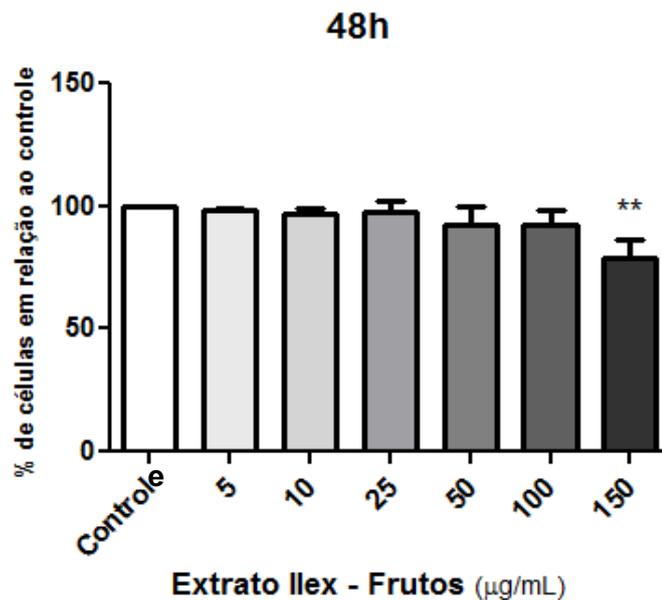


Figura 6. Efeito citotóxico do extrato do fruto da erva-mate na linhagem humana T24 de tumor de bexiga. Os experimentos foram realizados com $n=3$ em triplicata e os valores expressos como média \pm DP e analisados pelo teste estatístico ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey. ** $p < 0,001$ comparado ao controle.

Considerando-se a atividade antiproliferativa observada para o extrato do fruto apenas na maior concentração testada e observando a aparente tendência dose-dependente, as células foram tratadas com concentrações maiores do extrato, 150, 300, 600, 800, 1000 $\mu\text{g/mL}$ pelo mesmo período, 48 horas (Figura 7). Os dados obtidos foram representados em diferentes gráficos, devido ao fato de que os

experimentos não foram feitos em momentos próximos, onde diferiram também no número de células presentes no controle, e no número de passagens das células.

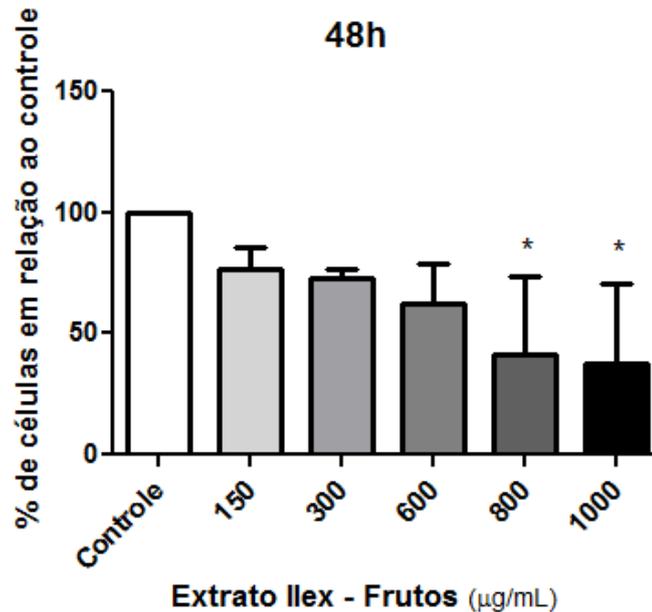


Figura 7. Efeito citotóxico do extrato do fruto da erva-mate na linhagem humana T24 de tumor de bexiga. Os experimentos foram realizados com $n=3$ em triplicata e os valores expressos como média \pm DP e analisados pelo teste estatístico ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparados ao controle.

Nessas concentrações, em 800 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, foi verificada uma redução significativa das células vivas, no entanto, essa significância não foi confirmada na concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$, como no primeiro experimento. Apesar de não significativa, a porcentagem de redução no número de células foi semelhante e manteve a tendência dose-dependente.

