

Avaliação da citotoxicidade in vitro do Paraquat e potencial efeito protetor da Erva-mate

Evaluation of in vitro cytotoxicity of Paraquat and potential protective effect of Yerba mate

Como citar este artigo:

OLIVEIRA, PIERRI E. A.; CORREIA, FABRINA M. A.; Avaliação da citotoxicidade in vitro do Paraquat e potencial efeito protetor da Erva-mate. Revista Saúde (Sta. Maria). 2021; 47 (1).

Autor correspondente:

Nome: Mariana Migliorini Parisi
E-mail: mariana_pari@yahoo.com.br
Telefone: (55) 3321-1596
Formação Profissional: Pesquisa em Atenção Integral à Saúde, Laboratório de Pesquisa e Experimentação em Saúde, Centro de Ciências da Saúde e Agrárias, Universidade de Cruz Alta, RS, Brasil.

Filiação Institucional: Universidade de Cruz Alta
Endereço para correspondência: Rodovia Municipal Jacob Della Mea Km 5,6
Bairro: Parada Benito
Cidade: Cruz Alta
Estado: RS
CEP: 98005-972

Data de Submissão:

28/02/2020

Data de aceite:

17/06/2021

Conflito de Interesse: Não há conflito de interesse



Thaís dos Santos da Costa, Patrícia Rizzi Vieira, Camila Pileco Capeletti, Morgane Goudinho Brito, Kelly Silva Rodrigues, Andressa Leal Zambra, Josiane Woutheres Bortolotto, Gabriela Bonfanti-Azzolin, Mariana Migliorini Parisi

RESUMO

Paraquat (PQ) é um herbicida altamente tóxico que tem como principal mecanismo de toxicidade a geração de estresse oxidativo intracelular. A erva-mate (EM), planta nativa da América do Sul, tem sido estudada devido a uma ampla variedade de propriedades benéficas à saúde, incluindo suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Considerando que o PQ é utilizado na agricultura em vários países e que a erva-mate tem potencial terapêutico, este estudo avaliou os efeitos citotóxicos e oxidativos do PQ nas células mononucleares do sangue periférico - linfócitos e monócitos - (PBMC) e o possível papel protetor da EM. Amostras de PBMC (n = 8) foram pré-expostas a 100 e 250 µg/mL de extrato hidroetanólico de erva-mate por 30 minutos e, posteriormente, a 1mM de PQ por mais 2 horas. Os testes de viabilidade celular e estresse oxidativo foram realizados após o protocolo de exposição. Diminuição significativa na viabilidade celular induzida por PQ foi detectada no teste de incorporação de vermelho neutro, mas não nos testes de MTT e LDH. Não foram encontradas diferenças significativas na peroxidação lipídica e nos níveis de grupos tiólicos celulares no grupo exposto a PQ. O extrato hidroetanólico de erva-mate não reverte a citotoxicidade induzida pelo PQ detectada pelo teste do vermelho neutro. Nossos dados preliminares sugerem que a erva-mate não tem potencial terapêutico na prevenção de danos causados pelo herbicida PQ.

PALAVRAS-CHAVE: Paraquat; Erva-mate; Citotoxicidade; Viabilidade celular

ABSTRACT

Paraquat (PQ) is a highly toxic herbicide that have as main toxicity mechanism generation of intracellular oxidative stress. Yerba mate (EM), a native plant to South America, has been studied due to a wide variety of beneficial health properties, including its antioxidant and anti-inflammatory properties. Considering that PQ is used in agriculture in several countries and that yerba mate has therapeutic potential, this study evaluated cytotoxic and oxidative effects of PQ on peripheral blood mononuclear cells - lymphocytes and monocytes - (PBMC) and the possible protective role of EM. PBMC samples (n=8) were pre-exposed to 100 and 250 µg/mL of hydroethanolic extract of yerba mate for 30 minutes and, subsequently, to 1mM of PQ for an additional 2 hours. Cell viability and oxidative stress tests were performed after the exposure protocol. Significant decrease in cell viability induced by PQ was detected in the neutral red uptake test, but not in the MTT and LDH tests. No significant differences were found in lipid peroxidation and cellular thiol groups levels in PQ-exposed group. The hydroethanolic extract of yerba mate not reverse the cytotoxicity induced by PQ detected by the neutral red test. Our preliminary data suggest that yerba mate has no therapeutic potential in preventing damage caused by the herbicide PQ.

