

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA QUERCETINA

RODRIGUES, Mateus Gonçalves¹; SILVA, Débora Scopel²; CLEFF, Marlete
 Brum³; FREITAG, Rogério Antônio e⁴; HÜBNER, Sílvia de Oliveira³

¹ Acadêmico da Faculdade de Veterinária da UFPEL

² Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da UFPEL

³ Médica Veterinária, Professora Doutora da Faculdade de Veterinária da UFPEL

⁴ Químico, Professor Doutor da Faculdade de Química da UFPEL

1. INTRODUÇÃO

Para avaliar a toxicidade de novos compostos em estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos são utilizados os testes de citotoxicidade (PUTNAM et al., 2002), visando o equilíbrio entre os efeitos farmacológicos e toxicológicos de um componente, que, para a sua aplicabilidade como agente terapêutico, é um requisito indispensável (MELO et al., 2002).

A viabilidade celular pode ser analisada por vários métodos, utilizando-se cultivo de células em microplacas, o que permite uma análise rápida e simultânea de um grande número de concentrações. Esses testes de citotoxicidade podem ser analisados utilizando diferentes parâmetros para identificar proliferação e morte celular, dentre eles, colorimetria e absorvância, devido à incorporação de certas substâncias (WEYERMANN et al., 2005).

O MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) é um teste colorimétrico que tem como base o sal tetrazólio. Esse ensaio baseia-se na redução metabólica do sal em um produto final, o formazan, processo que ocorre somente em células viáveis e é utilizado extensivamente em procedimentos histoquímico, análises de citotoxicidade e proliferação celular, análise enzimática e rastreamento bacteriológico (BERRIDGE et al, 1996).

A quercetina é um flavonóide amplamente distribuído no reino vegetal, presente em frutas, vegetais, flores, grãos, chás e vinhos (NIJVELDT et al, 2001). Com um consumo diário variando entre 50 e 500mg, é considerada o principal flavonóide presente na dieta humana (DESCHNER et al, 1991).

Alguns estudos atribuíram à quercetina ação anti-inflamatória (MORIKAWA et al., 2003), espasmolítica (SILVA, 1993), antimicrobiana para alguns tipos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (LIMA et al., 1990), antiviral (OHNISHI; BANNAL, 1993) e antioxidante (AQUINO et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do flavonóide quercetina em células renais de origem felina, pelo método colorimétrico MTT.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas células CRFK (*Crandell Rees feline kidney*) preparadas em duas placas de 96 poços com E-MEM (Meio Essencial Mínimo – Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco). As placas foram mantidas a 37°C em uma estufa com 5% de CO₂. Após a confluência celular foram adicionados ao cultivo de células 10mg/ml de quercetina (Sigma Aldrich) e realizadas diluições seriadas em E-MEM. Após esse processo, as placas retornaram à estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 72 horas adicionais. Células mantidas como controle não receberam adição de quercetina. As células foram avaliadas diariamente, verificando sua análise morfológica em microscópio invertido, observando as possíveis alterações do tapete celular.

Após 72 horas de incubação, o meio contendo quercetina foi retirado, e adicionado meio contendo MTT (1mg/ml) em cada poço. Após a incubação de quatro horas a 37°C e 5 % de CO₂, a solução foi removida e as células lavadas com E-MEM. Em seguida, foi adicionado 100µL de etanol. A placa foi mantida em temperatura ambiente por dez minutos para a posterior leitura das densidades ópticas em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm.

Para obtenção da porcentagem de viabilidade celular foi calculada mediante a fórmula $AT/AC \times 100$, sendo AT a absorbância dos tratados e AC a absorbância dos controles. Foram consideradas concentrações não tóxicas as que permitiram uma viabilidade celular igual ou maior que 90% quando comparada com o controle de células.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos apontam a quercetina como um componente de grande disponibilidade nos alimentos e com propriedades benéficas ao organismo. Por outro lado, é de suma importância saber quais são os níveis de toxicidade deste flavonóide, para auxiliar na produção de fármacos.

Após a leitura das placas, os valores obtidos foram submetidos ao cálculo para obtenção da porcentagem de viabilidade celular.

O ensaio com MTT foi eficaz em apontar concentrações tóxicas de quercetina sobre as células CRFK, sendo a concentração 11µg/ml a única que permitiu uma viabilidade celular > 90%; Nas condições utilizadas a partir de 22 µg/ml foi observado algum grau indesejado de toxicidade, representado por morte e desprendimento do tapete celular.

Em um estudo avaliando a quercetina como um possível agente antiviral contra o parvovírus canino em células CRFK, CARVALHO e colaboradores (2013) encontraram como concentração máxima não tóxica de quercetina o valor de 5µg/ml. Essas diferenças podem estar ligadas a qualidade da célula e ou em algumas alterações na execução do procedimento.

4. CONCLUSÕES

O conhecimento da concentração tóxica do flavonóide às células é de extrema relevância, pois garantirá maior segurança nos estudos envolvendo a sua aplicação terapêutica. A maior concentração de quercetina incapaz de apresentar toxicidade à linhagem CRFK foi de 11µg/ml.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO, R.; MORELLI, S.; TOMAINO, A.; PELLEGRINO, M.; SAIJA, H.; GRUMETTO, L.; PUGLIA, C.; VENTURA, D.; BONINA, F. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, n. 2, p. 183-191, 2002.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., MCCOY, K. D., WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, 1996, 4, p. 14-9.

CARVALHO, O.V.; OLIVEIRA, F.S.; SARAIVA, G.L; BOTELHO, C.V.; FERREIRA, H.C.C.; SANTOS, M.R.; SILVA JUNIOR, A.; ALMEIDA, M.R. Potencial antiviral da quercetina sobre o parvovírus canino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.2, p.353-358, 2013

DESCHNER, E.E. et al. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, London, v. 7, p. 1193-1196, 1991.

LIMA, C. S. A.; BIEBER, L.W.; MELLO, J.F. Constituintes antimicrobianos de *Achyrocline satureioides*, DC., in: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 11,1990, João Pessoa. Resumos, João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 1990, p.205.

MELO, P.S.; MARIA, S.S.; VIDAL, B.C. et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In vitro Cell. Dev. - An.*, v.36, p.639-543, 2002.

MORIKAWA; K.; NONAKA, M.; NARAHARA, M.; TORI, I.; KAWAGUCHI, K.; YOSHIKAWA, T.; MORIKAWA, Y.; KUMAZAWA, S. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sciences*, n. 74, p. 709-721, 2003.

NIJVELDT, R.J et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 74, p. 418-425, 2001.

OHNISHI, F.; BANNAI, H. Quercetin potentiates TNF-induced antiviral activity. *Antiviral Research*, v.22, n.4, p. 327-331, 1993.

PUTNAM, K.P.; BOMBICK, D.W.; DOOLITTLE, D.J. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol. In Vitro*, v.16, p.599-607, 2002.

SILVA, L. F. Estudo da potência antiespasmódica de extratos hidroalcoólicos 80% de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. E *Achyrocline vautheriana* DC. Asteraceae (marcela). 1993. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam, v. 288, p. 369–376, 2005.