

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DA FORMULAÇÃO DE UM FOTOPROTETOR

Nancy Gislaine Arruda Crespo¹; Celso Vataru Nakamura²; Jackeline Tiemy Guinoza Siraichi³

RESUMO: Com o aumento progressivo nas últimas décadas dos casos de câncer de pele, a utilização de fotoprotetor tornou-se de grande importância por todas as pessoas, e em todas as épocas do ano. Essa exposição prolongada aos raios UV, sem a devida proteção, traz consequências indesejáveis como a fotocarcinogênese, a fotosensibilidade e o fotoenvelhecimento. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo investigar a genotoxicidade de uma formulação de fotoprotetor, utilizando o teste de micronúcleo de eritrócitos da medula óssea de camundongos. Para o teste de genotoxicidade foi considerado como DL₅₀, o valor de 10000mg/Kg. As doses utilizadas foram de 75% da DL₅₀ (7500mg/Kg), 50% da DL₅₀ (5000mg/Kg) e 25% da DL₅₀ (2500mg/Kg). Todas as doses testadas induziram à formação de micronúcleo em eritrócitos policromáticos quando comparadas aos grupos controles, mostrando-se genotóxicas. Os resultados demonstraram que a formulação do fotoprotetor pode causar alterações no DNA, caracterizando-se como um possível agente genotóxico.

PALAVRAS-CHAVE: Fotoprotetor; Genotoxicidade; Teste de Micronúcleo.

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento progressivo nas últimas décadas dos casos de câncer de pele, a utilização de fotoprotetor tornou-se de grande importância por todas as pessoas, e em todas as épocas do ano.

Essa exposição prolongada aos raios UV, sem a devida proteção, traz consequências indesejáveis como a fotocarcinogênese, a fotosensibilidade e o fotoenvelhecimento.

Assim, a fotoproteção torna-se referência dentre os cuidados com a pele e merece estudo aprofundado quanto aos seus benefícios e possíveis males que podem acarretar as pessoas.

A utilização do fotoprotetor tem sido discutida devido ao seu benefício ou não para o organismo do ser humano. A princípio a utilização do fotoprotetor é de extrema importância visto a proteção efetiva que proporciona contra os efeitos indesejados da radiação ultravioleta como a fotocarcinogênese. Em contrapartida, estudos têm mostrado que este produto pode ser o causador do aumento da incidência dos carcinomas devido a diversos motivos.

Os estudos de danos ao DNA causados por substâncias de origem natural ou sintética é uma área essencial da toxicologia genética, uma vez que mutação em cromossomos é um evento importante na carcinogênese (FENECH, et al.,2005).

1 Discente do Curso de Tecnologia em Estética e Cosmética do Centro Universitário de Maringá – Cesumar, Maringá – Paraná. Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). nancygislaine@hotmail.com

2 Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. cvnakamura@uem.br

3 Orientadora e Docente do Curso de Tecnologia em Estética e Cosmética do Centro Universitário de Maringá – Cesumar, Maringá – Paraná. jackeline.guinoza@cesumar.br

ISBN 978-85-61091-69-9

Dentre os testes de avaliação de genotoxicidade preconizados pela ANVISA, o teste de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito e recomendado para avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001, RIBEIRO, et al., 2003).

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo investigar a genotoxicidade de uma formulação de fotoprotetor, utilizando o teste de micronúcleo de eritrócitos da medula óssea de camundongos.

Devido à importância do teste de micronúcleo, o estudo da genotoxicidade desta formulação pode contribuir para o desenvolvimento de um produto seguro, efetivo e não tóxico para o ser humano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação da genotoxicidade da formulação do fotoprotetor utilizou-se o extrato da planta *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot, uma Bignoniaceae, encontrada na Amazônia e amplamente utilizada na medicina popular como anti-inflamatório e adstringente, e para tratamento de várias doenças como cólicas intestinais, diarreias, anemias e enfermidades da pele. Devido as suas propriedades biológicas e a produção de corante, a espécie passou a ser utilizada pela indústria cosmética.

2.1 Obtenção e preparação do extrato da planta *Arrabidaea chica*

A planta medicinal com exsicata depositada no herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUM) – PR, sob número de registro 11428 foi coletada no Horto de Plantas Medicinais “Profª Irenice Silva” da Universidade Estadual de Maringá.

As amostras foram pesadas e, em seguida, secas em estufa de ar circulante a temperatura de 45°C. Após, o material vegetal seco foi pesado, triturado em moinho de facas e acondicionado em local seco e ao abrigo da luz.

Para o estudo, o material foi pesado e solubilizado todos os dias de experimento e em seguida administrado aos animais.

2.2 Estudo Toxicológico

Este estudo foi realizado seguindo a regulamentação da RDC nº 48 (ANVISA, 2004a) e do Guia para a realização de estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos (ANVISA, 2004b), sendo aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá, no parecer 14/2010.(Anexo 01).