KEYWORDS: Paraquat; Yerba mate; Cytotoxicity; Cell viability

INTRODUÇÃO

Paraquat (dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio) (PQ) é um herbicida não sistêmico e não seletivo proibido ou restrito em mais de 50 países. É altamente tóxico para humanos e animais, com vários relatos de mortes após ingestão acidental ou deliberada. O principal mecanismo de sua toxicidade é baseado no ciclo redox e na geração de estresse oxidativo intracelular^(1,2).

O PQ tem uma ampla gama de uso na agricultura, por isso se tornou o herbicida com a maior taxa de mortalidade por intoxicação aguda⁽³⁾. Os principais órgãos que sofrem danos por envenenamento por PQ são o coração, fígado, rins e especialmente o pulmão, que tem características inflamatórias mais evidentes em um estágio inicial, incluindo células epiteliais alveolares prejudicadas, hemorragia intra-alveolar, edema, infiltração de células inflamatórias e fibrose irreversível nos alvéolos⁽⁴⁾. Outros efeitos incluem congestão vascular e aderência de plaquetas ativadas e leucócitos polimorfonucleares ao endotélio vascular⁽⁵⁾. Além disso, o PQ tem potencial imunotóxico, podendo inibir a produção de imunoglobulinas e a função de linfócitos e causar toxicidade, induzindo células a processos de morte celular^(6,7).

Por outro lado, tem aumentado a demanda por alimentos contendo substâncias biologicamente ativas com efeitos benéficos, visto que os consumidores buscam esses produtos para uma vida mais saudável. A *Ilex paraguariensis*, conhecida como erva-mate, é uma planta nativa do Brasil, cultivada nos estados do sul do país e utilizada em bebidas tradicionais como o chimarrão ou o tereré. Vários de seus benefícios à saúde já foram descritos, como atividade hipocolesterolêmica e hepatoprotetora, estimulação do sistema nervoso central, ação diurética, inibição da proliferação de células neoplásicas e atividade antioxidante, prevenindo danos causados por radicais livres⁽⁸⁾. Estudos mostram que a erva-mate é capaz de aumentar a capacidade antioxidante e biomarcadores antiinflamatórios no sangue^(9,10). Portanto, a infusão e o extrato hidroetanólico de erva-mate tem potencial antioxidante que pode prevenir os efeitos citotóxicos dos xenobióticos nos sistemas biológicos.

Considerando que o PQ é um agente causador de danos oxidativos às células; e que a erva-mate tem poder antioxidante e é usada como bebida tradicional no sul do Brasil, este estudo avaliou o efeito agudo do PQ em parâmetros de citotoxicidade e estresse oxidativo em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e o possível papel protetor da erva-mate sobre os danos observados.

MÉTODO

Sujeitos da pesquisa e coleta das amostras

Foram selecionados aleatoriamente na comunidade acadêmica da UNICRUZ oito indivíduos saudáveis, com idade entre 20 e 40 anos, que não faziam uso de nenhum medicamento, não fumantes, não etilistas e não expostos

diretamente a agrotóxicos. O Comitê de Ética em Pesquisa aprovou este protocolo (N ° 3.085.361) e todos os participantes forneceram consentimento informado por escrito. Vinte milímetros de sangue periférico foram coletados de cada sujeito por punção venosa em tubos de EDTA. As PBMC foram isoladas por gradiente de densidade (FicollPaque Plus 1,077g/mL; GE Healthcare, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após o isolamento, a concentração celular foi determinada por contagem em hemocítmetro.

