

CITOTOXICIDADE *in vitro* DO EXTRATO AQUOSO DE LCEA206

JÉSSICA PAOLA SALAME¹; EDUARDO GARCIA FONTOURA²; EDUARDA SANTOS BIERHALS³; SAMUEL RODRIGUES FELIX⁴; GEFERSON FISCHER⁵; MARCIA DE OLIVEIRA NOBRE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – dassi.jessica@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – eduardogfontoura@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – dudabierhals@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – samuellrf@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – marciaonobre@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas na forma medicinal é uma prática antiga, e por serem naturais são utilizadas com a percepção de que não fazem mal (RATES, 2001, TOMAZZONI et al., 2006). Algumas ações terapêuticas relatadas das plantas com potencial medicinal são: antibacteriano e cicatrizante por exemplo, porém é necessário um estudo mais detalhado sobre essas plantas (PIERI et al., 2009, TILLMANN, 2011).

Preconiza-se que novos produtos de ação ainda desconhecida devem ser analisados quanto a sua biocompatibilidade, por meio de estudos *in vitro* de cultivo celular o mais utilizado para testes de toxicidade e de experimentos em animais para, em seguida, serem aplicados clinicamente (FRESHNEY, 2000). O principal objetivo desta técnica é permitir o estudo do comportamento celular em meio controlado, livre das complexas interações do organismo. As vantagens dessa metodologia são, além do controle ambiental das células, a facilidade de execução, rapidez e baixo custo (YUNES e CALIXTO, 2001).

Tendo em vista a grande utilização empírica da planta LCEA206, buscou-se, neste estudo, analisar a citotoxicidade do extrato de LCEA206.

2. METODOLOGIA

Para este ensaio foram utilizadas células da linhagem MDBK (*Madin Darby Bovine Kidney*) e VERO (*kidney epithelial cells from African monkey*). Tais células foram descongeladas em banho-maria a 37°C, cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), contendo 1% de solução antibiótica e acrescido de 10% de soro bovino fetal (SFB). Posteriormente, foram mantidas em estufa umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após formarem uma monocamada confluenta, alíquotas foram coletadas, para que fosse realizado o subcultivo em placas com fundo chato de 96

cavidades. As células subculturadas foram mantidas em MEM em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas, sendo finalizado este período e a confirmação da formação da monocamada confluyente nos poços, procederam-se então a retirada do MEM.

Para a diluição do extrato foram utilizados 900µL de MEM, nesta etapa sem o soro fetal bovino, adicionado de 100µL de extrato aquoso de LCEA206 caracterizando assim a diluição 1/10. Já na placa, utilizamos 100µL da diluição feita anteriormente contendo o extrato aquoso nos poços A-H/1. Nos poços da coluna 2 em diante, foram adicionados 90µL de MEM sem soro fetal bovino. Finalizando, ocorreu a diluição do extrato do poço 2 sequencialmente até o poço 11, sendo desprezados 10µL ao final. Os poços da coluna 12 foram utilizados para confecção de controles contendo somente MEM. Ao final a placa foi posta em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C por 48 horas.

Para a leitura dos danos celulares que poderiam ser causados pelo extrato aquoso, foi utilizada a coloração de vermelho neutro. O vermelho neutro foi diluído a concentração de 0,033% em MEM, desta solução foram adicionados a cada poço testado a quantia de 200µL, posterior a retirada do MEM contido nos poços. Com o vermelho neutro já em contato com as células, a placa foi posta novamente em incubação a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. Posterior a isso, foram retirados dos poços a solução de vermelho neutro e em seguida adicionados a cada poço 100µL de solução solubilizante (50% etanol, 1% ácido acético e água destilada q.s.p.). Após 10 minutos se procedeu à leitura em espectrofotômetro de placas, com o comprimento de onda de 492nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este ensaio nos permitiu a observação sobre a toxicidade gerada pelo extrato aquoso de LCA206 quando em contato direto com células. A incorporação do corante pelas células pode ser avaliada e evidenciada em valores de absorbância por espectrofotômetro de placas. Os índices demonstrados pela coluna controle foram adotados como padrão 100% e os índices superiores a 90% adotados como não citotóxicos. Foram utilizadas concentrações a partir de 10% (dose máxima) seguindo uma sequência de diluições até 0,0001%. Quando comparados ao controle, as concentrações a partir de 0,01% demonstraram a não toxicidade.

