

CRISTINA WERKMAN

**CITOTOXICIDADE DA *PUNICA GRANATUM L.* (ROMÃ)
SOBRE CULTURA DE FIBROBLASTOS E DE CÉLULAS DE
LINHAGEM CANCERÍGENA**



2009

CRISTINA WERKMAN

**CITOTOXICIDADE DA *PUNICA GRANATUM L.* (ROMÃ)
SOBRE CULTURA DE FIBROBLASTOS E DE CÉLULAS DE
LINHAGEM CANCERÍGENA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientador: Prof. Adj. Sigmar de Mello Rode

São José dos Campos

2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Sigmar de Mello Rode

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof^a. Dr^a. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof^a. Dr^a. Ana Christina Claro Neves

Faculdade de Odontologia
Universidade de Taubaté

Prof. Dr. José Benedito Oliveira Amorim

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra

Faculdade de Odontologia
Universidade Ibirapuera

São José dos Campos, 22 de Julho de 2009.

*Cada um que passa em nossa vida passa sozinho...
Porque cada pessoa é única para nós, e nenhuma substitui a outra.
Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só...
Levam um pouco de nós mesmos e nos deixam um pouco de si mesmos.
Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada.
Há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada.*

*Esta é a mais bela realidade da vida...
A prova tremenda de que cada um é importante e que ninguém se
aproxima do outro por acaso...*

(Saint Exupery)

DEDICATÓRIA

Dedico esta etapa de vida aos meus pais Delmina e Jacob que acreditaram na minha capacidade mesmo nos momentos que eu mesma duvidei.

Agradeço por fazerem do meu sonho o seu sonho e não medirem esforços para que eu o alcançasse.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Professor Sigmar** agradeço a atenção e incentivo ao longo dos três anos de convivência. Obrigada pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional.

Querida chefinha **Adriana Aigotti Haberbeck Brandão** e **família**, agradeço todos os dias por tê-los em minha vida; foram sete anos de uma convivência ímpar. Chefe, com todo o amor e carinho ensinou tantas coisas especiais sobre a vida, o mundo acadêmico e como procurar apaziguar os dois. Soube mostrar o quanto sou especial para mil funções e como posso buscar e compensar outras tantas que não sei fazer, mostrou como posso sempre trabalhar em equipe e ser feliz assim.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar nesta estrada com saúde e vitalidade para trilhar cada dia do meu doutorado.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Dr. **José Roberto Rodrigues** e do vice-diretor Prof. Dr. **Carlos Augusto Pavanelli**.

Às professoras. **Rosilene Fernandes da Rocha** e **Cristiane Yumi Koga Ito** pela competência e dedicação ao exercer o cargo de coordenador da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Às secretárias que estiveram no Departamento de Biopatologia Bucal da FOSJC ao longo deste curso; **Silvia Scarpel**, **Ivoneide Ramos Leandro** e **Neide do Nascimento**, sempre muito prestativas.

Às bibliotecárias da FOSJC: **Silvana Alvarez**, **Sônia Maria Reis**, **Maria das Dores Nogueira**, **Deise Cristina A. G. Coelho**, **Dezirée Alves de Souza**, **Glacy Silvério dos Santos**, **Renata Aparecida Couto**, **Ângela de Brito Bellini**.

Aos membros da equipe do pólo computacional **André Luiz Goia de Araújo**, **Newton Guimarães Junior**, **Pedro Henrique Moraes Ananias**, **Luciano Muller Lima**, que em todos os momentos dedicaram tempo e paciência para ajudar em resgates de dados, formatações e dúvidas sobre computadores.

Às secretárias da Pós – Graduação; **Rosemary, Erena e Cida** pelo cuidado na orientação e esclarecimentos prestados durante este curso.

Aos docentes do Programa de Graduação e Pós-graduação:
Profa. Dra. Maria Nadir Gasparoto Mancini, Prof. Dr. Lúcio Murilo dos Santos, Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito, Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira, Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira, Profa. Adj. Ana Sueli R. Cavalcante, Prof. Tit. Horácio Faig Leite, Profa. Adj. Janete Dias Almeida, Prof. Dr. José Benedito Oliveira Amorim, Profa. Dra. Luana M. Reis de Vasconcellos, Profa. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim, Profa. Adj. Mônica Fernandes Gomes, Prof. Adj. Walter Domingos Nicoli Filho, Profa. Adj. Yasmin Rodarte de Carvalho, Prof. Tit. José Roberto Sá Lima, Prof. Adj. Paulo Villela Santos Junior, Prof. Dr. Fernando Renó de Lima, Prof. Dr. Warley David Kerbauy, Prof. Dr. Carlos Rocha Gomes Torres, Prof. Adj. Clóvis Pagani, Prof. Adj. Sergio Eduardo de P. Gonçalves, Profa. Dra. Alessandra Bühler Borges, Prof. Dr. Alexandre Luiz Souto Borges, Prof. Adj. Estevão Tomomitsu Kimpara, Prof. Dr. Rubens Nisie Tango, Prof. Dr. Lafayette Nogueira Junior, Prof. Dr. Tarcísio, Prof. Dr. Marcos Yasunóri Maekawa, Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado, Prof. Adj. Luiz Antonio Guimarães Cabral, Prof. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante, Prof. Adj. Janete Dias Almeida, Prof. Dr. Ivan Balducci, Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi, Profa. Dra. Denise Nicodemo, Profa. Dra. Symone Cristina Teixeira, Prof. Adj. Silvio Issáo Myaki. Obrigada por todos os ensinamentos e convívio.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Biopatologia Bucal: **Ana Lourdes da Silva Machado, Antônio D.S.B.M. Vasconcellos, Domingos Gonçalves Pontes, Ivan Carlos Vanzella, Ivoneide Ramos Leandro, Lourival Jacobs, Marco Antonio Correa Alfredo, Maria Salete Faria, Paulo Rogério Martins, Sergio Giovanni Alves, Walter Cruz** e do Departamento de Prótese e Materiais Dentários: **Fernando Carlos Fontes, Maria Inês Moreira dos Santos, Miguel Lemes da Silva, Suzana Cristina de Oliveira** por todo o suporte e atenção.

Aos amigos que fiz na Universidade Ibirapuera agradeço a visão de equipe que me proporcionaram. Realmente foi um enorme prazer conviver e o trabalhar com pessoas tão competentes. Agradeço a **Adriana Fraga Costa** e **Sandra Regina da Silva Lascosck**, pelo auxílio no laboratório sempre “cuidando de mim pelo vidro”. Aos professores **Sonia Maria Gaglioti**, **Ricardo Carneiro Borra**, **Marcelo Ferreira Witzel**, **Claudio Pannuti**, **Miriam Rubio Faria**, **Cristiane Miranda França**, **Mônica Andrade Lotufo**, **Ricardo Raitz**, obrigada pelas experiências compartilhadas. Aos alunos **Fabiana Mesquita Barros**, **Ludmilla Martinelli Elias**, **Fabiana Viviane Alves**, obrigada por revezarem o fluxo laminar e as experiências de vida.

A todos os alunos de pós-graduação que conviveram comigo nesta instituição durante os últimos sete anos. Nossa, são tantos, **Ana Cristina Posh**, **Ana Paula Lima**, **Fernando A. C. G. de Sousa**, **Carlos Colombo**, **Paula Komori**, **Renata Prado**, **Samira Fonseca Camargo**, **Daniel Freitas Alves Pereira**, **Nívea Cristina Sena Costa**, **Ana Lourdes da Silva Machado**, **Fernanda Bertini Moreira**, **Edna A. F. de Araújo Navas**, **Celina Faig Lima**, **Fernando A. Perrella**, **Flávio Pires Molina**, **Graziella N. Back Brito**, **Lilibeth F. de Brito P. Forte**, **Luís FCS Carvalho**, **Márcia Hatakeyama**, **Marta Majewski**, **Rodrigo Dias Nascimento**, **Rogério Lima Romeiro**, **Rosilene B. de Aguiar Almeida**, **Vitor Hugo Farina**, **Breno Cherfên Peixoto**, **Carolina Porto**, **Laurene**, **Aleska Dias Vanderlei**, **Liliana Gressler May**, **Lucas Villaça Zogheib**, **Humberto Lago de Castro**, **Priscilla Cristoforides Pereira**, **Susana María Salazar Marcho**, **Rodrigo Othavio de A. e Souza**, **Silvia Masae de Araujo Michida**, **Eron**, **Tassiana Capelete**. Sempre companheiros de longos papos, créditos e muitas boas risadas amigos especiais que acompanharam a caminhada de créditos, trabalhos, cirurgias e muitos finais de semana trabalhando na faculdade

Aos amigos do curso de empreendedorismo **Ana Paula T. Santos Moreira**, **Antônio Carlos Girelli Gómez**, **Fabio Santiago**, por todos os momentos de convívio aos sábados.

Aos amados amigos **Juliana Madureira Alonso** e **Renato Barchetta Alonso** por todos os momentos de estudo, papo e descontração, desde os dias e noites de estudo para a prova do doutorado, passando pelos créditos e horários loucos, além das noites de terças feiras em minha casa, com Kaka, Hill e muitas gargalhadas... Obrigada por mostrar “a visão além do alcance” nas cirurgias de ligadura em camundongos... Seres miniatura que tanto nos fizeram rir. Nossa foram tantos mil papos e trocas e experiências. Juju, você fez o doutorado ser divertido do início ao fim!

Ao casal **Carolina Foot Gomes de Moura** e **André Luiz de Moura** por toda a atenção, carinho e convivência por estes anos. Carol, você me proporcionou momentos únicos, obrigada por ser amiga e companheira para tantas coisas, tantos cafés com conversa e tantas correrias para pegar ônibus.

Querida amiga **Karina Bortolin Lodi** (salve salve) que muito agregou no curto período de tempo que tivemos. Obrigada por toda consideração, carinho e papos farmacológicos.

A amiga **Giselle Segnini Senra** e toda sua família. Agradeço por mostrar como uma mãe pode ser tão multifuncional e multifatorial e ainda assim não descuidar da família. Com um carinho especial para a grande **Lívia**, uma mocinha doce com quem tive momentos muito agradáveis.

Ao amigo **Pietro Mainenti**, que desde longa data é companheiro de cafés com conselhos. Obrigada por todos os momentos juntos.

A amiga **Angela Bolanho** e as risadas mais deliciosas da faculdade. Sempre com comentários inteligentes que fizeram a diferença, ensinando como me expressar com ótimo humor em momentos difíceis de ser compreendida.

Agradeço a todos os alunos da graduação da Unesp que fizeram companhia durante os almoços no Diretório Acadêmico ou em sala de aula, mostrando o quanto é bom trabalhar repassando conhecimento e

experiência. Alguns são especiais, pois as amizades foram ampliadas com trabalhos e momentos únicos: **Tais Moreira Leite, Priscila Ferreira Amslinger** (e nossas idas e vindas da USP), **Patrícia Rosa, Michelle Fernandes Fonseca, Junia de Oliveira Barbosa, Fabiana Frattes, Paula de Siqueira Barbosa, Megg Aparecida Ribeiro, Taeny Yumi.**

Aos queridos pacientes e amigos da equipe de prótese Bucomaxilofacial da Universidade do Vale do Paraíba: **Elisabeth Maibrava, Viviane Regina Côas, Éderson, Priscila** que muito me ensinaram sobre a vida e como ser mais feliz. Minha querida “chefona” **Ana Christina Claro Neves** com todo seu coração e carinho, me acolheu em todos os momentos, certamente me ensinou não apenas a ser uma profissional, mas também uma pessoa melhor.

Aos queridos amigos **Josephina Faccioli Contieri, Silvio Holleben, Teresinha Isabel Contieri Holleben, Priscila Holleben, Déborah Holleben, Daniela Holleben,** agradeço pelo maravilhoso convívio, atenção e ensinamentos de vida e família.

Carolina Werkman Tavares, Vinicius Tavares e minha amada afilhada **Beatriz Werkman Tavares,** agradeço pelos bons momentos.

Madrinha **Nair Siqueira** por todo o carinho no período que permaneci em sua casa durante meu experimental.

Aos amigos **Leila Cristina Andrade** e seu esposo **Marcus e Edmilson Padovani** que nas correrias de SP me receberam com carinho, em momentos de congestionamentos, aguardando a melhora para pegar estrada rumo casa. Obrigada pelo convívio durante meu experimental de doutorado com nossos “felinos” em comum.

A querida amiga que sempre cuidou de mim, **Saete Ramos** e **Francisco Rosa** por todos os anos de apoio e alegria que trouxeram para meu mundo com cafés de final de tarde, muito amor e carinho.

Aos amigos **Eduardo Aoki, Fabiana Carneiro Aoki, Marcelo Aoki, Larissa Gonçales, Alessandro Nogueira, Daniela Moura, Fernando Augusto, Luciano, Gabriela, Nathalia Sapucahy, Larissa Pedrote, Lúcio Pedrote Alexandre Kikko, Mariana Delgado, Lincoln Delgado, Nathália Montuori, Marcos Pellegrino Giopatto e Fabio Borges** pelos momentos de cafés, risadas e descontração, mostrando que ainda existe um “mundo fora de uma faculdade”.

Ao amigo **Daniel Junkes Neto**, agradeço por todo o otimismo e alegria, mostrando que posso e devo sonhar mais alto, ir mais longe sempre.

Camila Verde e Rodrigo pela deliciosa convivência nos domingos na praça. Obrigada pelo carinho e companhia em momentos tão agradáveis.

À amiga **Cristiane Carubelli** e família agradeço por ser recebida por sua família sempre com sorrisos e sábios conselhos.

As amigas **Daniela Granato e Shirley Pereira**, agradeço pela receptividade e atenção, sempre com muito bom humor e carinho.

Ao **Carlos Guedes** por todos os momentos que ajudou a mim e a tantos outros sempre com tranquilidade, sorrisos, bom humor e balinhas que tanto adoçaram minhas manhãs.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos que tornou possível minha permanência integral dentro do meio acadêmico no período do doutorado e conseqüente realização deste trabalho.

A todos os **funcionários da FOSJC** que direta ou indiretamente muito contribuíram no convívio diário.

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos –
UNESP pelo incentivo durante o desenvolvimento do curso.

SUMÁRIO

	RESUMO	16
1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1	Fitoterapia	26
2.1.1	Histórico	26
2.1.2	Diferença entre a fitoterapia e o alimento a base de plantas	30
2.1.3	Legislação para os produtos fitoterápicos.....	32
2.1.4	A liofilização conservando os princípios ativos das plantas.....	34
2.2	<i>Punica granatum L.</i>	36
2.2.1	Histórico.....	36
2.2.2	Utilização e estudos já realizados.....	38
2.3	Testes de Citotoxicidade	42
2.3.1	Cultura celular.....	44
2.3.2.	Cultura celular primária.....	45
2.3.3.	Cultura celular secundária.....	47
2.4	Testes de citotoxicidade com fitoterápicos	49
2.4.1	Testes com fitoterápicos e cultura celular.....	50
3	PROPOSIÇÃO	51
4	MATERIAL E MÉTODO	52
4.1	Instituições envolvidas	52
4.2	Liofilização	53
4.3	Obtenção das soluções padronizadas de PG	53
4.4	Cultura de células	54

4.5	Grupos experimentais.....	56
4.6	Procedimentos para Cultura Celular.....	57
4.7	Procedimentos para Descongelamento Celular.....	59
4.8	Procedimentos prévios ao início dos ensaios de viabilidade e de citotoxicidade celular.....	61
4.9	Contagem Celular pelo Método do Azul de Trypan.....	63
4.10	Ensaio de viabilidade das células.....	65
4.11	Ensaio de citotoxicidade das células.....	70
4.12	Análise Estatística.....	72
5	RESULTADOS.....	73
5.1	Teste de viabilidade celular.....	73
5.2	Teste de citotoxicidade celular.....	75
5.3	Manchamento dos poços.....	83
6	DISCUSSÃO.....	87
7	CONCLUSÃO.....	95
8	REFERÊNCIAS.....	96
	ANEXO 1 – Comitê de Ética.....	108
	ANEXO 2 – Dados de leitura.....	109
	ABSTRACT.....	115

Werkman C. Citotoxicidade da *Punica granatum L.* (romã) sobre cultura de fibroblastos e de células de linhagem cancerígena [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho: 2009.

RESUMO

Embora diversos estudos já tenham sido realizados sobre a *Punica granatum L.*, seus possíveis efeitos citotóxicos não são bem conhecidos. No presente trabalho foi avaliada a toxicidade da *Punica granatum L.* (PG) por meio de cultura celular com duas linhagens: fibroblastos humanos de mucosa oral (FLM) e células de carcinoma epidermóide oral humano (KB). As células foram submetidas ao teste de viabilidade celular por 24 horas em placas de 96 poços nas concentrações da PG (1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,062% e 0,031%) e aos testes de citotoxicidade celular em placas de 24 poços, em cinco períodos diferentes (4 horas, 1, 3, 5 e 7 dias) e com quatro diferentes concentrações (1%, 0,5%, 0,25%, 0,062%). Todos os testes foram realizados em triplicata e em três momentos diferentes. Foram adicionados dois grupos, um controle negativo (Tryton 10%) e um controle positivo constituído de meio de cultura acrescido de soro bovino fetal 10% e sem o extrato de PG. A quantificação celular foi realizada pelo método do *Resazurin*, com avaliação por espectrofotometria óptica (espectrofotômetro UVM340 - Asys Hitech GmbH) e leitura de absorbância dos comprimentos de onda de 570 nm a 600 nm. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA (5%). Os resultados de viabilidade mostraram que nas concentrações de 0,031%; 0,062%; 0,125%; 0,25% e 0,05% o extrato de PG inibiu a viabilidade celular ($\geq 40\%$) principalmente das células KB. O teste de citotoxicidade mostrou que apenas as culturas tratadas com PG a 0,062% exibiram citotoxicidade para as linhagens celulares. A PG a 1% foi tóxica para as células FLM e KB. O extrato de PG inibiu a citotoxicidade celular nas demais concentrações testadas. Estes resultados podem ser relacionados a propriedade anticarcinogênica da *Punica granatum L.*

Palavras chave: *Punica granatum*. Fitoterapia. Toxicidade. Técnicas de cultivo celular. Fibroblastos. Carcinoma.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro	1	- Metodologia de análise fitoquímica segundo Sonaglio et al., 1999.	33
Tabela	1	- Concentrações e quantidade de <i>Punica granatum</i> L. com respectiva quantidade de polifenóis testados para definir as concentrações a serem utilizadas nos testes de viabilidade.....	56
Tabela	2	- Representação em porcentagem dos valores do teste de viabilidade realizado para as células FLM e KB em diferentes concentrações de PG.....	74
Tabela	3	- Representação em porcentagem de sobrevivência dos valores de citotoxicidade das células FLM nos períodos de 4 horas, 1, 3, 5 e 7 dias em diferentes concentrações de PG.....	76
Tabela	4	- Representação dos valores de citotoxicidade das células KB nos períodos de 4 horas, 1, 3, 5 e 7 dias em diferentes concentrações de PG.....	77
Tabela	5	- Tabela representativa em porcentagem da sobrevivência celular após 4 horas para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.....	79
Tabela	6	- Tabela representativa em porcentagem da sobrevivência celular em 1 dia para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.....	80

Tabela 7	- Tabela representativa em porcentagem da sobrevivência celular em 3 dias para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.....	81
Tabela 8	- Tabela representativa em porcentagem da sobrevivência celular em 5 dias das células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.....	82
Tabela 9	- Tabela representativa em porcentagem da sobrevivência celular em 7 dias para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Esquema para obtenção de uma cultura primária a partir de um explante.	46
Figura 2	- Desenho esquemático de obtenção e cultivo de células por cultura secundária.	49
Figura 3	- Desenho esquemático com imagens das etapas para obtenção da cultura primária de fibroblastos humanos de mucosa oral (FLM).	55
Figura 4	- Solução base e diluições preconizadas de PG para os testes de viabilidade.	57
Figura 5	- Desenho esquemático da disposição dos criotubos durante o processo de congelamento em nitrogênio líquido.	59
Figura 6	- Desenho esquemático para descongelamento de células mantidas em nitrogênio líquido.	60
Figura 7	- Disposição das células colocadas na placa de cultivo 24 h antes do início dos testes de viabilidade.	62
Figura 8	- Grupos experimentais, esquema de diluição por titulação ou a partir da concentração de 1% de PG, além dos grupos controle negativo e controle positivo.	64
Figura 9	- Esquema de distribuição da placa de 96 poços com as células (FLM e KB) em diferentes concentrações de PG e o controle sem células.	65

Figura 10	- Fórmula para cálculo de volume de meio contendo células para ser colocado em cada poço para cultura.	65
Figura 11	- Disposição das células colocadas na placa de cultivo 24 h antes do início dos testes de viabilidade.	66
Figura 12	- Grupos experimentais, esquema de diluição por titulação ou a partir da concentração de 1% de PG, além dos grupos controle negativo e controle positivo.	67
Figura 13	- Esquema de distribuição da placa de 96 poços com as células (FLM e KB) em diferentes concentrações de PG e o controle sem células.	68
Figura 14	- Esquema de preparo para leitura por meio do espectrofotômetro: placa com grupos experimentais (1), remoção das soluções teste (2), lavagem e remoção do PBS (3) e preenchimento com RZ 2.100 μ M (4).	69
Figura 15	- Exemplo de alteração de cor ocorrida durante a reação de RZ.	70
Figura 16	- Esquema de disposição das células na placa para realizar os experimentos de citotoxicidade.....	71
Figura 17	- Desenho do experimento de citotoxicidade com as placas de cultivo e placas controle durante o período experimental de quatro horas a sete dias.	72
Figura 18	- Gráfico demonstrativo da viabilidade para as células FLM e KB.....	74
Figura 19	- Gráfico representativo dos valores de citotoxicidade das células FLM nos períodos de 4 horas, 1, 3, 5 e 7 dias.....	75

Figura 20	- Gráfico representativo dos valores de citotoxicidade das células KB nos períodos de 4 horas, 1, 3, 5 e 7 dias.	77
Figura 21	- Representação gráfica do teste de citotoxicidade após 4 horas para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.....	78
Figura 22	- Representação gráfica do teste de citotoxicidade no dia 1 para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.	79
Figura 23	- Representação gráfica do teste de citotoxicidade em 3 dias para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.	80
Figura 24	- Representação gráfica do teste de citotoxicidade em 5 dias das células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.	81
Figura 25	- Representação gráfica do teste de citotoxicidade em 7 dias para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.....	82
Figura 26	- Alteração colorimétrica nas placas para as células FLM na concentração de PG 0,062% e para as células KB na concentração PG 1%.....	84
Figura 27	Alteração colorimétrica nas placas onde as células estavam contidas, imagem mostrando a alteração de cor com o RZ e após a remoção do RZ.	84
Figura 28	Alteração colorimétrica das células em meio no sétimo dia (Microscópio de luz invertida 100x).....	85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	=	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
COBEA	=	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMEM	=	Meio Dubelco modificado por Eagle
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
EAGLE	=	Meio de cultura celular
FLM	=	Célula de cultura de Fibroblastos de mucosa oral
g	=	Gramma
h	=	Hora
KB	=	Célula de cultura de Carcinoma epidermóide oral humano
mg	=	Miligrama
min	=	Minuto
mL	=	Mililitros
mmHg	=	Milímetros de mercúrio
OMS	=	Organização Mundial de Saúde
PG	=	<i>Punica granatum L.</i>
RZ	=	Resazurina 2.100 μ M
SBF	=	Soro Bovino Fetal
SUS	=	Sistema Único de Saúde
TRIP	=	Tripsina
Trypan	=	Trypan blue 4%
WHO	=	World Health Organization
μ M	=	Micromolar
μ L	=	Microlitros
μ g	=	Microgramas

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a grande disponibilidade de produtos naturais e a constante busca por uma melhor qualidade de vida têm colocado a "medicina alternativa" em posição de destaque. No cenário mundial, um grande esforço tem sido realizado pela comunidade científica objetivando identificar compostos derivados de produtos naturais e que apresentem propriedades benéficas para o homem.