Material vegetal e preparação de extrato

As folhas de *Ilex paraguariensis* foram coletadas no município de Cruz Alta (Rio Grande do Sul, Brasil), identificados e registrados no herbário da Universidade de Cruz Alta, sob o número 1124. As folhas passaram por um processo de secagem em estufa com circulação de ar a ± 40 °C e posteriormente foram esmagadas em moimho de faca e submetidas a uma maceração hidroetanólica (EtOH: H₂O 3: 2, v/v). O macerado foi submetido a agitação manual diária, por um período de sete dias, durante a primeira maceração. Ao final desse período, o material foi filtrado em algodão, e novamente coberto com o solvente por mais sete dias (segunda maceração). O líquido extrativo resultante das duas macerações foi concentrado em evaporador rotativo, a uma temperatura inferior a 40 °C, para eliminação do etanol. Em seguida, o extrato concentrado foi submetido a um processo de secagem para evaporação total dos solventes e obtenção do extrato hidroetanólico (EHEM) em pó⁽¹¹⁾.

Protocolo de exposição

As amostras de células foram divididas em 5 grupos experimentais (G1 = Controle; G2 = PBS + PQ 1mM; G3 = PBS + EHEM 250 ug / ml; G4 = PBS + EHEM 100 ug / ml + PQ 1mM; G5 = PBS + EHEM 250 ug / ml + PQ 1mM). De acordo com os grupos, as amostras foram pré-tratadas com 100 ou 250 µg/mL de EHEM diluído em PBS por 30 min em banho-maria a 37°C e com agitação. Posteriormente, as PBMC foram expostas a 1mM de PQ e incubadas em banho-maria com agitação por 2 horas. No final do período de incubação, foram realizadas análises de viabilidade celular e danos oxidativos.

Avaliação da Viabilidade celular

A atividade metabólica de oxidoredutases celulares dependentes de NADPH, como uma medida de viabilidade celular, foi avaliada pelo ensaio de Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT). Após o período de exposição, as PBMC foram incubadas com 1mg/mL de MTT (Sigma Aldrich, EUA) por 60 minutos a 37°C. Cristais de formazan foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorbância lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) em relação ao controle.

A desidrogenase láctica (LDH) liberada das células danificadas foi medida quantitativamente usando o kit de Ensaio de LDH por método cinético, de acordo com as instruções do fabricante (Labtest®). Após o período de exposição, as PBMC foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos e 20 µL do sobrenadante foram incubados com o reagente de trabalho previamente preparado. A absorbância foi lida imediatamente em espectrofotômetro semiautomático BioPlus em um comprimento de onda de 340 nm em 3 tempos diferentes. Os resultados foram expressos em U/L.

Para o ensaio de viabilidade celular pelo ensaio de incorporação de corante supravital vermelho neutro (VN), PBMCs foram incubadas com 50 µg/mL de reagente vermelho neutro (Sigma Aldrich, EUA) por 180 min, protegidos da luz, a 37°C. Em seguida, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS e o reagente revelador foi adicionado ao pellet celular, a partir do qual a absorbância foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) em relação ao controle.

Avaliação do dano oxidativo

O nível de lipoperoxidação foi determinado medindo as Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), comparado à curva de calibração com malondialdeído (MDA). O MDA e outros hidroperóxidos formados no processo, quando aquecidos junto com a presença de ácido tiobarbitúrico, formam um composto rosa que foi medido espectrofotometricamente a 532 nm. Os resultados foram expressos por nmol MDA/mg de proteína⁽¹²⁾.

A determinação dos grupos de proteínas tioicas (P-SH) foi realizada pela técnica descrita por de Ellman (1959). Tampão de fosfato de potássio 0,3 M (TFK) a pH 7,0 e 50 µL do reagente 5',5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) foram adicionados às amostras no momento da leitura. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 412 nm. Os dados foram expressos como µmol GSH/mg de proteína, com base em uma curva de calibração com glutathiona (GSH)⁽¹³⁾.

