

Citotoxicidade *in vitro* de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*)

In vitro cytotoxicity of arnica brasileira (*Solidago microglossa*) and arnica paulista (*Porophyllum ruderale*)

Manoela Domingues Martins¹; Márcia Martins Marques²; Sandra Kalil Bussadori³; Raquel Agneli Mesquita-Ferrari⁴; Vanessa Christina Santos Pavesi⁵; Nilsa Sumie Wadt⁶; Kristianne Porta Fernandes⁷

^{1,4,5,7} Professora do Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação – Uninove

² Professora do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia – USP

⁵ Aluna do Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação – Uninove

⁶ Professora da Diretoria da Saúde – Uninove

Endereço para correspondência

Manoela Domingues Martins
Rua Tatsuo Okachi, 199 – Chácara Inglesa
05142-000 – São Paulo – SP [Brasil]
manomartins@gmail.com

Resumo

Um fitoterápico muito utilizado na clínica médica é arnica, que tem ações analgésicas, anti-inflamatórias e cicatrizantes, na forma tópica ou de tintura no tratamento de golpes, contusões, hematomas, distensões, edemas e ferimentos em geral. Neste estudo, avalia-se a citotoxicidade do extrato de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e paulista (*Porophyllum ruderale*) em excipiente para utilização em úlceras bucais sob fibroblastos de mucosa bucal humana (FMM1) cultivados. Os FMM1 foram mantidos por 24 horas em contato com os meios condicionados com arnica paulista e brasileira. A análise da citotoxicidade foi realizada pelo método do MTT. Os resultados foram comparados pelo método ANOVA, complementado pelo teste de Tukey, considerando $p \leq 0,05$. As substâncias analisadas mostraram-se biocompatíveis, apresentando atividade mitocondrial similar à do controle. Concluímos que os extratos são biocompatíveis *in vitro* com fibroblastos da mucosa bucal humana e devem ser realizados testes *in vivo* para analisar sua ação anti-inflamatória e reparadora.

Descritores: Arnica brasileira; Arnica paulista; *Porophyllum ruderale*; *Solidago microglossa*; Teste de materiais; Viabilidade celular.

Abstract

Arnica is a phytotherapeutic extensively used in clinical medicine, which has analgesic, anti-inflammatory and cicatrizant effects. It is used in tincture form or in topical treatment of contusions, hematomas, stretching, swelling and injuries in general. Our objective is to evaluate the cytotoxicity of the extract of arnica brasileira (*Solidago microglossa*) and arnica paulista (*Porophyllum ruderale*) in excipient for use in oral ulcers on fibroblasts of human buccal mucosa (FMM1) cultivated. The FMM1 were kept for 24h in contact with the conditioned environment with arnica paulista and brasileira. The analysis of cytotoxicity was performed by the method of MTT. The results were compared by ANOVA method complemented by the Tukey test considering $p \leq 0.05$. The substances analyzed were considered biocompatible, presenting mitochondrial activity similar to the control. We conclude that the extracts are biocompatible *in vitro* with fibroblasts of human oral mucosa and should be tested *in vivo* to examine its anti-inflammatory and healing action.

Key words: Arnica brasileira; Arnica paulista; Biocompatibility; Cytotoxicity; *Porophyllum ruderale*; *Solidago microglossa*.

Introdução

Existem inúmeros medicamentos fitoterápicos e homeopáticos utilizados pela população, associados ou não, com finalidade terapêutica. Desde 1790, Samuel Hahnemann passou a estudar diversas substâncias vegetais, como beladona e a digitalina, que resultariam mais tarde na Homeopatia¹.

Um dos fitoterápicos amplamente utilizados desde o século XVI é a arnica, uma planta que pertence à família da Asterácea, antes conhecida como compostas e descrita por Linneu, em 1753, em sua obra *Species Plantarum*. Seu nome vem do latim *ptarnica*, que significa a que faz espirrar^{2,3}. Popularmente também é conhecida como espirradeira, erva santa, erva das quedas. Os constituintes ativos dessa planta são arnicina, carotenóides, óleos essenciais, arnidiol, arnilenediol, isoarnilenediol, arnisterina, flavonóides, fulina, inulina, quercetina3-monoglicosídeo, quercetina3-glicogalcturônico, taninos e lactonas sesquiterpênicas².

