

COMUNICADO
TÉCNICO

427

Colombo, PR
Dezembro, 2018

Embrapa

Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA

Washington Luiz Esteves Magalhães
Emanoela Lundgren Thá
Daniela Morais Leme

Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA

Washington Luiz Esteves Magalhães, Engenheiro químico, doutor em Ciências e Engenharia de Materiais, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Emanoela Lundgren Thá**, graduanda do curso de Biomedicina, Universidade Federal do Paraná; **Daniela Morais Leme**, Bióloga, doutora, professora Adjunta do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

A lignina é um dos materiais poliméricos mais abundantes e importantes dentre os recursos naturais. Na planta, ajuda na captação de água e outros nutrientes dentro da estrutura vascular, enquanto mantém a microestrutura geral da planta, se comportando como um aglutinante e enchimento para organizar os polissacarídeos em pequenos feixes ou microfibrilas. É um material aromático renovável e o segundo polímero orgânico mais abundante depois da celulose (Steinbüchel; Hofrichter, 2001).

A lignina pode ser obtida a partir da madeira, de plantas anuais ou resíduos agrícolas, por diferentes processos de extração (Lourençon et al., 2015). Atualmente, são extraídas cerca de 70 milhões de toneladas de lignina no mundo e apenas 5% são utilizados para fins comerciais, sendo o restante queimado para produção de energia (Laurichesse; Avérous, 2016). Contudo, apesar de a lignina ser considerada um produto de baixo valor industrial até o presente, ela apresenta funcionalidade química atraente o suficiente para que se promova uma busca de valorização, tendo potencial de aplicação nos setores

energético (e.g., substituto do petróleo), farmacêutico, alimentício e de cuidados pessoais (i.e., cosméticos) (Vinardell; Mitjans, 2017).

No que diz respeito às propriedades farmacológicas, crescente estímulo tem sido destinado à bioprospecção de compostos com capacidade de proteção da integridade do material genético (DNA) humano (De Flora; Ferguson, 2005). Esse estímulo deve-se ao fato de as células estarem constantemente expostas a agentes químicos e/ou físicos que podem causar efeitos adversos, seja diretamente ou indiretamente, pela geração, por exemplo, de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o ânion superóxido (O₂⁻) e radicais hidroxila (OH⁻) (Klaunig et al., 2011). ROS são potentes indutores de danos a macromoléculas, incluindo o DNA. Sistemas de defesa antioxidantes e de reparo no DNA agem no sentido de impedir a ação deletéria de ROS sobre o material genético. Contudo, muitas vezes, esses sistemas de defesa não são eficientes para evitar os danos no DNA, promovidos por ROS e/ou outros agentes químicos (Klaunig et al., 2011). Desta forma, o uso de

compostos exógenos antígeno-tóxicos, tal como carotenoides, é indicado para a proteção do DNA (Wu et al., 2017).

A capacidade da lignina de sequestrar radicais livres e, consequentemente, de estabilizar as reações induzidas por oxigênio e ROS, já é reconhecida em estudos científicos (Dizhbite et al., 2004; Ugartondo et al., 2009). Nesse sentido, a capacidade antioxidante da lignina aponta esse composto como promissor componente de suplementos alimentares, com a função de proteção da molécula de DNA (Martínez et al., 2012). Contudo, a verificação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA requer a execução de testes de antígeno-toxicidade; esses devem ser conduzidos com concentrações não citotóxicas do composto para certificação da veracidade da resposta antígeno-tóxica, uma vez que há uma íntima relação entre danos no DNA e processos de morte celular (i.e., efeitos citotóxicos).

Apesar de existirem diversos testes colorimétricos para a determinação da

citotoxicidade de agentes químicos, o teste do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] é um dos mais utilizados devido à sua sensibilidade de detecção de citotóxicos. O teste do MTT quantifica o dano induzido por um agente no metabolismo celular de glicídeos, pela avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial e, consequentemente, a viabilidade celular, é então quantificada pela redução do MTT a formazan, pela atividade das enzimas desidrogenases (Figura 1). Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (Mosmann, 1983).

