

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO BILOBALIDE EXTRAÍDO DE FOLHAS DE *Ginkgo biloba* L. EM CÉLULAS HEPG2/C3A.

Fabiola Terra Lucio (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Veronica Elisa Pimenta Vicentini (Orientador), e-mail: 94.fabiola@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá/ Centro de Ciências da Saúde e Biológicas/
Maringá, PR.

Palavras-chave: terpenolactona, fitoterapia, hepatocarcinoma humano.

Resumo:

As folhas do *Ginkgo biloba* L. possuem um composto exclusivo, o Bilobalide. Nos últimos tempos, compostos vêm sendo isolados de plantas e testados quanto à indução ou proteção de danos celulares, a fim de descobrir novos agentes terapêuticos e averiguar a segurança destes. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação do Bilobalide em células de hepatoma humano HepG2/C3A pelo método colorimétrico MTT. Para o teste, realizado em triplicata, as células, foram tratadas com diferentes concentrações do Bilobalide (1, 5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 $\mu\text{M}/\text{mL}$), Controle (PBS) e agente citotóxico Doxorubicina, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. As absorbâncias foram submetidas à análise estatística e demonstraram que, somente as concentrações de 75 a 200 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de Bilobalide, apresentaram valores médios de absorbância diferentes significativamente em relação ao controle nos diferentes tempos amostrais. Isso demonstra que as mitocôndrias não converteram de forma significativa o sal MTT em cristais de formazan, como no controle, indicando atividade citotóxica do composto Bilobalide a partir da concentração de 75 μM , nas condições avaliadas. Assim, devem ser desenvolvidos mais estudos com este composto para comprovar a sua ação e garantir o seu consumo de forma segura.

Introdução

O *Ginkgo biloba* L. é uma planta milenar, de origem Chinesa, que possui uma variedade de efeitos biológicos e farmacológicos (MOHANTA *et al.*, 2014). Atualmente essa planta medicinal é amplamente utilizada e entre suas indicações estão incluídas doenças cardiovasculares, neurológicas, vasculares e oftalmológicas (HEINONEN e GAUS, 2015). O *Ginkgo biloba* L possui um composto exclusivo o Bilobalide, uma terpenolactona, com estrutura única, na atualidade, com atividade antioxidante e reguladora de genes relacionados a apoptose (STROMGAARD e NAKANISHI, 2004; SHI *et al.*, 2010).

Apesar da citotoxicidade do extrato do *Ginkgo biloba* L. já ter sido explorada pela comunidade científica (NTP, 2013), as informações sobre os seus componentes individuais ainda são escassas e concomitantemente, há a necessidade de investigar novas substâncias que possam ser usadas como coadjuvante de cura de diversas sintomatologias, bem como para a prevenção de doenças. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade do composto Bilobalide, por meio do teste do MTT, em células de hepatoma humano (HepG2/C3A).

Materiais e métodos

Teste de Citotoxicidade (MTT): foram utilizadas placas de cultura celular contendo 96 poços, onde em cada poço foi semeado 10^4 células de HepG2/C3A, com exceção dos poços controle sem células (branco). Após a estabilização por 24 horas, o meio de cultura foi descartado e foram adicionados os seguintes tratamentos: Controle (DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal); Doxorrubicina [$18\mu\text{M}$], e o composto Bilobalide extraído das folhas de *Ginkgo biloba* L. CAS 25316-40-9 (*Sigma-Aldrich*): 1; 5; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175 e 200 $\mu\text{M}/\text{mL}$.

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas. Após este período, o meio de cultura contendo os tratamentos foi descartado e foram adicionados meio de cultivo contendo MTT na concentração de 0,167mg/mL. A placa foi incubada por 4 horas. Após este período, o meio de cultura contendo MTT foi descartado e aos poços foram adicionados 100 μL de DMSO, para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em leitor de microplacas a 550nm. Os experimentos foram realizados em três repetições biológicas e os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido do Teste de Dunnett ($\alpha=0,05$).