2.2.1 Animais

Foram empregados camundongos machos e fêmeas Suíços, adultos, com média de 30-40g, para o teste agudo e teste de micronúcleo, adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram mantidos em biotérios com condições controladas de temperatura (22°C ± 2°), ciclo claro-escuro de 12 horas, ração e água à vontade.

2.2.2 Doses

As doses escolhidas para o teste agudo partiram do valor máximo aceitável como representativo da DL₅₀ determinada. As doses do teste do micronúcleo foram a da

terapêutica (10000 mg/kg), na maior dose que produza efeito adverso detectável e uma dose intermediária.

2.2.3 Determinação da DL₅₀ do extrato e Teste agudo

Foram utilizados 6 camundongos machos e 6 camundongos fêmeas para cada dose testada e para o controle, separados em caixas de polipropileno devidamente identificadas. Antes do tratamento, foram privados da alimentação por um período de 14 horas.

Os grupos de animais testes receberam o extrato e os do grupo controle receberam água. A droga foi solubilizada em água e administrada via oral através de cânulas de aço inoxidável (gavage).

Período de observação: Durante as primeiras 24 horas, nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas e diariamente durante 14 dias após administração foram observados sinais de toxicidade incluindo alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorréia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais. Desde a 24^a hora e até 14 dias após administração da dose, foram observados a variação de peso e o consumo de alimentos diariamente.

2.2.4 Teste de Formação de Micronúcleo

Para a realização do teste, grupos de animais (6 machos e 6 fêmeas) foram tratados, via gavage, nas doses de 25%, 50% e 75% da DL₅₀ obtida da fração. No controle negativo foi utilizada água destilada esterilizada e no controle positivo, 40 mg/kg de ciclofosfamida.

Após 24 horas de tratamento, os animais foram sacrificados e ambos os fêmures retirados. As epífises dos fêmures foram cortadas e a medula óssea aspirada com 1 mL de soro bovino fetal (SBF). Após completa homogeneização da medula no soro, foi centrifugada a 300xg por 5 min. O sobrenadante foi parcialmente descartado e o precipitado de células homogeneizado com pipeta Pasteur. Uma gota de suspensão celular foi transferida para uma lâmina de vidro, onde foi feito o esfregaço. Para cada animal foram confeccionadas quatro lâminas, das quais duas foram utilizadas na contagem.

3 RESULTADOS

3.1 Determinação da DL₅₀ do extrato e Teste agudo

As doses testadas de 10000mg/Kg, 5000mg/Kg, 2500mg/Kg, 1000mg/Kg não apresentaram indução de mortalidade, morbidade, toxicidade excessiva, baseada na presença de sinais clínicos como hiperventilação, piloereção, diarreia, salivação, astenia, hipnose, catatonia, ptose, convulsão, hiperexcitabilidade, hipotermia, alteração motora, contorções abdominais. Somente na dose de 10000mg/Kg houve a morte de 01 animal, no 08^o dia de observação. Nenhuma das doses testadas acarretou na morte de 50% dos animais, logo a DL₅₀ foi o valor maior à dose máxima testada.

3.2 Teste de formação de micronúcleo

Para o teste de genotoxicidade foi considerado como DL₅₀, o valor de 10000mg/Kg. As doses utilizadas foram de 75% da DL₅₀ (7500mg/Kg), 50% da DL₅₀ (5000mg/Kg) e 25% da DL₅₀ (2500mg/Kg).

ISBN 978-85-61091-69-9

Todas as doses testadas induziram à formação de micronúcleo em eritrócitos policromáticos quando comparadas aos grupos controles, conforme Tabela 01, mostrando-se genotóxicas, sendo necessário a realização de outros experimentos para a confirmação da dose não genotóxica aos animais, partindo de uma porcentagem menor à DL₅₀.

Tabela 01: Freqüência de micronúcleo (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea de camundongo após 24h de tratamento com o extrato *Arrabidaea chica* (n=12/grupo)

Tratamento	Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (EPCMN/2000)
75% da DL ₅₀ (7500mg/Kg)	36,0 ± 3,68
50% da DL ₅₀ (5000mg/Kg)	31,9 ± 3,17
25% da DL ₅₀ (2500mg/Kg)	27,7 ± 4,92
Controle positivo (Ciclofosfamida- 40mg/Kg)	26,7 ± 7,02
Controle negativo (Água destilada)	7,2 ± 2,53

4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos com o teste de micronúcleo, observou-se que a do formulação fotoprotetor pode causar alterações no DNA, caracterizando-se como um possível agente genotóxico.

Outros estudos deverão ser realizados com o objetivo de confirmar os efeitos genotóxicos apresentados neste trabalho, além de estudos que indiquem os mecanismos envolvidos que possam explicar a clastogenicidade e/ou interação com o DNA demonstrado por esta planta.

REFERÊNCIAS

CHOY, W. N. **Regulatory genetic toxicology tests**. *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment* (Choy, W. N.ed.), Marcel Dekker, Inc, New York,. 93-113, 2001.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, 392: 11-18, 1997.

FENECH, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. **Methods Mol Med.**;111: 3-32, 2005.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA, Edição Única, 173-198, 2003.