

Avaliação da citotoxicidade, fototoxicidade e genotoxicidade do óleo fixo de *Pterodon emarginatus* Vogel

Marcelly Tochimi Uemura, Patricia Santos Lopes e Monica Beatriz Mathor
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

Pterodon emarginatus Vogel é facilmente encontrada no cerrado e pode ser usada como promotores de permeação ou agente antioxidante devido à presença de diterpenos e flavonóides.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade, fototoxicidade e genotoxicidade do óleo fixo de sucupira.

METODOLOGIA

Os ensaios foram realizados sob condições assépticas, em ambiente controlado, utilizando materiais e reagentes esterilizados, no laboratório do Centro de Tecnologia das Radiações - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR-IPEN-CNEN /SP). Células da linhagem Balb 3T3 (CCL-163, ATCC), cresceram em meio DMEM, suplementado e foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ na concentração de 2x10⁴(cel/poço). Nos testes de citotoxicidade as concentrações da amostra (1,25; 2,50; 5,00; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; 160 µg/100µL) e do solvente PEG 400 (1,11; 0,555; 0,277; 0,139; 0,069; 0,035; 0,017; 0,009 µL/100µL) foram adicionadas a placas de 96 poços e incubadas por 24 horas. Para os testes de fototoxicidade as células foram cultivadas da forma já descrita e dispostas em 4 placas sendo 2 para o óleo fixo de sucupira e duas para o solvente PEG 400. Foram adicionadas as amostras nas concentrações (0,3125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 µg/100 µL) para o extrato, já para o solvente (1,11; 0,555; 0,277; 0,139; 0,069;

0,035; 0,017; 0,009 µL/100 µL). Após 1 hora da adição das amostras, as placas foram transferidas para câmara de ensaio de fototoxicidade onde permaneceram por 1 hora (5 J/cm²) [1]. Após o período de 24 horas em ambos os testes, o meio de cultura foi retirado e adicionada a solução do corante vital MTS. Após 3 horas de incubação, foi realizada a medida de absorbância (490 nm) em espectrofotômetro de placa de ELISA [2]. No ensaio de genotoxicidade foi utilizada a linhagem de células CHO-K1 (2x10⁴ cel/poço), em meio RPMI e incubadas durante 48 horas a 37 ° C em 5% de CO₂. O teste foi realizado em duplicado, com e sem a presença de um sistema de ativação metabólico S9. Antes da exposição das células ao óleo fixo de Sucupira em três concentrações diferentes (0,09; 0,17 e 0,34 µg/ml) definidas no método de teste de citotoxicidade. Procedimento foi baseado no guia da OECD 487 [3].

RESULTADOS

O experimento de citotoxicidade mostrou que todas as concentrações testadas do óleo fixo não foram citotóxicas, observando-se índice de viabilidade celular de 100%. O solvente PEG 400, nas concentrações testadas, não interfere no resultado, mantendo a viabilidade celular (Dados não mostrados). Desse modo, todas as concentrações foram consideradas seguras na faixa de concentração considerada ativa.

Na tabela 1 observa-se que os valores para CBPI para amostras com S9 não apresenta um aumento no número de ciclos de células em comparação com os respectivos controles de células.

Tabela 9 - Médias do CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation Index) e RI (Replication Index)

Amostras	Sem S9		Com S9	
	CBPI (0,01 ± erro)	RI (%) (± DP)	CBPI (0,01 ± erro)	RI (%) (± DP)
CHO-K1 Controle (CC)	1,71	-----	1,61	-----
Controle Negativo NaCl (NaCl)	1,59	82,53 ± 4,20	1,66	109,07 ± 17,06
Controle Clastogenico Mitomicina C (MTMC)	1,71	100,44 ± 10,27	-----	-----
Controle Clastogenico Benzo [α] pireno (BZP)	-----	-----	1,16	27,08 ± 4,46
Controle Aneugenico Colchicina (COLCH)	1,65	99,29 ± 4,52	-----	-----
Solvente PEG 400 Controle (PEG 400)	1,68	96,56 ± 5,39	1,63	103,21 ± 13,65
Controle Óleo Fixo de Sucupira 0,09mg/mL (C1)	1,57	80,28 ± 7,27	1,62	102,15 ± 15,63
Controle Óleo Fixo de Sucupira 0,17mg/mL (C2)	1,59	83,32 ± 12,48	1,65	107,10 ± 12,75
Controle Óleo Fixo de Sucupira 0,34mg/mL (C3)	1,59	83,33 ± 1,04	1,66	108,16 ± 14,49

Na tabela 1, para todas as amostras, com a exceção de o benzo [α] pireno com S9, valores de RI foram superiores a 50%, resultando em baixas quantidades de células citostáticas, garantindo a integridade celular.

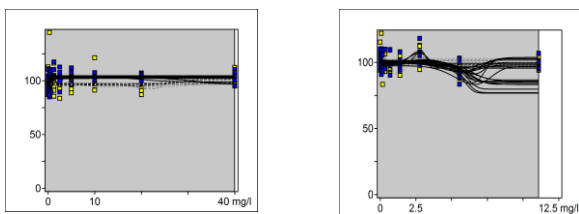


Figura 2: Gráfico criado pelo programa Phototox®, com as leituras feitas da fototoxicidade do óleo fixo de Sucupira (C) e do solvente PEG 400 (B), na presença e na ausência de radiação UVA.

O potencial de fototoxicidade é avaliado por um software [4] usando duas medidas: Fator de Foto-Irritabilidade (PIF) e a média do efeito fototóxico (MPE). De acordo com o preconizado pela OCDE 432 [2] o óleo fixo com MPE igual a 0.046 e PIF igual a 1 não apresenta fototoxicidade, assim como o solvente onde MPE é -0.012 e PIF igual a 1.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados o óleo fixo Sucupira não apresentou toxicidade em

nenhum dos ensaios nas diferentes concentrações testados no intervalo em que há ação antioxidante (0,097 a 25,0 µg/100µL) de acordo com Dutra et al. (2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[100]OECD. In vitro 3T3 NRU phototoxicity test. Guideline for testing of chemicals. OECD/OCDE, n. 432, 2004.

[101]ICCVAM, 2006. Peer review panel report: The use of in vitro basal cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing. NIH publication nº: 07-4519. ResearchTriangle Park: NationalToxicologyProgram. Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invitro.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2010.

[102]Test No. 487: in vitro Mammalian Cell Micronucleus test (MNvit), 2010. IN: <<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9748701e.pdf?expires=1366471876&id=id&accname=guest&checksum=7BD6F0DF313C48D36907E9E8E540CCCC>>.

[103]PHOTOTOX®: Statistical Software Phototox Version 2.0 for OECD Test Guideline 432. Disponível em: http://www.oecd.org/searchResult/0,3400,en_2649_201185_1_1_1_1_1,00.html> Acesso em: 29 set. 2008.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq, bolsa PIBIC - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.-Ipen/CNEN-SP.