Dados divulgados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2005, mostraram que o uso de plantas medicinais tem aumentado nos últimos anos e que, cerca de 85% da população mundial utilizou algum tipo de planta na busca de alívio para uma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Do total, pelo menos 30% ocorreu por indicação médica. A utilização de plantas medicinais tem recebido incentivo da OMS (Brasil, 2006 a).

No Brasil se identifica a preocupação do Governo Federal com a ampliação das opções terapêuticas para os usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), garantindo acesso a plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. O Ministério da Saúde (Portaria n.212 de 11 de setembro de 1981) destacou o estudo de plantas medicinais como uma das prioridades de investigação em saúde (Brasil, 2006 b). Obedecendo a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, em dezembro de 2005 foi aprovado o uso de terapias alternativas na rede pública. Entre estas terapias, a utilização dos fitoterápicos, monitorados pela vigilância sanitária (Brasil, 2006 a).

Muitos fatores, destacando-se os econômicos e sociais, têm colaborado com o desenvolvimento das práticas de saúde

relacionadas com plantas medicinais. Assim, diversas plantas têm sido empregadas de forma medicinal pelo esperado poder curativo e preventivo a elas atribuído. Pesquisas com plantas medicinais, quase sempre, originam medicamentos em menor tempo e com custo inferior, conseqüentemente mais acessíveis à população. Desta forma, pesquisas devem ser realizadas, até que os mesmos possam ser disponibilizados comercialmente para consumo (Langley, 2000).

As plantas sintetizam compostos químicos a partir dos nutrientes do solo, água e luz que recebem. Muitos desses compostos, ou grupos deles denominados “princípio ativo”, dependendo da dosagem administrada, podem provocar reações de toxicidade no organismo.

A *Punica granatum* Linus utilizada como medicamento fitoterápico, apresenta propriedades antimicrobiana, anti-helmíntica, antiviral e resposta positiva no tratamento de *diabetes mellitus* (Pereira et al., 2005; Werkman et al., 2008). Embora diversos estudos já tenham sido realizados com este fitoterápico, seus possíveis efeitos citotóxicos nos tecidos humanos ainda não são bem conhecidos.

As investigações relacionadas com fitoterápicos, quase sempre, objetivam avaliar as formas de assimilação pelo organismo e os possíveis efeitos nocivos dos mesmos. Entre os diversos testes pré-clínicos comumente realizados, destaca-se o teste de citotoxicidade em cultura celular. Experimentos em cultura celular representam importante ferramenta para caracterizar eventos que possibilitam às células superarem o controle normal, identificando bases genéticas, processos fenotípicos envolvidos na transformação celular e a comparação do comportamento coletivo de linhagens celulares normais e cancerosas (Vilela et al., 2002).

Técnicas de cultura celular possibilitam a manutenção de diversos tipos de células em diferentes meios de cultivo. A cultura celular é realizada em recipientes especializados e os testes feitos em

placas com poços individualizados. Possibilita o estudo da citotoxicidade e da citotoxicidade, em diferentes tipos de tecidos.

Testes de citotoxicidade por meio de cultura celular são utilizados com sucesso, pela sua reprodutibilidade, rapidez, sensibilidade e custo acessível. Avaliam os possíveis danos teciduais, mais especificamente nas membranas celulares (Rogerio et al., 2003).

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a citotoxicidade da *Punica granatum L.* sobre duas linhagens celulares, uma de fibroblastos humanos de mucosa oral e outra de células cancerígenas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Para melhor compreensão, este capítulo foi subdividido. Inicialmente foram revistos os estudos relacionados com fitoterapia, fitoterápicos e, principalmente com a *Punica granatum L.* Em um segundo momento foram abordados os testes de viabilidade e sobrevivência em cultura celular.

2.1 Fitoterapia

2.1.1 Histórico

Fitoterapia é o método terapêutico mais antigo de toda a medicina natural. Na pré-história o homem aprendeu a distinguir entre os diversos tipos de plantas, aquelas que podiam atenuar ou sanar suas moléstias. Estas informações foram transmitidas ao longo das gerações e conhecimentos foram adicionados à medida que o homem realizava novas experimentações. A difusão das informações se deu de forma oral,

desenhos em cavernas e posteriormente em papiros, sendo assim disseminados por povoados e civilizações (Newal et al., 2002).

Com o passar do tempo, as ervas com poder medicinal foram descritas e catalogadas, primeiro por curandeiros e posteriormente por botânicos. Estes por sua vez, organizaram e classificaram levando em conta diferentes critérios, desde a forma, cor, sabor, aroma até ligações com astros e atributos mágicos que apresentavam. Com a evolução da ciência, foram possíveis estudos e análises mais precisos de seus componentes químicos com finalidade de verificar o efeito destes sobre os organismos de animais e posteriormente em humanos (Newal et al., 2002).

As plantas medicinais colaboram nas práticas de saúde principalmente por motivos econômicos e sociais. Diversas pesquisas foram realizadas com base no conhecimento popular de plantas, que devem ser testadas antes de disponibilizadas como medicamento (Langley, 2000).

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos, elaborou Diretrizes e Linhas de Ação em diversas áreas. Publicados sob forma de Decreto Presidencial nº5813 em 22 de janeiro de 2006, com as diretrizes objetivando garantir à população o acesso seguro e uso racional de plantas e fitoterápicos, mantendo a biodiversidade sustentável, além de inová-la com base no desenvolvimento tecnológico (Brasil, 2006 b).

Quando um fitoterápico é indicado, a idéia inicial não é a substituição dos medicamentos registrados e já comercializados, mas tornar mais abrangente a quantidade de opções terapêuticas. Os fitoterápicos podem oferecer aos pacientes medicamentos equivalentes com espectros de ação adequados, também registrados e muitas vezes mais baratos, atuando também de forma complementar as medicações existentes (Simões et al. 1999).

Além do custo e opção terapêutica, outro objetivo do emprego destes medicamentos é a valorização da cultura popular e a possibilidade do desenvolvimento da indústria farmacêutica local (Simões et al., 1999).

A partir de 1950 os medicamentos que continham os substâncias ativas extraídas de plantas, ou seus derivados sintéticos, começaram a ser desenvolvidos e comercializados com alguma normatização em farmácias. Poucas foram as plantas medicinais estudadas com base nos protocolos modernos, permitindo reunir informações necessárias para a utilização destas substâncias. Grande parte do conhecimento atual sobre a maioria das plantas é obsoleta quando comparada a grande capacidade de desenvolvimento técnico-científico disponível (Simões et al., 1999).

A prática exclusiva da medicina alternativa através da utilização de plantas medicinais é mais comum na população de baixa renda. Estes indivíduos acabam obtendo as plantas em mercados, no canteiro de suas residências e em alguns casos, na natureza. Grande parte dos usuários tem uma imagem errônea que fitoterápicos são remédios que, além de eficazes, são mais seguros e sem efeitos colaterais por serem naturalmente balanceados. Para este argumento, tomam como garantia o emprego prolongado na espécie humana sem relatos de possíveis malefícios causados pelos fitoterápicos (Simões et al., 1999).

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, os trabalhos de pesquisa com plantas medicinais normalmente originam medicamentos em menor tempo, com custos inferiores e mais acessíveis à população (Brasil, 2006 b). Porém, para o uso destes medicamentos é essencial o estudo da farmacognosia de cada planta além da avaliação dos indivíduo e sua reação aos farmacos.

Farmacognosia é a área da farmácia que estuda os princípios ativos das plantas. O termo deriva de duas palavras gregas,

pharmakon, ou droga, e *gnosis* ou conhecimento. Nesta ciência são realizadas todas as descrições e mensurações com identificação, extração e isolamento de substâncias e identificação dos componentes bioquímicos. São realizados os estudos nas áreas de fitoquímica, microbiologia, biossíntese e biotransformação das substâncias ativas, quimiotaxia entre outras ciências bioquímicas e farmacológicas (Simões et al., 1999).

Apesar de os fitoterápicos serem originados a partir de plantas naturais as substâncias químicas contidas nestes, quando usados como medicamento, são reconhecidas pelo corpo humano como um elemento estranho ao organismo, chamada de um xenobiótico. A efetividade de um infuso, tintura, cápsula, ou mesmo um conjunto de plantas, pode também ser devido ao efeito placebo de substâncias eficientes no estresse, hipertensão, ansiedade, úlceras gástricas e nos diversos tipos de dores. Algumas vezes, estes medicamentos são considerados “curativos” para patologias como diarreias, cólicas intestinais, tosse, resfriado ou males mal definidos como indisposição geral. Também é importante avaliar até que ponto a auto-sugestão do paciente pode interferir minimizando os sintomas e postergando a busca por auxílio médico (Simões et al., 1999).

Como qualquer medicamento, o mau uso de fitoterápicos pode ocasionar problemas à saúde, como alterações na pressão arterial, problemas no sistema nervoso central, fígado e rins, podendo levar a internações hospitalares e, dependendo da forma de uso, levar ao óbito (ANVISA, 2009). A toxicidade pode apresentar não apenas efeitos imediatos; mas também a longo prazo, muitos dos quais de maneira assintomática como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos (Simões et al., 1999).

É fundamental conhecer os compostos químicos presentes nos fitoterápicos. Desta forma é possível ter cuidado para possíveis interações medicamentosas na associação de medicamentos

com as plantas medicinais resultando em efeitos indesejados (ANVISA 1999).

O uso tradicional e popular de uma planta não faz com que seja considerada eficiente e segura para consumo. Este tipo de avaliação só é possível após diversos testes que apresentarão evidências comprobatórias que os benefícios gerados pela sua ingestão suplantam os riscos gerados, quando Órgãos Governamentais conferem a autorização para o consumo da mesma (Brasil, 2006 b).

2.1.2 Diferença entre a fitoterapia e o alimento a base de plantas

A busca pelo estilo de vida mais equilibrado e natural acarretou no aumento do interesse para o uso de plantas medicinais com finalidades preventivas ou terapêuticas. Ao consumir produtos naturais, procura-se elevar a qualidade de vida, promovendo saúde e bem-estar. Porém, muitos utilizam termos como fitoterápicos, homeopáticos, plantas medicinais de forma errônea e genérica.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), existem diferenças entre as plantas medicinais e os fitoterápicos. As plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades tendo tradição de seu uso como remédio em uma população ou comunidade. Para usá-las, é preciso conhecer a planta, saber onde colher e como preparar (ANVISA, 1999).

As plantas medicinais podem ser comercializadas no Brasil em farmácias e ervanarias (casas especializadas na comercialização de plantas), desde que não apresentem estrita indicação terapêutica definida. O acondicionamento deve ser adequado e sua classificação botânica declarada. Alimentos como chás e infusões à base de ervas são classificados no Brasil como alimentos, tendo suas

normatizações através do Ministério da Agricultura e Fazenda (ANVISA, 1999).

Porém, quando a planta medicinal é trabalhada e industrializada para se obter um medicamento, o resultado é o fitoterápico. Este processo de industrialização evita contaminações (microorganismos, agrotóxicos entre outras substâncias estranhas), padroniza a quantidade e a forma certa a ser usada, permite maior segurança para pesquisa e posterior utilização (ANVISA, 1999).

Os medicamentos fitoterápicos são obtidos empregando-se exclusivamente derivados de princípio vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, entre outros). Devendo seguir padrões de qualidade da ANVISA como todos os medicamentos, apresentando efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança para consumo (ANVISA, 1999).

Para garantir eficácia e segurança, estudos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em bibliografia e publicações indexadas além de estudos farmacológicos, toxicológicos, pré-clínicos (*in vivo* e *in vitro*) e clínicos devem ser realizados para validação (ANVISA, 1999).

A qualidade deve ser alcançada adotando padrões como o controle de matéria-prima, produto acabado, embalagem, formulação farmacêutica manipulada e estudos de estabilidade final do fitoterápico. Quando industrializados, os fitoterápicos devem obter registro na ANVISA e no Ministério da Saúde antes da distribuição e venda comercial (ANVISA, 1999).

Ainda é comum o comércio de plantas medicinais na forma de suplementos nutricionais. Assim a inscrição é realizada no Ministério da Agricultura, aonde são direcionados para suplementação nutricional e não são submetidos ao controle de qualidade realizado em produtos fitoterápicos. Não existe o controle rigoroso sobre substâncias e quantidades declaradas nos rótulos, bem como possíveis componentes

químicos presentes na formulação, os quais podem resultar em interações indesejáveis (Turolla, 2006).

2.1.3 Legislação para os produtos fitoterápicos

“A Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, é autarquia especial vinculada ao Ministério da Saúde, criada pela Lei nº.9.782, de 26 de janeiro de 1999, regulamentada pelo Decreto nº.3.029, de 16 de abril de 1999, e tem por finalidade institucional promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados” (ANVISA, 1999)

A definição de produto fitoterápico segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil (Portaria nº.6) relata que a transformação de uma planta em medicamento deve preservar a integridade química e farmacológica do vegetal, assegurando constante ação biológica e segurança da sua utilização, valorizando seu potencial terapêutico. (Brasil, 1995 b)

Para uma planta chegar a ser um medicamento fitoterápico, estudos prévios devem ser realizados. Nestes, são avaliados os aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de tecnologias analíticas e tecnológicas. (Brasil, 1995 b). Os objetivos destes estudos estão dispostos no quadro abaixo.

Quadro 1 - Metodologia de análise fitoquímica segundo Sonaglio et al., 1999.

Estudo	Descrição
Estudos Botânicos	Objetivam a identificação da espécie vegetal. É realizado analisando características anatômicas e morfológicas, evidenciando suas peculiaridades da espécie e em última instância, que seja matéria prima vegetal. É importante detectar as características botânicas comparativas e, caso necessário, identificar a presença de um ou mais espécimes adulterantes.
Estudos Agrônômicos	Objetivam a produção homogênea e abundante de matéria-prima vegetal, preservando a espécie e mantendo a biodiversidade. Estes estudos investigam a otimização da produção de biomassa e de constituintes bioativos através de estudos edafo-climáticos (estudos que avaliam a relação planta-solo-clima para plantio, influenciando o desenvolvimento das culturas e também definindo os sistemas de produção.), de micropropagação, inter-relações ecológicas, densidade de plantio, necessidades nutricionais, ocorrência de pragas, beneficiamento e armazenagem, além de possível melhoramento genético da espécie.
Estudos Fitoquímicos	Responsáveis pelo isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes dos vegetais. São estudados diversos compostos, entre os quais, as substâncias originárias do metabolismo secundário, responsáveis ou não pela ação biológica. Dentre estes, o estabelecimento de marcadores químicos passíveis de serem monitorados, possibilitando estudos de estabilidade dos produtos intermediário e final (polifenóis e taninos, por exemplo).
Estudos de Atividades Biológicas	Incluem nesta etapa a avaliação de atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas, frações obtidas ou extratos totais do vegetal. Este é um aspecto fundamental a ser estudado para avaliar a transformação da planta em produto fitoterápico.
Estudos de Desenvolvimento de Metodologias Analíticas	Os métodos analíticos garantem a constância de ação terapêutica e a segurança de utilização do fitoterápico além de possibilitar a avaliar aspectos relativos à obtenção da homogeneidade dos lotes de produção. Podem ser avaliados sob duas formas: a) Avaliar a substância ativa (ou grupo destas) e o perfil qualitativo dos constituintes químicos de interesse, presentes estes na matéria-prima vegetal, produtos intermediários e produto final. b) avaliação das características físicas e físico-químicas dos produtos tecnologicamente transformados, podendo interferir sobre o perfil biofarmacêutico do produto fitoterápico.

2.1.4 A liofilização conservando os princípios ativos das plantas

“A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova a liofilização como um método para conservação de alimentos. Esta regulamentação é determinada pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, de acordo com o artigo nº 64, do Decreto Lei nº986, de 21 de outubro de 1969“ (Anvisa, 1978).

A liofilização ou desidratação a frio é uma forma para remoção do líquido de diversos tipos de materiais. Possibilita o aumento da vida útil do produto uma vez que com a diminuição da atividade de líquidos há a redução do peso e do volume, permitindo a estocagem por longo período de tempo sem alterar as características físico-químicas do material (Harris, 2002; Tatini Junior, 2008).

O processo de desidratação ocorre por meio da sublimação do solvente, geralmente água, transformada em gelo após o congelamento do produto a ser processado. Para que ocorra a sublimação do gelo e não a evaporação da água como ocorre nos processos tradicionais. O material deve permanecer no estado de congelamento e inerte durante quase toda a fase da secagem. A água irá sublimar do estado sólido (gelo) para o gasoso (vapor) quando as moléculas tiverem energia suficiente para ficarem livres, mas sem condições de formar líquidos (Harris, 2002; Tatini Junior, 2008).

Neste processo, alguns cuidados devem ser observados. É fundamental a utilização de um equipamento com um condicionador de ambiente adequado e potência suficiente para manter as condições ideais de temperatura e pressão. As substâncias apresentam diferentes valores de temperatura e pressão máxima para que ocorra o processo de liofilização. A água pura apresenta o limite superior de temperatura ao qual pode ocorrer esta passagem com 0.°C e pressão máxima de 4,58 mmHg. Normalmente deve-se operar em

temperaturas inferiores a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em pressões inferiores a 0,25 mmHg. (Coelho Junior, 2008). Por exemplo, ser realizado o processo com a temperatura a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantendo a pressão abaixo de 0,06 Atm. Em câmara a vácuo, a água alcançará a temperatura suficiente para derreter, mas não terá a pressão para formar um líquido passando por sublimação para forma de gás (Harris, 2002; Tatini Junior, 2008).

A temperatura de congelamento varia em função da natureza e concentração da substância dissolvida. O processo de congelamento deve ser rápido, para que sejam formados micro-cristais de gelo sem danificar a membrana celular. Quando o congelamento é lento os cristais formados são grandes levando ao rompimento da membrana celular, causando a perda do líquido citoplasmático. No congelamento rápido, a estrutura do produto mantém-se intacta, são conservadas características originais permitindo após a re-hidratação a recomposição normal (Harris, 2002; Coelho Junior, 2008; Tatini Junior, 2008)

A liofilização é o processo que possibilita a remoção da água contida em um produto. As estruturas protéicas e o conteúdo de vitaminas, especialmente as termolábeis, são preservadas uma vez que o calor não é aplicado ao produto. Assim, características sensoriais como sabor, odor e aroma dos produtos não são alterados (Harris, 2002).

2.2 *Punica granatum L.*

2.2.1 Histórico

A *Punica granatum L.* é um arbusto lenhoso, ramificado, da família Punicaceae, nativa da região que abrange, desde o Irã até o Himalaia, ao noroeste da Índia. Tem sido cultivada desde há muito tempo por toda a região Mediterrânea da Ásia, África e Europa. Tem folhas pequenas, rijas, brilhantes e membranáceas, flor disposta nas extremidades dos ramos, de cor vermelha-alaranjada e frutos esféricos, com muitas sementes em camadas, as quais se acham envolvidas em arilo polposo, conhecido no Brasil pelo nome de romã (Lorenzi; Souza, 2001; Sheets et al., 2004; Werkman et al., 2008)

Tem importância milenar, está presente nos textos da Bíblia sendo associada às paixões e à fecundidade humana. Na Grécia era considerada um símbolo do amor e fecundidade, representando vida, renascimento e indissolubilidade do casamento. Sua árvore é consagrada à deusa Afrodite, pois se acreditava em seus poderes afrodisíacos. Em Roma, a romã era considerada nas cerimônias e nos cultos como símbolo de ordem, riqueza e fecundidade (Morton, 1987).

Na religião judaica a *Punica granatum L.* têm um profundo significado no ritual do ano novo, representando simbolicamente que, o ano que chega, sempre será melhor do que aquele que vai embora. Esta é originada pela história quando os judeus chegaram à terra prometida, após abandonarem o Egito, os 12 “espias” que foram enviados para aquele lugar voltaram carregando romãs e outros frutos como

amostras da fertilidade da terra que Jeová (Deus) prometera (Morton, 1987; Manica, 2007).

Foi usada em rituais de Zoroastro na Pérsia antiga, onde a beleza de seu arbusto, flores e frutas simbolizam sanidade, fertilidade e abundância (Morton, 1987).

No budismo, a *Punica granatum L.* representa a essência de influências favoráveis. No Japão, ela é conhecida como Kishimojin e é consumida por mulheres inférteis. Na China é representada na arte da cerâmica, também simbolizando fertilidade e abundância. No Cristianismo, representa ressurreição, vida eterna e fertilidade. No islamismo também tem um papel especial como símbolo de fertilidade e abundância (Langley, 2000).

Na Idade Média era freqüentemente considerada como fruto cortês (a realeza consumia tornando-o um fruto da elite), aparecendo também nos contos e fábulas de muitos países. Os povos árabes salientavam os poderes medicinais dos seus frutos e como alimento (Manica, 2007). Além de aparecer citada em várias tradições primordiais, a *Punica granatum L.* é também utilizada em escudos de associações médicas (Morton, 1987).

Tanto a planta como o fruto, são utilizados em residências ou em banquetes para efeito decorativo com a beleza de suas flores e seus frutos, além de utilizá-lo como cerca viva ornamental. Segundo uma antiga crença popular, se levadas na carteira três sementes de romã, "dinheiro nunca há de lhe faltar" (Manica, 2007).

O seu cultivo é realizado em mais de 100 países do mundo. Dos países do Mediterrâneo, atravessou o Atlântico e acabou aportando no Brasil, onde encontrou condições favoráveis para um crescimento vegetativo, florescimento, frutificação e produção de frutos de primeira qualidade. O seu maior interesse no mundo está no seu cultivo para o consumo como fruta fresca. Também tem a sua aplicação em

clínicas especializadas no campo da medicina moderna e para receitas especializadas (Manica, 2007).

2.2.2 Utilização e estudos já realizados

Preparos obtidos de diferentes partes da *Punica granatum L.* (flor, fruto e casca da árvore) têm sido popularmente usados para tratar vários problemas de saúde, predominantemente gastro-intestinais (Ross et al., 2001). O suco da porção que envolve as sementes da *Punica granatum L.*, é usado como terapia para úlceras bucais e genitais, alivia dores de ouvido e é utilizado no tratamento de dispepsia, diarreia e hanseníase. As flores são usadas para tratamento da doença periodontal, prevenindo a perda dentária; possuem atividade adstringente e hemostática e são utilizadas no tratamento do diabetes mellitus. Os brotos das flores, secos e pulverizados, são usados como remédio para a bronquite (Langley, 2000). No México, preparações de diferentes partes da fruta são usadas para tratamento de diarreia, aftas, parasitismo, abscessos, tosse, angina, inflamação urinária e injúrias da pele (Navarro et al., 1996).

Embora muitos trabalhos científicos já tenham sido realizados, estudando as propriedades medicinais da *Punica granatum L.* obtemos informações mais precisas a respeito do potencial farmacológico dessa planta que vem sendo usada de forma indiscriminada ultimamente. Dentre os diversos componentes fitoquímicos da planta, destacam-se polifenóis, contendo os flavonóides e as antocianinas (punicalgina e ácido elágico). Estes componentes são responsáveis por potente ação antioxidante (diminuindo os valores sanguíneos de LDL), antiinflamatória e analgésica (Afaq et al., 2004; Pereira et al., 2005); e pela capacidade biológica anti-esclerosante (Seeran et al., 2004; Hidaka et al., 2005). A

romã também é uma fonte rica em taninos, pectinas (Prashant et al., 2001; Hidaka et al., 2005), glicosídeos e açúcares (Ross et al., 2001) e alcalóides que podem ser tóxicos em altas dosagem (Vidal et al., 2003).

As diferentes concentrações dos componentes fitoquímicos dependem de como é realizada a extração (Seeran et al., 2004). Prashant et al. (2001) comprovaram que, com diferentes processamentos para a extração, são obtidas além de concentrações diferentes, diferentes componentes ativos retirados das plantas. O processamento com petróleo-éter (60-80%) enfatiza a remoção de esteróis; com clorofórmio (CHCl₃), metanol (MeOH), taninos e alcalóides, e com água (H₂O), taninos.

Encontramos na literatura diversos autores relatando propriedades de plantas como a *Punica granatum L.*, *Carthamus lanatus*, *Cirsium tenoreanum*, *Buchholzia coriacea* entre outras. Relataram suas capacidades antimicrobianas e antivirais, sendo que, em alguns casos, foi estudada a citotoxicidade destas plantas (Taskova et al., 2002; Ajaiyeoba, 2003; Loizzo, 2004).

