

Teste de toxicidade do extrato de *Rubus rosaefolius* utilizando cultura celular de queratinócitos humanos *in vitro*

Daniele Yoshito e Mônica Beatriz Mathor
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

INTRODUÇÃO

No mercado mundial, o desenvolvimento de formulações cosméticas que utilizam componentes ativos de origem vegetal ou mineral tem crescido muito nos últimos anos. A busca cada vez maior de produtos eficazes e seguros tem sido constante.

O *Rubus rosaefolius* Sm. Rosaceae é conhecido popularmente como morango silvestre ou amora-do-mato. A espécie nasce espontaneamente nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo [1]. Resultados preliminares demonstraram marcante atividade bacteriostática em extratos hidroalcoólicos, tornando-os elegíveis como antimicrobiano natural [4].

Visando a segurança ao consumidor frente aos produtos cosméticos com componentes naturais, novas substâncias ativas de origem vegetal devem ser avaliadas extensivamente, quanto a sua toxicidade. Atualmente, os testes de toxicidade em animais são contestados pelos pesquisadores, levando ao desenvolvimento de novas metodologias, como por exemplo, o teste de citotoxicidade que utilizam linhagens especializadas de células, resultando em ensaios confiáveis e esclarecedores [2].

No presente trabalho, realizou-se estudo de citotoxicidade do extrato de *Rubus rosaefolius* utilizando cultura celular de queratinócitos humanos.

OBJETIVO

Avaliar a toxicidade de extrato hidroalcoólico de folhas de *Rubus rosaefolius* utilizando cultura celular de queratinócitos humanos *in vitro*, em monocamada.

METODOLOGIA

Preparou-se solução estoque na concentração 200 mg/mL solubilizando-se o extrato bruto do *Rubus rosaefolius* em metanol e polietilenoglicol 400 (PEG 400), na proporção de 1:1. Foram feitas diluições do solvente e

da solução estoque de forma obter as seguintes concentrações: 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL e 1 mg/mL, 1,5 mg/mL e 2 mg/mL, com os respectivos controles do solvente. Semeou-se aproximadamente 50.000 queratinócitos em placas de 96 poços com meio de cultura, constituído de: DMEM e meio de Ham F12 (na proporção de 2:1), contendo 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mg/mL), gentamicina (50 mg/mL), anfotericina B (2.5 mg/mL), glutamina (4 mM), adenina (0,18 mM), insulina (5 mg/mL), hidrocortisona (0,4 mg/mL), toxina colérica (0,1 nM), triiodotironina (20 pM) e EGF (10 ng/mL, hormônio de crescimento epidérmico), em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂ [3]. Após 24 horas, adicionaram-se as amostras resultantes das diluições descritas anteriormente, aos poços das placas. Incubou-as em estufa de atmosfera controlada, observando-se o comportamento das células periodicamente, por 6, 12, 24 e 48 horas. Após a retirada da última amostra (48 horas de contato), uma das placas foi submetida a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm, com a adição de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio). A outra placa foi corada com um corante não vital, Rodamina B (C₂₈H₃₁C₁N₂O₃).

RESULTADOS

Na Figura 1 pode-se observar a placa corada com Rodamina B, após incubação com concentrações variadas de extrato de *Rubus rosaefolius*

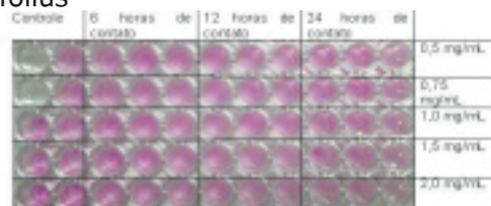


FIGURA 1 - Avaliação da citotoxicidade do extrato de *Rubus rosaefolius* nas concentrações 0,5, 0,75, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/mL, nos tempos 6, 12 e 24 horas, coradas com Rodamina B

Na figura 2 encontram-se os resultados finais da viabilidade celular obtidos após experimentos com MTS.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq/PIBIC e FAPESP/PIPE

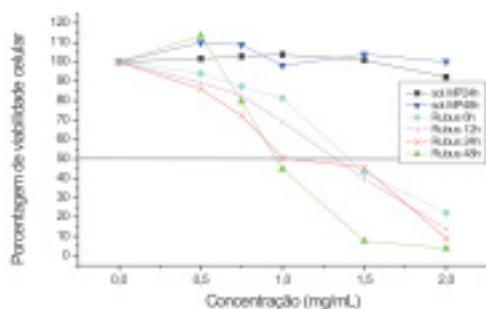


FIGURA 2 - Viabilidade celular das culturas de queratinócitos expostos ao extrato de *Rubus rosaefolius* Sm e solventes metanol e PEG 400 (1:1), nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas para os extratos e 24 e 48 horas para os solventes, utilizando como indicador da viabilidade celular o MTS

CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que o extrato de *Rubus rosaefolius* Sm. apresenta citotoxicidade a partir da concentração de 1,0 mg/mL quando avaliado em cultura de queratinócitos humanos, nos intervalos de tempo de maior contato, 24 e 48 horas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] HOOKER, J.D. Rosaceae. In: Martius, C.F.P. & Eichler, A.G. (eds) Flora brasiliensis 14 (2), 1-75, 1967.
- [2] LOPES, P.S. Avaliação da eficácia e segurança da papaína como promotor de absorção cutâneo utilizando técnicas biofísicas e cultura celular de queratinócitos humanos. São Paulo, 2003. 215p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP.
- [3] MATHOR, M.B.; Estudos da expressão gênica mediante utilização de queratinócitos humanos normais transduzidos com o gene do hormônio de crescimento humano. "Possível utilização em terapia gênica". São Paulo, 158p. Tese (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, 1994.
- [4] MAURO, C.; CARDOSO, C.M.Z.; LOPES, P.S.; MARCONDES, E.M.C.; MIRANDA, J.P.; FROTA, M; PACHECO, A.L. Estudo botânico, fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de *Rubus rosaefolius* Sm., Rosaceae. Rev. Bras. Farmacognosia, v. 12, Supl., p. 23-25, 2002.