Apesar de o protocolo do teste do MTT já ser bem descrito na literatura, nesse trabalho são apresentadas modificações do protocolo padrão requerido para a avaliação da citotoxicidade da lignina. Alterações como na forma de manuseio das células, exposição das células e quantificação dos dados serão apresentadas a seguir.

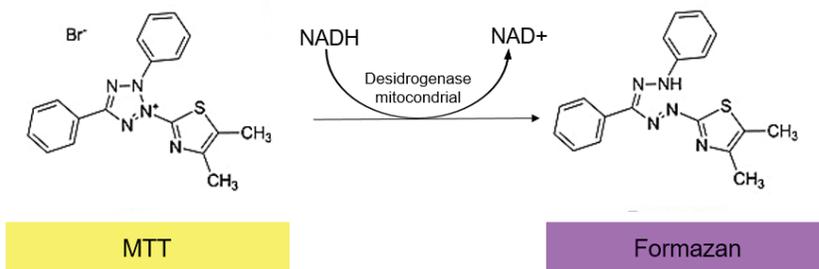


Figura 1. Reação de redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água).

Preparo da Lignina

Frações de lignina devem ser preparadas como segue (Lourençon et al., 2015):

Inicialmente, deve-se ajustar uma solução de licor negro proveniente do processo de polpação kraft de madeira de eucalipto para uma concentração de 40% de sólidos, pela adição de água. A partir de uma única amostra desta solução vai-se adicionando ácido clorídrico (12 M), gota a gota, até que o pH da solução seja diminuído para 9. Neste pH precipita-se uma fração de lignina que é removida por centrifugação a 3.500 rpm por 15 minutos. Continua-se adicionando ácido ao sobrenadante até que o pH abaixe para 7, novamente a fração de lignina precipitada é retirada por centrifugação. Faz-se o mesmo procedimento retirando-se frações de lignina precipitadas nos pH's 5, 3 e 1. Estas frações são purificadas separadamente, suspendendo cada fração em solução aquosa no mesmo pH em que a fração foi obtida e centrifugando-a novamente. Cada fração é lavada em filtro com solução aquosa acidificada (~pH 2) seca em estufa a 50 °C e moída em gral com pistilo.

Observação: A lignina apresenta baixa solubilidade em meio aquoso (e.g., meio de cultivo) e requer a adição de solvente para aumentar a sua solubilidade no meio de cultivo. Por isso, as frações estavam inicialmente na concentração de 10 mg/mL de dimetilsulfóxido (DMSO).

Os testes para este trabalho foram realizados com a lignina técnica kraft, mas poderia ser utilizada qualquer lignina que tenha solubilidade em DMSO.

Observação: Todos os procedimentos descritos a seguir nos itens “Cultivo das células” e “Teste do MTT (etapas 1 e 2)” devem ser realizados em sala de cultivo de células de mamíferos com manutenção das condições de esterilidade dos descartáveis plásticos e reagentes.

Cultivo das células

Uma semana antes da execução da avaliação da citotoxicidade das frações de lignina, descongelar as células HepG2 (linhagem de hepatocarcinoma humano) e estabilizá-la em uma passagem (subcultivo) antes da realização do teste do MTT.

Procedimento para o descongelamento

- 1) Adicionar meio completo [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), contendo antibióticos (penicilina 1 U/mL e estreptomicina 1 µg/mL)], ao frasco de cultivo e colocá-lo na incubadora a 37 °C para estabilização do pH por, pelo menos, 15 minutos. A quantidade de meio está relacionada ao tamanho do frasco, que dependerá da quantidade de células no vial (normalmente, são

congeladas 1×10^6 células por vial) a ser descongelado (para um frasco com 75 cm^2 de área de superfície, adiciona-se 1×10^6 células em 15 mL de meio DMEM suplementado com 10% SFB). Observação: é importante evitar excesso de alcalinidade no meio durante a recuperação das células pelo descongelamento. Para isso, colocar previamente o frasco de cultivo contendo meio completo na incubadora de CO_2 a 37°C , para estabilização do pH.