Katsube et al. (2003) estudando componentes fitoquímicos das frutas vermelhas, com ênfase nos pigmentos fenólicos observaram em maior abundância as antocianinas. A antocianina possui atividade antioxidante, participando como mediadora das funções fisiológicas relacionadas à supressão do câncer, uma vez que age como inibidora de crescimento celular. Os flavonóides, também encontrados em abundância nestas frutas vermelhas, com capacidade de induzir células cancerígenas à apoptose. Desta forma, a associação de flavonóides e antocianinas é importante na prevenção do câncer.

Pereira et al. (2005) avaliaram, o potencial mutagênico e quimioprotetor do extrato alcoólico da *Punica granatum L.*, por meio do teste de micronúcleo. Utilizando camundongos *swiss* machos. Os autores estudaram o efeito mutagênico da romã, administrando uma dose única de PG em diferentes concentrações (12,5; 25; 50; 75 mg/kg), vinte e

quatro horas depois, a medula óssea foi removida e realizado o estudo do micronúcleo dos eritrócitos. Os autores concluíram que a *Punica granatum L.* produzia redução dose-dependente significativa (Tukey e ANOVA $p < 0,05$) na frequência de células micronucleadas, mostrando que a dose única não induziu a formação de micronúcleos.

Pereira et al. (2005) avaliaram o efeito quimioprotetor do extrato alcoólico de *Punica granatum L.*, em diferentes concentrações (12,5; 25; 50 e 75 mg/kg), através de dois protocolos que utilizaram a ciclofosfamida, potente imunossupressor utilizado no tratamento do câncer de alta capacidade proliferativa neoplásica (Garcia et al. 2004). O extrato alcoólico de *Punica granatum L.* foi administrado no grupo 1 por dez dias antes da administração de ciclofosfamida; no grupo 2, o extrato de *Punica granatum L.* foi ministrado por dez dias depois da ministração do medicamento. Foram retiradas as medulas ósseas e realizados os testes de micronúcleo nos diferentes grupos. Os dados obtidos indicaram o potencial quimioprotetor do extrato da *Punica granatum L.* na prevenção e reversão dos danos ao DNA.

Afaq et al. (2004) relataram que, para a prevenção do câncer, agentes com capacidade de intervir em mais de um ponto crítico no processo da carcinogênese, têm vantagem sobre agentes de único-alvo. Para avaliar o potencial antineoplásico da *Punica granatum L.*, foi feito o extrato utilizando acetona como meio de depuração e esta solução foi aplicada em ratos CD-1. A aplicação tópica (2 mg/rato) foi realizada 30 minutos antes da aplicação de TPA, potente indutor na formação de câncer de pele (3.2 nmole/rato). Foi verificada inibição significativa, de forma tempo-dependente. Os resultados evidenciaram os efeitos anti-tumorais do extrato da *Punica granatum L.* em ratos CD-1, por meio da inibição dos biomarcadores da promoção do tumor, sugerindo que talvez exerça atividade quimio-preventiva, em outros modelos do tumor. Ainda são necessários novos estudos para avaliação do componente presente no extrato de *Punica granatum L.*, que apresente estas funções.

Adams et al. (2006) relataram que a *Punica granatum L.* em forma de suco pronto e comercializado (POM Wonderful – Los Angeles - CA), reduz de forma dose-dependente a expressão da proteína de COX-2. Os testes foram realizados em cultura de células de câncer de colon (HT-29) e normatizados para 50mg/L da punicalagina. Foi observada a supressão de 79% da expressão da proteína de COX-2. Comprovando sua ação antiinflamatória.

Aviran et al. (2000) testaram o efeito antioxidativo do suco de *Punica granatum L.* (POM Wonderful – Los Angeles -CA), realizando testes em humanos. O estudo foi desenvolvido em duas etapas; na primeira, os voluntários (entre 20 e 35 anos, saudáveis, não estando sob tratamento médico) receberam 50 mL de suco de *Punica granatum L.* por dia (1.5 mol total de polifenóis), durante duas semanas. Em uma segunda etapa, os participantes ingeriram de 20 a 80 mL/dia (0.54–2.16 mol total de polifenóis/dia), durante 10 dias. Os autores por meio de exames sanguíneos verificaram que o suco de *Punica granatum L.* diminui a formação de placas ateromatosas nas artérias.

Neurath et al. (2004), em estudo in vitro, verificou que o suco de *Punica granatum L.* possui inibidores para o envelope do vírus HIV-1, correspondendo a uma classe de drogas anti-retrovirais ainda escassas. Ele atuava bloqueando o sítio de ligação entre o vírus e o linfócito T CD4, porém, este mecanismo ainda não foi completamente esclarecido.

A ação do suco de *Punica granatum L.* na diabetes foi estudada por Huang et al. (2004). Segundo os autores, o suco de *Punica granatum L.* apresenta um componente denominado GA (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), com propriedade de ativar PPAR- σ , molécula importante no metabolismo, quando induzida sua expressão ocorre a melhora na sensibilidade dos receptores de insulina à glicose, atuando sobre o diabetes tipo II. Este mesmo componente age diminuindo as citocinas pré-inflamatórias (minimizando desordens inflamatórias) e

induzindo a contração e o relaxamento endotelial, prevenindo doenças vasculares.

Ross et al. (2001) estudaram a ação da *Punica granatum L.* sobre a resposta imune, procurando enfatizar a resposta humoral. Para tanto, foi utilizado o extrato aquoso na dose de 100mg/kg, via oral, na água de beber dos animais. Para o experimento foi aplicado 0,1mL do derivado puro de proteína subcutaneamente em coelhos e avaliada a migração leucocitária usando o teste de aglutinação, no tubo de Widal. Os resultados mostraram aumento, tanto para a resposta humoral, quanto para a mediada por células, nos animais que receberam a *Punica granatum L.*, mas os autores enfatizaram a necessidade de avaliação dos métodos destas respostas. Pereira et al. (2005) também citaram a atividade imunomoduladora da *Punica granatum L.*

Werkman et al. (2008) enfatizaram a multifuncionalidade desta fruta como fitoterápico, descrevendo a capacidade antimicrobiana e antiinflamatória, além de ações terapêuticas na odontologia e em especialidades médicas.

Toi et al. em 2003 estudaram a inibição de angiogênese pelos constituintes do extrato de PG, os autores explicaram que esta ocorria devido a diminuição do fator de crescimento endotelial em células de câncer de mama MCF-7 e linhagem de células endoteliais de cordão umbilical.

2.3 Testes de Citotoxicidade

Os protocolos sugeridos para estudos de medicamentos, inclusive de medicamentos fitoterápicos, são extensos e repletos de questões éticas. A complexidade dos estudos tem o objetivo de garantir a ausência da toxicidade e a efetividade terapêutica dos

medicamentos de acordo com o que é determinado na Declaração de Helsinki (Simões et al. 1999, Schmalz, 2002).

Para os fitoterápicos, os processos de estudo são extensos até que uma planta tenha sua ação comprovada ou não. A planta é avaliada em diferentes etapas, na etapa botânica é feita a confirmação e identificação da planta recebendo esta uma certificação (exsicata). Na etapa farmacêutica, acontecerá o preparo da fórmula farmacêutica a ser administrada, tendo a qualidade, uniformidade e estabilidade garantidas para os testes pré-clínicos e clínicos (Simões et al., 1999; Rogero et al., 2003).

Assim, ensaios farmacodinâmicos e toxicológicos devem ser realizados em diferentes níveis: pré-clínicos e clínicos, avaliando a relação risco/benefício. Na etapa de ensaios pré-clínicos temos ensaios biológicos de forma geral, testes laboratoriais *in vitro* e *in vivo* com células e animais respectivamente. Quando autorizados os testes que avaliam a citotoxicidade *in vitro* (primários) e quando obtidos resultados satisfatórios nos testes primários, os testes de biocompatibilidade *in vivo* (secundários) deverão ser realizados (Camps et al., 1992).

Quando no organismo, o fitoterápico passará por diversos processos químicos de biotransformação que possivelmente originarão um ou mais produtos, sendo que alguns destes podem ser ou tornarem-se tóxicos. O estudo biológico do produto fitoterápico deve iniciar a partir da observação do mecanismo de ação dos componentes citotóxicos presentes no fitoterápico, os testes *in vitro* são os eleitos para iniciar este tipo de avaliação (Rogero et al., 2003;).

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization - ISO*), ensaios *in vitro* são os primeiros testes para avaliar o quanto um material é biocompatível ou não. Para tanto, são publicados documentos normatizando as diversas etapas experimentais. Diversos são os testes de citotoxicidade descritos

na ISO 10993, que padronizam e orientam as formas que estes devem ser conduzidos, entre eles os testes utilizando a cultura celular (ISO, 1999).

Muitas pesquisas são desenvolvidas utilizando os estudos de citotoxicidade para avaliar medicamentos *in vitro*. O modelo de eleição é o realizado com cultura de células que podem ser obtidas através de cultura primária (explante) ou compradas comercialmente (Camargo et al., 2008). Através destes estudos podem ser realizadas avaliações prévias do comportamento biológico dos fitoterápicos em diferentes tecidos (Schmalz, 2002; Cavalcanti et al., 2005; Wang et al., 2006).

Os estudos com cultura de células são passíveis de determinar efeitos citotóxicos dos materiais que permanecerão em contato com tecidos humanos e devem ser feitos através de técnicas rápidas, reprodutíveis e monitorados os efeitos ao longo do tempo experimental (Schmalz, 2002; Cavalcanti et al., 2006).

2.3.1 Cultura celular

A cultura celular consiste no conjunto de técnicas que permitem o cultivo e a manutenção de células fora do organismo do qual são provenientes. Estas são mantidas preservando características próprias como a capacidade de desagregação (mecânica ou enzimática) do tecido original. Existem culturas a partir de tecidos animais (incluindo tecidos humanos) e vegetais.

Em diversas pesquisas (Vilela et al., 2002; Rogero et al., 2003; Daguano et al., 2007), testes *in vitro* são realizados em culturas de células por estas poderem ser armazenadas por um período bastante longo, permanecendo viáveis quando descongeladas. Entre as vantagens

da cultura celular estão: a possibilidade de estudar fenômenos inacessíveis em tecidos intactos; e a obtenção de células com boa homogeneidade e bem caracterizadas (em nível fisiológico e funcional).

Entretanto, faz-se necessário controle e constante observação das células cultivadas, avaliando possíveis instabilidades das características celulares e perda de características fenotípicas, o que pode inviabilizar a utilização desta. Assim, são necessários operadores experientes para a utilização da técnica de cultura celular, que apresenta limites para a extrapolação dos resultados obtidos do modelo para o organismo intacto (Vilela et al., 2002; Rogero et al., 2003; Daguano et al., 2007).

No entanto, as aplicações da cultura de células na produção de vacinas antivirais, na compreensão de fenômenos de neoplasia, no estudo da imunologia e em ensaios de fármacos e cosméticos *in vitro*, compensam largamente todo o investimento em recursos econômicos e humanos que exigem. São duas as formas de obtenção da cultura celular. A cultura primária e cultura secundária, classificadas a partir da forma que estas células são obtidas (Vilela et al., 2002; Rogero et al., 2003; Daguano et al., 2007).

2.3.2. Cultura celular primária

A cultura primária é preparada diretamente dos tecidos de um organismo. Quando obtido o fragmento de tecido, este é colocado em uma placa de petri com meio próprio para o início do cultivo celular acrescido de 10% de Soro Bovino Fetal (SBF). O tecido pode ser fragmentado após a biópsia ou colocado íntegro (inteiro) para os procedimentos subseqüentes de crescimento celular (Soriano, 2005).

Uma vez na placa, com meio de cultura específico para a célula a ser cultivada e com nutrientes necessários para citotoxicidade, as células entram em mitose, tomando o fundo da placa onde estão. Um exemplo de cultura primária acontece na obtenção de fibroblastos de mucosa oral humana a partir de uma biópsia (Soriano, 2005) (Figura 1).

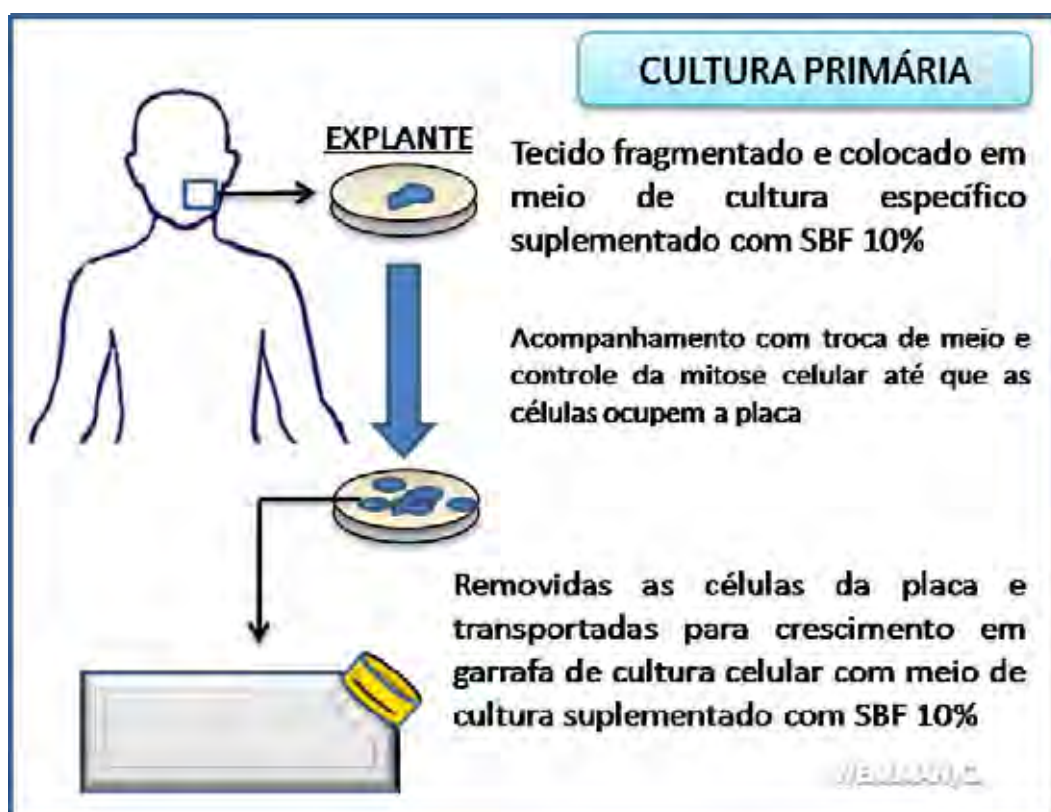


Figura 1 - Esquema para obtenção de uma cultura primária a partir de um explante.

Muggleton-Harris e Hayflick, em 1976, postularam que todo tipo de célula normal tem um potencial intrínseco limitado de citotoxicidade, sendo o núcleo responsável pelo controle do número de divisões que cada célula vai realizar.

As células originadas de culturas primárias apresentam um período de vida limitado variando com o tipo de tecido e espécie. O número de divisões mitóticas, também chamadas “passagens”, são

limitadas devido à pré-determinação genética, capaz de controlar o número de gerações celulares. Em um dado período de suas vidas, estas células entram em estado de senescência, entram em estágio Go (sem atividade metabólica) e posteriormente morrem (Maluf; Pompéia, 2005; Antonialli Junior, 2008).

2.3.3. Cultura celular secundária

A cultura celular secundária compreende a obtenção de uma cultura imortalizada a partir de células retiradas de uma cultura primária, com alterações genéticas nucleares ou linhagens celulares obtidas (Martins et al., 2005).

No processo de alteração molecular pode ocorrer a transformação de uma célula normal para célula neoplásica. Quando reportamos ao ciclo celular e suas fases (G1, S, G2, M), são observados diferentes conjuntos de genes expressos ou não (“ativados” ou “silenciados”) (Martins et al., 2005).

Os genes estão envolvidos no controle do ciclo e da citotoxicidade celular. Caso existam alterações, a proteína resultante da síntese de seu produto poderá não ser constituída ou ter sua função alterada. Se esta proteína for importante para determinado passo do ciclo, a sequência de eventos programada pelo código genético será alterada. A célula poderá então ter três comportamentos distintos: a correção do erro através de mecanismos de reparo do DNA; apoptose; ou alteração permitindo sua perpetuação, sendo esta nova condição transmitida para as células filhas (Belizário, 2002).

Esta última opção origina uma população de células com alterações no DNA e nos mecanismos de controle da divisão e da

citotoxicidade celular, de forma irrestrita, contribuindo para transformação do fenótipo celular (Belizário, 2002).

A obtenção de uma linhagem de células transformadas é possível a partir da coleta de células de um tumor maligno, colocando-as em meio de cultura para crescimento. Em cultura, apresentarão padrão de crescimento diferente das células extraídas de tecidos normais, porém serão mantidas características como: crescimento independente de mecanismos de ancoragem, menor necessidade de fatores de crescimento para proliferarem e ausência de inibição por contato. Essas características conferem a condição de células transformadas. (Martins et al., 2005).

Também é possível a obtenção de células transformadas a partir de alterações moleculares no núcleo de células originárias de uma cultura primária. Com a manipulação estas células não entrarão em Go, acarretando um comportamento anômalo, que compromete o ciclo de crescimento e citotoxicidade, sendo consideradas desta forma imortais. As linhagens celulares estabelecidas a partir de células imortalizadas passam a dividir indefinidamente. Elas permanecem com algumas características semelhantes às células normais em cultura como a adesão ao substrato, a necessidade de fatores de crescimento, característica de inibição por contato e manter um padrão de crescimento organizado em monocamadas. Apesar de imortalizadas, essas células ainda dependem do meio adequado para crescer e se dividir. (Martins et al., 2005).

As células imortalizadas e transformadas apresentam características semelhantes às células cancerosas, mas não podem ser consideradas como tal, pois para esta classificação, precisam adquirir a propriedade de gerar metástase (Martins et al., 2005).

Estas células podem ser obtidas comercialmente através de centros de pesquisa, laboratórios, empresas farmacêuticas, entre outros, sempre com certificação de procedência e qualidade.

Quando é obtida uma linhagem de células (neoplásicas ou não), estas são enviadas ao laboratório ou comprador em frascos de cultura fechados com meio de cultivo celular completando todo o volume interno e com as células aderidas ao fundo. No momento que chegam ao laboratório estas células são removidas da garrafa de origem e transferidas para novas garrafas para o crescimento (Figura 2).

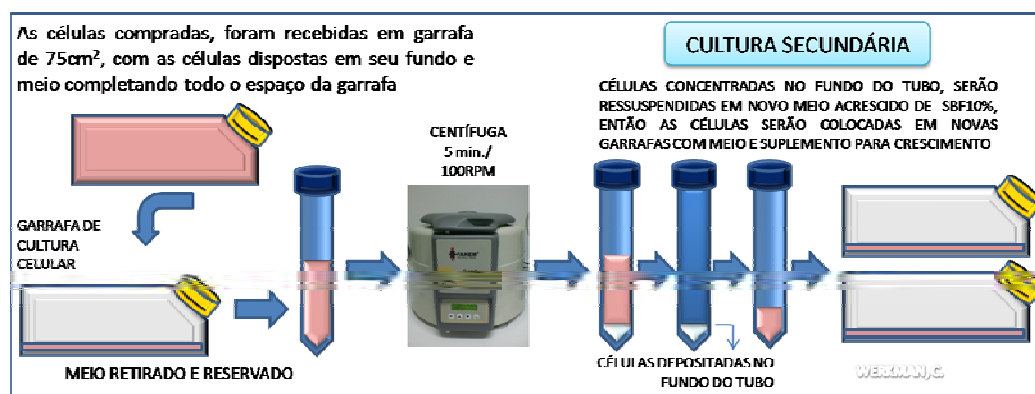


Figura 2 - Desenho esquemático de obtenção e cultivo de células por cultura secundária.

2.4 Testes de citotoxicidade com fitoterápicos

O teste de citotoxicidade de produtos fitoterápicos é de fundamental importância, pois o uso indiscriminado dos mesmos pode determinar reações adversas, intoxicações, lesões no organismo do paciente acarretando riscos à saúde humana (Taskova et al., 2002; Ajaiyeoba, 2003; Rogero et al., 2003; Garcia, 2004; Loizzo, 2004).

Pesquisadores buscam medicamentos atuantes sobre células neoplásicas, seja suprimindo seu crescimento ou induzindo-as a morte. Porém, este medicamento não deve agredir células normais do organismo (Katsube et al. 2003; Yang et al., 2006).

A partir destes estudos, é possível fazer uso das propriedades terapêuticas de cada planta, sem riscos para os tecidos humanos saudáveis (Garcia, 2004). Diferentes são os testes realizados para avaliar o efeito citotóxico de uma substância, seja por ação letal sobre animais ou sobre cultura de células.

Vidal et al. (2003) estudaram a ação citotóxica da *Punica granatum L.* sobre embriões de ratos Wistar, constatando que, menos de 0,1mg por embrião, não foi na dose tóxica. Reportaram também que a DL₅₀ administrada intraperitoneal, era de 731,1 mg/kg, com intervalo de confiança entre 565-945 mg/kg. Os autores relatam que a toxicidade provavelmente se devia à presença de alcalóides no extrato hidroalcoólico da *Punica granatum L.*

2.4.1 Testes com fitoterápicos e cultura celular

Normalmente os testes de citotoxicidade *in vitro* são realizados de diferentes formas. Colocando os produtos a serem testados em contato com os locais onde posteriormente serão colocadas as células, realizando assim um teste com contato indireto com a confecção de corpos de prova que serão colocados em contato com o recipiente e removidos antes das células serem colocadas (Camargo et al., 2008) ou colocando o produto a ser testado diretamente no meio de cultura celular (Ahmed et al., 2005).

Ahmed et al. em 2005, mostrou em seus experimentos com células de linha condroblástica a ação da *Punica granatum L.* sobre condrócitos humanos, demonstrando que o frações separadas do extrato de *Punica granatum L.* com altas doses de antocianinas inibiram a expressão de IL-1Beta e Metaloproteínases (MMPs 1, 3 e 13), marcadoras clássicas de inflamação e degradação destas células.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar *in vitro* e utilizando análise quantitativa e qualitativa, os efeitos da *Punica granatum L.* em diferentes concentrações, sobre duas linhagens de células, fibroblastos de mucosa bucal humana e uma linhagem de célula cancerígena.

4 MATERIAL E MÉTODO

A toxicidade da *Punica granatum L.* (PG) foi avaliada, utilizando cultura de células, por meio da resposta de fibroblastos humanos (FLM) e de uma linhagem de células cancerígenas (KB). Os testes foram realizados levando-se em conta a viabilidade e a citotoxicidade das células quando em contato com a PG em diferentes concentrações. O controle positivo utilizado foi uma cultura sem PG e o controle negativo o meio de cultura adicionado de solução de Tryton a 1%. A capacidade de resistência ou viabilidade celular foi observada no período de 24 h e a sobrevivência e citotoxicidade celular por sete dias. O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Ibirapuera, com protocolo n°. 298/07 (Anexo 1).

4.1 Instituições envolvidas

O projeto deste estudo foi idealizado e elaborado na Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual “Julio Mesquita Filho” - UNESP de São José dos Campos/SP. Para sua realização houve cooperação de diversos núcleos de estudo no Brasil. Desta forma, a Universidade Federal da Paraíba (UFPB) forneceu o extrato do fitoterápico, em forma de gel, utilizado nos experimentos e a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) foi responsável pela identificação botânica da planta e pela quantificação bioquímica do extrato. No

Laboratório de Boodontologia da Universidade Ibirapuera (UNIB), foram realizados os testes de citotoxicidade em cultura celular.

4.2 Liofilização

Para melhor conservação do extrato de PG, e para manter suas propriedades fitoterápicas por tempo prolongado, permitindo manipular de forma adequada as concentrações necessárias para o experimento, o gel foi submetido ao processo de liofilização no Laboratório de Química da Universidade de São Paulo. O produto desidratado obtido foi embalado em sacos de polietileno que foram, em seguida, hermeticamente fechados.

4.3 Obtenção das soluções padronizadas de PG

No Laboratório de Boodontologia da Universidade Ibirapuera, o material liofilizado foi acondicionado em tubos com 6 g cada um, os quais foram mantidos sob vácuo em dessecador (Vidrolabor – São Paulo/ SP - Brasil).