4.2 EFEITO DO EXTRATO DA FOLHA SOBRE A CITOTOXICIDADE

Para verificar o efeito do extrato hidroalcoólico da folha da *Ilex paraguariensis* sobre a citotoxicidade, o extrato liofilizado foi dissolvido em DMSO (0,5%). As células da linhagem humana de câncer de bexiga T24 foram tratadas primeiramente com o extrato nas mesmas concentrações utilizadas para o fruto (5 a 150 $\mu\text{g/mL}$) pelo

período de 48 horas e o efeito, com esse tratamento, foi comparado ao controle-DMSO, no qual as células receberam a concentração máxima de DMSO utilizado para a dissolução dos tratamentos. Nenhuma dessas concentrações testadas foi capaz de reduzir significativamente o número de células, no entanto a concentração de 150 µg/mL apresentou uma redução de 19,59% ($\pm 8,935DP$) no número de células vivas.

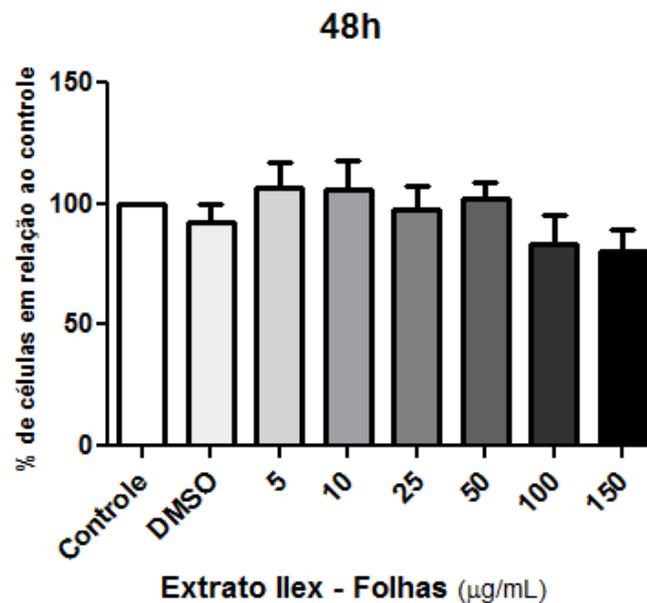


Figura 8. Efeito citotóxico do extrato das folhas da erva-mate na linhagem humana T24 de tumor de bexiga. Os experimentos foram realizados com $n=3$ em triplicata e os valores expressos como média \pm DP e analisados pelo teste estatístico ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey.

A partir desses resultados, conforme protocolo utilizado para o tratamento com o extrato do fruto, foi realizado o tratamento com as concentrações maiores (150, 300, 600, 800, 1000µg/mL) por 48 horas. Confirmou-se uma tendência de redução na porcentagem na concentração de 150 µg/mL. A partir da concentração de 300µg/mL, essa redução foi significativa, e nas concentrações de 600, 800 e 1000µg/mL, o extrato foi capaz de reduzir as células vivas em 94,89%, 94% e 99,43%, respectivamente.

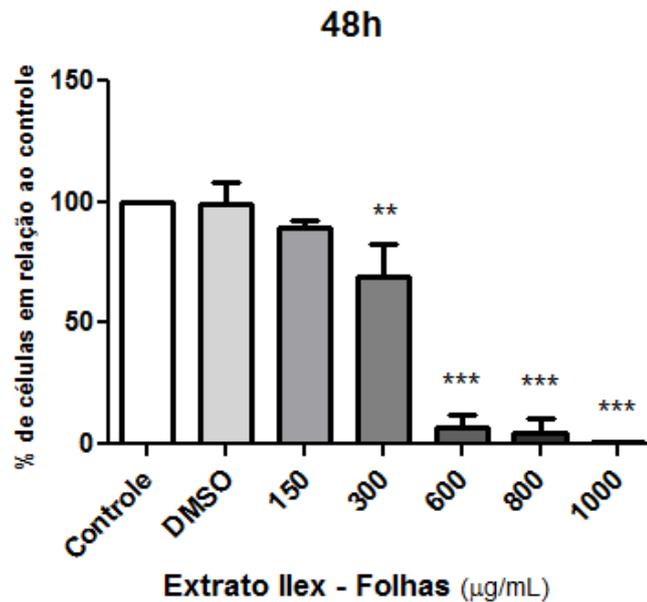


Figura 9. Efeito citotóxico do extrato das folhas da erva-mate na linhagem humana T24 de tumor de bexiga. Os experimentos foram realizados com $n=3$ em triplicata e os valores expressos como média \pm DP e analisados pelo teste estatístico ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey. ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$ comparados ao controle DMSO.