- 2) Remover o vial do nitrogênio líquido e limpá-lo com álcool 70%. Levá-lo rapidamente para o banho-maria a 37°C e submergi-lo com cuidado. Esperar até que o conteúdo descongele. Observação: o processo de descongelamento não deve durar mais do que 2 minutos, para não prejudicar a viabilidade das células.
- 3) Limpar o vial com álcool 70% e transferir seu conteúdo para o

frasco de cultivo com auxílio de uma pipeta de 1 mL. Observação: alguns tipos celulares podem sofrer choque osmótico se um grande volume de meio fresco é adicionado muito rapidamente à suspensão de células durante o descongelamento. Neste caso, adicionar vagarosamente a suspensão do vial ao frasco de cultura com meio DMEM, iniciando por gotejamento e aumentando gradativamente a velocidade de adição do meio.

- 4) Homogeneizar delicadamente o frasco de cultura para distribuir uniformemente as células e incubar a 37°C , 5% CO_2 e atmosfera úmida.
- 5) Após 24 horas, descartar o meio do frasco de cultivo e adicionar novo meio DMEM completo previamente estabilizado a 37°C .

As etapas do descongelamento estão ilustradas na Figura 2.

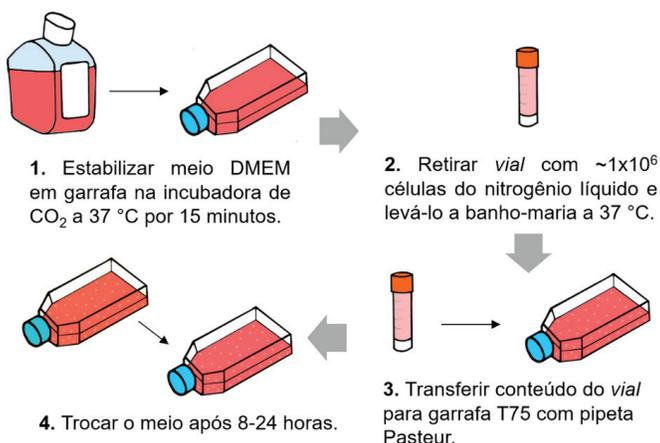


Figura 2. Esquema ilustrativo do procedimento de descongelamento das células HepG2.

Procedimento para o subcultivo

- 1) Após o descongelamento, acompanhar o crescimento das células no microscópio (Figura 3) e o espaço entre elas (grau de confluência). Subcultivar quando as células atingirem 80% de confluência.
- 2) Descartar o meio e lavar o frasco com 10 mL de tampão fosfato salino (Phosphate Saline Buffer - PBS) 1x concentrado (137 mM NaCl; 10 mM PO_4^{3-} ; 2,7 mM KCl) com pH 7,4.
- 3) Adicionar 3 mL de tripsina a 0,05% (10 mL de tripsina-EDTA 0.5% em 90 mL de PBS 1x concentrado) e incubar o frasco a 37 °C por 3 minutos.
- 4) Soltar as células com leves batidas nas laterais do frasco e imediatamente inativar a tripsina com meio DMEM suplementado com 10% de SFB.
- 5) Transferir o conteúdo do frasco de cultivo para um tubo de centrifuga de 15 mL estéril e centrifugar por 5 minutos a 1.500 rpm.

- 6) Desprezar o sobrenadante e res-suspender o pellet em 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB.
- 7) Semear as células em novos frascos de cultivo, na proporção 1:3 (~333 μL da suspensão celular para cada um dos 3 frascos de cultivo). Observação: tempo de subcultivo a cada 3 dias.
- 8) Incubar os frascos de cultivo a 37 °C, 5% CO_2 e atmosfera úmida (umidade relativa 95%).