Vários autores utilizam os diversos tipos arnica de diferentes maneiras em seus estudos, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*^{2,3,4}. Os resultados desses trabalhos mostram que a arnica, utilizada no tratamento de golpes, contusões, hematomas, distensões, edema, dor, combate à fadiga e ferimentos em geral, exibe ação analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante. Sua aplicação vem sendo feita na forma tópica ou de tintura obtida de extratos das flores e outras partes da planta⁴. Essas propriedades parecem estar relacionadas com um componente denominado de flavonóides que podem interferir nas propriedades funcionais em células de mamíferos, tais como mastócito, basófilo, linfócito, mioblastos e plaquetas⁴.

Muitas plantas medicinais populares têm sido utilizadas indiscriminadamente sem bases científicas sólidas que demonstrem sua eficiência e segurança. Verificamos que não há estudos a respeito da citotoxicidade dos diferentes tipos de arnica empregados no tratamento tópico de lesões inflamatórias⁵.

Preconiza-se que novos produtos ou 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 em humanos. 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 custo⁶.

Tendo em vista a grande utilização clínica da arnica, busca-se, neste estudo, analisar a citotoxicidade do extrato de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e paulista (*Porophyllum ruderale*) em excipiente para utilização em úlceras bucais são biocompatíveis *in vitro* com fibroblastos da mucosa bucal humana

Material e métodos

Cultivo celular

As células utilizadas foram fibroblastos de mucosa bucal, cultivados no meio de cultura de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Company, St Louis MO, USA), contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma).

As células foram mantidas em estufa a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂ (Forma Scientific). A monitorização do crescimento celular foi feita a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase (Axiovert 25 - ZEISS). Fez-se o subcultivo quando a monocamada celular tornou-se subconfluyente para a perpetuação da linhagem celular. Para o repique, o sobrenadante foi removido e as células lavadas com meio PBS, tratadas com solução de tripsina 0,25%, durante um minuto, a 37 °C. Após incubação, realizou-se nova lavagem com meio, com centrifugação de 1200 rpm a

4 °C, por cinco minutos, e posterior, ressuspensão em 1ml de meio.

Ensaio de citotoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade, os fibroblastos de mucosa foram incubados em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (Costar), mantidos em DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle) com 5% de soro fetal bovino completo, condicionado com diferentes concentrações das substâncias a serem testadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Os meios foram condicionados com diferentes substâncias na proporção 1mg/ml. Após 24 horas de condicionamento, o meio foi removido e adicionado nas placas de cultura. A ação dos materiais sobre os fibroblastos cultivados foi analisada levando-se em consideração o crescimento celular após 24h do contato com o meio condicionado.

Análise do crescimento celular

Os dados do crescimento celular foram obtidos da análise da viabilidade celular. Essa análise se baseou no teste de atividade mitocondrial das células pelo método da redução do MTT (brometo de 3-(dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado, e sua concentração, determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 562 nm. Para a realização do teste, foram preparados os reagentes A e B. O A foi composto por 0,05 g de MTT (CalBioChem, Canadá), em 10 ml de Phosphate Buffer Saline (PBSA), e o B, por 1 g de SDS (dodecil sulfato de sódio; QBioGene, EUA) em 10 ml de 0,01 M de HCl (ácido clorídrico).