Para a medição das concentrações de proteína total, foi utilizado o Método de Lowry modificado. A reação colorimétrica foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 750 nm e os resultados expressos em mg/ml⁽¹⁴⁾.

Análise estatística

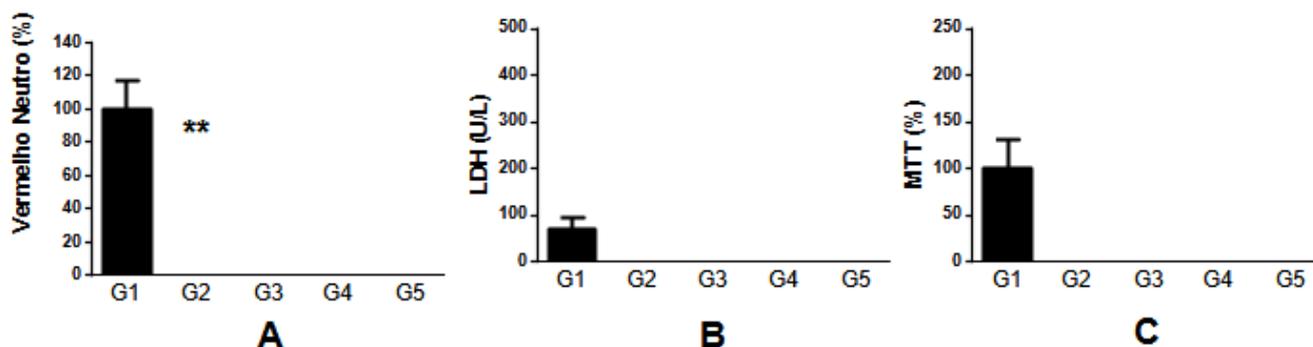
Os dados foram expressos em médias e desvios-padrão. As diferenças estatisticamente significativas foram avaliadas pelo teste ANOVA de uma via, seguido do teste Tukey, no programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., versão 6.01). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADO E DISCUSSÃO

O PQ é um herbicida que tem sido estudado por apresentar riscos à saúde devido ao seu efeito tóxico, que pode resultar em alta mortalidade por ingestão oral acidental ou intencional. A indução da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) é um dos processos biológicos mais importantes no envenenamento por PQ, pois causa danos a diversos tecidos e células, por meio da geração de estresse oxidativo⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Assim, o acúmulo desse agrotóxico no organismo é capaz de alterar o ciclo redox celular e a expressão de diversos genes de resposta precoce que estão associados à citotoxicidade⁽¹⁸⁾.

Neste estudo, a avaliação dos parâmetros de citotoxicidade mostrou que a exposição aguda a 1mM de PQ causou diminuição da viabilidade celular em relação ao controle no teste de vermelho neutro. Porém, não foi possível observar redução da atividade mitocondrial, avaliada pelo teste do MTT, bem como aumento da atividade da enzima LDH, parâmetro que indica lise celular (Figura 1).

Figura 1. Avaliação da citotoxicidade de tratamentos PQ e EHEM



A - Ensaio de incorporação de VN; B - atividade de LDH; C - Ensaio de MTT. Grupo G1 = controle, G2 = PQ 1Mm, G3 = EHEM 250 µg / ml, G4 = EHEM 100 µg / ml + PQ 1mM, G5 = EHEM 250 µg / ml + PQ 1mM. Os dados foram analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey, expressos como média ± erro padrão da média (n = 8). ** p <0,01 diferente de G1.

Esses resultados podem estar relacionados ao mecanismo de citotoxicidade do PQ e à sensibilidade específica das estruturas celulares afetadas. O ensaio de incorporação de VN é um ensaio colorimétrico que mede a absorção do corante por lisossomos funcionais, sendo considerado muito sensível e prontamente quantificável^(19, 20). O ensaio do MTT, por sua vez, é baseado principalmente na conversão enzimática do MTT em formazan, na mitocôndria. Compostos citotóxicos capazes de danificar ou causar morte celular diminuem a redução do MTT no formazan, uma vez que haverá menos células viáveis⁽²¹⁾.

