

Guia Prático para Determinação de Curva Dose-Resposta e Concentração Letal em Bioensaios com Extratos Vegetais

¹Alessandro Pelegrine Minho

²Emanuelle Baldo Gaspar

³Robert Domingues

Introdução

Em estudos de toxicologia para seres humanos e animais, a dose letal média (DL50) pode ser uma maneira de medir o potencial de envenenamento em curto prazo (toxicidade aguda) de um composto químico. Já a concentração letal média (CL50) refere-se à concentração de um produto químico no ar ou na água que leva à morte de 50% dos indivíduos num tempo pré-estabelecido (QUEIROZ, 2015).

Por outro lado, estes termos também podem ser usados em testes de eficácia de drogas. Algumas drogas, porém, não apresentam letalidade, mas sim efeito inibitório de uma determinada ação biológica. Nestes casos, o termo CL50 deve ser substituído por concentração inibitória média (CI50) ou, como uma denominação mais ampla, pode-se usar o termo concentração eficaz (Ce50), que engloba tanto a CL50 quanto a CI50.

Em quase todos os casos, os testes de CE50 são realizados usando uma forma pura do produto químico. As misturas são raramente estudadas. Em avaliações de prospecção de compostos bioativos a situação se inverte, pois a maioria dos compostos avaliados são extratos complexos com diferentes constituintes que podem agir de forma sinérgica ou antagônica durante a realização de testes de eficácia.

Na criação de animais de produção, o estabelecimento e o desenvolvimento da multirresistência parasitária de endo e ectoparasitos aos produtos químicos disponíveis no mercado mundial acarretou um crescente interesse de pesquisadores na identificação e isolamento de compostos bioativos (MINHO et al., 2008a, 2008b). Várias pesquisas têm sido desenvolvidas na busca de fitofármacos com eficácia antiparasitária.

Vários princípios ativos vegetais, com diferentes modos de ação foram identificados, podendo ser utilizados em conjunto (produtos fitoterápicos) ou isolados (desenvolvimento de produtos semissintéticos ou sintéticos), em programas de controle parasitário, ou ainda, visando o aumento da vida útil de drogas já disponíveis no mercado.

Inicialmente, a triagem para a seleção de compostos com potencial antiparasitário é realizada utilizando testes *in vitro*. Os testes *in vitro* não substituem os testes *in vivo*, mas são mais práticos e baratos, tendo, portanto, a função de selecionar os compostos com maior efeito antiparasitário para serem avaliados em testes com animais. Uma fase primordial dos ensaios *in vitro* é a determinação da CE50.

¹ Pós-Doutor em Energia Nuclear na Agricultura, Pesquisador da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, alessandro.minho@embrapa.br

² Pós-Doutora em Microbiologia Médica, Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, emanuelle.gaspar@embrapa.br

³ Mestre em Genética e Melhoramento, Analista Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, robert.domingues@embrapa.br

Nas avaliações *in vitro* de efeito antiparasitário, a CL50 consiste na concentração de um composto bioativo em contato com o parasito (formas adultas ou imaturas) que acarreta a morte de 50% (metade) de um grupo de indivíduos em contato com o composto. A CI50 consiste na concentração de um composto bioativo em contato com o parasito (formas adultas ou imaturas) capaz de inibir atividade de 50% (metade) de um grupo de indivíduos em contato com o composto. Neste caso, a inibição pode ser da eclosão, alimentação, migração, motilidade ou desenvolvimento de algum estágio do parasito. Dentro da mesma linha de pensamento, podem ser calculadas as contrações eficazes, letais ou inibitórias, sobre 90%, 95% e 99% dos estágios parasitários avaliados (CE90, CE95 e CE99, respectivamente).

A determinação das CE50 de compostos bioativos em testes *in vitro* de eficácia antiparasitária depende do tipo de extrato vegetal utilizado, suas frações (utilização de solventes de diferentes polaridades) e da solubilização desses compostos nos diferentes solventes, o que irá afetar seu efeito sobre os diferentes estágios parasitários a serem avaliados. As concentrações (CE, CL e CI) devem ser descritas em unidades massa/volume (mg.mL^{-1} , $\mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo especificado o tipo de teste e duração da exposição do composto avaliado em contato com o indivíduo alvo.