4.3 EFEITO DOS EXTRATOS DE ERVA-MATE SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

Levando em consideração os resultados obtidos com os ensaios de contagem celular, resolveu-se testar a viabilidade celular através do método do MTT após os tratamentos de ambos os extratos, a fim de confirmar os efeitos desses sobre a morte das células T24.

4.3.1 Extrato do fruto

Utilizando as concentrações que variaram entre 150 e 1000 µg/mL, o tratamento com o extrato do fruto de *Ilex Paraguariensis* diminuiu significativamente a viabilidade celular da linhagem T24 apenas na concentração de 800µg/mL, reduzindo-a em 26,99%.

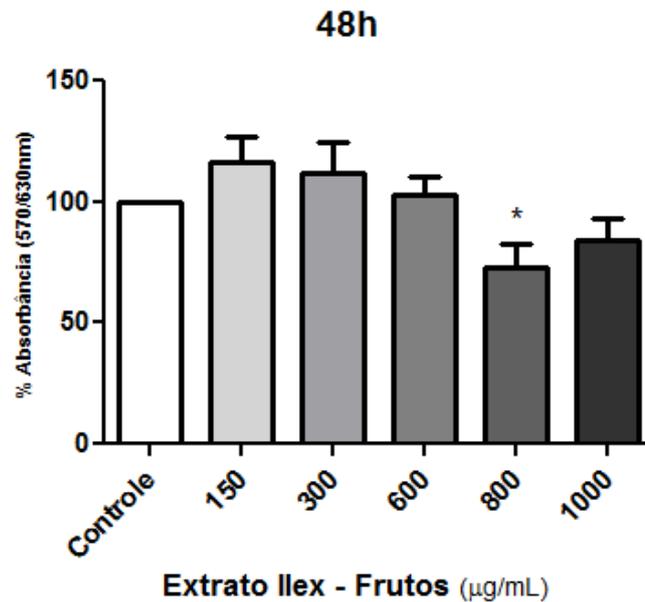


Figura 10. Efeito do extrato do fruto de erva-mate na viabilidade celular da linhagem humana T24 de tumor de bexiga. Os experimentos foram realizados com $n=3$ em triplicata e os valores expressos como média \pm DP e analisados pelo teste estatístico ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0.05$ comparado ao DMSO.

4.3.2 Extrato da folha

Neste ensaio, o tratamento com o extrato liofilizado hidroalcoólico da folha de *Ilex Paraguariensis* diminuiu significativamente a viabilidade celular da linhagem T24 já na concentração de 150µg/mL, reduzindo-a em 35,35%, e nas concentrações de 300, 600, 800 e 1000µg/mL em 76,82%, 76,56%, 76,41% e 70,08% respectivamente.