O ensaio de LDH, por sua vez, é baseado na liberação da enzima LDH para o meio de cultura após dano à

membrana celular. Esta enzima é normalmente encontrada no citoplasma das células, no entanto, quando a viabilidade celular é afetada, o rompimento da membrana permite que a enzima LDH vaze para o meio extracelular⁽²²⁾. Portanto, os ensaios de LDH, NRU e MTT são os testes mais comuns usados para detectar citotoxicidade ou viabilidade celular após exposição a substâncias tóxicas. No entanto, podem apresentar resultados diferentes, dependendo do agente e do teste de citotoxicidade utilizado⁽²³⁾.

Nos últimos anos, cresceram os estudos com plantas medicinais com propriedades benéficas ao homem. O interesse pelas propriedades da erva-mate e seus efeitos benéficos no organismo também tem crescido consideravelmente na comunidade científica⁽²⁴⁾. No presente estudo, não foi possível detectar a atividade protetora do EHEM no efeito citotóxico causado pelo PQ em nenhum dos parâmetros avaliados (Figura 1).

Além disso, não foi observado efeito citotóxico do EHEM (grupo G3 - 250µg/ml), apesar de alguns estudos na literatura apresentarem resultados controversos. Um estudo de Munoz-Culla e co-autores⁽²⁵⁾ mostraram que altas concentrações de erva-mate (acima de 100µg/ml), adicionadas aos PBMC in vitro, são tóxicas, mas que em concentrações mais baixas não causam morte celular. No entanto, Santos⁽²⁶⁾ demonstrou segurança do extrato de erva-mate mesmo em concentrações mais elevadas.

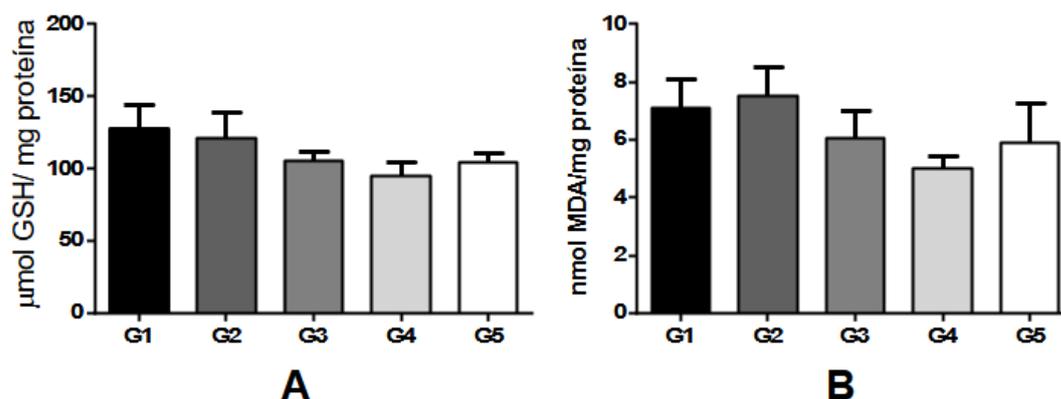
Nos estudos que avaliam os danos celulares causados por herbicidas, destaca-se o método TBARS, procedimento introduzido por Buege e Aust⁽¹²⁾, que avalia o nível de peroxidação lipídica, que pode ser iniciada por oxidantes. Além disso, para evitar o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica, a célula possui defesas, como os compostos tiólicos que contêm o grupo sulfidril (-SH) em sua estrutura. Entre esses compostos estão a glutatona, a cisteína e as proteínas tiólicas, que desempenham um papel crucial na defesa antioxidante e podem ser quantificadas em modelos experimentais⁽²⁷⁾.

O presente estudo demonstrou que a exposição ao PQ 1mM não alterou o nível de lipoperoxidação e os grupos tiólicos celulares, assim como o EHEM não alterou os níveis encontrados (Figura 2).