As etapas do subcultivo estão ilustradas na Figura 4.

Observação: é fundamental seguir os procedimentos de cultivo descritos aqui, pois as células são suscetíveis a alterações morfológicas e fisiológicas ao longo dos subcultivos, o que pode comprometer seriamente a predição dos efeitos citotóxicos do composto teste, neste caso as frações de lignina.

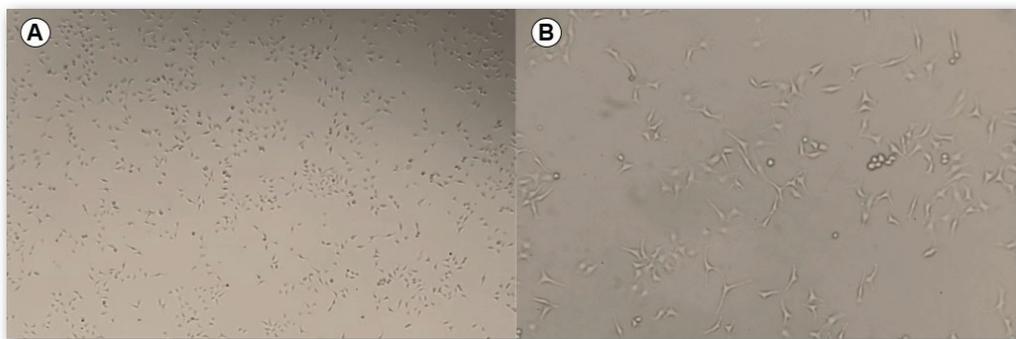


Figura 3. Células HepG2 visualizadas em microscopia óptica com aumento de 4x (A) e 10x (B).

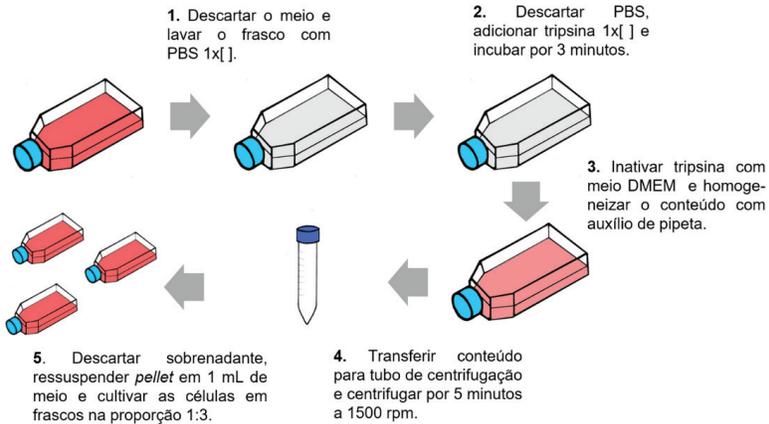


Figura 4. Esquema ilustrativo do procedimento de subcultivo das células HepG2.

Teste do MTT modificado para a avaliação da citotoxicidade de frações de lignina

1) Preparar a placa de 96-poços

Para isso, coletar as células por tripsinização, como acima descrito (subcultivo), contá-las em câmara de Neubauer, e calcular a viabilidade celular utilizando o método de exclusão do Trypan Blue, o qual cora as células não viáveis de azul. Semear 1×10^4 células viáveis/poço em 100 μ L de meio DMEM completo e reservar uma fileira da placa de 96-poços para o tratamento branco, o qual consiste em adição de 100 μ L

de meio completo por poço sem adição de células. Incubar nas condições de manutenção de cultivo das células por 48 horas, para adesão celular (estabilização).