Os meios de cultura dos poços foram aspirados e substituídos por 100 µL de meio DME fresco. Foi adicionado 10 µL do reagente A em cada poço, incluindo os sem células, que serviram de controle negativo para a leitura, no espectrofotômetro, de espaços entre os poços que

receberam as drogas. Depois de 4 horas de incubação com o reagente A, em estufa a 37 °C e protegido da luz com folha de papel alumínio, foram adicionados, para cada poço, 100 µL do reagente B. Usando pipetador multicanal, essa solução foi gentilmente homogeneizada. As culturas retornaram para incubação em estufa a 37 °C, por 4 a 18 horas, também protegidas da luz. Decorrido esse período, as culturas foram gentilmente misturadas com auxílio de pipetador multicanal e levadas para leitura de sua absorbância em espectrofotômetro ELISA (Amersham Biosciences, Biotrak II, Inglaterra), em filtro de 562 nm.

Para a análise, 10µl do reagente A foram adicionados em cada poço experimental e nos controles (sem células, só com o meio de cultivo), ficando incubados, em estufa a 37° C, por 4 horas. Depois, em cada poço, foram acrescentados 100 µl do reagente B, permanecendo em estufa por mais 4 horas. Decorrido esse período, as culturas foram misturadas gentilmente com auxílio de pipetador multicanal e levadas para leitura de sua absorbância em espectrofotômetro ELISA (Amersham Biosciences, Biotrak II, Inglaterra) com leitor de 562 nm.

Análise estatística

Os dados de densidade óptica, ou seja, de viabilidade celular, obtidos de quadruplicata para o tempo experimental de cada grupo, foram apresentados como média ± o erro padrão da média (SEM). Esses dados foram comparados pelo método de ANOVA, complementado pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% (p≤0.05).

Grupos experimentais

- I – controle com meio 5% de soro fetal bovino (sem tratamento);
- II – extrato de arnica paulista;
- III – extrato de arnica brasileira.

Resultados

Nenhum dos grupos teste mostrou diminuição da viabilidade celular em comparação com o grupo controle. No GII, verificou-se maior número de células viáveis após 24 horas de contato com o meio condicionado; entretanto, a análise estatística não indicou diferenças entre os três grupos. No GII, constatou-se um percentual de lise celular de 16,88%, e no GIII, de 43,46%. A Figura 1 demonstra os valores médios da viabilidade celular dos grupos analisados.

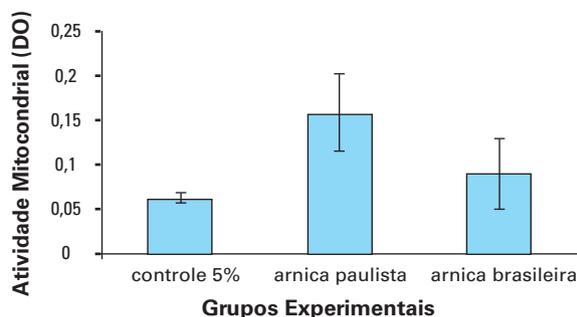


Figura 1 - Valores médios da viabilidade celular dos grupos analisados por MTT

Discussão

A fitoterapia é o método de tratamento de enfermidades humanas e animais que emprega vegetais frescos, drogas vegetais ou ainda extratos vegetais preparados com esses dois tipos de matéria-prima. Trata-se de uma das modalidades terapêuticas mais antigas.

Os fitoterápicos, em geral, são utilizados pela população nos tratamentos crônicos, por serem mais bem tolerados e por oferecerem menos efeitos colaterais. Além de serem bem aceitos pela população, os custos para produzi-los são, geralmente, menores se comparados com os medicamentos sintéticos⁷.

A ideia principal na indicação do uso dos fitoterápicos na medicina humana não é substituir os medicamentos alopáticos e já comercializados, mas, sim, aumentar as opções terapêuticas, ofertando medicamentos equivalentes,

também registrados, talvez mais baratos e com espectro de ação mais adequado⁸.

As plantas produzem uma grande diversidade de compostos resultantes do metabolismo primário e secundário⁹. A síntese de substâncias indispensáveis à sobrevivência das espécies vegetais, tais como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados, faz parte do metabolismo primário das plantas. Já as substâncias sintetizadas por outras vias, aparentemente sem atividade na planta, estão integradas ao metabolismo secundário, sendo denominadas, de, compostos secundários¹⁰ ou princípios ativos – óleos essenciais, ou essências naturais, resinas, alcalóides, flavonóides, taninos, princípios amargos, entre outros¹¹ – que apresentam frequentemente atividades biológicas interessantes, muitas delas de importância comercial na área farmacêutica.