Nesse contexto, embora outros modelos experimentais utilizando diferentes tipos de células e tecidos animais já tenham encontrado estresse oxidativo causado por PQ, in vitro, o modelo aqui apresentado com PBMCs pode não ter a mesma sensibilidade. Ainda assim, sugere-se que outros mecanismos de defesa antioxidante, além dos grupos tiólicos, podem ser consumidos, principalmente no mecanismo oxidativo do PQ.

Além disso, um dos mecanismos de proteção dos extratos vegetais é a capacidade de incorporação dos flavonóides na membrana. Pelos resultados aqui apresentados, no modelo experimental utilizado, o PQ não parece atuar nas membranas celulares, uma vez que não causa aumento na lipoperoxidação ou liberação de LDH, o que pode dificultar a visualização do efeito do extrato neste modelo. Além disso, o tempo de incubação e as concentrações utilizadas neste estudo podem ser insuficientes para causar danos que possam ser detectados pelos testes realizados.

Figura 2 – Efeito de PQ e EHEM na peroxidação lipídica (A) e grupos tiólicos celulares (B).



A - Efeito de PQ (1mM) e EHEM sob o n\u00edvel de composto ti\u00f3ico n\u00e3o proteico. B - Efeito de PQ (1mM) e EHEM no n\u00edvel de lipoperoxida\u00e7\u00e3o.

Os dados foram analisados pela an\u00e1lise de vari\u00e2ncia (ANOVA) seguida do teste de Tukey expresso em m\u00e9dia \pm erro padr\u00e3o da m\u00e9dia (n = 8).

Grupo G1 = controle, G2 = PQ 1mM, G3 = EHEM 250 μg / ml, G4 = EHEM 100 μg / ml + PQ 1mM, G5 = EHEM 250 μg / ml + PQ 1mM

Apesar disso, a maioria das pesquisas publicadas relata efeitos do extrato aquoso da planta e usa outros modelos de indutores de oxida\u00e7\u00e3o. Assim, este \u00e9 um dos poucos estudos envolvendo o extrato hidroetan\u00f3lico, um dos m\u00e9todos de prepara\u00e7\u00e3o considerados mais adequados para extrair um maior n\u00famero de fitoqu\u00edmicos ^(28, 29).

CONSIDERA\u00c7\u00d5ES FINAIS

Neste estudo, a citotoxicidade de PQ foi verificada por meio do ensaio de capta\u00e7\u00e3o de vermelho neutro. O extrato hidroetan\u00f3lico de erva-mate n\u00e3o foi capaz de proteger os PBMCs contra a citotoxicidade causada pelo PQ. Este estudo servir\u00e1 de base para estudos futuros que esclare\u00e7am o mecanismo de a\u00e7\u00e3o t\u00f3xica do PQ, bem como a capacidade protetora do EHEM nas c\u00e9lulas do sistema imunol\u00f3gico

REFER\u00caNCIAS

1. Ma J, Li Y, Niu D, Li Y, Li X. Immunological effects of paraquat on common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish & shellfish immunology*. 2014;37(1):166-72.
2. Wu Q, Xu Q, Jian X, Wang H, He X, Gao B, et al. A new sight for paraquat poisoning from immunology. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2018;40(4):269-72.
3. Konthonbut P, Kongtip P, Nankongnab N, Tipayamongkholgul M, Yoosook W, Woskie S. Paraquat Expo-

sure of Pregnant Women and Neonates in Agricultural Areas in Thailand. International journal of environmental research and public health. 2018;15(6).