Observação: em geral, o tempo de adesão das células em monocamadas para posterior exposição das mesmas ao composto teste é 24 horas. No entanto, células expostas à lignina apresentam uma menor adesão à placa (Figura 5) e, por isso, requerem um maior tempo de estabilização antes da exposição da lignina. O aumento do tempo de estabilização de 24 horas para 48 horas é suficiente para que as células não se desprendam da placa durante as etapas do teste do MTT.

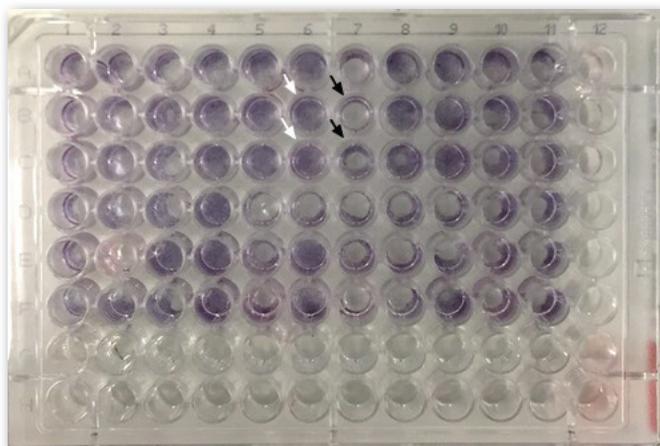


Figura 5. Imagem ilustrativa do problema de desprendimento das células HepG2 expostas às frações de lignina na última etapa do teste do MTT em placas de 96 poços. Setas brancas indicam poços sem desprendimento e setas pretas indicam poços com desprendimento celular.

2) Expor as células às frações da lignina

Verificar a qualidade da placa em microscópio de luz invertido, observando se as células estão aderidas e se possuem morfologia epitelial. Descartar o meio dos poços cuidadosamente e adicionar os tratamentos (frações de lignina diluídas em meio DMEM nas concentrações 1,5; 3,12; 6,25; 12,5 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) considerando o volume final de 100 μL de meio DMEM sem SFB por poço. Incubar nas

condições de cultivo requeridas pela célula e ausência de luz por 24 horas e/ou 48 horas (ou tempo de exposição definido de acordo com objetivo do estudo). A disposição dos poços está ilustrada na Figura 6.

Observação: cada fração da lignina deve ser avaliada em uma faixa compreendendo 5 concentrações, considerando a concentração máxima 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ou 5 mg/mL , qualquer que seja a mais baixa, como recomendado para ensaio Cometa (testes de genotoxicidade) (Tice et al., 2000).

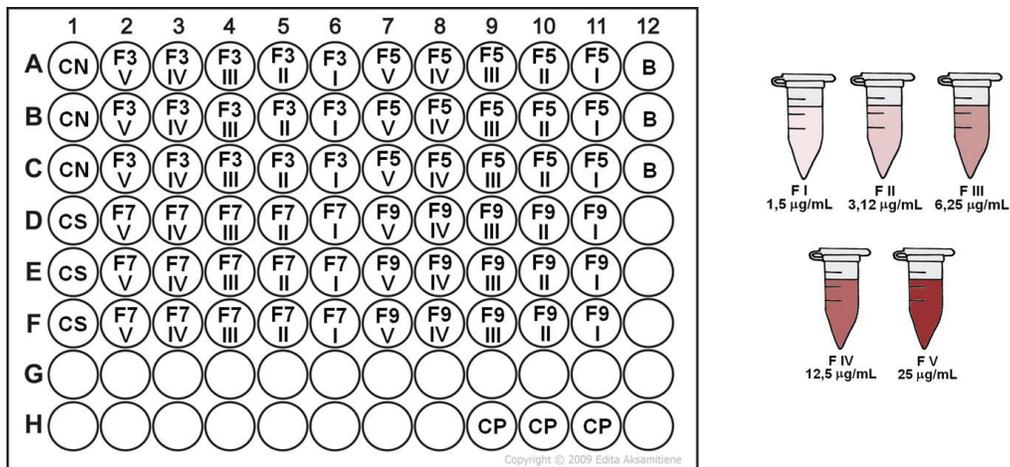


Figura 6. Esquema ilustrativo da disposição dos tratamentos na placa de 96-poços para exposição das células HepG2 às frações de lignina e posterior avaliação da citotoxicidade (teste do MTT). CN: controle negativo; CS: controle solvente; CP: controle positivo; B: branco.