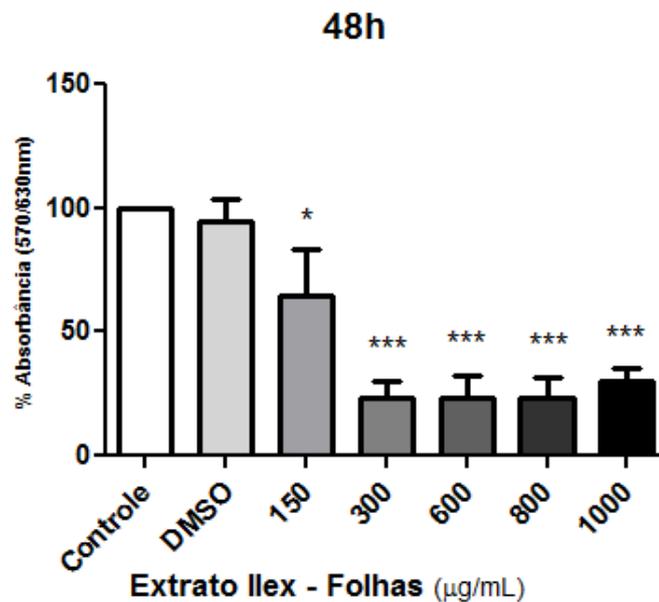


Figura 11. Efeito do extrato da folha de erva-mate na viabilidade celular da linhagem humana T24 de tumor de bexiga. Os experimentos foram realizados com $n=3$ em triplicata e os valores expressos como média \pm DP e analisados pelo teste estatístico ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$ comparados ao DMSO.

5. DISCUSSÃO

Tido seus usos mais remotos pela civilização Inca do Peru, a *Ilex paraguariensis*, planta nativa da América do sul, teve o aperfeiçoamento do seu cultivo, o aumento de sua produção, de seu comércio e de sua exportação pelos jesuítas. Por se tratar de uma planta nativa, o consumo do mate funciona como um elo cultural entre os povos dos diferentes países da região sul da América, assim como entre moradores dos estados do sul do Brasil (53). No Rio Grande do Sul, em uma área urbana da região metropolitana, entre os consumidores de chimarrão, mais de 90% faziam o consumo diário e em média em quantidades superiores a 1L (54). Devido à ampla utilização da erva mate, às suas propriedades terapêuticas, e aos impactos na saúde, ela vem sendo cada vez mais estudada.

O consumo da erva mate na forma de bebidas, como chimarrão, tem sido questionado quanto a sua participação como fator de risco para o aparecimento de

alguns tipos de cânceres, como o de bexiga, renal e do trato aerodigestivo superior, principalmente de esôfago.

Em contrapartida, os benefícios de seus metabólitos secundários são descritos, inclusive quanto ao potencial anticarcinogênico em diferentes tipos de tumores (55,56,57), incluindo linhagens de câncer de bexiga (55,58), como a T24, estudada no presente trabalho. A ampla busca por novos compostos no tratamento dessa neoplasia e possíveis efeitos quimiopreventivos resultantes do seu consumo, fundamentam-se no fato de que os atuais tratamentos mais utilizados para a neoplasia de bexiga, além de permitir um alto número de recidivas, ainda apresentam diversos efeitos adversos (13).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o extrato da folha da erva mate foi capaz de reduzir o número de células na linhagem de tumor de bexiga T24, nas concentrações que variaram de 300 a 1000 µg/mL. Tais resultados corroboram o potencial anticarcinogênico *in vitro*, descrito em outras linhagens celulares, como linhagens de carcinomas orais de células escamosas OSCC-3 e SCC-61(43) e linhagem de células HepG2 de fígado (42).

Dos extratos utilizados, o extrato de folha é o que mais se assemelha à erva-mate comercializada, já que tem como matéria prima as folhas e talos da planta, não incluindo seus frutos. Contudo, a forma de obtenção do produto final não foi realizada como é feita comercialmente, seguindo as etapas básicas de processamento já descritas anteriormente. O extrato hidroalcoólico utilizado, possivelmente, foi capaz de extrair mais fitoquímicos que os extratos aquosos utilizados popularmente como bebidas. O que pode explicar o potencial citotóxico encontrado e não a promoção tumoral, como sugerem alguns estudos epidemiológicos (46, 47).

Além disso, na primeira fase pós-colheita do processamento da erva-mate comercial, na qual há o branqueamento da erva mate através do sapeco com fogo direto, sugere-se que haja a formação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (59, 60). Gerados na combustão incompleta de matéria orgânica, podem ser formados em queimadas florestais, poluição ambiental e em alguns tipos de processamento como defumação, torrefação e secagem direta com madeira. Machado et al., citado por Camargo et al. (59), encontrou níveis de 0,22µg de benzo[a]pireno em 250mL de chimarrão, excedendo recomendações desse HPA para água pura. Fagundes et al. correlacionaram a presença de 1-hidroxipireno-

glicuronídeo (I-OHPG), um derivado e marcador de HPAs na urina de indivíduos com o consumo de mate (60). Os HPAs, por sua vez, possuem potencial mutagênico e carcinogênico já descritos inclusive em tumores de bexiga (61, 62). Christian C. Abnet relacionou a presença de HPA na urina de indivíduos do Rio Grande Sul, com a presença de diferentes polimorfismos (63).