Para obtenção das soluções padronizadas de PG utilizadas para os testes de citotoxicidade, 0,1 mg do material liofilizado foi colocado em 10 mL de meio de cultivo e homogeneizados em vórtex (Quimis Q-220-B – São Paulo/SP - Brasil) até a dissolução total do soluto. O meio de cultura foi selecionado de acordo com o tipo de célula a ser cultivada. Foram preparadas soluções contendo o equivalente a 12,5 mg de extrato de PG em cada 10 mL do meio de cultura. Em seguida, as

soluções foram colocadas em seringas descartáveis estéreis (DB Plastipak – São Paulo - Brasil) e passadas em filtro com poros de 0,22 µm (Corning Inc.) objetivando a esterilização das mesmas, e conservadas em geladeira a 4° C.

A solução de Triton (Sigma Aldrich Co.) adotada como controle negativo foi preparada com a adição de 1 mL de Triton a 10% em 9 ml de PBS e homogeneizada em vórtex, sendo igualmente reservada em geladeira.

Os meios de cultura utilizados para controle positivo foram os próprios meios de cultura, que foram manipulados como preconizado pelos fabricantes. Todos os grupos experimentais foram suplementados com 10% de Soro Bovino Fetal no momento dos testes.

4.4 Cultura de células

A avaliação da citotoxicidade da PG foi realizada em duas culturas celulares já estabelecidas e mantidas no Banco de Células do Laboratório de Biodontologia da Universidade Ibirapuera.

A cultura de fibroblastos humanos de mucosa oral (FLM) foi obtida por meio de cultura primária originada de material de explante de doador voluntário (Soriano, 2005). Foram realizados os procedimentos de cultivo conforme demonstrado no esquema a seguir (Figura 3).



Figura 3 - Desenho esquemático com imagens das etapas para obtenção da cultura primária de fibroblastos humanos de mucosa oral (FLM).

As células cancerígenas de Carcinoma Epidermóide Oral Humano ATCC CCL-17 (KB) pertencem a uma linhagem comercial adquirida através do Instituto Adolf Lutz e são mantidas no banco de células do Laboratório de Bioodontologia da Universidade Ibirapuera.

Os procedimentos de cultivo celular e os ensaios de citotoxicidade do fitoterápico foram realizados no Laboratório de Bioodontologia da Universidade Ibirapuera, em câmara de fluxo laminar (Esco Biotech, São Paulo, Brasil) evitando contaminação e comprometimento do experimento.

Diferentes meios de cultivo foram usados dependendo de cada tipo celular. Os fibroblastos de mucosa humana (FLM) foram mantidos em garrafas de 75 cm² contendo meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) (Cutilab Materiais para Cultura de Células Ltda. – São Paulo - Brasil) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, EUA). As células KB foram mantidas em garrafas de 75 cm² contendo o meio Eagle (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) suplementado com 1% de aminoácidos (Sigma Aldrich Co., St

Louis, MO, EUA), 1% de piruvato (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) e 10% de SBF (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, EUA).

4.5 Grupos experimentais

Em uma primeira etapa, foram delineados como piloto, testes experimentais de viabilidade por 24 horas. Estes foram feitos com diferentes concentrações, com quantidade de polifenóis diferentes e avaliando em quais concentrações foi observada a morte das células as células (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentrações e quantidade de *Punica granatum L.* com respectiva quantidade de polifenóis testados para definir as concentrações a serem utilizadas nos testes de viabilidade.

Concentrações testadas	Volume (mL) de PG	Quantidade Polifenóis (%)	Morte celular no teste piloto
50%	0.5	0,3	Sim
25%	0.25	0,15	Sim
12,5%	0.125	0,075	Sim
10%	0.1	0,06	Sim
7,5%	0.075	0,045	Sim
5%	0.05	0,03	Sim
2,5%	0.025	0,015	Sim
1%	0.01	0,006	Não
0,8%	0.008	0,0048	Não
0,5%	0.005	0,005	Não
0,25%	0.0025	0,003	Não
0,125%	0.00125	0,0015	Não
0,062%	0.00062	0,000372	Não
0,031%	0.00031	0,000186	Não

De acordo com as respostas obtidas, foram estabelecidas seis diferentes concentrações para a os testes de viabilidade em triplicata.

A concentração de 1% foi escolhida, pois foi a primeira a ter células sobreviventes em 24 horas e as demais foram estabelecidas dependendo da titulação realizada com a solução inicial padronizadas de PG a 1%.

Estas titulações foram realizadas com a diluição da solução inicial de PG a 1% no meio de cultura, sendo estabelecidos grupos experimentais com 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,062% e 0,031% (Figura 4).

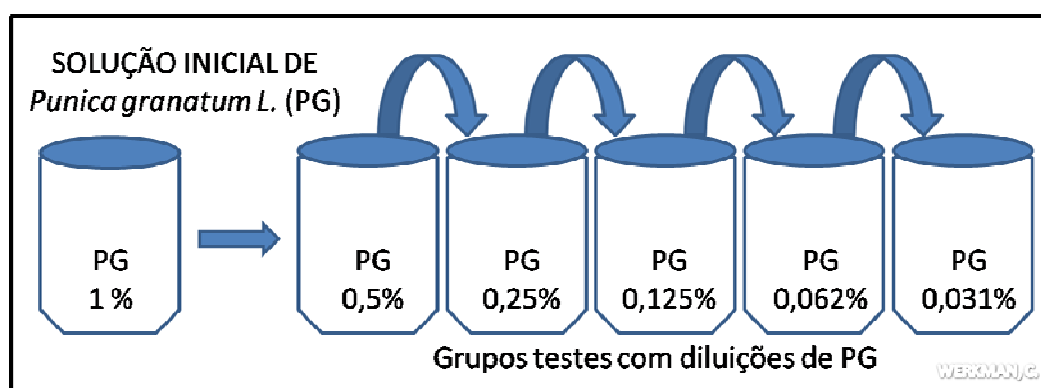


Figura 4 - Solução base e diluições preconizadas de PG para os testes de viabilidade.

4.6 Procedimentos para Cultura Celular

Para a realização da cultura de células foram realizados vários passos sequenciais que incluíram:

- a) preparo prévio do material a ser utilizado;
- b) descontaminação da área de trabalho e do material;
- c) realização da cultura propriamente dita.

Antes do início do experimento alguns cuidados foram tomados para minimizar o risco de contaminação. A limpeza de todas as superfícies, materiais e suportes presentes no interior da câmara de fluxo laminar foi feita com álcool 70^o GL. Os materiais a serem utilizados (pipetas, tubos e garrafas de cultivo celular) foram inseridos no fluxo após a descontaminação dos invólucros com álcool 70^o GL. Após a distribuição e organização do material no interior da câmara a mesma foi submetida à luz ultravioleta durante 15 minutos.

Os meios de cultura DMEN e EAGLE foram preparados previamente pelo Laboratório de BIODONTOLÓGIA da Universidade Ibirapuera. Tanto os meios de cultura como o soro bovino fetal (SBF) foram separados em alíquotas e mantidos em geladeira (os meios) ou em freezer -20^oC (as alíquotas de SBF) até o momento de sua utilização. Quando removidos da geladeira ou freezer, estes foram levados ao banho-maria a 37^oC até atingirem temperatura equivalente.

Os dois tipos celulares a serem testados estavam armazenados em nitrogênio líquido, identificados e separados em diferentes criotubos mantidos em *canisters*. Para que as células pudessem permanecer de forma adequada no nitrogênio líquido foi adicionada ao meio de cultura uma substância crioprotetora, o Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich Co.) acrescido de 10% de SBF. Os criotubos foram fechados com suas respectivas tampas (Figura 5).

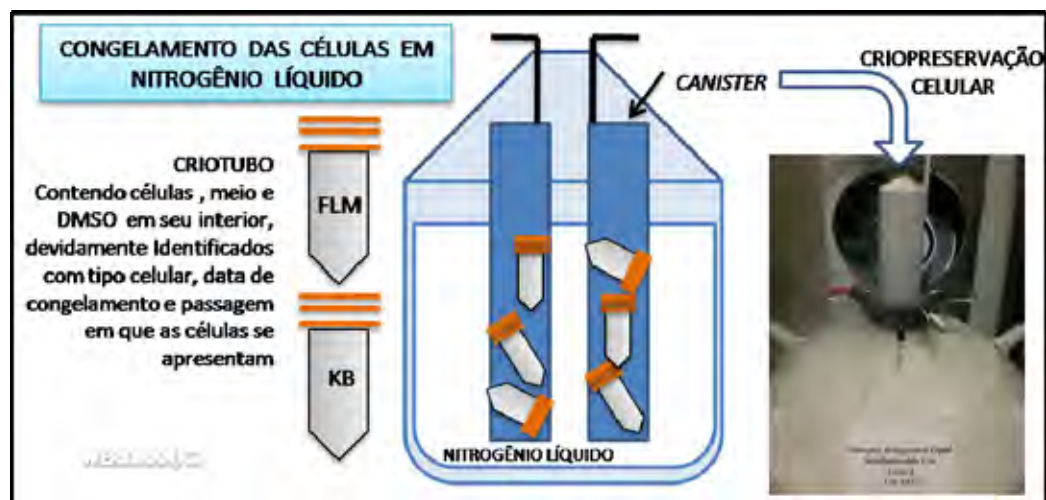


Figura 5 - Desenho esquemático da disposição dos criotubos durante o processo de congelamento em nitrogênio líquido.

4.7 Procedimentos para Descongelamento Celular

No momento da utilização, os criotubos foram retirados dos *canisters* para as células serem descongeladas em banho-maria a 37°C. Todo o processo de manipulação das células desde a remoção do invólucro de filme plástico até a colocação das mesmas em garrafas de cultivo foi realizado em fluxo laminar de forma rápida e cuidadosa para evitar contaminação e degradação celular.

No fluxo laminar, os criotubos contendo um tipo ou outro de células tiveram todo o conteúdo coletado com micropipeta e colocado em tubos com 2 mL de DMEM ou de EAGLE acrescidos de SBF a 10%. Os tubos foram levados à centrífuga (Centrífuga Excelsa II - Modelo 206 BL- FANEN – São Paulo - Brasil) por 5 minutos a 1000 rpm para que ocorresse uma precipitação das células no fundo dos tubos, formando uma massa celular chamada “*pellet*”.

Os meios de cultura foram então removidos e descartados a fim de eliminar o conteúdo de DMSO adicionado como crioprotetor antes do congelamento.

As células foram ressuspensas em 2 mL de meio de cultura novo (DMEM ou EAGLE) com 10% de SBF e colocadas em garrafas de cultura celular de 75 cm². Foram acrescidos 8 mL de DMEM ou EAGLE com 10% de SBF para que o volume final nas garrafas fosse de 10 mL, constituindo quantidade suficiente de meio para suprir de nutrientes as células em crescimento (Figura 6).



Figura 6 - Desenho esquemático do descongelamento de células mantidas em nitrogênio líquido.

Os frascos foram fechados por completo e levados ao microscópio de luz invertida para observação das células no seu interior. Neste momento as células apresentavam-se arredondadas e bastante

móveis. A tampa do frasco foi então parcialmente aberta e colocado em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ (Garcia et al., 2003, Fraser et al., 2004).

O meio de cada garrafa de células foi parcialmente trocado a cada 2 dias, com substituição de 50% do volume a cada troca, até a formação de uma de monocamada preenchendo toda a superfície da garrafa.

4.8 Procedimentos prévios ao início dos ensaios de viabilidade e de citotoxicidade celular

As células tiveram seu cultivo em garrafas de 75 cm², com 10 mL de meio acrescido de SBF 10%. Um dia antes do experimento, estas células foram transferidas para placas de 96 ou 24 poços para a realização dos testes propostos. Independente do teste a ser realizado, os, com exceção do tempo de cultivo e número de células por poços, todos os procedimentos descritos foram iguais para os testes de viabilidade ou citotoxicidade celular.

As garrafas foram completamente fechadas para a saída da estufa e imediatamente levadas ao fluxo laminar. O meio de cultura foi removido com pipetas sorológicas e 6 mL foram reservados em tubo cônico de 15 mL. Foram colocados 3 mL de tripsina 0,25% no interior da garrafa, estas novamente fechadas e devolvidas a estufa por 5 min. Neste período, a tripsina agiu sobre as células promovendo o desprendimento destas do fundo da garrafa e entre si. Após este período no interior da estufa, a garrafa foi removida e levada ao microscópio de luz invertida (Nikon Eclipse TS 100) para certificação do desprendimento celular e morfologia celular no meio de cultura.

Em fluxo laminar, o meio reservado anteriormente (6.mL) foi recolocado nas garrafas para diluir e inativar a ação da tripsina,

além de auxiliar na remoção das células. Posteriormente todo o conteúdo foi coletado com macropipeta e transferido para um tubo cônico de 15 mL, protegido com filme de laboratório (Parafilm – Pechiney Plastic Packaging) e levado à centrifuga 1000 RPM por 5 min. O meio com a tripsina foi cuidadosamente removido e as células ressuspensas com 1 mL de meio novo acrescido de SBF 10% e homogeneizadas.

Após este procedimento, a solução contendo as células foi considerada pronta para ser utilizada para a contagem (Figura 7).

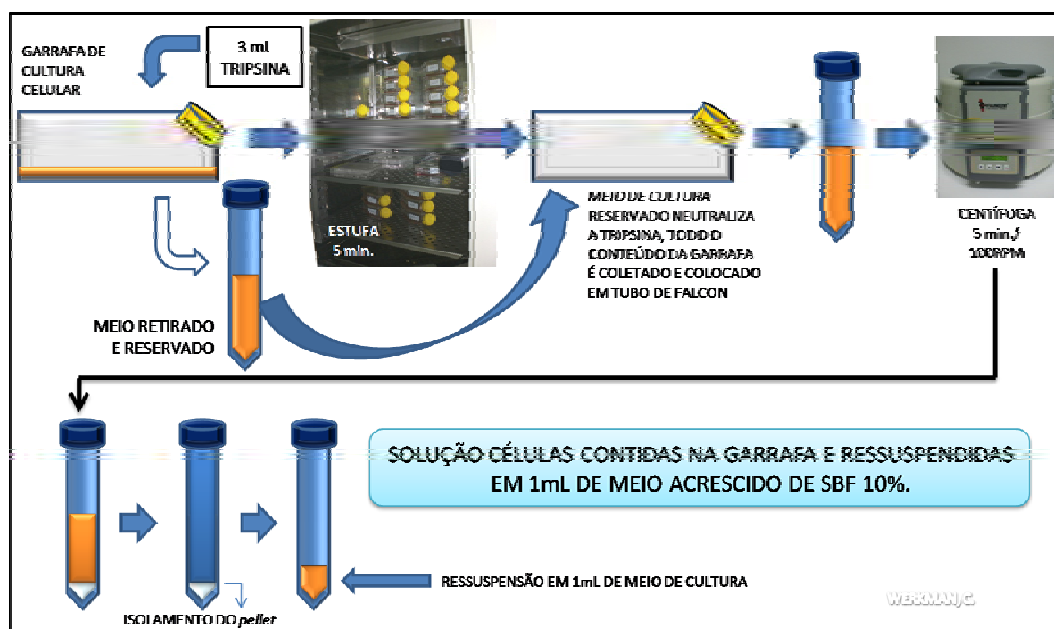


Figura 7 - Esquema de procedimentos para remoção das células da garrafa e preparo da solução para contagem.

4.9 Contagem Celular pelo Método do Azul de Trypan

A partir da solução de células coletadas da garrafa, pode ser feita a contagem das células com auxílio da Câmara de

Neubauer® (Laboroptik - EUA), pelo método de exclusão de células coradas pelo Azul de Trypan.

Tomando como base a solução de 1 mL contendo as células que estavam na garrafa, foram retirados 10 µL desta solução de células e colocados em microtubo de 1,5 mL, no qual foi feita nova suspensão, acrescentando a esta 90 µL do respectivo meio de cultura 10 µL de Azul de Trypan a 0,4%.

Após homogeneizadas as soluções no tubo de 1,5 mL, 10 µL do conteúdo foram pipetados e imediatamente transferidos para um hemocítmetro também conhecido como Câmara de Neubauer previamente limpa com álcool 70° GL e recoberta por uma lamínula limpa (Figura 8). Na Câmara, que contém duas grades de contagem, é colocado 1 mm³ volume em cada grade. A difusão da solução contendo as células a serem visualizadas, ocorre por capilaridade.

Após colocada a solução contendo as células (10 µL em cada grade de contagem), a Câmara foi levada ao microscópio de luz invertida e feita a contagem de células na objetiva com aumento de 10 vezes. Nos 25 quadrados de cada grade, foram anotadas as células viáveis (não coradas pelo Azul de Trypan) em todo o campo de cada quadrado. Neste experimento não foram contabilizadas as células nas linhas superior e direita (Figura 8).

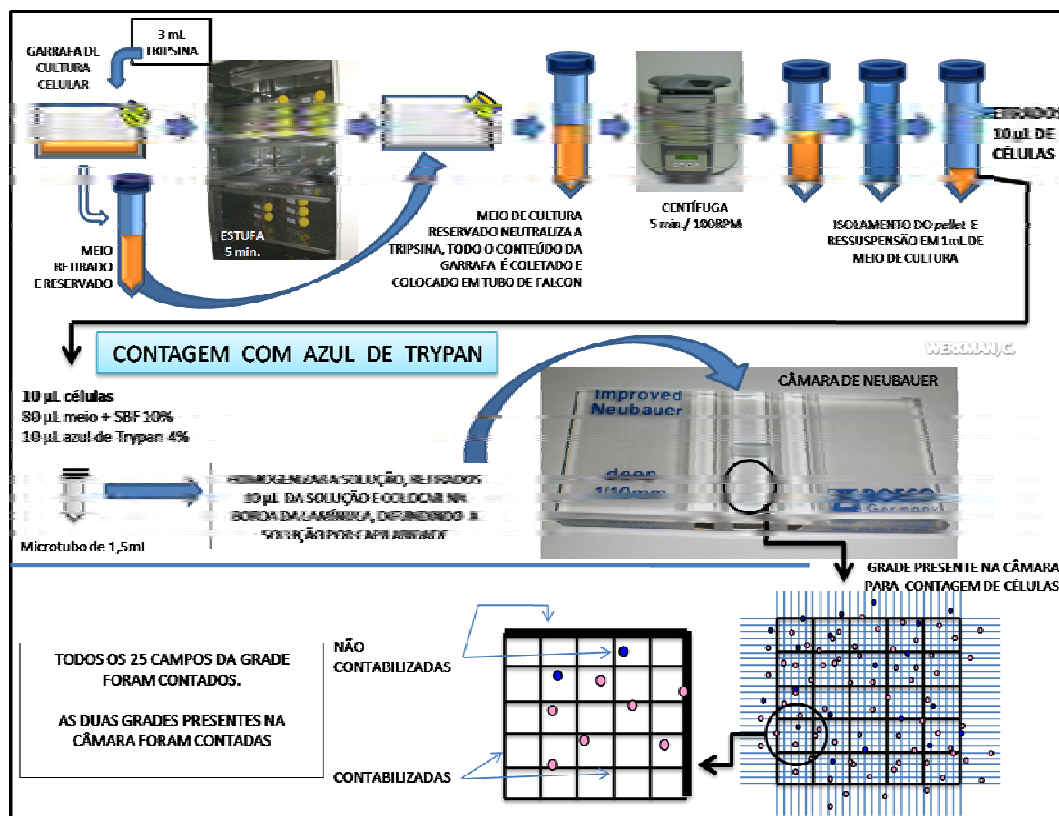


Figura 8 - Câmara de Neubauer e esquema da grade de contagem exemplificando as células contabilizadas (rosadas e dentro da grade) e as excluídas da contagem (coradas pelo Azul de Trypan e localizadas nas linhas superior e direita).

Para determinar a quantidade de células removidas da garrafa, foi realizada uma média da contagem celular presente nas duas grades da Câmara de Neubauer. Na fórmula demonstrada na figura 9, o volume da grade é representado por 10^4 , o valor de diluição representado por 10 e a quantidade de grades contabilizadas foi igual a dois.

Volume de solução contida entre a lâmina e a lamínula, compreendendo 0,1 µL (1mm x 1mm x 1mm)

$$\text{Concentração celular por mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células contadas} \times 10^4 \times 10}{2}$$

Diluição da solução com células contadas

Figura 9 - Fórmula para contagem das células presentes nas duas grades da Câmara de Neubauer.

A partir do valor obtido, foi avaliado o número de células usado no experimento de viabilidade (6×10^4) ou de citotoxicidade (4×10^4), possibilitando calcular por meio de proporcionalidade a quantidade de volume necessário em cada poço como demonstrada na fórmula da Figura 10.

Nº total celular x $10^5 \rightarrow$ passar para potência de 10^4

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ total celular} \times 10^4}{6 \times 10^4} = \frac{1000 \mu\text{L}}{x \mu\text{L}} \left. \vphantom{\frac{\text{N}^\circ \text{ total celular} \times 10^4}{6 \times 10^4}} \right\} x = \frac{6000}{\text{N}^\circ \text{ total celular}} \left. \vphantom{\frac{6000}{\text{N}^\circ \text{ total celular}}} \right\} x = ??? \mu\text{L}$$

Figura 10 - Fórmula para cálculo de volume de meio contendo células para ser colocado em cada poço para cultura.

4.10 Ensaio de viabilidade das células

Para este teste a placa de 96 poços com 6,4 mm de diâmetro foi escolhida. Para cada poço, foi preconizado um volume final de 200 µL do conjunto (células e meio) sendo estipulado por poço o número de 6×10^4 células. Foram usados 3 poços para cada grupo

experimental além dos controles positivo e negativo. Os experimentos foram feitos em triplicata, em três momentos diferentes.

Após contadas e dispostas nos poços, completando o espaço programado da placa, esta foi colocada por 24 h em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após este período foi confirmada a presença das células para o teste com auxílio de microscópio de luz invertida (Figura 11).

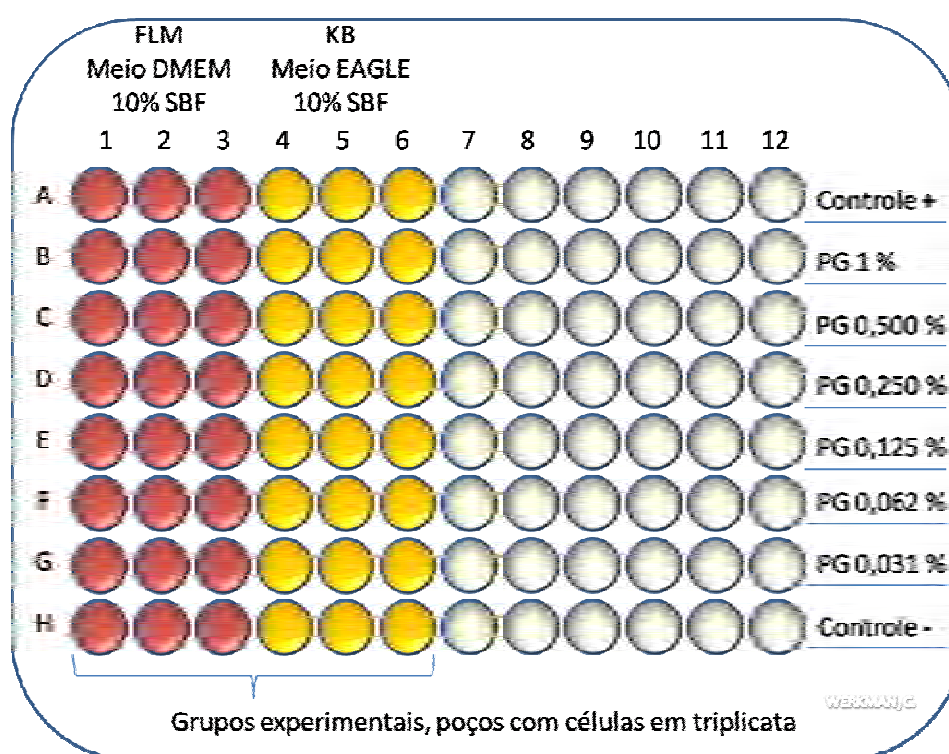


Figura 11 - Disposição das células colocadas na placa de cultivo 24 h antes do início dos testes de viabilidade.