Para determinação de CE50 de um composto bioativo, é necessário definir a curva dose-resposta do mesmo. Segundo De Lean et al. (1978), a curva dose-resposta é a representação gráfica da expressão matemática da relação entre a dose de um princípio farmacologicamente ativo e o seu efeito desejado. Geralmente, a curva dose-resposta segue um padrão sigmoide, ou em forma de S (Figura 1). Da análise dessa curva é possível inferir indicadores farmacodinâmicos, como CE50 e efeito máximo, e entender a relação entre a resposta de um composto bioativo e a dose utilizada. Para que uma curva dose-resposta siga o padrão sigmoide é necessário que o eixo X (concentração da droga) esteja em escala logarítmica. Desta forma, muitos dos estudos já realizam os testes laboratoriais utilizando concentrações que sejam igualmente espaçadas numa escala logarítmica. Entretanto, também é possível fazer o teste com concentrações espaçadas em uma escala linear. Em qualquer um dos casos, antes de definir a curva, é necessário transformar cada um dos valores de concentração para seu valor em logarítmico ($X = \text{Log}(X)$).

Vários softwares estatísticos podem ser utilizados para o cálculo da CE50. Neste documento, será abordada a utilização do GraphPad Prism 6.0 (GRAPHPAD..., 2015) por se tratar de uma ferramenta prática e eficaz, a qual pode ser utilizada de diferentes formas na adequação da melhor maneira de se determinar a concentração letal/inibitória em um teste *in vitro*, seja ele utilizando compostos químicos puros ou extratos vegetais compostos. Nos extratos biológicos complexos podem existir vários princípios ativos que, por sua vez, podem interagir entre si de forma sinérgica ou antagônica, o que faz com que sua análise seja diferenciada da análise de um composto químico isolado, como, por exemplo, um produto anti-helmíntico comercial, de molécula única.

Depois da determinação da curva dose-resposta e do valor da CE50 (CL50 ou CI50) de um extrato vegetal frente a um determinado parasito, este pode ser comparado com as concentrações obtidas na avaliação de outras fontes vegetais/drogas com efeito antiparasitário similar. Esses compostos, então, devem ter sua toxicidade em *in vitro* e *in vivo* avaliada e seguem para testes de avaliação *in vivo* com animais para confirmação de seu efeito antiparasitário na espécie alvo. O desenvolvimento de medicamentos envolve, ainda, a ação terapêutica de fármacos, a qual resulta de interações destes com sistemas biológicos e é dependente de fatores relacionados com sua estrutura química e, conseqüentemente, de suas propriedades físico-químicas (TAVARES, 2004). Assim, com base neste conceito, foi possível desenvolver nova área do conhecimento, que se preocupa com o estudo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica (HANSCH et al., 1990).

Parâmetros da curva dose-resposta para estudos de compostos vegetais

Segundo Motulsky e Christopoulos (2004), as curvas de dose-resposta podem ser utilizadas para representar graficamente os resultados de muitos tipos de experimentos, em que no eixo X (abscissa) é plotada a concentração da substância teste (fármaco, extrato vegetal, extrato microbiano) e o eixo Y de resposta pode ser utilizado para demonstrar qualquer medida da função biológica.

A resposta da atividade da substância teste pode ser, por exemplo, alteração da frequência cardíaca de um indivíduo, potencial de inibição de um estágio larvar, um efeito antiparasitário etc.

Deste modo, a curva dose-resposta pode assumir dois formatos (Figura 1):

- Curva dose-resposta de estimulação: quanto maior a concentração do composto químico testado, maior é a ocorrência do processo biológico analisado (por exemplo, efeito de um composto larvicida na ocorrência de morte de larvas) (Figura 1A).

- Curva dose-resposta de inibição: quanto maior a concentração do composto químico testado, menor é a ocorrência do processo biológico analisado (por exemplo, efeito de um composto ovicida na ocorrência de eclosão de ovos) (Figura 1B).