4. Wu W, Li Y. Lung injury caused by paraquat poisoning results in increased interleukin-6 and decreased microRNA-146a levels. Experimental and therapeutic medicine. 2018;16(1):406-12.
5. Gawarammana IB, Buckley NA. Medical management of paraquat ingestion. British journal of clinical pharmacology. 2011;72(5):745-57.
6. Hassuneh MR, Albin MA, Talib WH. Immunotoxicity induced by acute subtoxic doses of paraquat herbicide: implication of shifting cytokine gene expression toward T-helper (T(H))-17 phenotype. Chemical research in toxicology. 2012;25(10):2112-6.
7. Okabe M, Nishimoto S, Sugahara T, Akiyama K, Kakinuma Y. Oral administration of paraquat perturbs immunoglobulin productivity in mouse. The Journal of toxicological sciences. 2010;35(2):257-63.
8. Piovezan-Borges AC, Valerio-Junior C, Goncalves IL, Mielniczki-Pereira AA, Valduga AT. Antioxidant potential of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) extracts in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in oxidant defense genes. Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia. 2016;76(2):539-44.
9. Colpo AC, Lima ME, da Rosa HS, Leal AP, Colares CC, Zago AC, et al. *Ilex paraguariensis* extracts extend the lifespan of *Drosophila melanogaster* fed a high-fat diet. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas. 2017;51(2):e6784.
10. Panza VP, Diefenthaler F, Tamborindeguy AC, Camargo Cde Q, de Moura BM, Brunetta HS, et al. Effects of mate tea consumption on muscle strength and oxidative stress markers after eccentric exercise. The British journal of nutrition. 2016;115(8):1370-8.
11. Simões CMO. Farmacognosia: da planta ao medicamento. UFSC, editor. Florianópolis, 2001.
12. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods in enzymology. 1978;52:302-10.

-
13. Boyne AF, Ellman GL. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Analytical biochemistry*. 1972;46(2):639-53.
 14. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical biochemistry*. 1977;83(2):346-56.
 15. Herraiz T. N-methyltetrahydropyridines and pyridinium cations as toxins and comparison with naturally-occurring alkaloids. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2016;97:23-39.
 16. Oliveira FM, Lima ADS, Batista WFDM, Santos KPP, Silva GMN, Barros RFDM. Agrotóxicos: impactos sobre o meio ambiente e saúde dos agricultores na comunidade Graciosa / José de Freitas / PI / Brasil. *Cadernos de Agroecologia Anais do VI CLAA, X CBA e V SEMDF*. 2017;13(1).
 17. Ranjbar A, Soleimani Asl S, Firozian F, Heidary Dartoti H, Seyedabadi S, Taheri Azandariani M, et al. Role of Cerium Oxide Nanoparticles in a Paraquat-Induced Model of Oxidative Stress: Emergence of Neuroprotective Results in the Brain. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2018;66(3):420-7.
 18. Mitsopoulos P, Suntres ZE. Cytotoxicity and gene array analysis of alveolar epithelial A549 cells exposed to paraquat. *Chemico-biological interactions*. 2010;188(3):427-36.
 19. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 1988;2(1):1-6.
 20. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*. 2006;1(3):1112-6.
 21. Ulukaya E, Ozdikicioglu F, Oral AY, Demirci M. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2008;22(1):232-9.

22. Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. 2018.
23. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. International journal of pharmaceutics. 2005;288(2):369-76.
24. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on Ilex paraguariensis research: minireview. Journal of ethnopharmacology. 2011;136(3):378-84.
25. Munoz-Culla M, Saenz-Cuesta M, Guereca-Barandiaran MJ, Ribeiro ML, Otaegui D. Yerba mate (Ilex paraguariensis) inhibits lymphocyte activation in vitro. Food & function. 2016;7(11):4556-63.
26. Santos TWD. Efeitos da erva mate (Ilex paraguariensis) na Modulação do Metabolismo Energético Mitochondrial Associado à Obesidade. 2018. Tese, Doutorado, Genética e biologia molecular.
27. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Química Nova. 2006;29(1):113-23.
28. CECHINEL-FILHO V, YUNES RA. Breve história da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na concepção de fármacos ocidentais e orientais. Plantas medicinais. Sob a óptica da química medicinal moderna. Argus, editor. Chapecó 2001. 19-46 p.
29. Chaicousk A, Silva JEd, Trindade JLFd, Canteri MHG. Determinação da quantidade de compostos fenólicos totais presentes em extratos líquido e seco de erva-mate (Ilex paraguariensis). Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. 2014;16(1):33-41.