No dia do teste de viabilidade as soluções a serem testadas foram preparadas. Então, a partir de uma solução-mãe padronizada de PG foi feita diluição serial no meio de cultura específico para cada tipo celular, sendo estabelecidos os grupos experimentais de acordo com as concentrações (Figura 12). Para controle positivo foi utilizado o meio de cultivo de cada tipo celular acrescido de SBF 10%.

Para o controle negativo, foi utilizada uma solução de Triton 1% (Dinâmica – São Paulo - Brasil).

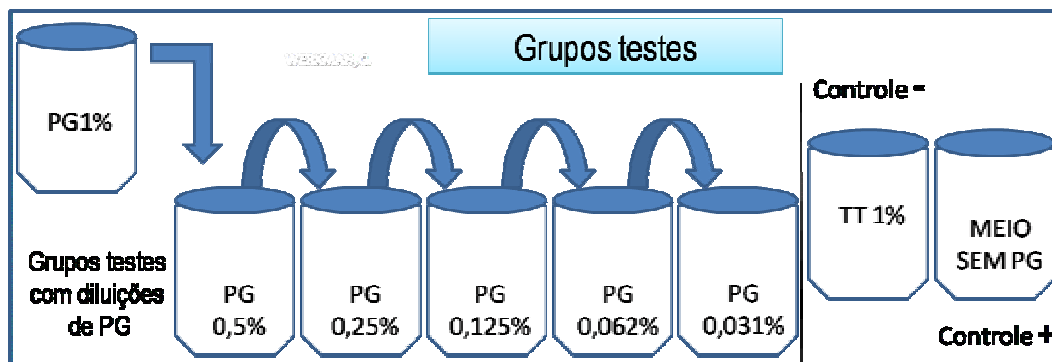


Figura 12 - Grupos experimentais, esquema de diluição por titulação ou a partir da concentração de 1% de PG, além dos grupos controle negativo e controle positivo.

Após todas as soluções teste estarem prontas, a placa foi removida da estufa e levada ao fluxo. Com auxílio de micro-pipeta, os meios contidos nos poços foram removidos. Em seguida as soluções de PG em diferentes concentrações foram colocadas nos poços com células, assim como as soluções para os grupos controle positivo (C+) e controle negativo (C-). Para controlar a qualidade dos meios, na mesma placa foi determinado o chamado “controle branco”, em que os meios de cultura utilizados foram colocados em poços sem células. (Figura 13). A placa foi então incubada em estufa por 24 h a 37 °C com 5% CO₂.

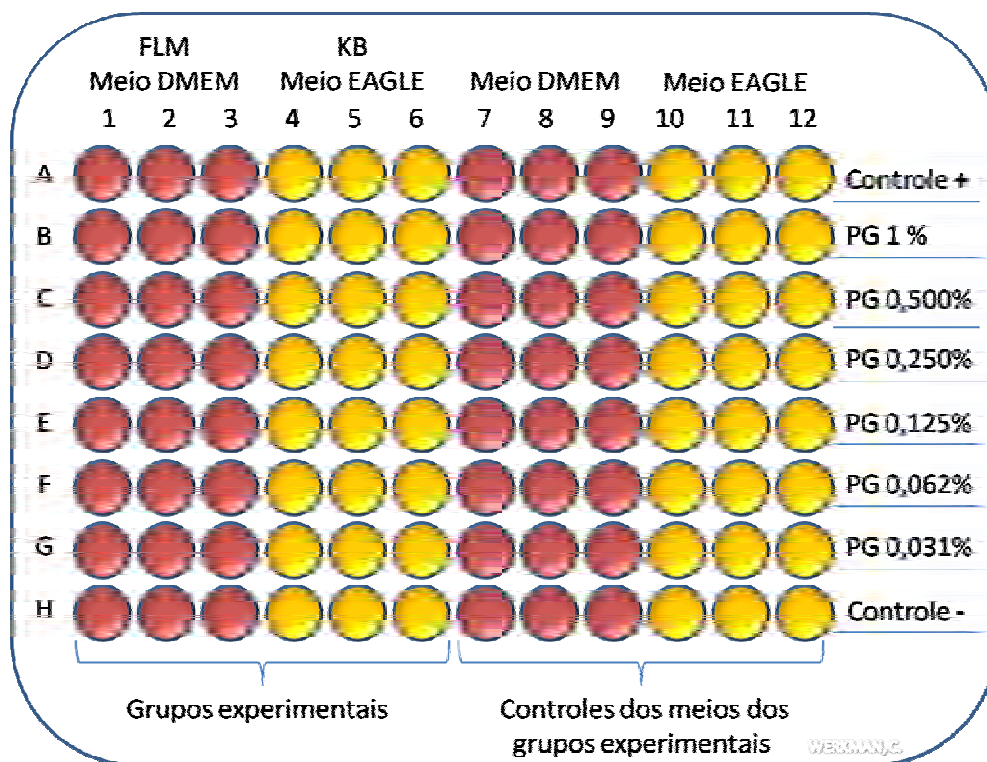


Figura 13 - Esquema de distribuição da placa de 96 poços com as células (FLM e KB) em diferentes concentrações de PG e o controle sem células.

Após 24 h com a cultura em contato com o meio preparado com PG, foram realizados os seguintes procedimentos:

O meio contendo ou não a PG foi removido completamente e cada poço foi lavado com 200 μ L de solução de PBS (Sigma Aldrich Co.) para remoção completa do extrato e meio. Posterior a remoção do PBS, foi colocada em cada poço, uma solução contendo 90% de meio suplementado com SBF 10%, acrescido de 10% de Resazurina (RZ) a 2.100 μ M (Figura 14).

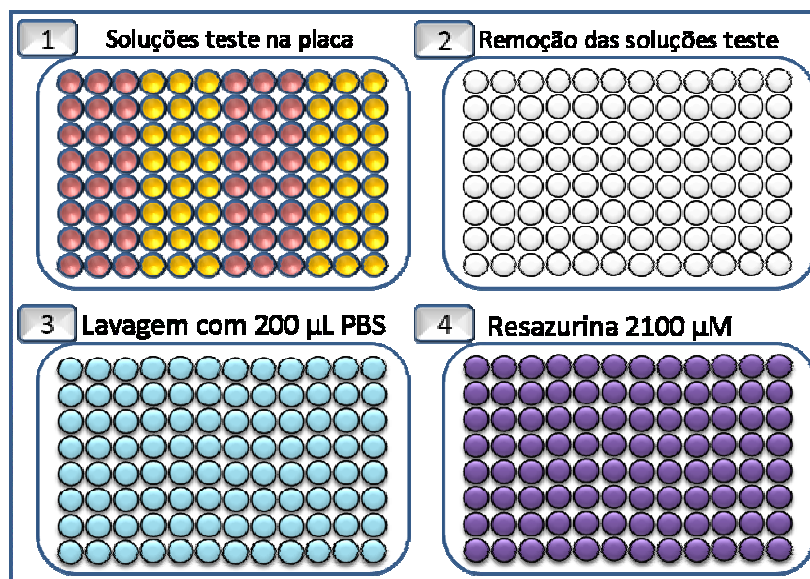


Figura 14 - Esquema de preparo para leitura por meio do espectrofotômetro: placa com grupos experimentais (1), remoção das soluções teste (2), lavagem e remoção do PBS (3) e preenchimento com RZ 2.100 µM (4)

A quantificação celular foi realizada pelo método da Resazurina (RZ), avaliada por espectrofotometria óptica. Para o controle de cor, o mesmo meio de cultivo foi colocado com as diferentes concentrações em poços sem células (controle branco) e estes também foram submetidos ao teste de RZ.

A placa foi levada à estufa 37°C e 5% CO₂ e após 3 horas, período de tempo necessário para que ocorresse a reação de oxirredução do RZ e conseqüente alteração ou não de cor dos poços, o nível de redução foi quantificado usando o espectrofotômetro UVM 340 (Asys Hitech GmbH) para a leitura de absorbância dos comprimentos de onda de 560 nm (Figura 15).

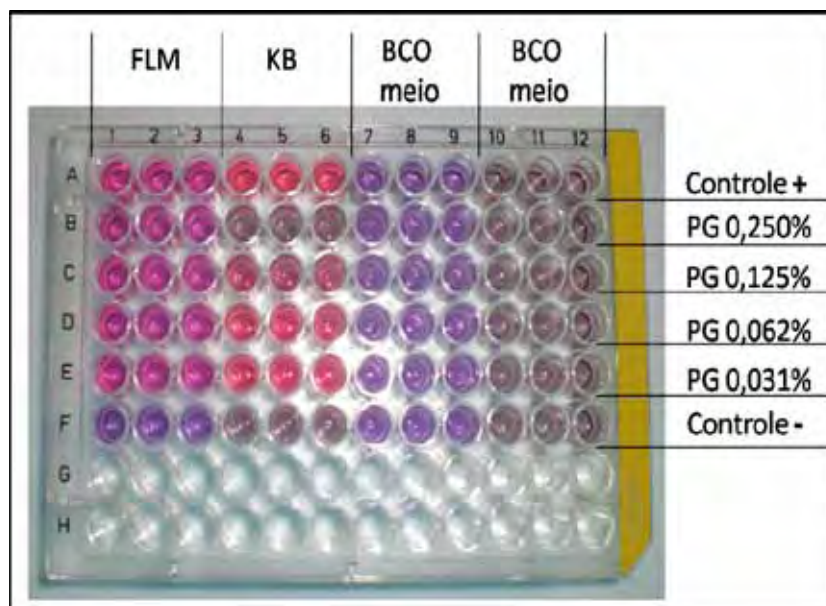


Figura 15 - Exemplo de alteração de cor ocorrida durante a reação de RZ.

4.11 Ensaio de citotoxicidade das células

Este experimento foi realizado em placas de 24 poços 4×10^4 células por poço, em triplicata e em três tempos diferentes. A citotoxicidade celular foi analisada em cinco tempos diferentes (4h, 24h, 3 dias, 5 dias e 7 dias). Foram testadas cinco concentrações diferentes de PG diluída no meio (1%, 0,5%, 0,25%, 0,125% e 0,062%), além dos controles positivo (meio sem PG) e controle negativo (meio contendo Triton 1%).

Antecedendo o início do experimento, as células foram colocadas nos poços com o meio de cultivo acrescido de SBF 10% (totalizando 1000 μL por poço), e as placas incubadas em estufa a 37°C com 5% CO_2 . Após 24 h todas as placas foram retiradas da estufa e os meios removidos dos poços, permanecendo apenas as células. Foram então colocados 1000 μL das soluções teste e dos controles positivo e negativo sobre as células e no grupo branco (Figura 16).

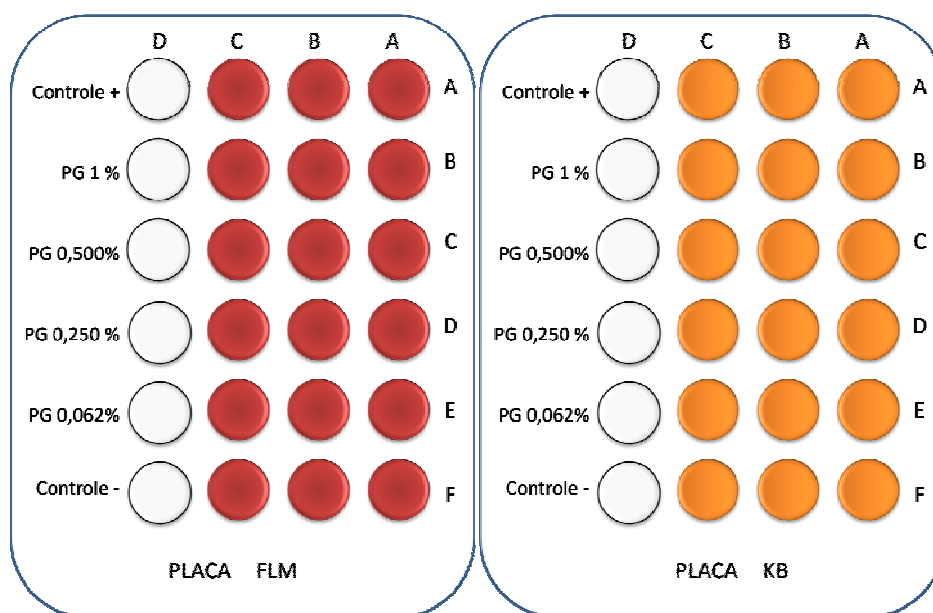


Figura 16 - Esquema de disposição das células na placa para realizar os experimentos de citotoxicidade.

No dia em que foram colocados os meios, as cinco placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% CO₂. Quatro horas após, uma das placas denominada tempo quatro horas, foi preparada para a colocação do RZ. Todos os poços foram lavados com 500 µL de PBS e colocado 1000 µL de RZ 2100 µM a 10%. A placa foi novamente incubada em estufa por 4 h para a reação do RZ e após este período, retirada e levada ao espectrofotômetro para a leitura.

As demais placas foram retiradas de acordo com os períodos programados (1, 3, 5 e 7 dias), removidas as substâncias teste dos poços, realizada a lavagem com PBS e subsequente colocação de RZ 2100 µM a 10%. Para manutenção das células, foi realizada a troca de meio nos dias 3 e 5, conforme esquema a seguir (Figura 17).

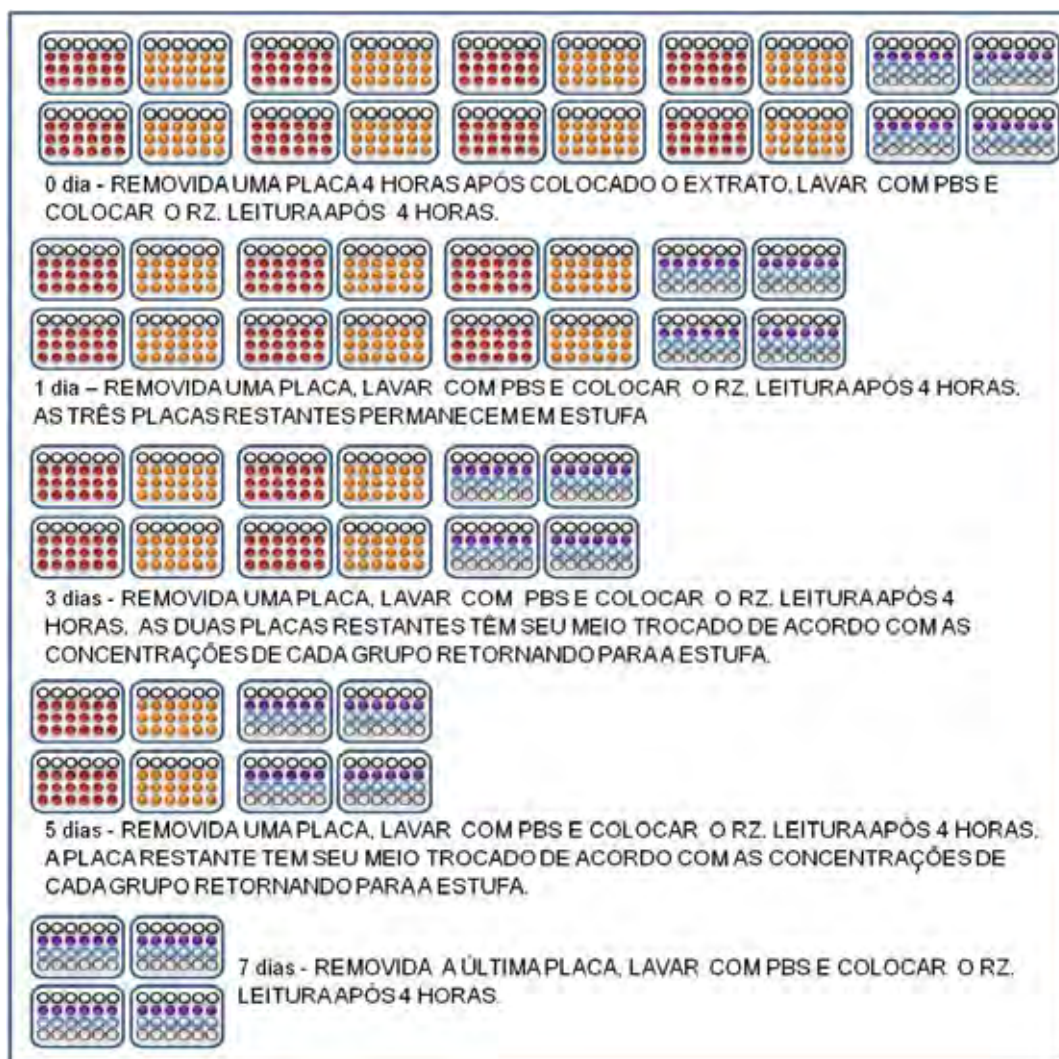


Figura 17 - Desenho do experimento de citotoxicidade com as placas de cultivo e placas controle durante o período experimental de quatro horas a sete dias.

4.12 Análise Estatística

Os dados, em triplicata, obtidos nos dois ensaios foram submetidos a tratamento estatístico utilizando Análise de Variância ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Teste de viabilidade celular

O teste de viabilidade permitiu observar sobrevivência de mais de 70% das células FLM ou KB em baixas concentrações de PG (0,031%; 0,062%; 0,125%; 0,25%). Na concentração de 0,50% ocorreu uma redução significativa da quantidade de células, porém com desvio-padrão amplo, principalmente para as células FLM, dificultando o estabelecimento do padrão de vida e morte das mesmas. Na concentração de 1% de PG foi observada diminuição de cerca de 40% das células FLM e destruição importante das células KB. Os resultados estão expressos na Figura 18 e Tabela 2.

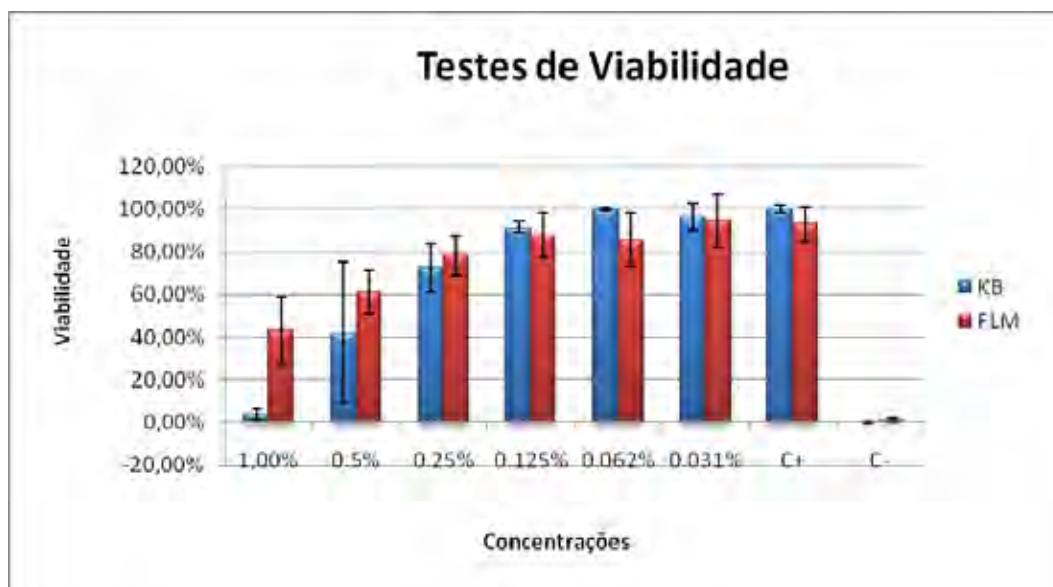


Figura 18 - Gráfico demonstrativo da viabilidade para as células FLM e KB.

Tabela 2 - Representação em porcentagem dos valores do teste de viabilidade realizado para as células FLM e KB em diferentes concentrações de PG.

Concentração	KB	FLM
PG	Resultado ± Desvio-padrão	Resultado ± Desvio-padrão.
1,00 %	3,69 ± 2,9 %	43,34 ± 15,9 %
0,50 %	42,04 ± 33,1 %	61,10 ± 10,1 %
0,25 %	72,40 ± 11,1 %	78,24 ± 9,4 %
0,125 %	91,33 ± 2,5 %	87,58 ± 10,5 %
0,062 %	99,83 ± 0,5 %	85,59 ± 12,5 %
0,031 %	96,19 ± 6,2 %	94,34 ± 12,2 %
C+	100,00 ± 1,8 %	92,94 ± 7,9 %
C-	0,00 ± 0,5 %	1,05 ± 1,3 %

5.2 Teste de citotoxicidade

As concentrações utilizadas para esta etapa de pesquisa basearam-se em resultados previamente obtidos nos testes de viabilidade. O grupo 1% foi escolhido por apresentar elevada taxa de morte celular, o grupo 0,50% pela variação do desvio-padrão apresentado na viabilidade, o grupo 0,062% por ter apresentado a maior sobrevivência neste período e o grupo 0,25% por ser intermediário entre estes últimos.

Os resultados estão graficamente representados de forma individual e por tipo celular nas Figuras 22 e 23 e posteriormente confrontados com o segundo período de experimental nas Tabelas 4 e 5.

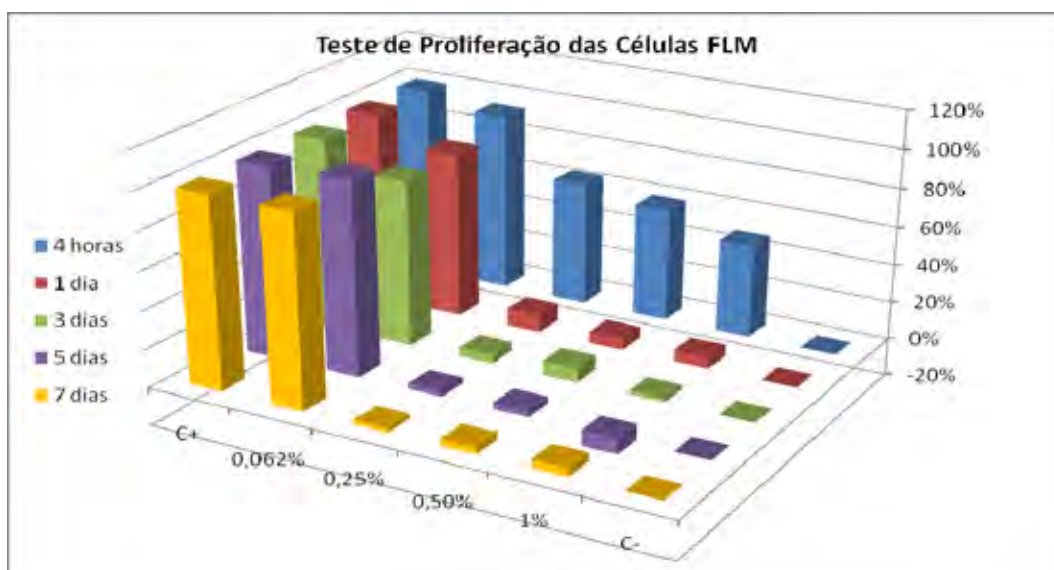


Figura 19 - Gráfico representativo dos valores do teste de citotoxicidade das células FLM nos períodos de 4 horas, 1, 3, 5 e 7 dias.

Tabela 3 - Representação em porcentagem do teste de citotoxicidade das células FLM nos períodos de 4 horas, 1, 3, 5 e 7 dias em diferentes concentrações de PG.

Concentração PG	Citotoxicidade para células FLM				
	4 horas	1 dia	3 dias	5 dias	7 dias
1,00%	48,59 ± 16,4	5,94 ± 0,8	2,06 ± 2,5	-8,24 ± 12,4	4,48 ± 5,0
0,50%	59,19 ± 4,3	5,96 ± 0,7	7,56 ± 1,2	3,50 ± 0,4	3,65 ± 1,8
0,25%	64,50 ± 1,5	9,33 ± 5,3	4,80 ± 3,1	3,24 ± 1,0	2,37 ± 1,8
0,062%	93,43 ± 1,7	86,68 ± 0,8	86,30 ± 4,9	101,34 ± 2,9	99,98 ± 5,4
C +	100,00 ± 2,4	100,00 ± 1,1	100,00 ± 5,4	100,00 ± 2,7	100,00 ± 0,7
C -	0,00 ± 1,0	0,00 ± 0,4	0,00 ± 0,9	0,00 ± 0,5	0,00 ± 0,7

Foi observado, no período de 4 horas, redução do número de células FLM metabolicamente ativas nas concentrações de 0,25%, 0,5% e 1%. A partir do primeiro dia de contato das células com o extrato, foi observada morte de todas as células nos grupos 0,25%, 0,5% e 1%. O grupo 0,062% mostrou nível de citotoxicidade muito próximo ao grupo controle positivo (C+) (Figura 19 e Tabela 3).