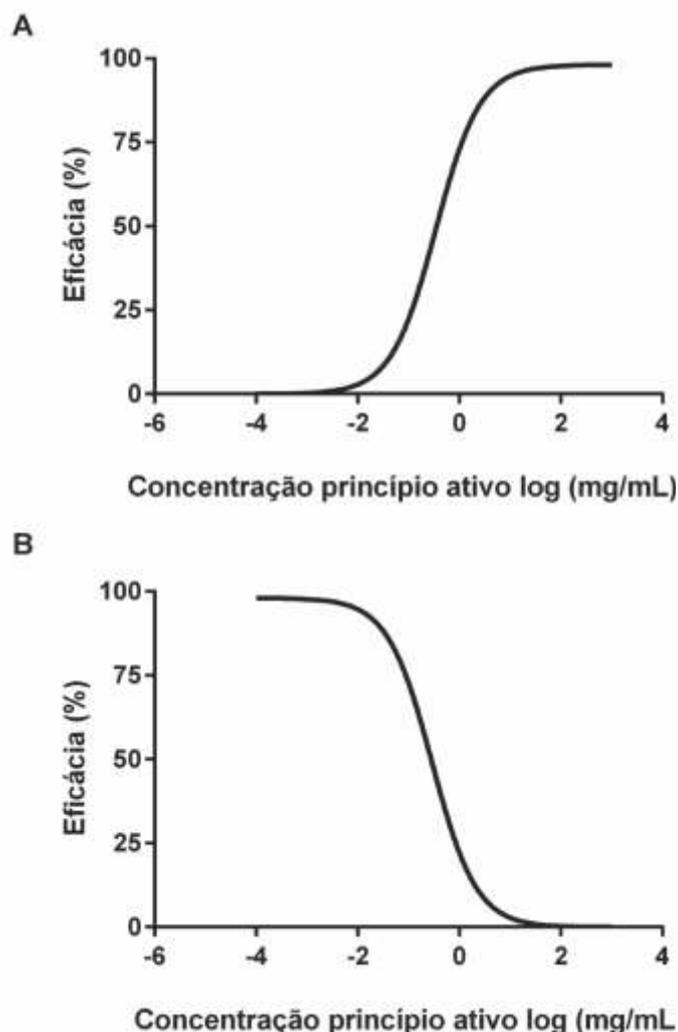


Figura 1. Padrões mais comuns de curva dose-resposta de estimulação (A) e de inibição (B).

Mesmo que o efeito da droga seja inibitório, podem-se analisar os dados em questão da eficácia do composto, deste modo a curva terá a forma de dose-resposta de estimulação (Figura 1A), uma vez que quanto maior a concentração deste, maior sua eficácia. Ainda, os valores plotados no eixo Y podem ser percentuais (normalmente variando de 0 a 100%) ou absolutos (número de indivíduos com certa característica), sendo que, neste último caso, o número de indivíduos utilizados em cada teste deve ser o mesmo.

Geralmente, as curvas de resposta biológica assumem uma forma sigmoide que pode ser bem aproximada por meio da equação logística não linear de quatro parâmetros, também chamada equação de Hill (GADAGKAR; CALL, 2015). Uma curva de dose-resposta padrão é definida por quatro parâmetros: a linha de resposta base (*bottom*), a resposta máxima (*top*), a inclinação (Hill *slope*), e a concentração média (CE50), onde:

Linha de resposta base: É o valor obtido no controle negativo. É indicado realizar os testes com diluições seriadas até que se atinja o platô basal da curva dose-resposta e o efeito seja próximo ao do controle negativo. Caso mesmo no controle negativo seja observado efeito, podem-se corrigir os valores obtidos nas diluições da droga pelo efeito observado neste controle. Duas das correções mais utilizadas são:
 i) Subtração do valor obtido no teste pelo valor obtido no controle negativo;
 ii) Correção de mortalidade descrita por Abbot (1925):

$$\% \text{ Mortalidade (corrigido)} = \frac{\% \text{ Mortalidade Grupo teste} - \% \text{ Mortalidade Grupo Controle negativo}}{(100 - \% \text{ Mortalidade Grupo controle negativo}) * 100}$$

Resposta máxima: É o maior efeito observado dentre as diluições testadas. Novamente é indicado realizar os testes com diluições seriadas até que se atinja o platô superior da curva dose-resposta. Porém, diferente da linha de resposta base, a resposta máxima pode ser diferente do controle positivo.