3) Redução do MTT a formazan

Após a exposição, descartar os tratamentos cuidadosamente com auxílio de uma pipeta multicanal. Lavar as placas com PBS, adicionando esse tampão vagarosamente e pela parede dos poços, para evitar desprendimento das células. Adicionar 100 µL de MTT a 0,5 mg/mL (solução preparada previamente em meio DMEM sem SFB) por poço e incubar por 3 horas nas condições de cultivo requeridas pelas células HepG2 (37 °C e 5% CO₂). Decorridas as 3 horas de incubação, descartar o MTT com cuidado para

evitar possíveis perdas de células e adicionar 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por poço. Realizar a leitura de absorbância da placa em espectrofotômetro de microplacas utilizando filtro de 540 nm.

As etapas do teste do MTT estão ilustradas na Figura 7.

Observação: soluções de MTT apresentam baixa estabilidade. Assim, a solução estoque de MTT deve ser preparada e armazenada a -20 °C em alíquotas, para evitar processos repetidos de congelamento e descongelamento que possam interferir na qualidade desse reagente.

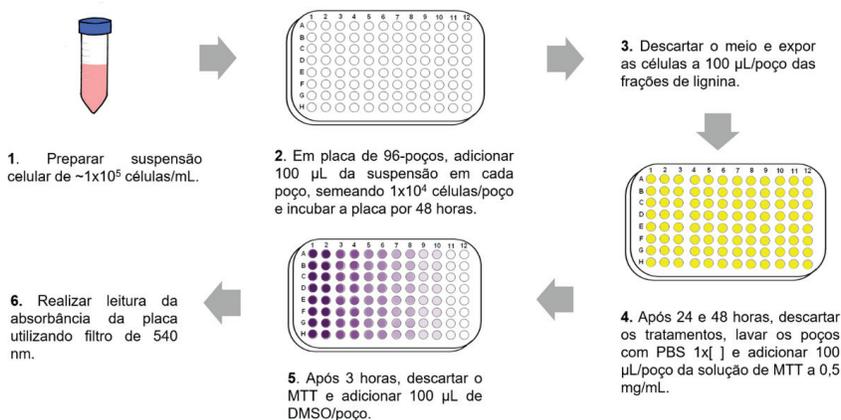


Figura 7. Esquema ilustrativo do teste do MTT para avaliação da citotoxicidade das frações de lignina em células HepG2.

4) Cálculo da viabilidade (%). A viabilidade celular é calculada com base nos dados de absorbância obtidos, como segue:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância branco}) \times 100}{(\text{absorbância do controle negativo} - \text{absorbância branco})}$$

Observação: quando utilizado solvente, o controle negativo passa a ser o controle solvente, como o caso da lignina. Células em cultivo não toleram muitos tipos de solventes e altas concentrações. Assim, para a lignina, as frações desse composto dissolvidas inicialmente em DMSO, são posteriormente adicionadas ao meio de cultivo, tomando-se o cuidado para manter uma concentração final máxima de solvente de 0,25% (v/v), no meio de cultivo.

Após a avaliação da viabilidade das células expostas à lignina, serão escolhidas duas frações (F3, F5, F7 ou F9) e três concentrações (1,5; 3,12; 6,25; 12,5 ou 25 $\mu\text{g/mL}$) que apresentarem

a viabilidade celular superior a 70% em relação ao controle negativo para a avaliação da capacidade protetora contra danos no DNA (antigenotoxicidade) das frações de lignina.