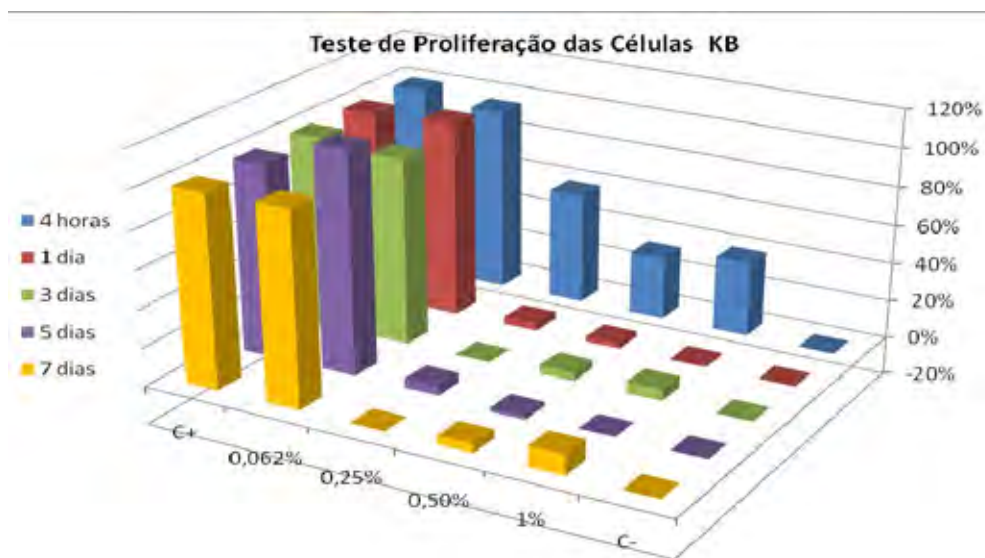


Figura 20 - Gráfico representativo dos valores de citotoxicidade das células KB nos períodos de 4 horas, 1, 3, 5 e 7 dias.

Tabela 4 - Representação em porcentagem dos valores de citotoxicidade das células KB nos períodos de 4 horas, 1, 3, 5 e 7 dias em diferentes concentrações de PG.

Concentração PG	Citotoxicidade para células KB				
	4 horas	1 dia	3 dias	5 dias	7 dias
1,00%	39,00 ± 11,4	0,81 ± 0,9	5,90 ± 5,5	0,17 ± 2,6	10,55 ± 7,0
0,50%	32,90 ± 10,4	2,63 ± 3,1	4,58 ± 3,4	-2,02 ± 2,7	4,52 ± 3,4
0,25%	58,22 ± 3,3	4,07 ± 4,3	0,43 ± 4,4	4,95 ± 4,3	0,13 ± 4,8
0,062%	95,47 ± 3,1	101,94 ± 6,5	96,79 ± 2,2	114,94 ± 14,3	100,95 ± 7,0
C +	100,00 ± 2,1	100,00 ± 2,6	100,00 ± 2,3	100,00 ± 1,7	100,00 ± 3,8
C -	0,00 ± 1,0	0,00 ± 1,1	0,00 ± 2,5	0,00 ± 0,6	0,00 ± 0,7

Os resultados do teste de citotoxicidade das células KB evidenciaram diminuição do número de células metabolicamente ativas nos grupos de 0,25%, 0,5% e 1%, no período de 4 horas. A partir do primeiro dia de contato das células com o extrato, foi observada morte de praticamente todas as células dos grupos 0,25%, 0,5% e 1%. No grupo com concentração de 0,062% os resultados foram semelhantes ao grupo controle positivo (C+).

Quando observados individualmente os períodos de 4 horas, 1, 3, 5 e 7 dias, é possível comparar o comportamento das células entre si (Figuras 21, 22, 23, 24, 25 e Tabelas 5, 6, 7, 8, 9).

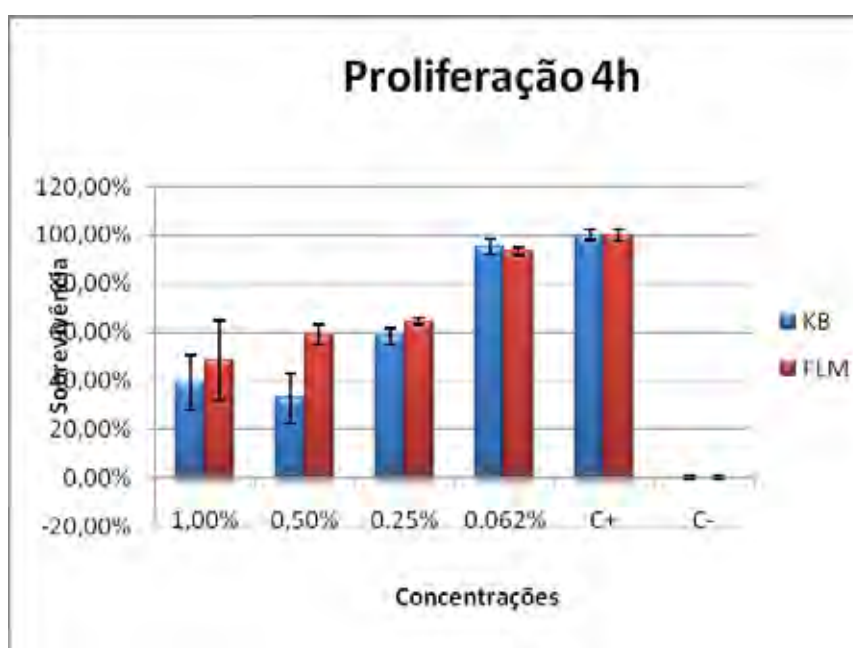


Figura 21 - Representação gráfica do teste de citotoxicidade após 4 horas para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.

Após 4 h de contato entre as células e a PG, ocorreu redução do número celular proporcional ao aumento da concentração de PG. A diminuição foi significativa para a concentração de 0,50% e 1% de PG, sendo maior para as células KB. Na concentração de 0,062% não

houve alteração significativa em comparação com o grupo controle. Os valores estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5 - Tabela representativa em porcentagem do teste de citotoxicidade após 4 horas para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.

Células	Citotoxicidade celular em 4 h					
	1,00%	0,50%	0,25%	0,062%	C +	C -
FLM	48,59 ± 16,4	59,19 ± 4,3	64,50 ± 1,5	93,43 ± 1,7	100,0 0 ± 2,4	0,00 ± 1,0
KB	39,00 ± 11,4	32,90 ± 10,4	58,22 ± 3,3	95,47 ± 3,1	100,0 0 ± 2,1	0,00 ± 1,0

Após um dia de contato entre células e meio contendo extrato de PG, foi possível observar morte de grande quantidade das células nas concentrações de 1%, 0,50% e 0,25% de PG, com valores da reação de RZ semelhantes ao grupo controle negativo. As células KB foram mais afetadas que as células FLM, porém a diferença entre os valores de sobrevivência só foi significativa na concentração de 1%. As células KB presentes no grupo 0,062% mostraram baixa taxa de citotoxicidade, apresentando crescimento semelhante às células do grupo controle positivo (Figura 22 e Tabela 6).

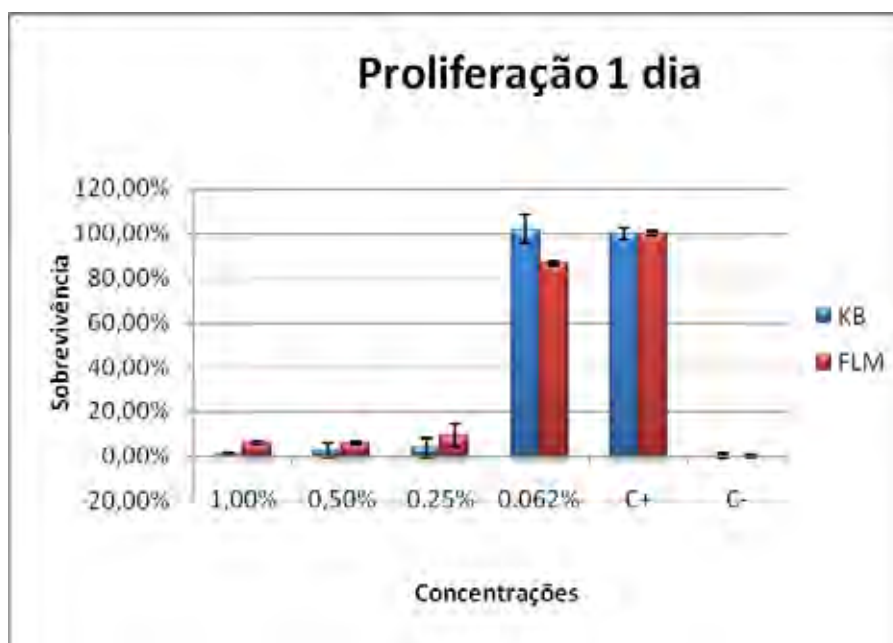


Figura 22 - Representação gráfica do teste de citotoxicidade no dia 1 para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.

Tabela 6 - Tabela representativa em porcentagem do teste de citotoxicidade em 1 dia para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.

Células	Citotoxicidade celular no dia 1					
	1,00%	0,50%	0,25%	0,062%	C +	C -
FLM	5,94 ± 0,8	5,96 ± 0,7	9,33 ± 5,3	86,68 ± 0,8	100,00 ± 1,1	0,00 ± 0,4
KB	0,81 ± 0,9	2,63 ± 3,1	4,07 ± 4,3	101,94 ± 6,5	100,00 ± 2,6	0,00 ± 1,1

Com três dias de contato entre células e meio contendo o extrato de PG, foi possível constatar citotoxicidade contínua das células presentes no grupo 0,062%. A citotoxicidade acompanhou o ritmo de crescimento das células do grupo controle positivo, sem diferença significativa entre os grupos. Nas concentrações de 1%, 0,50% e 0,25% houve grande destruição dos dois tipos celulares, porém sem diferença estatística entre os grupos (Figura 23 e Tabela 7).

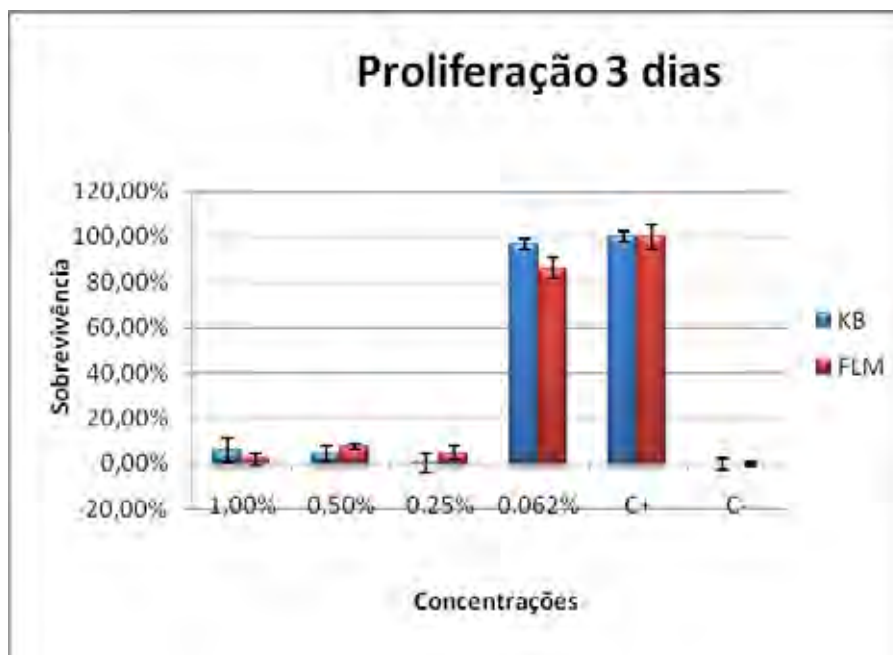


Figura 23 - Representação gráfica do teste de citotoxicidade em 3 dias para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.

Tabela 7 - Tabela representativa em porcentagem do teste de citotoxicidade em 3 dias para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.

Células	Sobrevivência celular em 3 dias					
	1,00%	0,50%	0,25%	0,062%	C +	C -
FLM	2,06 ± 2,5	7,56 ± 1,2	4,80 ± 3,1	86,30 ± 4,9	100,00 ± 5,4	0,00 ± 0,9
KB	5,90 ± 5,5	4,58 ± 3,4	0,43 ± 4,4	96,79 ± 2,2	100,00 ± 2,3	0,00 ± 2,5

Com cinco dias de teste, foi possível constatar baixa taxa de citotoxicidade das células no grupo 0,062% de PG que apresentam crescimento semelhante ao das células controle positivo. Nos grupos com concentração 1%, 0,50% e 0,25% foi observada morte de praticamente todas as células, sem diferença entre os grupos (Figura 24 e Tabela 8).

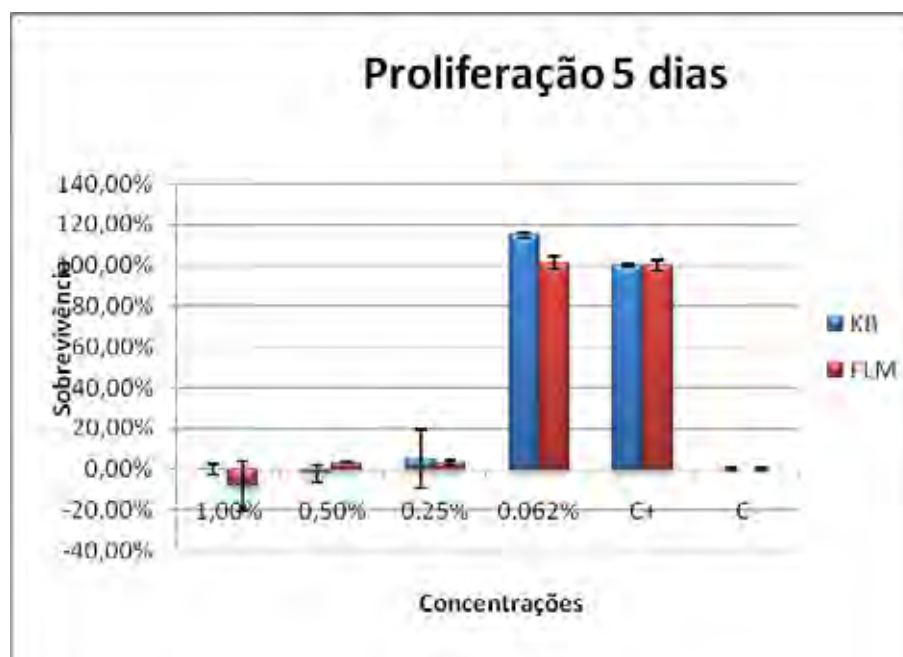


Figura 24 - Representação gráfica do teste de citotoxicidade em 5 dias das células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.

Tabela 8 - Tabela representativa em porcentagem do teste de citotoxicidade em 5 dias das células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.

Células	Citotoxicidade celular em 5 dias					
	1,00%	0,50%	0,25%	0,062%	C +	C -
FLM	-8,24 ± 12,4	3,50 ± 0,4	3,24 ± 1,0	101,34 ± 2,9	100,00 ± 2,7	0,00 ± 0,5
KB	0,17 ± 2,6	-2,02 ± 2,7	4,95 ± 4,3	114,94 ± 14,3	100,00 ± 1,7	0,00 ± 0,6

Com sete dias teste, foi observado comportamento semelhante ao dos 3 e 5 dias (Figura 25 e Tabela 9).

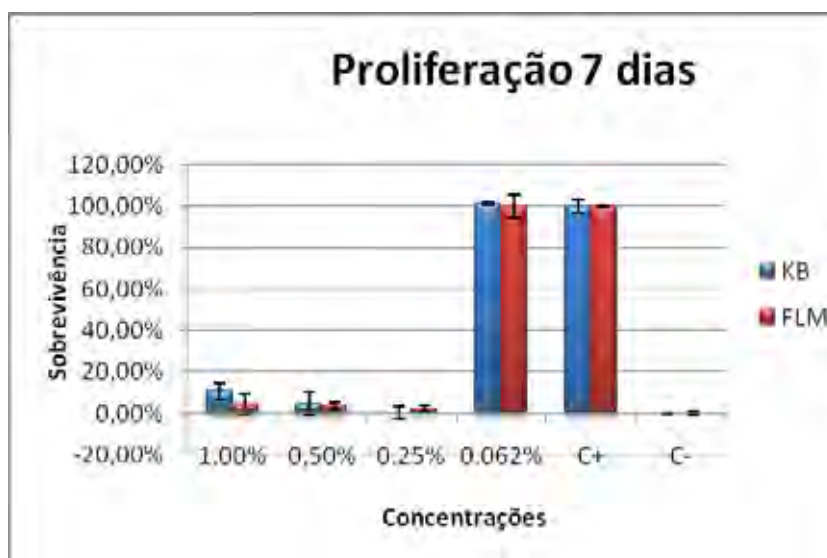


Figura 25 - Representação gráfica do teste de citotoxicidade em 7 dias para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.

Tabela 9 - Tabela representativa do teste de citotoxicidade em 7 dias para as células FLM e KB nas diferentes concentrações de PG.

Células	Citotoxicidade celular em 7 dias					
	1,00%	0,50%	0,25%	0,062%	C +	C -
FLM	4,48 ± 5,0	3,65 ± 1,8	2,37 ± 1,8	99,98 ± 5,4	100,00 ± 0,7	0,00 ± 0,7
KB	10,55 ± 7,0	4,52 ± 3,4	0,13 ± 4,8	100,95 ± 7,0	100,00 ± 3,8	0,00 ± 0,7

5.3 Resultados não previstos

Foram encontrados resultados não previstos tais como o manchamento dos poços.

Nas placas de 24 poços, foram observadas alteração colorimétrica visíveis a olho nú. Estas alterações não foram evidentes nas placas de 4 horas, mas do dia 1 até o dia 7, foi claro o manchamento de

diferentes poços, variando de intensidade com o aumento da concentração de PG e com o tempo de contato com a PG.

Na concentração de 1% PG tanto para as células KB quanto para FLM, foi possível observar nos poços um líquido de cor acastanhada, que formava delicada película sobrenadante que se aderiu ao fundo do poço (Figura 26 e 27). As células presentes neste grupo apresentavam uma coloração castanha escura podendo ser observada na fotomicrografias (Figura 28).

Na concentração de 0,062% as células FLM apresentavam uma distribuição frouxa, possibilitando verificar uma coloração acastanhada impregnada nas células e também presente dos espaços intercelulares. Foi observado o manchamento para as células KB na concentração de PG 1% (Figura 26).

Os extratos utilizados em todos os três experimentos de citotoxicidade foram feitos no mesmo dia, sendo dividido em três porções iguais para todo o experimento. O extrato foi armazenado sob refrigeração sendo retirado no momento da diluição para o início de cada teste. O manchamento foi mais acentuado quando o extrato foi filtrado e utilizado logo após seu preparo no primeiro dos três testes. Foi sensível diminuição do manchamento na terceira triplicata, quando o mesmo foi utilizado após 15 dias.

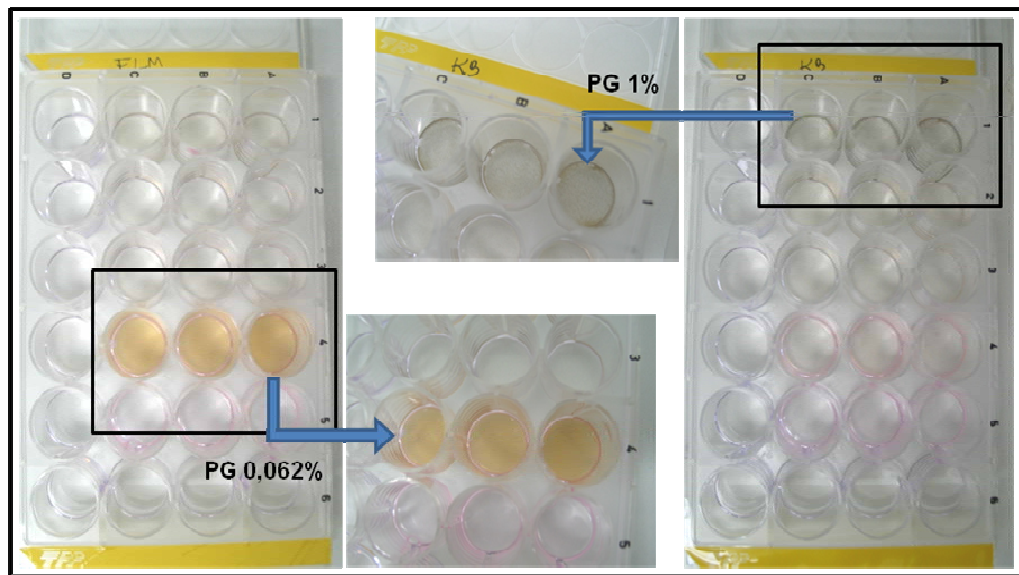


Figura 26 - Alteração colorimétrica nas placas para as células FLM na concentração de PG 0,062% e para as células KB na concentração PG 1%.

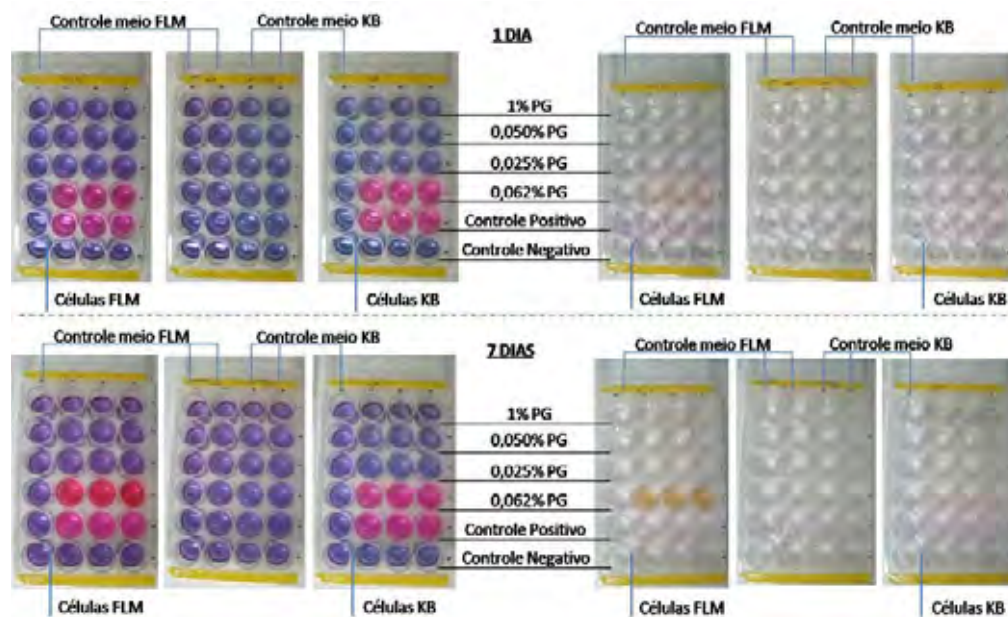


Figura 27 - Alteração colorimétrica nas placas onde as células estavam contidas, imagem mostrando a alteração de cor com o RZ e após a remoção do RZ.