Inclinação: Muitas das curvas dose-resposta possuem uma inclinação padrão, que segue a forma de uma curva de ligação de receptor (receptor binding curve), cujo valor de inclinação é de 1,0 para estimulação (Figura 1A) ou -1,0 para inibição (Figura 1B). Esta inclinação habitual se dá devido à exclusividade de ligação da molécula/droga a um único sítio de ligação

e é independente da quantidade de passos e vias metabólicas envolvidas entre esta ligação e o efeito final da droga. Porém, como os compostos bioativos são uma mistura de várias moléculas, e algumas delas podem ter atividade sinérgica ou antagônica, não se pode inferir que há apenas um sítio de ligação e, portanto, a curva poderá não ter inclinação padrão. Em análise de experimentos com estes tipos de compostos é indicado que se permita inclinação variável (Figura 2), para que a curva dose-resposta se ajuste melhor aos dados obtidos. Vale ressaltar que, para que esse ajuste seja o mais próximo do real, é necessário fazer o teste em várias concentrações da amostra teste para que se tenham vários pontos na abscissa (x).

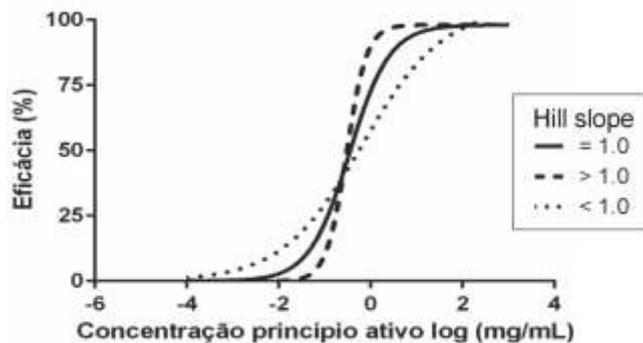


Figura 2. Padrões de curva dose-resposta com diferentes coeficientes de inclinação (*Hill slope*)

Passo-a-passo da determinação da curva dose-resposta e CE software GraphPad Prism 6.0

Tabular, corrigir e transformar os dados: Quando indicado, deve-se transformar os resultados obtidos em porcentagem de ação da droga; * Em planilha tipo Excel, tabular os resultados obtidos de forma que cada linha corresponda a uma diluição testada da droga, seguindo exemplo da tabela mostrada na Figura 3;

	A	B	C	D	E	F
1	Concentração (mg.ml)	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5
2	1000,0000	100	100	100	100	100
3	100,0000	99	98	99	100	99
4	10,0000	87	88	90	93	92
5	1,0000	71	74	77	77	76
6	0,1000	19	23	19	21	18
7	0,0100	5	8	9	4	9
8	0,0010	1	2	2	3	2
9	0,0001	0	0	0	0	0

Figura 3. Esquema de como os dados devem ser tabulados em planilha para facilitar a entrada destes no software GraphPad Prism 6.0 (GRAPHPAD..., 2015).

* Ce_{50} : concentração da droga que provoca uma resposta eficaz em metade dos indivíduos submetidos ao teste. Normalmente é calculada a partir dos dados obtidos, sendo o ponto médio entre a linha de resposta base e a resposta máxima.

A estimativa dos parâmetros da equação de Hill requer o acesso ao *software* comercial ou a capacidade de desenvolver um algoritmo em algum *software* (java, R, Fortran, C++, jupyter e etc). Neste documento será utilizado como exemplo o *software* GraphPad Prism 6.0 (GRAPHPAD..., 2015). Este *software* utiliza o método interativo para estimar dois dos parâmetros da equação de Hill (EC_{50} e o *Hill slope*), ao mesmo tempo em que permite limitar os valores dos outros dois parâmetros (o *bottom* e o *top*), a fim de ajustar os dados de testes *in vitro* (eficácia x concentração) à equação de Hill.

(A primeira coluna deve representar as concentrações e as demais colunas representam as repetições).

* Calcular a média aritmética do controle negativo. Caso a média deste seja diferente de 0 (ou de 100, para testes de inibição), sugere-se que seja feita correção dos dados em relação ao controle negativo.