Cuidados a serem tomados

Vale ressaltar que há necessidade de uso de jalecos descartáveis, luvas nitrílicas, máscaras e óculos de proteção para o manuseio das células HepG2. Apesar de ser uma linhagem celular adquirida comercialmente e para a qual foi confirmada ausência de contaminação viral (e.g. vírus da hepatite, HIV),

há riscos biológicos por se tratar de uma linhagem celular humana. Assim, o comportamento do executor e manuseio das células adequados no laboratório de cultivo celular são fundamentais para não comprometer a saúde do executor.

Além disso, o executor deve utilizar jaleco, luvas e óculos de proteção ao manusear o MTT e o DMSO, apesar de não serem considerados compostos perigosos pelo Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) e pelo sistema de rotulagem de substâncias perigosas (Directiva 67/548/EEC).

Referências

DE FLORA, S.; FERGUSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 591, n. 1-2, p. 8-15, 2005. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2005.02.029.

DIZHBITE, T.; TELYSHEVA, G.; JURKJANE, V.; VIESTURS, U. Characterization of the radical scavenging activity of lignins: natural antioxidants. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 3, p. 309-317, 2004. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.02.024.

KLAUNIG, J. E.; WANG, Z.; PU, X.; ZHOU, S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, n. 2, p. 86-99, 2011. DOI: 10.1016/j.taap.2009.11.028.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Towards biobased aromatic polymers from lignins. In: KALIA, S.; AVÉROUS, L. (Ed.). **Biodegradable and biobased polymers for environmental and biomedical applications**. Hoboken: Wiley, 2016. p. 385-436. DOI: 10.1002/9781119117360.ch11.

LOURENÇON, T. V.; HANSEL, F. A.; SILVA, T. A. da; RAMOS, L. P.; BOLZON DE MUNIZ, G. I.; MAGALHAES, W. L. E. Hardwood and softwood kraft lignins fractionation by simple sequential acid precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 154, p. 82-88, 2015. DOI: 10.1016/j.seppur.2015.09.015.

MARTÍNEZ, V.; MITJANS, M.; VINARDELL, M. Pharmacological applications of lignins and lignins related compounds: an overview. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 16, p. 1863-1870, 2012. DOI: 10.2174/138527212802651223.

MOSMANN, T. 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.

STEINBÜCHEL A.; HOFRICHTER M. **Biopolymers: lignin, humic substances and coal**. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. v. 1.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-21, 2000.

UGARTONDO, V.; MITJANS, M.; VINARDELL, M. P. Applicability of lignins from different sources as antioxidants based on the protective effects on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 2, p. 184-187, 2009. DOI: 10.1016/j.indcrop.2009.03.001.

VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. Lignins and their derivatives with beneficial effects on human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017. DOI: 10.3390/ijms18061219.

WU, J. C.; LAI, C. S.; TSAI, M. L.; HO, C. T.; WANG, Y. J.; PAN, M. H. Chemopreventive effect of natural dietary compounds on xenobiotic-induced toxicity. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 1, p. 176-186, 2017. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.10.019.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, km 111, Guaraituba,
Caixa Postal 319
83411-000, Colombo, PR, Brasil
Fone: (41) 3675-5600
www.embrapa.br/florestas
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Versão digital (2018)



MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Florestas

Presidente

Patrícia Póvoa de Mattos

Vice-Presidente

José Elidney Pinto Júnior

Secretária-Executiva

Neide Makiko Furukawa

Membros

*Álvaro Figueredo dos Santos, Gizelda Maia
Rego, Guilherme Schnell e Schühli, Ivar
Wendling, Luis Cláudio Maranhão Froufe,
Maria Izabel Radomski, Marilice Cordeiro
Garrastazu, Valderés Aparecida de Sousa*

Supervisão editorial/Revisão de texto

José Elidney Pinto Júnior

Normalização bibliográfica

Francisca Rasche

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Neide Makiko Furukawa

Fotos e ilustrações

Emanoela Lundgren Thá

CGPE 15087