

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO FENÓLICO ÁCIDO GENTÍSICO NAS LINHAGENS TUMORAIS DE FÍGADO (HEPG2/C3) E DE RIM (786-O) *IN VITRO*

Vinicius Rodrigues Camilo da Silva (PIBIC/FA), Matheus Gimenez Buzo, Veronica Elisa Pimenta Vicentini (Orientadora), e-mail: arbvepv@wnet.com.br

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

Área e subárea do conhecimento: Genética/Mutagenese

Palavras-chave: Citotoxicidade, ácido fenólico, cultura celular.

Resumo: Os compostos fenólicos, presentes em frutas e legumes, são muito estudados por apresentarem atividades farmacológicas e nutricionais, além de contribuírem para a cor, adstringência e aroma dos alimentos que o possuem em sua composição. O ácido gentísico é um ácido fenólico derivado do ácido salicílico e está presente principalmente em frutas e outros vegetais. É conhecido pelo efeito antioxidante, anti-inflamatório e antirreumático. Diante disto, este trabalho investigou, usando o teste do MTT, a citotoxicidade do ácido gentísico em cultura de células de tumor de fígado humano (HepG2/C3A) e de tumor de rim humano (786-O). Para esse teste, em ambas as linhagens, foram utilizadas cinco concentrações de ácido gentísico: 10, 20, 30, 40 e 50 μM ; um controle com meio de cultura (DMEM) e Soro Bovino Fetal 10%, e um conhecido agente citotóxico, o MMS (Metil Metano Sulfonato) a 100 μM . As linhagens ficaram expostas aos tratamentos por 24, 48 e 72 horas. A leitura das absorbâncias mostrou que o ácido gentísico não foi citotóxico para as células renais em nenhuma das concentrações e tempos testados, mas diminuiu consideravelmente a proliferação das células hepáticas nas concentrações de 30, 40 e 50 μM , a partir do tempo de 24 horas. Mais investigações sobre a ação do ácido gentísico devem ser realizadas, para reforçar os dados obtidos.

Introdução

Os componentes da alimentação humana vêm sendo amplamente estudados, já que a mesma é considerada a principal porta de entrada de substâncias no organismo. Essas substâncias podem ser benéficas, como no caso dos antioxidantes e antitumorais, ou maléficas, como os agentes carcinogênicos e mutagênicos (SERVAN-SCHREIBER, 2008).

Nesse contexto, os ácidos fenólicos são importantes por estarem em grande quantidade na composição de frutas e legumes, juntamente com carotenoides e vitaminas C e E, fatores que tornam esses compostos um excelente antioxidante (RATNAM *et al.*, 2006). No grupo dos ácidos fenólicos encontra-se o ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), um biossintético derivado do ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico), que apresenta efeito antioxidante, anti-inflamatório e antirreumático. Ele é encontrado em frutas cítricas, uva,

alcachofra de Jerusalém, gergelim, gencianas, sândalo vermelho e oliveira e, portanto, está presente no azeite de oliva virgem (GODOY-CABALLERO *et al.*, 2012).

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial citotóxico do ácido gentísico, por meio do teste do MTT, em células tumorais de fígado humano (HEPG2/C3A) e de rim (786-O).

Materiais e métodos

Linhagem celular – HepG2/C3A e 786-O

As células das linhagens HepG2/C3A e 786-O foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm², contendo meio DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco), e mantidas em estufa com CO₂ a 5% e 37°C.

Ensaio de Citotoxicidade (MTT)

A avaliação da citotoxicidade do composto ácido gentísico foi determinada pelo ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), segundo ensaio descrito por Mosmann (1983). Uma suspensão de 100µL, contendo 10⁴ células foi cultivada em placas de 96 poços, por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após a estabilização, foram tratadas com cinco concentrações do composto ácido gentísico: 10, 20, 30, 40 e 50 µM, um controle composto por meio de cultura (DMEM) e soro bovino fetal, e um grupo tratado com o agente citotóxico MMS (Metil Metano Sulfonato - 100µM). As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas. Posteriormente, os tratamentos foram descartados e em seguida uma solução de meio de cultura com MTT (0,15mg/mL) foi adicionada, incubando as placas por mais 4 horas. Após este período, o meio foi retirado e em cada poço foi feita a solubilização dos cristais de formazan com 100µL de DMSO. A absorbância foi obtida por meio da leitura das placas em espectrofotômetro a 550nm, e os dados foram expressos em absorbância.

A análise das absorbâncias médias e a análise estatística foram realizadas por análise de variância (*one-way* ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett ($\alpha=0,05$, $p<0,05$, $n=3$). As análises foram realizadas com auxílio do programa GrafPad Instat versão 3.02.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos com a leitura de absorbância por espectrofotômetro tanto para a linhagem HepG2/C3A quanto para a linhagem 786-O estão representadas na Figura 1, respectivamente. Os testes demonstraram que para a linhagem HepG2/C3A, o ácido gentísico foi citotóxico nas concentrações de 30, 40 e 50 µM em todos os tempos de exposição. Além disso, as concentrações de 10 e 20 µM apresentaram potencial citotóxico quando comparadas ao controle, no tempo de 72 horas. Para a linhagem 786-O o composto em análise não foi considerado citotóxico nas concentrações testadas em nenhum tempo de tratamento.

