



AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Tanacetum parthenium in vitro* PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Carolina Salinas de Moraes (PIBIC/CNPq/UEM), Erica Benassi Zanqueta, Tania Ueda-Nakamura (Orientador), e-mail: tunakamura@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Farmácia, Farmacognosia.

Palavras-chave: *Tanacetum parthenium*; citotoxicidade; difusão em ágar.

Resumo:

O *Tanacetum parthenium* é uma planta herbácea utilizada na medicina popular para diversas aplicações, como febre, enxaqueca e dores de estômago. Entretanto não há estudos que mostrem sua toxicidade e eficácia *in vivo*. Atualmente estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de avaliar métodos complementares *in vitro* que substituam ou complementem os ensaios *in vivo*. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade *in vitro* do extrato hidroetanólico de *T. parthenium*, pelo método de difusão em ágar, em células Vero e queratinócitos humano. Os resultados obtidos para células Vero foram: ausência de toxicidade na concentração de 100 µg/ml, onde não houve formação de halo, toxicidade branda para a concentração de 500 µg/ml com média de halo de inibição de 7,2 mm e toxicidade severa para a concentração de 1000 µg/ml com média de halo de inibição de 10,3 mm. Tais resultados demonstram que com essa metodologia complementar é possível fazer uma triagem das concentrações que foram tóxicas *in vitro*, a fim de evitá-las nos ensaios de irritação dérmica *in vivo*.

Introdução

O *Tanacetum parthenium* é uma planta herbácea pertencente à família Asteraceae, popularmente conhecida como *feverfew*. Suas partes aéreas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de enxaqueca, artrite reumatóide, febre, distúrbios menstruais, dores de estômago, infertilidade e





picadas de insetos (PAREEK et al., 2011). Apesar de seu amplo uso na medicina popular, não há estudos que mostrem sua toxicidade *in vivo*. Vários métodos de ensaios complementares *in vitro* vêm sendo desenvolvidos e empregados em diversas áreas da biologia com o objetivo de reduzir o número de cobaias utilizadas nos testes *in vivo*. O teste de irritação dérmica *in vitro* é um deles, pois é possível selecionar concentrações não tóxicas para serem aplicadas nos animais, reduzindo assim os grupos testes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade *in vitro* do extrato hidroetanólico de *T. parthenium*, pelo método de difusão em ágar, primeiro em células Vero para padronizar a metodologia e depois em células HaCaT, queratinócito humano.

Materiais e métodos

Obtenção do material vegetal

Para a obtenção do extrato hidroetanólico, o pó das partes aéreas secas e moídas de *T. parthenium* foi submetido ao processo de maceração dinâmica à temperatura ambiente, até esgotamento, utilizando como líquido extrator uma mistura contendo etanol: água destilada (9:1). O extrato foi filtrado, liofilizado e armazenado ao abrigo de luz em freezer (-20 °C).

Cultivo de células

Os ensaios foram realizados em células Vero (CCL-81/ATCC), cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina e estreptomicina (1%), mantidas em estufa úmida com tensão de 5% de CO₂.

Viabilidade celular *in vitro* pelo método de Difusão em Ágar

Placas de 6 poços foram preparadas com monocamada de células VERO e incubadas a 37° C até confluência. O meio de cultura foi retirado e foi adicionado 1 mL do meio de cobertura em cada poço, composto de partes iguais de DMEM 2x e ágar a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro. As placas permaneceram na capela de fluxo laminar por 15 min, aguardando a solidificação do ágar, à temperatura ambiente. Em seguida os papéis filtros embebidos nas diferentes concentrações do extrato, bem como o controle positivo, papel filtro embebido em DMSO e controle negativo, apenas o papel filtro, foram colocados no centro do ágar. As placas foram embrulhadas em papel de alumínio e levadas à estufa a 37° C com 5% de CO₂ por 24 h.





Leitura das placas

Após a incubação de 24 h, realizou-se a análise microscópica qualitativa e os poços foram fotografados com a câmera digital Olympus SC30 acoplada ao Microscópio invertido. Após esta análise, as placas foram fixadas com 2 mL de formaldeído 10% por poço, durante 24h ao abrigo de luz, seguida de lavagem em água corrente e água destilada. Após a secagem, as placas foram coradas com cristal violeta por 30 minutos, lavada e extensão da área correspondente à região da monocamada onde houve morte celular (halo de inibição) foi medida macroscopicamente utilizando-se papel milimetrado, conforme o POP/FIOCRUZ.

Resultados e Discussão

Realizou-se primeiramente a análise microscópica qualitativa das amostras, que permitiu observar a presença de um halo de células descoradas onde o vermelho neutro - que se acumula nos lisossomos de células viáveis - foi liberado, devido a lise celular e/ou células alteradas morfológicamente. A extensão microscópica do halo não foi medida, pois Miranda e colaboradores (2007) indicaram que não houve diferença estatística entre as medidas microscópicas e macroscópicas.

A medição do halo foi realizada após a fixação e coloração com cristal violeta, após verificar dificuldades de medição do halo apenas com a coloração com vermelho neutro. As médias finais das medidas do halo de cada amostra (Tabela 1) foram confrontadas com o POP/FIOCRUZ, permitindo a determinação da toxicidade.

Tabela 1. Extensão do halo de inibição nos poços do extrato hidroetanólico do *Tanacetum parthenium* e nos poços do controle positivo e negativo em células VERO

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Extensão do halo de inibição em mm			Média	DP
	1	2	3		
1000	10,0	11,0	10,0	10,3	0,57
500	6,0	8,5	7,0	7,2	1,25
100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
Controle positivo	11,0	10,0	10,0	10,3	0,57
Controle negativo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00

DP= Desvio Padrão





Dessa forma, a concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ do extrato hidroetanólico do *Tanacetum parthenium* apresentou grau zero com ausência de citotoxicidade; a concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$ apresentou citotoxicidade branda e concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$ demonstrou toxicidade severa, semelhante ao controle positivo (DMSO). O controle de células e o controle negativo mantiveram-se com as células confluentes e viabilidade até o fim do experimento, validando o ensaio.

A avaliação com as células HaCaT não foi realizada devido à contaminação da cultura e perda do estoque celular. Contudo, estes ensaios serão realizados assim que a cultura for reestabelecida.

Conclusões

O ensaio de citotoxicidade pelo método de difusão em ágar foi padronizado com êxito em células Vero, dessa maneira obtivemos um método complementar para a avaliação da citotoxicidade *in vitro*, que auxiliará como triagem na seleção de concentrações da droga que não serão tóxicas *in vivo*. Porém, ensaios com queratinócitos e fibroblastos ainda são necessários para avaliação do potencial de irritação dérmica *in vitro*.

Agradecimentos

Fundação Araucária, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

Referências

MIRANDA, R. B. **Citotoxicidade de alguns cimentos reparadores de perfuração radicular sobre células L929**. 2007. Dissertação de Mestrado – Universidade do Grande Rio.

PAREEK, A.; SUTHAR, M.; RATHORE, G. S.; BANSAL, V. **Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): a systematic review**. Pharmacognosy review, v. 5, n. 9, p. 103-110, 2011.

PROCEDIMENTO Operacional Padronizado/ Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ. (65.3330.010). **Ensaio de citotoxicidade in vitro – método de difusão em ágar**. 17 p.