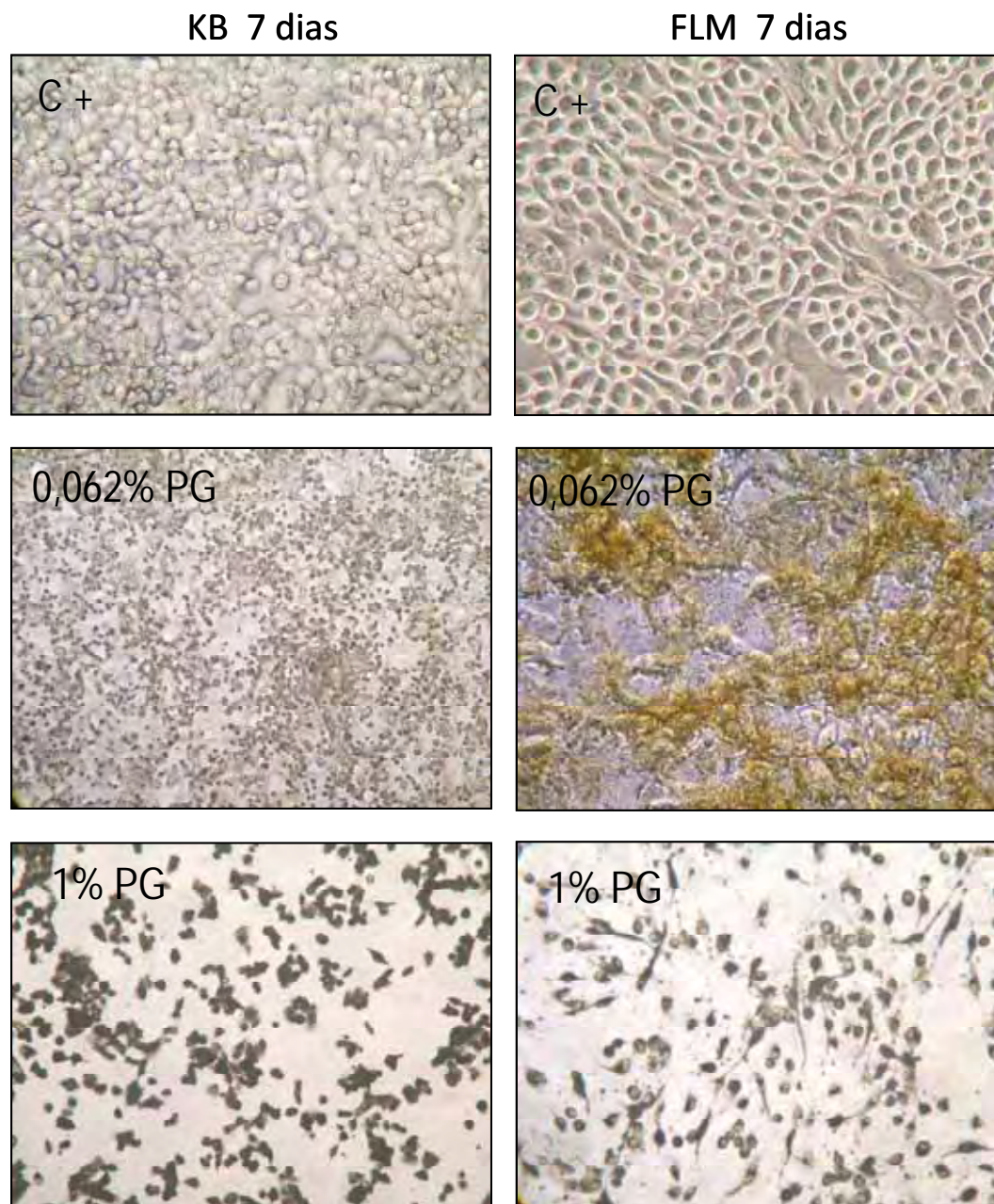


Figura 28 - Alteração colorimétrica das células em meio no sétimo dia (Microscópio de luz invertida 100x).

6 DISCUSSÃO

O principal objetivo da fitoterapia é utilizar os efeitos terapêuticos das plantas medicinais estimulando os processos metabólicos, ajudando na manutenção do equilíbrio no organismo na evolução e tratamento de doenças.

Os seres humanos agregam conhecimentos a respeito de plantas medicinais desde o princípio de sua existência. Inicialmente, este conhecimento era fundamentado com base na fé, na cultura de experimentação, sendo compreendido por poucos que detinham o conhecimento, na maioria das vezes, empírico. Com o avanço da ciência e as diversas tecnologias somadas a novas técnicas de triagem farmacológica a fim de testar e quantificar substâncias presentes em plantas, pesquisadores passaram a realizar experimentos científicos com preocupação na análise dos componentes fitoquímicos e na comprovação de seus efeitos.

Estudos científicos nem sempre possibilitarão chegar aos mesmos achados populares uma vez que diferentes tipos de extrações e concentrações nem sempre fornecem os mesmos componentes obtidos na composição final do fitoterápico. Também deve se levar em conta a influencia de diversas variáveis como: a avaliação do solo onde a planta cresceu, forma e período da coleta, manuseio e extração dos princípios ativos e meios de conservação adotados (Fonseca et al., 2007). O controle das etapas de produção influencia na eficácia, segurança e qualidade do fitoterápico e conseqüentemente em sua ação terapêutica.

Pesquisas relatadas na literatura confirmam as prescrições da medicina popular, na qual as plantas reinam absolutas (Yang et al., 2006; Werkman et al., 2008, García-García et al., 2008). Atualmente a fitoterapia têm chamado muita atenção, como um método terapêutico preventivo, conservador, regenerador e curativo. Dependendo da sintomatologia apresentada e estando diagnosticada a patologia, as diretrizes de tratamento são determinadas e o produto fitoterápico poderá ser instituído como tratamento único ou auxiliar (Newal et al., 2002).

Enquanto toda a legislação para os medicamentos de fármacos sintéticos está bem estabelecida e fundamentada para os fitoterápicos, ainda carecem de maior esforço para equalizar regulamentos e normas (Turolla, 2006).

Os Estados Unidos consideram os medicamentos fitoterápicos como suplementos nutricionais, não sendo necessário submeter dados de segurança e eficácia ao FDA para sua comercialização. Assim, o grande problema com relação aos suplementos nutricionais é que não há controle de qualidade destes produtos, logo não há como provar que as substâncias e as quantidades declaradas nos rótulos estão presentes, bem como não há controle sobre outras substâncias como fármacos sintéticos ou outros contaminantes, que podem estar presentes na formulação, os quais podem resultar em interações indesejáveis (Turolla, 2006).

O Brasil se destaca no contexto internacional por possuir regulamentação com critérios específicos para produtos fitoterápicos, que é periodicamente revisada e atende às recomendações dispostas pela OMS. A implantação de um sistema de farmacovigilância, que focalize principalmente os fitoterápicos considerados tradicionais, e a realização de estudos controlados com desfechos relevantes podem contribuir muito para avaliação da eficácia e segurança e, conseqüentemente, para sua utilização racional (Brasil, 2006).

Para utilizar o medicamento fitoterápico, são necessários ensaios pré-clínicos e clínicos (Turolla, 2006). Estes estudos têm grande importância, pois a partir destes, é possível fazer uso das propriedades terapêuticas de cada planta, eliminando ou minimizando os riscos para os tecidos humanos (Garcia, 2004).

A composição química do extrato final depende de forma direta da identificação e obtenção da planta, Neste projeto os frutos da PG coletados para este experimento e o preparo do extrato foram realizados por equipes de pesquisadores da UFPE e UFPB para garantir a qualidade do fitoterápico: A percolação ou lixiviação em fluxo contínuo à temperatura ambiente se constituiu no método de extração empregado. (Vasconcelos et al., 2006).

Foi evitada a utilização da extração a quente para preservar a estabilidade do material, uma vez que se tratava de uma matéria rica em polifenóis, de fácil modificação de estrutura. No processo de percolação em fluxo contínuo utilizado existe a renovação constante da solução extratora (solução hidroalcoólica a 80% v/v) durante 24 horas o que resultou em uma solução com 60% de taninos (Vasconcelos et al., 2006).

O extrato de qualquer planta é composto de um *pool* de compostos fitoquímicos, entre eles alcalóides, taninos, polifenóis, que irão interagir de formas diferentes com o organismo. Quando liofilizamos a PG, visamos manter a integridade química de seus componentes, evitando a contaminação e alterações pelos diluentes.

Antes de o fitoterápico ser indicado para uso, independente da forma de administração, o estudo de toxicidade deve ser realizado. Os métodos *in vitro* apresentam algumas vantagens em relação aos testes *in vivo* tais como a possibilidade de limitar o número de variáveis experimentais, obtendo dados significativos em menor período de tempo experimental (Rogerio et al., 2003). Quando é levado em consideração o estágio já atingido pelos protocolos que especificam

testes de toxicidade para substâncias químicas, é claro que ainda existem dificuldades para os fitoterápicos, principalmente diante da dificuldade de padronização das preparações (Turolla, 2006). A padronização é fundamental para a utilização adequada destes produtos sem danos a população.

A cultura de células é um excelente método para testar a atividade e citotoxicidade de fitoterápicos sendo um dos passos necessários para a aprovação como medicamento (Garcia, 2004). Diferentes autores utilizaram com sucesso diferentes tipos de linhagens celulares para realizar estudos *in vitro* (Lansky, 2003; Katsube et al., 2003; Ahmed et al., 2005).

As células a serem utilizadas são mantidas congeladas até o dia do experimento e requerem manipulação criteriosa. Durante o congelamento no nitrogênio líquido adiciona-se o DMSO, substância crioprotetora, que atua na proteção da membrana citoplasmática durante o processo. Em temperatura ambiente, é uma substância tóxica à célula, e a agilização da manipulação do criotubo com retirada desta substância evita ou minimiza possíveis danos à membrana plasmática. Neste experimento não houve morte celular causada pelo DMSO, pois foi observado bom índice de crescimento celular.

O número de células utilizado nos testes foi determinado individualmente. Para o experimento de viabilidade das células, foi optada pela utilização das placas de 96 poços com alto número de células (6×10^4). Para o teste de citotoxicidade, o número de células relativamente foi pequeno (4×10^4) ao tamanho dos poços, porém, considerando a permanência de 7 dias no teste piloto mostrou ser o número adequado.

A avaliação diária das garrafas foi realizada avaliando as células de forma isolada ou em grupo, observando o crescimento, características fenotípicas e a distribuição sobre o fundo da garrafa. É importante compreender a dinâmica celular para avaliar possíveis

alterações nas células de cultura primária, pois a estabilidade destas dentro da cultura pode ter alterações fenotípicas (Vilela et al., 2003).

Durante o experimento de viabilidade, foram observadas alterações nas células FLM, provavelmente por estarem na décima segunda passagem. O experimental foi cancelado e as células alteradas foram descartadas. Nova biópsia foi realizada para coleta de fragmento de mucosa e estabelecimento de novo cultivo celular. Então os testes de viabilidade tiveram continuidade quando as células cultivadas estavam na quinta passagem.

Nos testes de viabilidade foram observados diferentes resultados para os dois tipos celulares, sendo que as células KB apresentaram-se muito mais sensíveis ao extrato de romã, pois apresentaram menor taxa de viabilidade. As células KB apresentaram maior taxa de morte que as FLM, o que corrobora com relatos encontrados na literatura, onde autores evidenciam a citotoxicidade de fitoterápicos em células neoplásicas (Ajaiyeoba, 2003; Loizzo, 2004).

Componentes presentes na PG como taninos e flavonóides são apontados como responsáveis pela citotoxicidade para as células neoplásicas, principalmente em altas doses (Katsube et al., 2003). A extração hidroalcoólica do extrato utilizada para a pesquisa resultou em uma taxa de 60% de taninos (Vasconcelos et al., 2006), o que pode explicar a ação sobre as células FLM e KB durante os testes de viabilidade e citotoxicidade. No teste de viabilidade, o grupo KB com PG a 1% foi o único que apresentou morte de todas as células, fato não observado no grupo de células FLM com PG a 1%, demonstrando o efeito antiproliferativo sobre as células cancerígenas. Nos demais grupos com concentrações de PG a 0,5%, 0,25%, 0,125%; 0,062%; 0,031%; houve diminuição gradativa da taxa de citotoxicidade, porém as células KB sempre apresentaram índices de sobrevivência menores que as FLM, o que está de acordo com os resultados descritos por Toi et al. 2003 e Lansky em 2005.

No teste de citotoxicidade, foi clara a constatação do efeito antiproliferativo do extrato de PG ao longo do período para os grupos com concentrações de PG a 1%, 0,5% e 0,25%, levando a morte todas as células destes grupos após 24 horas.

Os flavonóides encontrados em abundância em frutas vermelhas e na PG, apresentam capacidade de induzir apoptose em células cancerígenas. A associação de flavonóides e antocianinas é importante na prevenção do câncer, participando como mediadoras das funções fisiológicas relacionadas à supressão do câncer, atuando de forma inibidora do crescimento celular. Há relatos discutindo a destruição de células cancerígenas *in vivo* por flavonóides, supondo-se serem tóxicas também para células *in vitro* (Katsube et al., 2003).

Ahmed et al em 2005, mostraram em seus experimentos com células de linha condroblástica a ação da PG sobre condrócitos humanos, demonstrando que frações separadas do extrato de PG com altas doses de antocianinas inibiram a expressão de IL-1Beta e Metaloproteínases (MMPs 1, 3 e 13), marcadoras clássicas de inflamação e degradação destas células.

Extratos preparados a partir de diversas partes das PG (casca, raiz, sementes) foram utilizados em estudos *in vitro* com diferentes tipos de linhagens celulares de câncer de próstata. Estudos mostraram a potencialidade para inibir a citotoxicidade e capacidade de invasão induzindo apoptose e inibindo o crescimento destas linhagens celulares. Nestes estudos ficou claro que o extrato feito a partir da combinação de diferentes partes da PG foi mais efetivo (Lansky, 2005). Apesar de trabalharmos com um extrato feito a partir da casca do fruto, o efeito antiproliferativo foi comprovado tanto em células cancerígenas quanto em fibroblastos.

O estudo em vários animais elucidou os mecanismos de ação dos constituintes da PG em células cancerígenas. Estudos utilizando a implantação de células de câncer de próstata de linhagem

PC-3 mostraram a ação do extrato da semente e polpa da PG comprovando a inibição do crescimento celular induzindo apoptose através da modulação de proteínas reguladoras de apoptose (Malik, 2006).

Toi et al. em 2003 estudaram a inibição de angiogênese pelos constituintes do extrato de PG, explicando que ocorria devido a diminuição do fator de crescimento endotelial em células de câncer de mama MCF-7 e linhagem de células endoteliais de cordão umbilical.

São várias as possibilidades que levam aos resultados encontrados como a possibilidade de interação semelhante aos estudos de Saruwatari et al. (2008), no qual os autores comprovaram os efeitos de conjugação dos polifenóis, em especial da molécula de punicalagina sobre as células Caco-2 demonstrando os efeitos inibitórios de sulfoconjugação, sem efeitos significativos sobre a gluconidação nestas células de epitélio intestinal. A reação sobre a sulfoconjugação aconteceu de forma dose-dependente.

Em nosso experimento o efeito inibitório de citotoxicidade foi observado nos grupos com concentrações de PG a 1%, 0,5% e 0,25% durante os testes de citotoxicidade, do primeiro até o sétimo dia, e este efeito diminuiu gradativamente com a diluição da PG. No contexto do nosso experimento não podemos confirmar que a ação dos polifenóis atuantes no estudo *in vitro* se traduzirá necessariamente em uma interação positiva dos princípios ativos da PG *in vivo*.

Durante o experimento foi observado nos poços que a PG apresenta potencial de alteração colorimétrica, o que pode limitar sua indicação clínica em odontologia, como por exemplo em enxaguantes e pastas dentais, dependendo da concentração empregada.

Devem ser realizados novos estudos em nível molecular da ação da PG e de cada um de seus componentes, individuais

e associados, em reações frente a uma maior diversidade celular a fim de explicar e entender mecanismos dos efeitos de romã.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- a) O extrato de PG mostrou efeitos inibitórios, sendo maior nas células KB em relação as FLM durante os testes de viabilidade.
- b) Os testes de citotoxicidade mostraram inibição e morte das células KB e FLM nas concentrações 1%, 0,5% e 0,25%.
- c) O efeito inibitório da PG é dose dependente para ambas as células estudadas.
- d) A concentração 0,062% de PG mostrou ter um efeito bifásico.

8 REFERÊNCIAS *

Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D, Heber D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 2006 Feb;54(3):980-5.

Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF- κ B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer.* 2005 Jan 20;113(3):423-33.

Ahmed S, Wang N, Hafeez BB, Cheruvu, VK, Haqqi TM. *Punica granatum* L. Extract inhibits IL-1 β -induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF- κ B in human chondrocytes *in vitro*. *J Nutr.* 2005;135:2096-102.

Ajaiyeoba EO, Onocha PA, Nwozo SO, Sama W. Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of *Buchholzia coriacea* stem bark. *Fitoterapia.* 2003 Dec;74(7-8):706-9.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: sample references [homepage na Internet]. Bethesda: US National Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

American Society For Testing And Materials (ASTM). Annual Book of ASTM Standards: medical devices 1992. West Conshohocken, USA: ASTM.

Antonialli Junior WF. Mecanismos básicos e moleculares da senescência celular. <http://www.rc.unesp.br/ib/biologicas/meca.html>. acesso em junho, 2008.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução - CNNPA nº 12, de 1978. Disponível em:http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_frutas_lio.htm

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Portaria nº. 354, de 11 de agosto de 2006.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). FAQ - Sistema de Perguntas e Respostas - 12 registros, 30/10/2008. disponível em <http://www.anvisa.gov.br/faqdinamica>.

Aviram ML, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E - deficient mice. *Am J Clin Nutr.* 2000 May;71(5):1062-76.

Belizário JE. Oncologia Telomerase e imortalização celular. *Ciência hoje.* 2002 Jul; 31(184):50-7.

Brasil, Portaria nº 16, de 31 de janeiro de 1995. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 31 de janeiro de 1995.*

Brasil. TERAPIAS ALTERNATIVAS NAS UNIDADES DO SUS. Saúde, BRASIL. Junho 2006 a. p.5. <http://www.saude.gov.br>

Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas medicinais da Central de Medicamentos/ Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica – Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 148 p. (Série B. textos Básicos de Saúde).

Camargo SEA, Camargo CHR, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J.* 2009 42:227-37.

Camps J, Salomon JP, Pertot WJ, Dejou J. The coherence between 3 evaluation methods of biocompatibility. *J Biol Buccale* 1992;20(4):211–7.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J.* 2005 Aug;38(8):505-9.

Cavalcanti BC, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Burbano RR, Silveira ER, Cunha, KMA et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:388–92.

Cerdá B, Cerón JJ, Tomás-Barberá FA, Espín JC. Repeated Oral Administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J Agric Food Chem.* 2003;51(11):3493-501.

Coelho LB Jr. Apostila didática de Engenharia de Alimentos [Apostila na internet]. Goiás: Universidade Católica de Goiás; 2008. [Acesso em: 10 jul2008].
Disponível em:
<http://agata.ucg.br/formularios/sites_docentes/maf/lauro/maf3211/pdf/Rotairo%202.pdf.

Daguano JKMF, Santos C, Rogero SO. Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes. *Matéria*. 2007;12(1):134-9. doi: 10.1590/S1517-70762007000100017

Ferreira ABH. *Novo Dicionário da Língua Portuguesa*. 2. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1986.

Fraser Jf, Cuttle L, Kempf A, Kimble R. Cytotoxicity of topical antimicrobial agents. *ANZ J Surg*. 2004 Mar;74(3):139-42.

Fonseca MCM, Casali VWD, Barbosa LCA. Influence of the season and harvest time in essential oil and tannin yield in couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*) (Jacq.) Cassini. *Rev Bras Plantas Med*. 2007 May; 9(2):75-9.

García-García P, López-Muñoz F, Rubio G, Martín-Agueda B, Alamo C. Phytotherapy and psychiatry: bibliometric study of the scientific literature from the last 20 years . *Phytomedicine*. 2008 Aug;15(8):566-76.

Garcia M, Sertório SP, Alves GJ, Chate SC, Carneiro R, Lallo MA. Uso da ciclofosfamida em modelo de imunodepressão experimental em ovinos. *Pesq Vet Bras*. 2004 24(3): 115-9.

Garcia M, Pepe VLE, Martins Júnior D. *Vigilância em saúde*. Rio de Janeiro: Escola de Governo em Saúde; 2004. 119 p. (Coleção Escola de Governo. Série trabalho de alunos, 2).

Garcia JMQ, Martins MD, Jaeger RG, Marques MM. Immunolocalization of bone extracellular matrix proteins (type I collagen, osteonectin and bone sialoprotein) in human dental pulp and cultured pulp cells. *Int Endod J*. 2003 Jun;36(6):404-10.

Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem*. 1986;159:109–13.

Harris T. Como funciona a secagem por congelamento a vácuo (liofilização). São Paulo: HowStuffWorks do Brasil; 2002. Disponível em: 22 out. 2008. Acesso em: <http://lazer.hsw.uol.com.br/secagem-por-congelamento2.htm>.

Hidaka M, Okumura M, Fujita K, Ogikubo T, Yamasaki K, Iwakiri T et al. Effects of pomegranate juice on human cytochrome p450 3a (cyp3a) and carbamazepine pharmacokinetics in rats. *Drug Metabolism and Disposition*. 2005; 5(33):644–8.

Huang THW, Pegn G, Kota BP, Li GQ, Yamaha J, Roufogalis BD et al. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: activation of PPAR-delta and identification of an active component. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 1;207(2):160-9.

International Organization for Standardization (ISO). 10993-5: biological evaluation of medical devices. Part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: ISSO; 1999.

Louis Jeune MA, Kumi-Diaka J, Brown J. Anticancer Activities of Pomegranate Extracts and Genistein in Human Breast Cancer Cells J Med Food. 2005;8(4):469-75.

Katsube N, Iwashita K, Tsushida T, Yamaki K, Kobori M. Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the Anthocyanins. J Agric Food Chem. 2003;51(1):68-75.

Langley, P. Why a pomegranate? Brit Med J.2000;321(4):1153-4.

Lansky EP, Newman RA. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharmacol. 2007 Jan 19;109(2):177-206. Epub 2006 Sep 10. Review.

Lansky EP, Jiang W, Mo H, et al. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. Invest New Drugs.2005;23:11-20.

Loizzo MR, Statti GA, Tundis R, Conforti F, Ando S, Menichini F. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Cirsium tenoreanum*. Fitoterapia. 2004 Sep;75(6):577-80.

Lorenzi H, Souza HM. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3.ed. São Paulo: Nova Odessa; 2001.

Manica, I. Romã. Porto Alegre: Cinco Continentes; 2007; 90p. (Frutas Nativas e Exóticas 4).

Malik A, Mukhtar H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. *Cell Cycle*. 2006;5:371-373.

Maluf LMP; Pompéia C. Morte celular: apoptose e necrose. *In:___* Como cultivar células. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005; p.200-23.

Martins AKA, Boaventura MFC, Lima MMR. Cutivo de linhagens permanentes. *In:___* Como cultivar células. São Paulo: Guanabara Koogan. 2005.p.39-49

Morton J. Pomegranate. *In:___*. Fruits of warm climates. Miami: University of Miami.1987. p.352-5.

Muggleton-Harris AL, Hayflick L. Cellular aging studied by the reconstruction of replicating cells from nuclei and cytoplasm isolated from normal human diploid cells. *Exp Cell Res*. 1976 Dec;103(2):321-30.

Navarro V, Villareal ML, Rojas G, Lozoya X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J Ethnopharmacol*.1996 sep;53(3):143-7

Neurath R, Strick N, Li Y, Debnath AK. *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. BMC Infect Dis. 2004 Oct; 4:41. doi: 10.1186/1471-2334-4-41.

Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD. Fitoterapia: Plantas medicinais: guia para profissional da saúde. São Paulo: Premier; 2002. 296 p.

Pereira ERT, Paula JR, Valadares MC. Investigação do potencial quimioprotetor da *Punica granatum*. Rev Eletrônica de Farmácia. 2005;2 (Suppl2):168-171.

Prashanth D, Asha MK, Amit, A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. Fitoterapia. 2001;72(2):171-3.

Rogero SO, Lugao AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. Mat. Res. 2003;6(3):317-320. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-14392003000300003&lng=pt&nrm=iso>. doi: 10.1590/S1516-14392003000300003

Ross RG, Selvasubramanian S, Jayasundar S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits- a preliminary study. J Ethnopharmacol. 2001 Nov;78(1):85-7.