2. Importar a tabela para o software GraphPad Prism 6.0 (GRAPHPAD..., 2015):

- * Ao abrir o software, selecionar tipo de nova tabela como "XY", na aba lateral esquerda. Na parte central, selecionar no campo "Y", a entrada com repetições, colocando a quantidade de repetições utilizadas para cada concentração da droga no campo correspondente;
- * Clicar no ícone "Create" para gerar a planilha vazia;
- Na coluna X da planilha ainda vazia inserir o valor das concentrações utilizadas no ensaio experimental;

- * Nas colunas A:Y1 a A:YN (onde N é o número de repetições) inserir os valores tabulados no passo 1, com correção do controle negativo, caso necessário;
- * Renomear a tabela de dados de acordo com o nome do ensaio, clicando com o botão direito do mouse sobre o nome "Data 1" que está na aba esquerda da tela. Exemplo: "Ensaio 1".

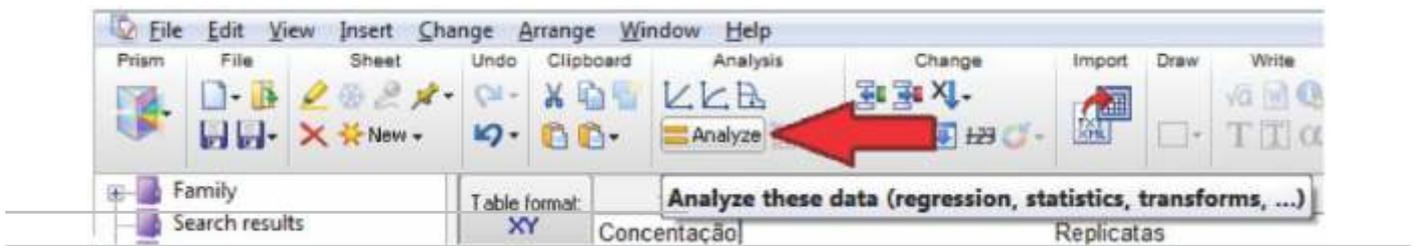


Figura 4. Tela do software GraphPad Prism 6.0 (GRAPHPAD..., 2015), com indicação do ícone "Analyze".

- * Selecionar "Transform", subitem de "Transform, Normalize..." e, em seguida clicar em <OK> (Figura 5);

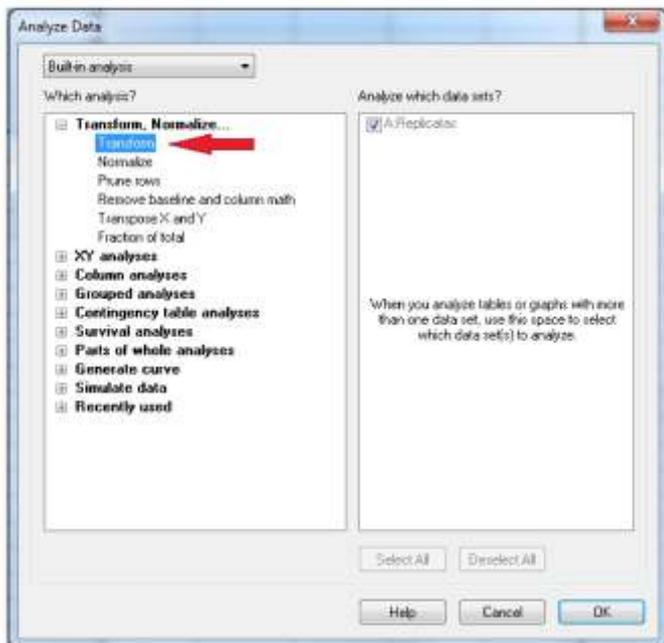


Figura 5. Tela do software GraphPad Prism 6.0 (GRAPHPAD..., 2015), com indicação da análise a ser selecionada para realizar transformação dos dados.

- * Na próxima janela, na parte superior selecionar "Standard functions" e, então, selecionar na parte intermediária "Transform X values using", "X = log (X)". Clicar em <OK> (Figura 6).