O estudo da toxicidade de um fármaco e/ou material deve ser realizado em três etapas, sendo a primeira delas a avaliação da citotoxicidade. Em saúde, o teste de citotoxicidade *in vitro* é o sistema biológico, em que os materiais têm contato direto com culturas celulares com o intuito de analisar o seu efeito direto nas células. As vantagens dessa metodologia são, além do controle ambiental das células, a facilidade e a rapidez de sua execução e baixo custo.

Neste estudo, avaliamos e comparamos a citotoxicidade, em cultura de fibroblastos de mucosa gengival humana, das substâncias liberadas pelos extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e paulista (*Porophyllum ruderale*). Buscou-se, com essa análise, fornecer informações a respeito do comportamento biológico dos extratos para que possam, posteriormente, ser utilizados em estudos *in vivo*. Os resultados demonstraram que ambas as formulações se mostraram biocompatíveis em ensaio de curto prazo, pois não ocasionaram diminuição da população celular. Dessa forma, em uma segunda etapa de avaliação pré-clínica, podem ser testadas em animais.

As células escolhidas para utilização neste experimento foram os fibroblastos, principais

responsáveis pelo reparo tecidual em quadros de inflamação tecidual. Além disso, optamos pelos fibroblastos de mucosa bucal humana, pois muitas lesões ulcerativas ocorrem na boca e necessitam de intervenção terapêutica com medicações anti-inflamatórias.

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 vivo¹². 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 testes¹³.

Apesar de estudos sobre citotoxicidade em cultivo celular de extratos de arnica não terem sido encontrados na literatura, vários trabalhos clínicos demonstram a eficácia de diferentes tipos de arnica na diminuição de processos inflamatórios e seus efeitos reparadores¹⁴. A maior parte desses trabalhos referem a ação da arnica montana, planta que não é encontrada no Brasil. Assim, neste estudo, optou-se pela utilização da arnica brasileira e paulista, pois ambas possuem ação anti-inflamatória e cicatrizante descrita na literatura e são encontradas com facilidade em várias regiões do Brasil¹⁵.

As propriedades medicinais das plantas populares se devem, principalmente, à presença de flavonóide, mas também podem ser influenciadas por outros compostos orgânicos e inorgânicos, tais como cumarinas, ácidos fenólicos e micronutrientes antioxidantes¹⁶.

Wagner et al.^{17, 18} e Wagner e Juric¹⁹ avaliaram a ação imunológica *in vitro/in vivo* de vários extratos de plantas, como o de arnica montana, observando aumento na fagocitose pelos granulócitos e macrófagos, assim como maior efetividade no teste do "clearance" do carbono.

Contrera et al.²⁰ avaliaram a ação da tintura de *Lichnophora ericoide* (arnica da serra dourada) e de *Solidago microglossa* (falsa arnica) sobre a cicatrização de feridas cutâneas, induzidas experimentalmente em ratos. Observou-se, por meio desse experimento, que houve demora na cicatrização após 10 dias, em razão da intensificação da inflamação local.

Na forma de tintura, a arnica montana aplicada sobre a pele, de acordo com Bucay et al.², provocou inflamação local e eritema como consequência da ativação da circulação.

A maior parte dos trabalhos desenvolvidos baseia-se na ação sistêmica da arnica; no entanto, esse estudo serve de subsídio para o desenvolvimento de produtos tópicos que, após estudos *in vivo*, poderão ser utilizados no tratamento de lesões inflamatórias não só da boca, como também de outros tecidos. Tendo em vista que a boca é sede de inúmeras doenças que se manifestam como úlceras sintomáticas, algumas crônicas e recorrentes, um produto fitoterápico com ação anti-inflamatória e cicatrizante torna-se excelente auxiliar terapêutico dessas lesões.