Saruwatari A, Okamura S, Nakajima Y, Narukawa Y, Takeda T, Tamura H. Pomegranate juice inhibits sulfoconjugation in Caco-2 human colon carcinoma cells. *J Medic Food*. 2008, 11(4): 623—628.

Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test *in vitro*. *J Endod*. 2002; 28(3):188-92.

Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nut Biochem*. 2005; 16:360-7.

Seeram NP, Lee R, Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clin Chim Acta*. 2004 Oct; 348(1-2):63-8.

Sheets MD, Du Bois ML, Williamson JG. The pomegranate. In:___ Horticultural Sciences Department. Miami: Florida Cooperative Extension Service. Institute of food and Agricultral Sciences. University of Florida; 2004.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFSC; 1999. 821p.

Sonaglio D, Ortega GG, Petrovick PR, Bassani VL. Desenvolvimento tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: __Farmacognosia: da planta ao medicamento. p.223-225

Soriano FG. Obtenção de células endoteliais. In: __ Como cultivar células. São Paulo: Guanabara Koogan. 2005. p 59-61.

Taskova R, Mitova M, Najdenski H, Tzvetkova I, Duddeck H. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Carthamus lanatus*. *Fitoterapia*. 2002 Oct;73(6):540-3.

Tatini Junior V. Etapas críticas na liofilização do pericárdio bovino. (Tese) 2008. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 106p

Toi M, Bando H, Ramachandran C, Melnick SJ, Imai A, Fife RS, et al. Preliminary studies on the anti-angiogenic potential of pomegranate fractions *in vitro* and *in vivo*. *Angiogenesis*. 2003;6:121-128

Turolla MSR; Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2006; v42(2):289-306. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000200015&lng=&nrm=iso>. Acesso em: 27 2008. doi: 10.1590/S1516-93322006000200015.

Vasconcelos LCS, Sampaio FS, Sampaio MCC, Pereira MSV, HiginoJS; Peixoto MHP. minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Braz Dent J.* 2006;17(3):223-7.

Vidal A, Fallarero A, Pena Br, Medina Bg, Rivera F, Gutierrez Y, Vuorela Pm. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *J Ethnopharmacol.* 2003 Dec; 89(2-3):295-300

Vilela MJ, Martins ML, Mendes RL, Santos AA. Determinação de padrões de crescimento de células em cultura. *J Bras Pat e Méd Lab.* 2003 39(1):67-72.

Wang FM, Qiu K, Hu T, Wan CX, Zhou XD, Gutmann JL. Biodegradable porous calcium polyphosphate scaffolds for the threedimensional culture of dental pulp cells. *Int Endod J.* 2006; 39:477-83.

Werkman C, Granato DC, Kerbauy WD, Sampaio FC, Brandão AAH, Rode SM. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). *Rev. Bras PI Méd.* 2008;10(3):p.104-11.

Yang H-L, Chen CS, Chang W-H, Lu F-J, Lai Y-C, Chen C-C, et al. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Antrodia camphorata*. *Cancer Letters.* 2006; 231:215–227.

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética



RECONHECIDA - PORTARIA MINISTERIAL MEC Nº 1.198/92 - DOU DE 14/05/92

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

PARECER COEPE-UNIb No. 298/07

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Ibirapuera – COEPE/UNIb – aprovou o Protocolo de Pesquisa intitulado "**Citotoxicidade da Punica granatum L. (romã) sobre fibroblastos e células de linhagem cancerígena**" de responsabilidade de Prof. Dr. Sigmar de Mello Rode.

De acordo com a Resolução no. 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, o pesquisador responsável fica obrigado a encaminhar relatório circunstanciado a este Comitê imediatamente após a conclusão ou interrupção – temporária ou definitiva – da pesquisa.

São Paulo, 28 de maio de 2007.

Profa. Miriam Rubio Faria
Coordenadora do COEPE/UNIb

ANEXO 2 – DADOS DE LEITURA

DADOS DE LEITURA NO PILOTO

Concent.	resultados piloto KB					
	KB			bco KB		
50,0%	0,381	0,335	0,37	0,234	0,389	0,359
25,0%	0,373	0,338	0,331	0,178	0,225	0,256
10,0%	0,157	0,13	0,081	0,011	0,1	0,076
7,5%	0,06	0,072	0,071	0,027	0,028	0,04
5,0%	0,051	0,055	0,054	0,002	0,04	0,008
2,5%	0,043	0,025	0,032	0,004	0,034	0,016
1,0%	0,005	0,009	0,005	0,025	0,001	0,03
0,8%	0,175	0,18	0,004	0,101	0,052	0,02
0,5%	0,181	0,173	0,005	0,004	0,015	0,03
0,25%	0,169	0,166	0,005	0,01	0,003	0,001
0,125%	0,462	0,473	0,513	0,055	0,042	0,043

Concent.	resultados piloto FLM					
	FLM			bco FLM		
50,0%	0,555	0,583	0,577	0,431	0,447	0,439
25,0%	0,465	0,476	0,468	0,517	0,282	0,007
10,0%	0,145	0,211	0,169	0,126	0,117	0,154
7,5%	0,155	0,171	0,167	0,135	0,143	0,129
5,0%	0,161	0,177	0,169	0,122	0,131	0,07
2,5%	0,129	0,123	0,14	0,142	0,155	0,128
1,0%	0,141	0,152	0,125	0,076	0,082	0,005
0,8%	0,603	0,584	0,575	0,298	0,276	0,002
0,5%	0,765	0,673	0,706	0,28	0,25	0,001
0,25%	0,731	0,502	0,754	0,216	0,226	0,001
0,125%	0,334	0,301	0,195	0,165	0,167	0,156

DADOS DE LEITURA OBTIDOS NA VIABILIDADE

Dados de leitura para as células KB e controle de meio (BCO)

Concent.	KB viabilidade 1			KB viabilidade 2			KB viabilidade 3		
1%							0,005	0,009	0,005
0.50%	0,181	0,173	-0,005	0,682	0,62	0,715	0,181	0,173	-0,005
0.25%	0,591	0,58	0,606	0,792	0,851	0,759	0,38	0,338	0,364
0.125%	0,627	0,621	0,644	0,802	0,849	0,854	0,462	0,473	0,513
0.062%	0,612	0,629	0,657	0,797	0,813	0,846	0,568	0,577	0,579
0.031%	0,649	0,635	0,65	0,78	0,826	0,845	0,614	0,575	0,484

Concent.	BCO KB viabilidade 1			BCO KB viabilidade 2			BCO KB viabilidade 3		
1%							-0,025	0,001	0,03
0.50%	0,004	0,015	0,001	0,074	0,085	0,047	0,004	0,015	0,03
0.25%	0,008	0,015	-0,01	0,029	0,054	0,057	0,038	0,066	0,043
0.125%	0,005	0,025	-0,01	0,054	0,019	0,063	0,055	0,042	0,043
0.062%	0,01	0,027	0,006	0,044	0,026	0,064	0,04	0,055	0,043
0.031%	0,007	0,021	0,013	0,048	0,048	0,059	0,035	0,031	0,047

Dados de leitura para as células FLM e controle de meio (BCO)

Concent.	FLM viabilidade 1			FLM viabilidade 2			FLM viabilidade 3		
1%							0,141	0,152	0,125
0.50%	0,447	0,466	0,498	0,603	0,584	0,575	0,765	0,673	0,706
0.25%	0,429	0,431	0,432	0,251	0,218	0,169	0,376	0,311	0,252
0.125%	0,451	0,514	0,493	0,334	0,301	0,195	0,229	0,222	0,222
0.062%	0,51	0,469	0,467	0,292	0,142	0,271	0,193	0,221	0,234
0.031%	0,539	0,506	0,503	0,304	0,29	0,293	0,207	0,184	0,216

Concent.	BCO FLM viabilidade 1			BCO FLM viabilidade 2			BCO FLM viabilidade 3		
1%							0,076	0,082	0,005
0.50%	0,055	0,025	0,008	0,28	0,25	0,001	0,28	0,25	0,001
0.25%	0,188	0,177	0,174	0,153	0,179	0,149	0,139	0,133	0,14
0.125%	0,196	0,198	0,203	0,165	0,167	0,156	0,135	0,132	0,131
0.062%	0,175	0,182	0,164	0,15	0,16	0,185	0,14	0,134	0,096
0.031%	0,174	0,18	0,182	0,141	0,167	0,178	0,098	0,13	0,141

DADOS DE LEITURA OBTIDOS NA CITOTOXICIDADE

Dados de leitura para as células KB e controle de meio (BCO)

4horas

Concent.	KB citotoxicidade 1			KB citotoxicidade 2			KB citotoxicidade 3		
1%	0,154	0,09	0,125	0,229	0,22	0,212	0,097	0,098	0,091
0.50%	0,172	0,157	0,158	0,158	0,016	0,166	0,108	0,085	0,079
0.25%	0,197	0,208	0,199	0,221	0,217	0,213	0,202	0,199	0,188
0.062%	0,318	0,338	0,343	0,341	0,312	0,297	0,342	0,343	0,318
C+	0,329	0,357	0,363	0,33	0,324	0,314	0,347	0,358	0,358
C-	0,018	0,015	0	0,011	0,009	0,009	0,014	0,014	0,014

Concent.	BCO KB citotoxicidade 1			BCO KB citotoxicidade 2			BCO KB citotoxicidade 3		
1%	0,002	0,018	0,014	0,054	0,022	0,017	0,004	0,004	0,007
0.50%	0,002	0,012	0,012	0,033	0,016	0,01	0,005	0,001	0,004
0.25%	0,001	0,019	0,004	0,024	0,019	0,005	0,006	0,002	0,003
0.062%	0,003	0,017	0,005	0,014	0,012	0,009	0,002	0,005	0,005
C+	0,009	0,007	0,008	0,019	0,012	0,008	0,005	0,001	0,006
C-	0,003	0,002	0,002	0,022	0,017	0,005	0,01	0,005	0,017

1 dia

Concent.	KB citotoxicidade 1			KB citotoxicidade 2			KB citotoxicidade 3		
1%	0,022	0,014	0,015	0,02	0,021	0,023	0,049	0,05	0,062
0.50%	0,006	0,002	0,002	0,014	0,02	0,023	0,059	0,069	0,081
0.25%	0,004	0,01	0,004	0,019	0,032	0,027	0,039	0,053	0,07
0.062%	0,308	0,285	0,308	0,275	0,254	0,256	0,357	0,351	0,354
C+	0,272	0,294	0,272	0,281	0,271	0,277	0,353	0,346	0,341
C-	0,009	0,006	0,017	0,009	0,007	0,007	0,009	0,003	0,017

Concent.	BCO KB citotoxicidade 1			BCO KB citotoxicidade 2			BCO KB citotoxicidade 3		
1%	0,023	0,02	0,007	0,023	0,021	0,017	0,114	0,243	0,142
0.50%	0,012	0,004	0,003	0,005	0,002	0,008	0,025	0,032	0,004
0.25%	0,01	0,015	0,001	0,006	0,005	0,003	0,009	0,021	0,035
0.062%	0,008	0,002	0,016	0,01	0	0,017	0,001	0,043	0,023
C+	0,017	0,006	0,007	0,011	0,022	0,003	0,025	0,008	0,013
C-	0,017	0,009	0,009	0,012	0,011	0,006	0,022	0,018	0,012

3 dias

Concent.	KB citotoxicidade 1			KB citotoxicidade 2			KB citotoxicidade 3		
1%	0,014	0,021	0,035	0,032	0,032	0,033	0,093	0,141	0,083
0.50%	0,005	0,007	0,006	0,033	0,027	0,03	0,059	0,069	0,04
0.25%	0,003	0,009	0,007	0,022	0,031	0,036	0,043	0,028	0,027
0.062%	0,304	0,292	0,284	0,279	0,278	0,269	0,336	0,338	0,308
C+	0,325	0,291	0,308	0,278	0,272	0,278	0,318	0,344	0,336
C-	0,007	0,005	0,01	0,051	0,016	0,018	0,012	0,014	0,005

Concent.	BCO KB citotoxicidade 1			BCO KB citotoxicidade 2			BCO KB citotoxicidade 3		
1%	0,001	0,004	0,002	0,037	0,049	0,041	0,073	0,061	0,065
0.50%	0,008	0,011	0,001	0,025	0,036	0,036	0,036	0,008	0,006
0.25%	0,12	0,003	0,005	0,024	0,015	0,03	0,002	0,012	0,009
0.062%	0,005	0,003	0,007	0,017	0,035	0,033	0,002	0,015	0,014
C+	0,013	0	0,007	0,023	0,009	0,028	0,007	0,007	0,014
C-	0,054	0,002	0	0,017	0,039	0,036	0,005	0,003	0,003

5 dias

Concent.	KB citotoxicidade 1			KB citotoxicidade 2			KB citotoxicidade 3		
1%	0,014	0,018	0,019	0,02	0,014	0,015	0,055	0,024	0,064
0.50%	0,01	0,009	0,004	0,012	0,012	0,012	0,023	0,035	0,055
0.25%	0,015	0,014	0,01	0,014	0,013	0,016	0,038	0,038	0,05
0.062%	0,337	0,333	0,524	0,291	0,278	0,269	0,385	0,373	0,378
C+	0,319	0,319	0,341	0,291	0,279	0,278	0,319	0,309	0,312
C-	0,02	0,019	0,019	0,007	0,006	0,006	0,002	0,001	0,011

Concent.	BCO KB citotoxicidade 1			BCO KB citotoxicidade 2			BCO KB citotoxicidade 3		
1%	0,015	0,013	0,008	0,015	0,022	0,014	0,055	0,024	0,064
0.50%	0,023	0,015	0,013	0,005	0,006	0,005	0,023	0,035	0,055
0.25%	0,015	0,012	0,012	0,011	0,008	0,015	0,038	0,038	0,05
0.062%	0,006	0,016	0,01	0,012	0,002	0,008	0,385	0,373	0,378
C+	0,011	0,024	0,016	0,003	0,003	0,006	0,319	0,309	0,312
C-	0,024	0,023	0,02	0	0,008	0,005	0,002	0,001	0,011

7 dias

Concent.	KB citotoxicidade 1			KB citotoxicidade 2			KB citotoxicidade 3		
1%	0,031	0,037	0,036	0,028	0,024	0,016	0,083	0,108	0,094
0.50%	0,009	0,006	0,015	0,022	0,013	0,019	0,051	0,054	0,048
0.25%	0,002	0,006	0,003	0,012	0,008	0,001	0,017	0,029	0,027
0.062%	0,356	0,374	0,362	0,329	0,337	0,25	0,354	0,346	0,374
C+	0,358	0,4	0,373	0,288	0,326	0,308	0,359	0,338	0,348
C-	0,034	0,035	0,039	0,009	0,001	0,004	0,012	0,009	0,008

Concent.	BCO KB citotoxicidade 1			BCO KB citotoxicidade 2			BCO KB citotoxicidade 3		
1%	0,014	0,013	0,011	0,015	0,022	0,014	0,04	0,026	0,017
0.50%	0,024	0,019	0,011	0,005	0,006	0,005	0,066	0,001	0,003
0.25%	0,03	0,031	0,033	0,011	0,008	0,012	0,002	0,005	0,004
0.062%	0,031	0,029	0,028	0,012	0,007	0,008	0,01	0,006	0,006
C+	0,039	0,048	0,058	0,003	0,003	0,006	0,018	0,004	0,006
C-	0,04	0,045	0,049	0	0,006	0,005	0,014	0,015	0,015

Dados de leitura para as células FLM e controle de meio (BCO)

4 horas

Concent.	FLM citotoxicidade 1			FLM citotoxicidade 2			FLM citotoxicidade 3		
1%	0,148	0,135	0,143	0,123	0,096	0,06	0,262	0,256	0,247
0.50%	0,204	0,225	0,239	0,206	0,192	0,187	0,248	0,242	0,247
0.25%	0,252	0,243	0,245	0,231	0,228	0,231	0,247	0,25	0,251
0.062%	0,386	0,337	0,336	0,312	0,299	0,316	0,339	0,323	0,326
C+	0,385	0,374	0,378	0,322	0,319	0,327	0,362	0,332	0,346
C-	0,056	0,055	0,045	0,023	0,019	0,022	0,045	0,05	0,057

Concent.	BCO FLM citotoxicidade 1			BCO FLM citotoxicidade 2			BCO FLM citotoxicidade 3		
1%	0,085	0,071	0,085	0,054	0,073	0,074	0,073	0,082	0,071
0.50%	0,075	0,074	0,066	0,032	0,07	0,075	0,068	0,073	0,071
0.25%	0,072	0,07	0,08	0,044	0,069	0,067	0,061	0,069	0,07
0.062%	0,049	0,064	0,071	0,046	0,034	0,048	0,062	0,075	0,052
C+	0,079	0,07	0,071	0,041	0,021	0,033	0,057	0,065	0,066
C-	0,079	0,065	0,067	0,033	0,057	0,046	0,078	0,047	0,068

1 dia

Concent.	FLM citotoxicidade 1			FLM citotoxicidade 2			FLM citotoxicidade 3		
1%	0,082	0,075	0,081	0,143	0,174	0,127	0,073	0,072	0,066
0.50%	0,076	0,051	0,067	0,109	0,084	0,081	0,069	0,069	0,075
0.25%	0,09	0,096	0,087	0,118	0,143	0,129	0,105	0,059	0,063
0.062%	0,321	0,305	0,304	0,349	0,347	0,338	0,339	0,334	0,332
C+	0,356	0,321	0,34	0,384	0,394	0,422	0,372	0,362	0,368
C-	0,069	0,069	0,063	0,062	0,058	0,058	0,049	0,046	0,05

Concent.	BCO FLM citotoxicidade 1			BCO FLM citotoxicidade 2			BCO FLM citotoxicidade 3		
1%	0,098	0,084	0,097	0,089	0,114	0,078	0,058	0,077	0,072
0.50%	0,07	0,054	0,079	0,036	0,067	0,073	0,055	0,061	0,064
0.25%	0,071	0,07	0,075	0,057	0,076	0,077	0,065	0,056	0,062
0.062%	0,061	0,087	0,075	0,061	0,081	0,072	0,053	0,052	0,053
C+	0,069	0,073	0,074	0,055	0,051	0,039	0,06	0,059	0,053
C-	0,058	0,073	0,083	0,069	0,051	0,061	0,05	0,048	0,053

3 dias

Concent.	FLM citotoxicidade 1			FLM citotoxicidade 2			FLM citotoxicidade 3		
1%	0,081	0,086	0,07	0,124	0,141	0,14	0,087	0,083	0,079
0.50%	0,07	0,078	0,06	0,083	0,074	0,075	0,083	0,081	0,079
0.25%	0,074	0,065	0,073	0,035	0,085	0,08	0,082	0,078	0,084
0.062%	0,368	0,349	0,34	0,324	0,37	0,282	0,313	0,297	0,304
C+	0,373	0,338	0,375	0,331	0,333	0,402	0,357	0,32	0,327
C-	0,054	0,058	0,055	0,043	0,051	0,038	0,072	0,068	0,074

Concent.	BCO FLM citotoxicidade 1			BCO FLM citotoxicidade 2			BCO FLM citotoxicidade 3		
1%	0,074	0,081	0,073	0,261	0,126	0,063	0,079	0,113	0,102
0.50%	0,054	0,072	0,067	0,055	0,057	0,053	0,078	0,096	0,096
0.25%	0,055	0,063	0,046	0,07	0,061	0,063	0,079	0,102	0,097
0.062%	0,059	0,049	0,049	0,065	0,072	0,065	0,07	0,119	0,099
C+	0,057	0,054	0,053	0,047	0,061	0,055	0,072	0,102	0,093
C-	0,068	0,053	0,056	0,045	0,055	0,055	0,083	0,1	0,111

5 dias

Concent.	FLM citotoxicidade 1			FLM citotoxicidade 2			FLM citotoxicidade 3		
1%	0,058	0,056	0,052	0,098	0,137	0,133	0,078	0,077	0,09
0.50%	0,046	0,045	0,044	0,07	0,071	0,07	0,076	0,072	0,076
0.25%	0,045	0,046	0,054	0,067	0,078	0,079	0,07	0,073	0,072
0.062%	0,406	0,401	0,371	0,346	0,331	0,339	0,386	0,384	0,375
C+	0,385	0,369	0,37	0,349	0,354	0,315	0,361	0,377	0,37
C-	0,04	0,033	0,035	0,058	0,056	0,057	0,065	0,059	0,059

Concent.	BCO FLM citotoxicidade 1			BCO FLM citotoxicidade 2			BCO FLM citotoxicidade 3		
1%	0,052	0,055	0,052	0,308	0,122	0,212	0,066	0,069	0,08
0.50%	0,048	0,055	0,041	0,06	0,057	0,057	0,064	0,064	0,072
0.25%	0,055	0,056	0,045	0,059	0,06	0,06	0,063	0,064	0,072
0.062%	0,052	0,048	0,038	0,056	0,054	0,083	0,06	0,057	0,064
C+	0,048	0,041	0,042	0,061	0,046	0,053	0,062	0,057	0,063
C-	0,043	0,048	0,046	0,061	0,051	0,053	0,055	0,067	0,069

7 dias

Concent.	FLM citotoxicidade 1			FLM citotoxicidade 2			FLM citotoxicidade 3		
1%	0,096	0,104	0,101	0,095	0,141	0,145	0,098	0,093	0,091
0.50%	0,064	0,063	0,056	0,066	0,075	0,071	0,087	0,082	0,085
0.25%	0,066	0,062	0,065	0,057	0,069	0,067	0,089	0,085	0,094
0.062%	0,463	0,452	0,408	0,389	0,378	0,397	0,377	0,378	0,365
C+	0,453	0,488	0,428	0,435	0,42	0,424	0,352	0,352	0,35
C-	0,045	0,035	0,04	0,047	0,047	0,043	0,082	0,076	0,075

Concent.	BCO FLM citotoxicidade 1			BCO FLM citotoxicidade 2			BCO FLM citotoxicidade 3		
1%	0,071	0,065	0,068	0,156	0,007	0,083	0,102	0,088	0,083
0.50%	0,039	0,04	0,041	0,05	0,047	0,054	0,074	0,077	0,078
0.25%	0,05	0,039	0,045	0,058	0,048	0,045	0,087	0,089	0,076
0.062%	0,043	0,042	0,05	0,051	0,055	0,048	0,076	0,091	0,084
C+	0,041	0,038	0,042	0,049	0,052	0,046	0,076	0,078	0,074
C-	0,043	0,036	0,036	0,05	0,05	0,057	0,075	0,075	0,074

Werkman C. Cytotoxicity of *Punica granatum* L. (pomegranate) a fibroblast cell line and a carcinoma cell line [tese]. *School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - São Paulo State University*; 2009.

ABSTRACT

Several studies have been conducted on *Punica granatum* L., but their cytotoxic effects are not well known. The purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity of *Punica granatum* L. extract (PG) in two cell lines: human oral mucosa fibroblasts (FLM) and cells of human oral squamous cell carcinoma (KB). The cells were analyzed to viability on 24 h using different concentrations of PG (1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.062% and 0.031%) and to cell proliferation in five different periods (4 h, 1, 3, 5 and 7 days) using four different concentrations of PG (1%, 0.5%, 0.25%, 0.062%). All tests were performed in triplicate and in three different times. There were a negative control (Tryton 10%) and a positive control (culture medium plus 10% SBF, without PG extract). Cell quantification was performed by the Resazurin method, with evaluation by optical spectrophotometry (spectrophotometer UVM340 - Asys Hitech GmbH) and measure of absorbance at a wavelength of 570 nm to 600 nm. Data were submitted to ANOVA (5%). The results showed inhibition of cell proliferation in 0,031%, 0.062%, 0.125%, 0.25% and 0.05% concentrations of PG extract ($\geq 40\%$) specialty to KB cells in comparison to FLM cells. PG 1% was toxic to KB and FLM cells. The proliferation test showed cell proliferation only when using PG 0,062%, for both cell lines and inhibited proliferation whith all other PG concentrations. These effects might be related to the anticarcinogenic properties of PG.

Palavras chave: *Punica granatum*. Phytotherapy. Toxicity. Cell culture. Fibroblasts. Carcinoma.