Será criada uma nova tabela, na aba esquerda, dentro do

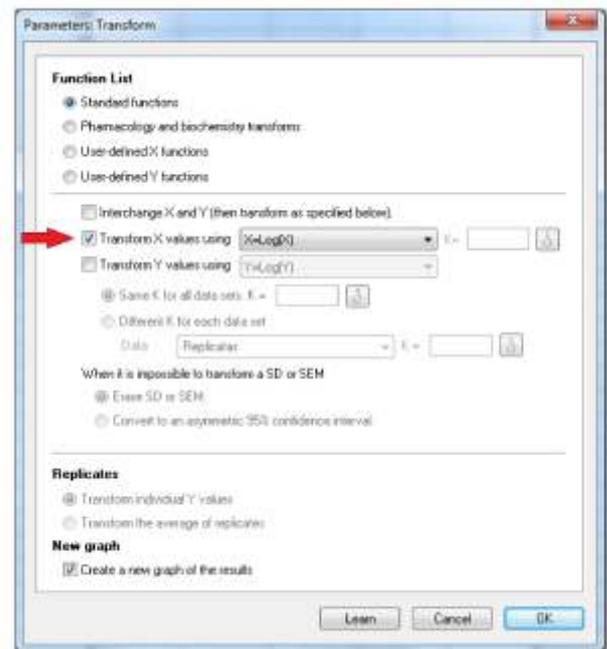


Figura 6. Tela do software GraphPad Prism 6.0 (GRAPHPAD..., 2015), com indicação do campo a ser selecionado para realizar transformação do eixo X.

- * Determinar a curva dose-resposta:
 - * Com a tabela dos dados transformados aberta (linhas verdes), no ícone "Analysis", clicar no ícone de "fit a curve with nonlinear regression" (ícone no formato de gráfico com curva) (Figura 7);

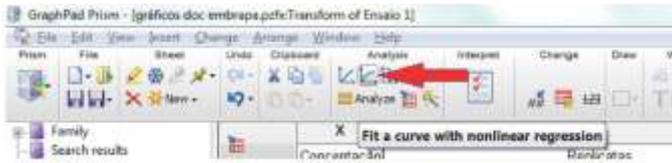


Figura 7. Tela do software GraphPad Prism 6.0 (GRAPHPAD..., 2015), com indicação do ícone "Fit a curve with nonlinear regression".

* Surgirá uma nova janela, na qual, na aba fit deve-se selecionar "Dose-response Special" > "log(agonist) vs. Response – Find E Anything";

* Ainda na mesma janela, clicar na aba "Constrain", e alterar apenas os parâmetros HillSlope, F e Bottom:

* HillSlope:

* Se o experimento foi realizado com compostos bioativos ou mistura de princípios ativos, deixar como "No constraint";

* Se o experimento foi realizado com princípio ativo isolado (como, por exemplo, ivermectina), deve-se selecionar "Constant equal to" em Constraint type e atribuir Value = 1.0 (figura 8);

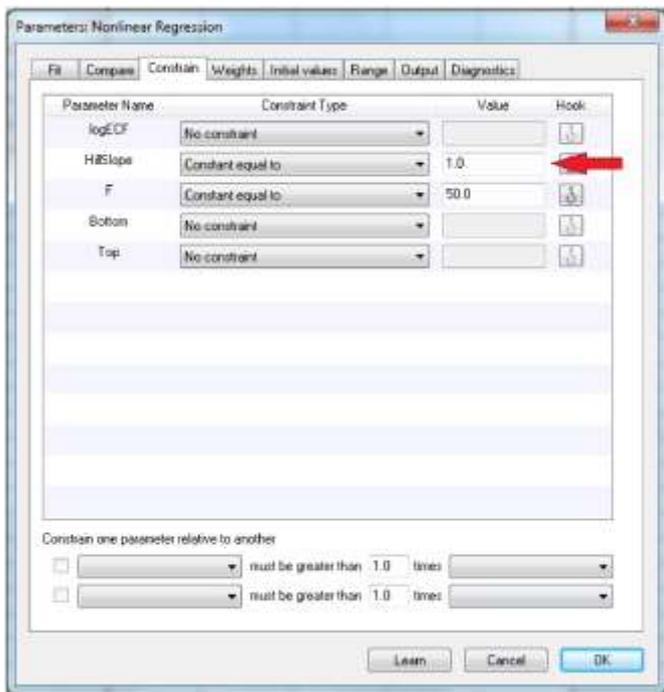


Figura 8. Tela do software GraphPad Prism 6.0 (GRAPHPAD..., 2015), com indicação de configuração de inclinação (Hill slope) constante.

* F: Inserir o valor da EC requerida, exemplo: 50, 95 e 99;
Bottom:

* Se os dados amostrais inseridos no software foram previamente corrigidos pelo controle negativo, selecionar "Constant equal to" em Constraint type e atribuir Value = 0 (figura 9);

* Se não foi realizada correção, selecionar "No constraint" em Constraint type.