Os frutos da erva-mate são pouco estudados quanto a suas possíveis atividades biológicas. Schubert et al. relatou atividade antioxidante em extratos do fruto, mas inferior quando comparada ao extrato da folha (64). Quanto à sua composição, tem sido relatada a presença de saponinas, e em maior concentração nos frutos imaturos. As saponinas são um grupo diverso de compostos amplamente distribuídos no reino vegetal, que se caracterizam por sua estrutura contendo um glicosídeo triterpeno ou esteroide e uma ou mais cadeias de glicídios. Suas propriedades hipocolesterolêmicas e anticancerígenas já são evidenciadas (27). Saponinas provenientes de *Ardisia gigantifolia* mostraram-se citotóxicas em linhagens de câncer de bexiga, carcinoma gástrico e cervical (65).

Quanto aos resultados obtidos com o tratamento com o extrato hidroalcoólico do fruto da erva-mate, dentre as concentrações que variaram de 5 a 150µg/mL, apenas a maior concentração, 150µg/mL, foi capaz de reduzir significativamente o número de células tumorais em 25,46%. Entretanto, essa redução não se repetiu quando tratadas nas concentrações maiores, de 150 a 1000µg/mL. Apesar de não significativa, a porcentagem de redução no número de células da concentração de 150µg/mL foi semelhante ao primeiro teste (24,9%) e manteve a tendência dose-dependente nas concentrações seguintes. No entanto, apenas nas concentrações de 800 e 1000µg/mL de extrato houve uma redução estatisticamente significativa no número de células vivas. Esses resultados devem-se ao fato de o desvio padrão, nas maiores concentrações testadas (150 a 1000µg/mL) ter sido evidentemente alto. Para a confirmação dos resultados dessa segunda etapa, a repetição do experimento seria o mais indicado.

No ensaio do MTT, confirmaram-se os resultados de citotoxicidade obtidos nas contagens, mais efetivamente com o tratamento do extrato da folha, demonstrando a morte celular já na concentração de 150µg/mL. No tratamento com o extrato do fruto, os resultados também se confirmaram, exceto quanto à maior concentração, 1000µg/mL, a qual não mostrou redução significativa. Uma possível

causa seria atribuída a algum erro experimental, o que traz a necessidade de repetição do experimento.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, não é possível afirmar que a ingestão de erva-mate tenha uma participação no tratamento ou prevenção de tumores de bexiga, considerando que: i) o extrato popularmente utilizado é aquoso, e não hidroalcoólico, como são os extratos de folhas e de frutos utilizados no presente estudo; ii) os resultados só foram significativos em altas concentrações; iii) a composição de cada planta pode variar quanto à suas condições de cultivo; iv) há limitações do modelo *in vitro*. No entanto, os extratos hidroalcoólicos de folhas e de frutos utilizados, reduziram o número de células tumorais de bexiga em cultura após 48h de tratamento, promovendo a citotoxicidade das células tumorais, e trazendo novas perspectivas de investigação para a ação dessa planta nesse tipo de tumor. A avaliação do tipo de morte celular e a avaliação da citotoxicidade em células não tumorais, bem como estudos em modelo animal de câncer de bexiga também seriam importantes a serem estudados, visando à aplicabilidade de possíveis tratamentos.