Corroborando com os resultados encontrados, o trabalho de Lin *et al.* (2015) demonstrou por meio da análise de citotoxicidade do extrato etanólico de *Litchi chinensis*, que contém ácido gentísico em alta concentração (30,26mg/g), que este possui atividade citotóxica nas linhagens tumorais de mama (MCF-7), fígado (HepG2/C3A), pulmão (A549) e nasofaringe (KB), sendo que para as

células de hepatocarcinoma esse efeito mostrou-se mais efetivo. Em relação as células de nefrocarcinoma (786-O) possivelmente o ácido gentísico não se mostrou citotóxico devido à uma maior resistência dessas células devido a sua função excretora no organismo.

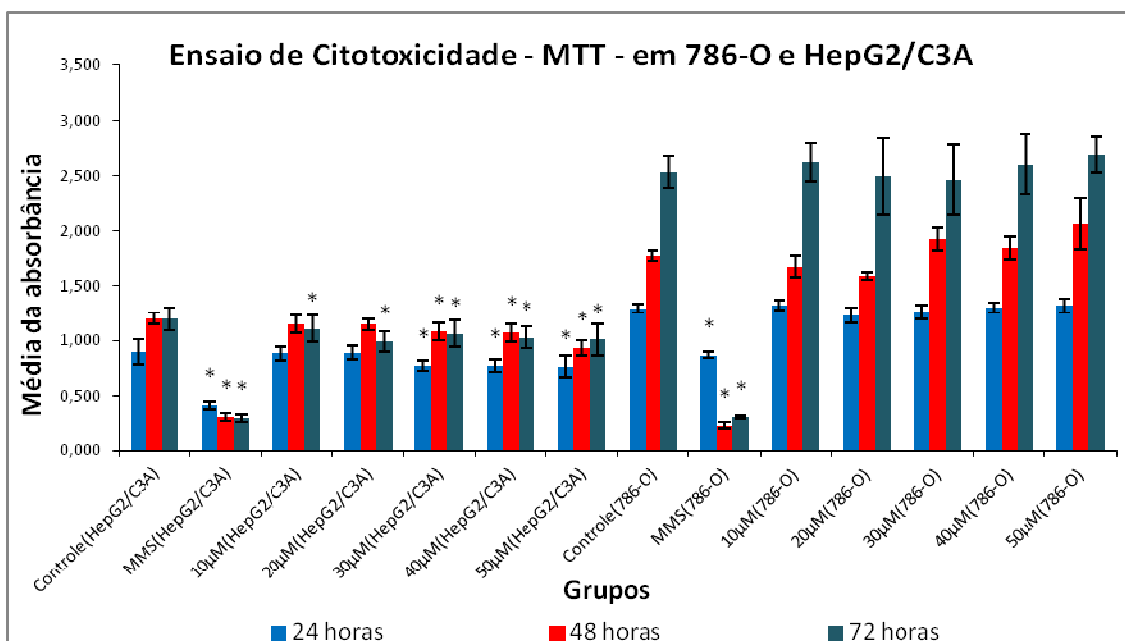


Gráfico 1 – Absorbância Média obtida com o Ensaio de Citotoxicidade do MTT, em células tumorais humanas de hepatocarcinoma (HepG2/C3A) e de nefrocarcinoma (786-O), controle, expostas a cinco concentrações de Ácido Gentísico (AG) e um tratamento com Metil Metano Sulfonato (MMS) por 24, 48 e 72 horas.

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

Conclusões

Analisando os dados obtidos com os ensaios de citotoxicidade e os dados encontrados na literatura, conclui-se que mais estudos devam ser realizados para definir os mecanismos de ação do ácido gentísico nos diferentes tipos celulares e assim, obter informações concisas sobre a ingestão de alimentos que contém esse composto pelos seres humanos.

Agradecimentos

Ao pessoal do Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental que me auxiliaram na realização do trabalho, em especial à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Veronica Elisa Pimenta Vicentini e à Fundação Araucária.

Referências

GODOY-CABALLERO, M. P.; ACEDO-VALENZUELA, M. I.; GALEANO-DÍAZ, T. Simple quantification of phenolic compounds present in the minor fraction of virgin olive oil by LC–DAD–FLD. *Talanta*, v. 101, p. 479-487, 2012.

LIN, Jau-Tien et al. Induction of apoptotic death of human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells by ethanolic extract from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) flower. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 100-109, 2015.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

RATNAM, D. Venkat et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of controlled release**, v. 113, n. 3, p. 189-207, 2006.

SERVAN-SHREIBER, D. **Anticâncer**: prevenir e vencer usando nossas defesas naturais. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Objetiva, 2011.