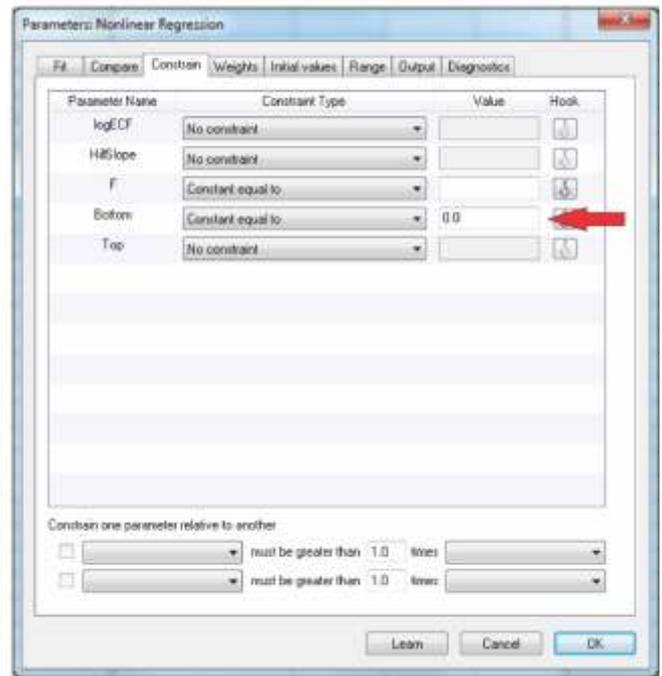


Figura 9. Tela do software GraphPad Prism 6.0 (GRAPHPAD..., 2015), com indicação de configuração de linha de resposta base (bottom) constante igual a 0.

* Clicar em <OK> .

5. Análise dos dados obtidos:

* Na aba esquerda da tela, será gerada nova tabela com os resultados (tabela com linhas vermelhas). Exemplo (*Nonlin fit of Transform of Ensaio 1*); (Figura 10);

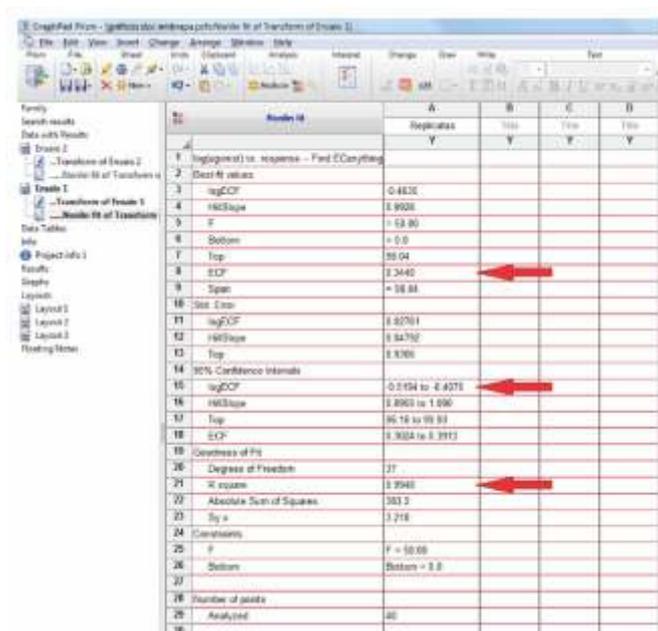


Figura 10. Tela do software GraphPad Prism 6.0 (GRAPHPAD..., 2015) com indicação dos resultados obtidos após análise de

Assim, com base neste conceito, foi possível desenvolver nova área do conhecimento, que se preocupa com o estudo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica (HANSCH et al., 1990).

Considerações finais

A construção de gráficos de dose-resposta e de determinação da CE50 (ou CE90; CE95...) são etapas fundamentais nos testes de triagem *in vitro* para efeitos biológicos de fármacos ou outros compostos, tais como para a determinação do efeito anti-helmíntico de extratos de plantas. Estas informações são importantes para o delineamento dos ensaios *in vivo* subsequentes. Neste documento foi apresentada uma metodologia bastante prática e rápida de construção destes gráficos e determinação das CE usando um *software* com plataforma de fácil utilização (GRAPHPAD..., 2015).