REFERÊNCIAS

- 1- BRASIL. Ministério da saúde, Instituto Nacional do Câncer. **O que é o câncer?** Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=322 > Acesso em: 10 de set. 2011.
- 2- KUMAR, V. **Robbins patologia básica**. 8. ed. São Paulo : Elsevier, 2008. 1028 p.
- 3- World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. **Global Cancer Statistics 2008**. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr/> > Acesso em: 16 de out 2011.
- 4- KUMAR, V. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 8 ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2010. 1450 p.
- 5- GUIMARÃES, J. L. M.; ROSA, D. C. **Rotinas em oncologia**. Porto Alegre : ArtMed, 2008. 942 p.
- 6- BRINKMAN, M.; ZEEGERS M.P. Nutrition, total fluid and bladder cancer. **Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.** v. 218, p. 25-36, 2008.
- 7- MARTINE M. et al. Fluid intake and the risk of urothelial cell carcinomas in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). **International Journal of Cancer**, v.128, p. 2695–2708, 2011.
- 8- HEMELT, M. et al. Fluid intake and the risk of bladder cancer: Results from the South and East China case-control study on bladder cancer. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 3, p. 638–645, 2010.
- 9- GUIMARÃES, J. R. Q. **Manual de oncologia**. 3. ed. São Paulo : BBS, 2008.
- 10- GUIMARÃES, J. L. M.; ROSA, D. C. **Rotinas em oncologia**. Porto Alegre: ArtMed, 2008. 942 p.
- 11- ROCKENBACH, L. **Inibição da ecto-5`-nucleotidase/CD73 pela quercetina em linhagem humana de câncer de bexiga T24**. 54 p. Monografia (Trabalho de

conclusão de curso). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia. Porto Alegre, 2009.

12 - BRASIL. Ministério da saúde, Instituto Nacional do Câncer. **TNM Classificação de Tumores Malignos**. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/tratamento/tnm/tnm2.pdf> > Acesso em: 17 de ago. 2011.

13- JACOBS, B. L. et al. Bladder Cancer in 2010: How far have we come? **A cancer journal for clinicians**, v. 60, n. 4, p. 244-272, 2010.

14- ISMAILI, N. et al. Chemotherapy in advanced bladder câncer: current tatus and future. **Journal of Hematology & Oncology**, p. 4-35, 2011.

15- AVRITSCHER, E.B. et al. Clinical model of lifetime cost of treating bladder cancer and associated complications. **Urology**, v. 68, n. 3, p. 549-553, 2006.

16- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistemas de produção**. Disponível em: < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-mate/CultivodaErvaMate/index.htm> > Acesso em: 11 de set. 2011.

17- EFING, Luiza M. A. C. **Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.- Hil.)**. 108 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Curitiba, 2008.

18- BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Espécies arbóreas brasileiras**. Disponível em: < http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/index_especies.htm. > Acesso em: 2 de out. 2011.

19- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Produção 2009**. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> >. Acesso em: 22 out. 2011.

20- BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. **Prod. Extr. veg. e Silv.**, v. 23, p.1-47, Rio de Janeiro, 2008.

- 21- HECK, C.I.; DE MEJI, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal Of Food Science**, vol. 72, n. 9, p.138-151, 2007.
- 22- VALDUGA, E. et al. Caracterização química da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) e de outras espécies utilizadas na adulteração do mate. **B.CEPPA**, v. 15, n. 1, p. 25-36, 1997.
- 23- BASTOS, D. H. M. et al. Bioactive Compounds Content of Chimarrão Infusions Related to the Moisture of Yerba Maté (*Ilex Paraguariensis*)Leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 399-404, 2006.
- 24- DA CROCE, M. D. Características físico-químicas de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) no estado de Santa Catarina. **Ciência Florestal, Santa Maria**, v. 12, n. 2, p. 107-113.
- 25- PEIXOTO, M. P. G. **Saponinas dos frutos de Ilex Paraguariensis A. St. Hil. (mate): Desenvolvimento de metodologia analítica, estudo físico-químico e biológico**. 153 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre, 2009.
- 26- GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAG, O; MAZZA, G. Saponins: properties, applications and processing. **Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 231-258, 2007.
- 27- COELHO, G. C. et al. Methylxanthines of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *vestita* Loes. and var. *paraguariensis*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 2, 2001.
- 28- SIMÕES, C. A. M. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2007. 1102 p.
- 29- BASTOS, D. H. M. et al. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. **Molecules**, v. 12, p. 423-432, 2007.
- 30- FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition research**, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.
- 31- BRACESCO, N. M. et al. 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. **The Journal Of Alternative And Complementary Medicine**, v. 9, n. 3, p. 379–387, 2003.