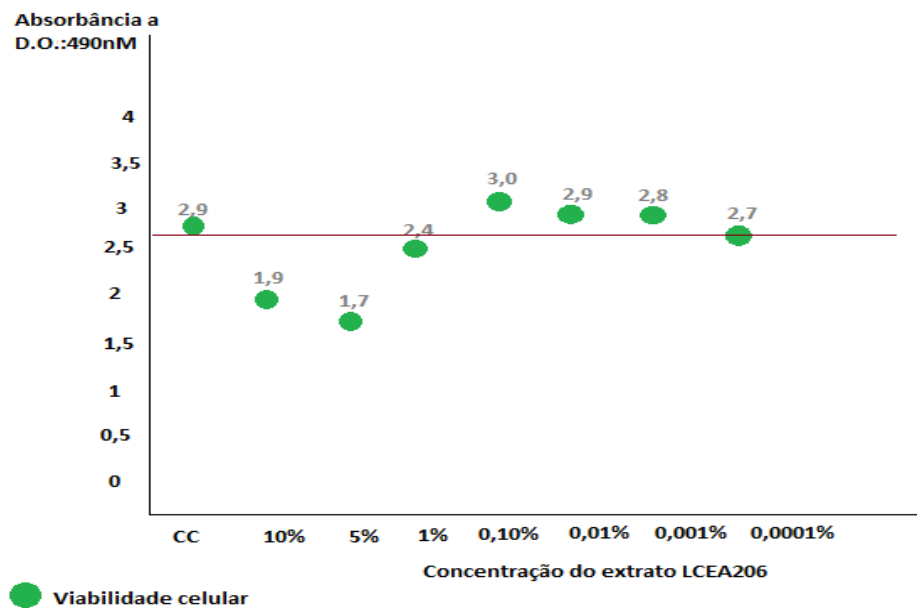


Figura 1. Leitura de viabilidade celular através da incorporação de corante vermelho neutro por células MDBK expostas a diferentes concentrações.

Supõe-se que os resultados tóxicos descobertos nas concentrações de 10 e 5% estejam mais relacionados à diluição do meio de cultura do que a toxicidade do LCEA206. Sobre a especificidade deste teste, o corante de vermelho neutro ultrapassa a barreira da membrana celular e se deposita junto aos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas na matriz lisossomal. Substâncias tóxicas irão acarretar em lesão à nível de membrana celular, consequentemente diminuição das ligações entre o vermelho neutro e os lisossomos. Assim, quanto menos tóxica a substância, mais coloração irá absorver, sendo possível distinguir as células vivas das mortas ou danificadas pela intensidade de cor (ROGERO et al., 2003).

Resultados semelhantes foram encontrados por Martins et al., 2009 avaliando extrato aquoso de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*) também utilizados como plantas medicinais empiricamente.

Embora os resultados dos testes que avaliam a citotoxicidade *in vitro* possam não ter uma correlação direta com os *in vivo*, é seguro afirmar que, se um material induz, comprovadamente, uma reação citotóxica em testes envolvendo cultura de células, é muito provável que desenvolva toxicidade quando aplicado em tecido vivo (ERNST, 2003).

Outros benefícios relacionados à escolha desse tipo de teste são na redução do número de testes que, na maioria das vezes, envolvem o sacrifício

de animais, e ainda, no fato de oferecer informações que permitem determinar os materiais que podem ser desconsiderados e quais merecem investigações mais aprofundadas com outros tipos de testes (LAPA, *et al.*, 2003). Os dados gerados nesse estudo associados ao potencial terapêutico atribuído a planta LCA206 justificam mais ensaios acerca deste fitoterápico, tanto para comprovar seu potencial medicinal, quanto para descrever de forma mais criteriosa suas características toxicológicas.

4. CONCLUSÕES

Concluimos que o extrato aquoso de LCA206 possui um baixo grau de toxicidade perante a análise de citotoxicidade *in vitro*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ERNST, E. The benefits of arnica: 16 Case Reports. **Homeopathy**. 2003 Oct; 92(4):217-9.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**, 4ª Ed. Indianapolis, In: Wiley- Liss, 2000.

LAPA, A.J., SOUCCAR, C., LIMA, M.T.R., GODINHO, R.O., NOGUEIRA, T.C.M.L. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. 5ª.Ed. Porto Alegre: Editora Da UFRGS. 2003.

MARTINS, M. D., MARQUES, M. M., BUSSADORI, S. K., FERRARI, R.M.A.M., PAVESSI, V.C.S., WADT, N.S., FERNANDES, K.P. Citotoxicidade *in vitro* de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). **Revista consciência e saúde**, v. 8, n.2, 2009.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n.2, 2001.

TILLMANN, M.T. **Anti-sépticos e Fitoterápico na cicatrização de feridas**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências - área do conhecimento: Sanidade Animal) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

TOMAZZONI, M. I., NEGRELLE, R.R. B, CENTA, M.L. fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enfermagem**, Florianópolis. V.15, n.1, p.115-121, 2006.

YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais, sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária. 2001.