Referências

DE LEAN, A.; MUNSON, P. J.; RODBARD, D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 235, n. 2, p. 97-102, Aug. 1978.

GADAGKAR, S. R.; CALL, G. B. Computational tools for fitting the Hill equation to dose-response curves. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 71, p. 68-76, Jan. 2015.

GRAPHPAD Prism for Windows. Version 6.0. La Jolla: GraphPad Software, 2015. Disponível em: <www.graphpad.com>. Acesso em: 15 set. 2016.

HANSCH, C.; SAMMES, P. G.; TAYLOR, J. B. **Comprehensive medicinal chemistry: the rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds**. Oxford; New York: Pergamon Press, 1990. v. 4, 766 p.

* A partir desta nova tabela, devem-se observar, pelo menos, os seguintes resultados:

* Dentro de *Best-fit values*, ECF: concentração do produto teste, em valores reais (não transformados), na qual é atingido a EC requerida (depende do valor de F);

* Dentro de *95% Confidence Intervals*, ECF: Intervalo de confiança onde se pode encontrar a EC requerida;

* Dentro de *Goodness of Fit, R square*: Coeficiente de determinação, que afere o ajuste dos pontos à curva determinada;

A potência de um princípio ativo ou extrato vegetal é normalmente apresentada como a CE50 ou o logaritmo da CE50. Mas em alguns casos, como na bioprospecção de produtos antiparasitários, o pesquisador pode estar mais interessado na CE95 ou algum outro valor. Pode-se calcular a CE95 ou CE99 utilizando o mesmo *software*. Depois da determinação do valor da CE50/CL50/CI50 de um extrato vegetal frente a um determinado parasito, este pode ser comparado com as concentrações obtidas na avaliação de outras fontes vegetais com efeito antiparasitário similar. Esses compostos então devem ter sua toxicidade *in vitro* e *in vivo* avaliada e seguem para testes de avaliação *in vivo* com animais para confirmação de seu efeito antiparasitário na espécie alvo. O desenvolvimento de medicamentos envolve, ainda, a ação terapêutica de fármacos, a qual resulta de interações destes com sistemas biológicos e é dependente de fatores relacionados com sua estrutura química e, conseqüentemente, de suas propriedades físico-químicas (TAVARES, 2004).

MINHO, A. P.; BUENO, I. C. D. S.; GENNARI, S. M.; JACKSON, F.; ABDALLA, A. L. *In vitro* effect of condensed tannin extract from acacia (*Acacia mearnsii*) on gastrointestinal nematodes of sheep. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, p. 144-148, 2008a. Suplemento 1.

MINHO, A. P.; BUENO, I. C. D. S.; LOUVANDINI, H.; JACKSON, F.; GENNARI, S. M.; ABDALLA, A. L. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, n. 1-3, p. 172-181, Nov. 2008b.

MOTULSKY, H. J.; CHRISTOPOULOS, A. **Fitting models to biological data using linear and non-linear regression: a practical guide to curve fitting**. Oxford: Oxford University Press, 2004. 351 p.

QUEIROZ, S. **Tratado de toxicologia ocupacional**. 2. ed. Rio de Janeiro: Biblioteca 24 Horas, 2015. 554 p.

TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

Comunicado Técnico, 93

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Pecuária Sul
Endereço: BR 153, km 633, Caixa Postal 242,
96401-970 - Bagé, RS
Fone: (53) 3240-4650
Fax: (53) 3240-4651
www.embrapa.br/fale-conosco/sac



1ª edição

Comitê de Publicações

Presidente: *Claudia Cristina Gulias Gomes*
Secretária-Executiva: *Graciela Olivella Oliveira*
Membros: *Estefania Damboriarena, Fernando Flores Cardoso, Jorge Luiz Sant'Anna dos Santos, Lisiane Bassols Brisolara, Marco Antônio Karam Lucas, Naylor Bastiani Perez, Renata Wolf Suñé*

Expediente

Supervisor editorial: *Lisiane Bassols Brisolara*
Revisor de texto: *Fernando Goss*
Normalização bibliográfica: *Graciela Olivella Oliveira*
Editoração eletrônica: *Núcleo de Comunicação Organizacional*