32- BERTÉ, K. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Yerba-Mate (*Ilex paraguariensis* A.St. Hill., Aquifoliaceae) Extract as Obtained by Spray Drying. **J. Agric. Food Chem**, 2011.

33- STEPHEN, L. S. et al. Analysis of Free-Radical Scavenging of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) using Electron Spin Resonance and Radical-Induced DNA Damage. **JFS C: Food Chemistry**, v. 75, n. 1, p. 14-20, 2010.

34- SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J.C; MOSCA, S.M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitricoxide-dependent mechanism. **Clin. Nutr.** v. 24, p.360–366, 2005.

35- GUGLIUCCI, A. et al. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v. 80, n. 6, p. 339-344, 2009.

36- LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v.76, p.419-427, 2005.

37- JAKUS, V; RIETBROCK, N. Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiol. Res.**, v. 53, n. 2, p. 131-142, 2004.

38- PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 15, n. 2, p.178-185, 2008.

39- ARÇARI, D.P. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 12, p. 2127-2133, 2009.

40- MARTINS, F. Maté tea inhibits in vitro pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n.1, p.42-47, 2010.

41- ANDERSEN, T. ; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **J. Hum. Nutr. Diet**, v. 14, n. 3, p. 243-250, 2001.

- 42- RAMIREZ-MARES, M. V.; CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research**, v. 554, p. 53–65, 2004.
- 43- MEJIA, E. G. et al. Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea on Topoisomerase Inhibition and Oral Carcinoma Cell Proliferation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n.6, p. 1966-1973, 2005.
- 44- JOTZ, G. P. et al. Estudo Experimental da Erva Mate (*Ilex Paraguariensis*) como Agente Etiológico de Neoplasia do Trato Aéreo-digestivo. **Arq. Int. Otorrinolaringol**, v.10, n.4, p. 306-311, 2006.
- 45- ALVES, R. J. V. et al. Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) como agente etiológico de neoplasia de língua. **Revista da AMRIGS**, v. 51, n. 1, p. 7-11, 2007.
- 46- DE STEFANI, E. et al. Meat intake, 'mate' drinking and renal cell cancer in Uruguay: a case-control study. **British Journal of Cancer**, v. 78, n. 9, p. 1239-1243.
- 47- DE STEFANI, E. et al. Dietary patterns and risk of bladder cancer: a factor analysis in Uruguay. **Cancer Causes Control**, v. 19, p. 1243–1249, 2008.
- 48- BATES, M. N. Bladder cancer and mate consumption in Argentina: A case-control study. **Cancer Letters**, v. 246, p. 268–273, 2007.
- 49- SZYMANSKA, K. et al. Drinking of mate´ and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Latin America: a case–control study. **Cancer Causes Control**, v. 21, p. 1799–1806, 2010.
- 50- SEWRAM, V. et al. Mate Consumption and the Risk of Squamous Cell Esophageal Cancer in Uruguay. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 12, p. 508–513, June 2003.
- 51- ISLAMI, F. et al. High-temperature beverages and Foods and Esophageal Cancer Risk -- A Systematic Review. **Int. J. Cancer**, v. 125, n. 3, p. 491–524, 2009.
- 52- VICTORA, C. G. et al. Patterns of mate drinking in a Brazilian city. **Cancer. Res.**, v. 50, p. 7112–7115, 1990.

