

ENSAIOS TOXICOLÓGICOS - AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DO EXTRATO DE ACEROLA (MALPIGHIA EMARGINATA)

Rodrigues, Luanda Flor¹
Maciel, Francisco Da Costa²
Miranda, Teresa Germano³
Auib, Claudia Alessandra Fortes⁴

RESUMO

Os estudos de segurança e eficácia são cruciais para o uso de produtos naturais, especialmente por ser crescente a procura por práticas alternativas. O teste de citotoxicidade é fundamental para garantir a segurança de novas substâncias. É um dos ensaios realizados em estudos de toxicidade e envolve expor as células a diferentes concentrações de um composto, com ou sem metabolização exógena (dependendo do objetivo), seguida de uma análise da viabilidade celular. O extrato de acerola (*Malpighia emarginata*) tem alta atividade antioxidante. O efeito protetor exercido por este alimento tem sido atribuído à presença de fitoquímicos com ação antioxidante, dentre os quais se destacam os polifenóis como: flavonoides, ácido clorogênico, antocianinas e catequinas que atuam como antioxidantes e anti-inflamatórios.

Para a produção do extrato de acerola os frutos in natura ocuparam 200 mL de um béquer de 250 mL. Após pesados e lavados, foram macerados por 5 minutos com 20 mL de NaCl 0,9%, à temperatura ambiente. O extrato foi filtrado e transferido para tubos de ensaio. Em seguida, foi centrifugado a 5000 RPM por 1 minuto para obter o sobrenadante. Para o teste de citotoxicidade: 1. Células viáveis são cultivadas em placas de cultura; 2. As células são expostas a várias concentrações do composto de teste por um período definido; 3. 24 horas após a exposição, é realizada uma análise para medir a viabilidade celular; 4. A citotoxicidade é expressa como a porcentagem de células mortas ou danificadas em comparação ao controle (NaCl 0,9%). As diluições mais altas parecem não prejudicar significativamente a viabilidade das células, indicando que o extrato de acerola pode ser seguro desde que usado em concentrações adequadas. Há uma leve redução na viabilidade conforme a [] aumenta, sugerindo um efeito dose-dependente. No entanto, o efeito só se torna mais pronunciado na amostra não diluída, o que indica que o extrato puro possui componentes com potencial tóxico quando em alta concentração. Até o momento, a pesquisa apresenta resultados promissores, embora ainda preliminares. No entanto, é importante destacar que a validade completa da hipótese depende da conclusão dos testes restantes, incluindo os experimentos de citotoxicidade e o teste de Ames.

Palavras-chave: Toxicologia; citotoxicidade; teste de Ames; produtos naturais.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Campus Auroras - Instituto de Ciências da Saúde, Discente, luandaflor95@gmail.com¹

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Discente, frankmaciel@aluno.unilab.edu.br²

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Desenvolvimento Rural, Discente, teresagermanomiranda@gmail.com³

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Docente, aiub.claudia@unilab.edu.br⁴

INTRODUÇÃO

Os estudos de segurança e eficácia são cruciais para o uso de produtos naturais, especialmente por ser crescente a procura por práticas alternativas. O teste de citotoxicidade é fundamental para garantir a segurança de novas substâncias, como medicamentos, produtos químicos, cosméticos e alimentos, ao avaliar seu potencial de causar danos celulares. Ele é um dos primeiros ensaios realizados em estudos de toxicidade, ajudando a identificar compostos que podem causar danos as células. O teste envolve expor as células a diferentes concentrações de um composto, com ou sem metabolização exógena (dependendo do objetivo), seguida de uma análise da viabilidade celular.

Extrato de Acerola (*Malpighia emarginata*)

Amostras de extratos de acerola apresentaram os melhores resultados, quando comparadas a outras frutas como caju, morango, e goiaba, sendo assim, a de maior atividade antioxidante dentre as demais (FREIRE, M. J., et al, 2013). O efeito protetor exercido por este alimento tem sido atribuído à presença de fitoquímicos com ação antioxidante, dentre os quais se destacam os polifenóis como: flavonoides, ácido clorogênico, antocianinas e catequinas que atuam como antioxidantes e anti-inflamatórios. Eles complementam os efeitos benéficos da vitamina C (ácido ascórbico) presente em alto teor na acerola e contribuem significativamente para as propriedades terapêuticas do extrato de acerola. Frente à ação antioxidante exibida, as frutas podem ser apontadas como boas fontes de antioxidantes naturais que podem ser mais efetivas e econômicas do que o uso de suplementos dietéticos na proteção do organismo contra os danos oxidativos (MELO, E. A., et al, 2008).

METODOLOGIA

Para a produção do extrato de acerola:

Selecionamos os frutos in natura da acerola ocupando um espaço de aproximadamente 200mL em copo de béquero com capacidade de 250mL. Pesamos e lavamos os frutos, maceramos em cadinho estéril com 20mL de NaCl 0,9%, por aproximadamente 5 minutos, a temperatura ambiente. Filtramos o extrato obtido com coador plástico de malha de 1mm em nylon e transferimos o extrato para tubos de ensaio com capacidade de 20mL, para obtenção de sobrenadante. Para obtenção do sobrenadante do extrato da acerola foi necessário submeter o material à centrifugação orbital (Ortoalresa - digicen 21R), à 5000 RPM por 1 minuto.