Conclusão

Conclui-se que a arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e a paulista (*Porophyllum ruderale*), em excipiente para utilização em úlceras bucais são biocompatíveis *in vitro* com fibroblastos da mucosa bucal humana e; por isso, devem ser realizados testes *in vivo* para analisar sua ação anti-inflamatória e reparadora.

Referências

1. Dantas F. O que é homeopatia? 4ª Ed. São Paulo, Brasiliense. Col. Prim. Passos. 1989;134.
2. Bucay JW. Algumas notas sobre la planta medicinal arnica montana L. Rev Med Inst Mex Seg Soc. 1995;33(3):312-26.



3. Macêdo SB, Ferreira LR, Perazzo FF, Carvalho JC. Anti-inflammatory activity of arnica montana 6ch: Preclinical Study In Animals. Homeopathy. 2004 Apr;93(2):84-7.
4. Yui F, Linarelli MCB, Zelante PM. Atividade anti-inflamatória da arnica montana . Rev Cienc Med. 1998;7(1):21-6.
5. Facury Neto MA, Fagundes DJ, Beletti ME, Novo NF, Ferreira JY, Penha-Silva N. Systematic use of solidago microglossa DC In the cicatrization of open cutaneous wounds in rats braz. J. Morphol. Sci. 2004;1(4):207-210.
6. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique, 4ª Edn. Indianapolis, In: Wiley-Liss, 2000.
7. Calixto JB. Medicamentos fitoterápicos. In: Yunes RA, Calixto JB. Plantas medicinais, sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos Editora Universitária. 2001:297-315.
8. Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Godinho RO, Nogueira TCML. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In Simões CMO, Shenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (Org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª.Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Da UFRGS/Editora Da UFSC. 2003:247-262.
9. Guerra MP, Nodari RO. Plantas transgênicas: os desafios da comunidade científica. O Biológico, São Paulo. 1999; 61(2):107-112.
10. Di Stasi LC. Plantas medicinais: arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora UNESP. 2002: 230p.
11. Cruz MES, Nozaki MH, Batista MA. Planta medicinais. Biotec Ciênc Desenv. 2000; 3(15): 28-34.
12. Osório RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity Of Endodontic Materials. Journal Of Endodontics. 1998;24, 91-96.
13. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. Journal of Endodontics. 1995. 21, 295-299.
14. Ernst E. The benefits of arnica: 16 Case Reports. Homeopathy. 2003 Oct; 92(4):217-9.
15. Wadt NSY, Ouno MA, Vasques NG, Silva R, Cruz MS, Okamoto MKH, Esteves R, Bussadori SK, Marques MM, Fernandes KPS, Martins MD, Bach EE. Comparación fitoquímica, antimicrobiana Y citotoxicidad de especies conocidas como arnica. La Plata. XVI Congreso Italo-Latinoamericano De Etnomedicina. La Plata; 2007. p. 198.
16. Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers natural antiulcerogenic antioxidant compounds. Brazilian Journal of medical and biological research, 2002; 35: 523-534.
17. Wagner H, Proksch A, Riess-Maurer I, Et Al. Immunostimulant action of polysaccharides (heteroglycans) from higher plants. Preliminary communication [In German]. Arzneimittelforschung. 1984;34:659-661.
18. Wagner H, Proksch A, Riess-Maurer I, et al. Immunostimulating action of polysaccharides (heteroglycans) from higher plants [In German]. Arzneimittelforschung . 1985;35:1069-1075.
19. Wagner, H., Juric, K. Immunologic studies of plant combination preparations. *In vitro* and *in vivo* studies on the stimulation of phagocytosis. Arzneimittelforschung. 1991;41: 1072-1076.
20. Contrera A, Bernardi AC, Pozetti GL, Lopes RA, Contrera MGD. Ação da tintura-mãe de Lichnophora ericoides, Aristolochia esperanzae e solidago microglossa, em feridas cutâneas de ratos. Rev Esc Farm Odont. 1985; 11: 157-60.