- 53- BOGUSZEWSKI, J. H. **Uma história cultural da erva-mate: o alimento e suas representações**. Dissertação (Mestrado) a Universidade Federal do Paraná. Pós-graduação em História. Curitiba, 2007.
- 54- BARROS, S. G. S. de. Mate (chimarrão) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. **Arq. Gastroenterol.**, v. 37, n. 1, 2000.
- 55- MA, L. et al. Growth inhibitory effects of quercetin on bladder cancer cell. **Front. Biosci.**, v.11, n. 1, p. 2275-2285, 2006 .
- 56- MERIGHI, S. et al. Caffeine Inhibits Adenosine-Induced Accumulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 α , Vascular Endothelial Growth Factor, and Interleukin-8 Expression in Hypoxic Human Colon Cancer Cells. **Molecular Pharmacology**, v. 72, n. 2, 2007.
- 57- ALIA M. et al. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 212, p.110- 118, 2006.
- 58- GARCÍA, M. J. M. et al. Effect of polyphenols from the Mediterranean diet on proliferation and mediators of in vitro invasiveness of the MB-49 murine bladder cancer cell line. **Actas. Urol. Esp.**, v. 29, n. 8, p.743-749, 2005.
- 59- CAMARGO, M. C. R; TOLEDO, Maria C. F. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) na dieta da população de Campinas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 49-53, 2002.
- 60- FAGUNDES, R. B. et al. Higher urine 1-hydroxy pyrene glucuronide (1-OHPG) is associated with tobacco smoke exposure and drinking mate in health subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. **BMC Cancer**, v.6, p. 139- 2006.
- 61- GU, J. et al. Benzo(a)pyrene diol epoxide-induced chromosome 9p21 aberrations are associated with increased risk of bladder cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 17, n.9, p.2445-50, 2008.
- 62- PLOTTNER, S. et al. Evaluation of time dependence and interindividual differences in benzo[a]pyrene-mediated CYP1A1 induction and genotoxicity in porcine urinary bladder cell cultures. **J. Toxicol. Environ. Health. A.**, v. 71, n. 13-14, p.969-975, 2008.

63- ABNET, C. C. et al. The influence of genetic polymorphisms in *Ahr*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *GST M1*, *GST T1* and *UGT1A1* on urine 1-hydroxypyrene glucuronide concentrations in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 1, p. 112-117, 2006.

64- SCHUBERT, A. et al. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripr fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Pharmazie**, v. 62, n. 11, p. 876-880, 2007.

65- MU, L. H. et al. Triterpenoid saponins from *Ardisia gigantifolia*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 58, n. 9, p. 1248-1251, Sep. 2010.

ANEXO - Procedência e preparo dos extratos

Extrato liofilizado dos frutos:

Os frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil utilizados, doados pela Ervateira Barão Com. Ind. de Erva-Mate Ltda. (Barão do Cotegipe, RS, Brasil), foram coletados no mês de janeiro de 2008, ainda imaturos. Para a preparação do extrato liofilizado, os frutos imaturos secos foram macerados em uma solução hidroetanólica a 40% (v/v) por 40 minutos. Posteriormente, o macerado foi submetido ao processo por turbo-extração, em aparelho de Ultra-Turrax (IKA, Alemanha) a 11.000 rpm por 15 min, a temperatura ambiente, sendo este período dividido em 3 etapas, com intervalos de 3 min entre as etapas para evitar o sobreaquecimento. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 2.01 g por 30 min e filtrada à pressão reduzida. A solução extrativa obtida foi concentrada sob vácuo em evaporador rotatório a 50°C até metade do volume inicial para eliminação do solvente orgânico, sendo a solução extrativa concentrada congelada e liofilizada (Modulyu, 4L–Edwards, USA).

Extrato liofilizado das Folhas:

A matéria prima para esse extrato foi adquirida em janeiro de 2011, da ervateira Barão do Cotegipe (Barão do Cotegipe, RS, Brasil) contendo uma proporção de folhas:talos (70:30, m/m). A erva-mate foi submetida à maceração dinâmica a 300rpm durante 2 h com uma solução hidroetanólica a 80% (v/v) em uma proporção droga-solvente de 1:10 (m/v), a temperatura ambiente e sob proteção da luz. A mistura foi filtrada a pressão reduzida e, posteriormente, a solução extrativa obtida foi concentrada sob vácuo em evaporador rotatório a 50°C até metade do volume inicial para eliminação do solvente orgânico, sendo a solução extrativa concentrada, congelada e liofilizada (Modulyu, 4L–Edwards, USA).