Para o teste de citotoxicidade, o processo geralmente segue estes passos:

Células viáveis são cultivadas em placas de cultura; e expostas a várias concentrações do composto de teste por um período definido; 24 horas após a exposição, é realizada uma análise para medir a viabilidade celular; A citotoxicidade é expressa como a porcentagem de células mortas ou danificadas em comparação ao controle.

Os teste são feitos com as bactérias *Salmonella typhimurium*, das linhagens: TA97a, TA98, TA100 e TA102, que são incapazes de sintetizar o aminoácido histidina logo (His-), assim não se proliferam em ambiente que não haja a presença desse aminoácido.

A citotoxicidade é crucial para interpretar corretamente os resultados do Teste de Ames, evitando confusões entre toxicidade e mutagenicidade e garantindo que as concentrações testadas sejam adequadas.

A detecção de diversos mutágenos se confirma a partir da percepção de que ao ser submetida em contato com possíveis agentes que induzem mutação, a bactéria passa a sintetizar a histidina, desse modo revertendo para histidina (His+) e adquirindo a capacidade de se proliferar em meio mínimo, o qual é majoritariamente

desprovido desse aminoácido (MARON e AMES, 1983; OCED, 1997; AIUB et al., 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados: Curva de sobrevivência do teste de citotoxicidade com a cepa Ta100 - Extrato de acerola

CURVA DE SOBREVIVÊNCIA - TA100 - ACEROLA

Concentração	Nº de colônias	Média ± DP %	Sobrevivência
Controle [Ø]	646 645 X	645,5 ± 0,7	100%
[1] Diluído 1000x	705 X 573	639 ± 93,3	98,9%
[2] Diluído 100x	656 621 X	638,5 ± 24,7	98,91%
[3] Diluído 10x	665 603 X	634 ± 43,8	98,21%
[4] Extrato puro	574 567 657	599,3 ± 50	92,84%

A média do controle foi de 645,5 colônias sobreviventes, com uma taxa de sobrevivência de 100%, indicando que, sem a presença do extrato, as células estão completamente viáveis. À medida que a concentração do extrato aumenta (diluída 1000x, 100x e 10x), as médias de colônias sobreviventes permanecem próximas (639, 638,5, e 634), com taxas de sobrevivência levemente reduzidas, variando entre 98,9% e 98,21%. Isso indica que, mesmo em concentrações diluídas, o extrato de acerola tem pouco impacto na viabilidade celular da cepa TA 100. No extrato não diluído, a média de colônias sobreviventes caiu para 599,3, com a taxa de sobrevivência em 92,84%. Aqui, observa-se uma citotoxicidade mais pronunciada, indicando que o extrato puro afeta a viabilidade das células, em sua forma concentrada, o extrato de acerola apresenta algum nível de citotoxicidade. Esse efeito pode estar relacionado à presença de compostos bioativos que, em altas concentrações, podem ser prejudiciais às células bacterianas. As diluições mais altas parecem não prejudicar significativamente a viabilidade das células, indicando que o extrato de acerola pode ser seguro desde que usado em concentrações adequadas. Há uma leve redução na viabilidade conforme a concentração aumenta, sugerindo um efeito dose-dependente. No entanto, o efeito só se torna mais pronunciado na amostra não diluída, o que indica que o extrato puro possui componentes com potencial tóxico quando em alta concentração.

CONCLUSÕES

Até o momento, a pesquisa apresenta resultados promissores, embora ainda preliminares. Os experimentos de citotoxicidade foram realizados com sucesso. No entanto, é importante destacar que a validade completa da hipótese depende da conclusão dos testes restantes, incluindo os experimentos de citotoxicidade que faltam e o teste de Ames, que avaliará o potencial mutagênico da substância. O teste de Ames será crucial para determinar se a substância, além de ser citotóxica, também pode causar mutações genéticas, o que aumentaria seu risco em aplicações terapêuticas ou industriais.



AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa intitulada ENSAIOS TOXICOLÓGICOS - Avaliação citotóxica do extrato de acerola (*Malpighia emarginata*) e executada entre setembro de 2023 e agosto de 2024, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (Pibic), da Unilab. Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial aos professores, colegas e equipe de laboratório, cujas orientações e apoio foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

AIUB, C. A. F & FELZENSZWALB, I. Os Princípios do Teste de Ames (Salmonella/ Microsomo) e sua aplicabilidade. SBG, 11-16, 2011.

FREIRE, J. M.; ABREU, C. M. P.; ROCHA, A. D. C.; MARQUES, N. R. Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. Lavras- MG, 2013.

MARON, D.M & AMES, B.N. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res. 173-215, 1983.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. Disponível em: <file:///C:/Users/luand/OneDrive/Documentos/N%C3%Bacleo/capacidade%20antioxidante%20das%20frutas.pdf>. Acesso em: 01 out 2024.

OECD. 1997. Test Guideline 471. Bacterial Reverse Mutation Test. In: OECD Guideline for Testing of Chemicals. Paris, Organization for Economic Cooperation & Development.