Resultados e Discussão

Os resultados de absorbância, obtidos no teste do MTT com células HepG2/C3A tratadas com o composto Bilobalide (Figura 1), pela análise por espectrofotometria, demonstraram que as concentrações de 1; 5; 25 e 50 μM . do composto após 24, 48 e 72h, tiveram uma absorbância equivalente ao do controle, portanto, nenhuma destas quatro concentrações do tratamento foi citotóxica para estas células. Diferentemente das concentrações de 75, 100, 125, 150, 175 e 200 μM onde houve diferença estatística em relação aos resultados do controle, sugerindo uma redução na atividade da enzima succinato desidrogenase, demonstrando atividade citotóxica desse composto sobre células HepG2/C3A, nas condições apresentadas neste experimento. Como esperado, o tratamento com Doxorrubicina foi citotóxico em todos os tempos de exposição, o que confirma a responsividade do teste para substâncias que interferem na atividade enzimática mitocondrial.

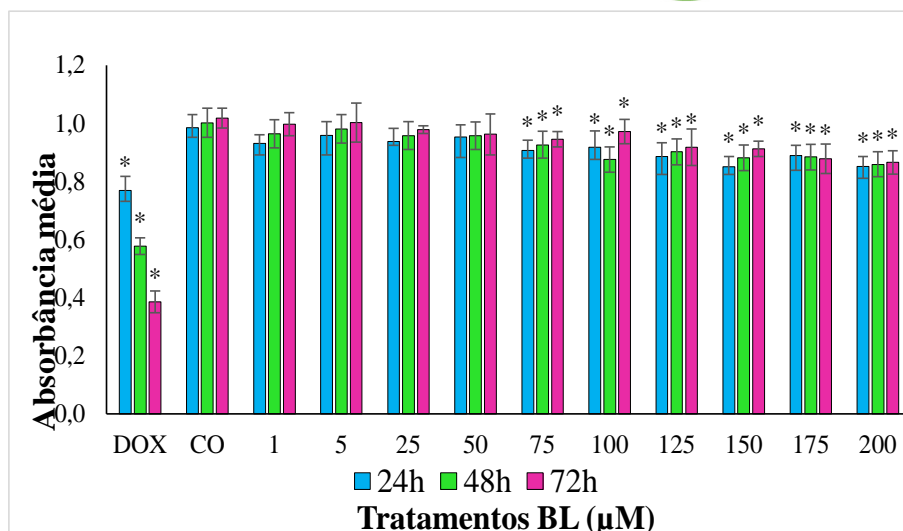


Figura 1: Efeito de 10 concentrações (μM) do composto Bilobalide extraído de folhas de *Ginkgo Biloba* L. no ensaio do MTT, sobre a atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, em células HepG2/C3A, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. DOX= Doxorubicina; CO= controle e BL= Bilobalide.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ($p < 0,05$).

Conclusões

Os resultados obtidos no teste de atividade mitocondrial pelo ensaio do MTT em células HepG2/C3A demonstraram que o Bilobalide no tempo de 24, 48 e 72 h, as concentrações de 1 a 50 $\mu\text{M/mL}$ foram biocompatíveis com o controle, portanto não foram citotóxicas, diferentemente das concentrações de 75 a 200 μM , que apresentaram redução da atividade mitocondrial, apresentando efeitos citotóxicos. Assim, devem ser desenvolvidos mais estudos com este composto, tais como genotoxicidade e mutagenicidade, para as células de hepatoma humano, a fim de comprovar a sua ação e garantir o seu consumo de forma segura.

Agradecimentos

Ao CNPq, órgão financiador deste projeto; à Prof^a. Dr^a. Veronica Elisa Pimenta Vicentini e aos meus colegas do Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental.

Referências

HEINONEN, T.; GAUS, W. Cross matching observations on toxicological and clinical data for the assessment of tolerability and safety of *Ginkgo biloba* leaf extract. **Toxicology**. v.327, p. 95-115, Jan. 2015.

MOHANTA, T. K.; TAMBOLI, Y.; ZUBAIDHA, P. K. Phytochemical and medicinal importance of *Ginkgo biloba* L. **Natural Product Research**. v. 28, n. 10, p. 746-52, 2014.

NTP- National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of *Ginkgo biloba* extract. **National Toxicology Program Technical Report Series**. n. 578, p. 1-183, 2013.

SHI, C.; WU, F.; YEW, D.T.; XU, J.; ZHU, Y. Bilobalide prevents apoptosis through activation of the PI3K/Akt pathway in SH-SY5Y cells. **Apoptosis**. v.15, n.6, p.715-27, 2010.

STROMGAARD, K.; NAKANISHI, K. Chemistry and biology of terpene trilactones from *Ginkgo biloba*. **Angewandte Chemie International Edition**. v.43, n.13, p.1940-58, 2004.