

TESTE *in vitro* DE CITOTOXICIDADE DE INFUSÃO DO BAGAÇO DE QUATRO VARIEDADES DE *Olea europaea* L.

CARLA BEATRIZ ROCHA DA SILVA¹; MÁRCIA KUTSCHER RIPOLL²; JOÃO ROBERTO BRAGA DE MELLO³; OTÁVIA DE ALMEIDA MARTINS⁴; RENATA OSÓRIO DE FARIA⁵; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas - carlabrsil@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul - marciaripoll@hotmail.com

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul - jmello@gabinete.ufrgs.br

⁴Universidade Federal de Pelotas - otavia.martins@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - renataosoriovet@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas - meireles@ufpel.tche.br

1. INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie frutífera da família botânica das *Oleaceae* datada de mais de 6.000 anos, cultivada mundialmente e está presente em pequenas e grandes propriedades de diversas regiões brasileiras (WREGUE et al., 2015; HASHIMI et al., 2015). Esta espécie também é conhecida popularmente por suas propriedades medicinais, apresentando ácidos graxos, compostos fenólicos e vitamina E em sua composição (NUNES et al., 2018), sendo seu uso descrito na medicina tradicional com o intuito de tratar e prevenir diabetes (KOMAKI et al., 2003), ação anti-inflamatória (EIDI et al., 2012) e também antimicrobiana (GOEL et al., 2016).

Aproximadamente 20% da matéria prima (azeitonas) encaminhadas para a indústria são convertidas em azeite, o restante faz parte dos resíduos, líquidos e sólidos. Dentre os resíduos sólidos da indústria oleícola obtidos a partir da extração do azeite tem-se o bagaço, composto por partes trituradas de epicarpo, polpa e caroço (ALCAIDE et al., 2010), que é descartado pela indústria e tem potencial para ser utilizado em pesquisas quanto a sua atividade antimicrobiana, sendo necessário para tal o conhecimento da sua toxicidade.

No Brasil, as normas para a realização de ensaios toxicológicos podem ser obtidas a partir da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.48/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e na Resolução Específica (RE) n.90/2004, que uniformiza os ensaios toxicológicos pré-clínicos (ANVISA, 2004a, 2004b). Das diversas etapas do processo de desenvolvimento, os testes pré-clínicos representam o maior filtro no desenvolvimento de novos compostos (PALMEIRA FILHO, et al., 2003). Um modelo de avaliação de toxicidade que vem ganhando força entre os pesquisadores é a de citotoxicidade. Tal modelo utiliza-se de células de mamíferos, avaliando os danos causados, formação ou não de colônias celulares e a viabilidade celular (ROGERO et al., 2003). A partir dessa perspectiva o trabalho objetivou testar extrato aquoso do bagaço do fruto de *Olea europaea* em cultura de células *Madin and Darby Bovine Kidney* (MDBK) e estabelecer sua citotoxicidade em diferentes concentrações.

2. METODOLOGIA

Os extratos aquosos foram obtidos a partir do bagaço da azeitona de quatro variedades de oliveira (arbequina, manzanilla, coratina e koroneiki) cedidos pela EMBRAPA - Cascata. Foram realizadas infusão e decocção do bagaço

durante dez minutos, filtrados e posteriormente armazenados em frasco âmbar e refrigerados.

Os testes de citotoxicidade foram realizados a partir de células MDBK (*bovine kidney cells*), cultivadas em RPMI-1640 acrescido de L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (pH 7,2) suplementado de penicilina-estreptomicina e fungizona (PSF) em atmosfera controlada com 5% de CO₂, úmida e a 37°C, o efeito citotóxico foi estabelecido a partir do ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5difeniltetrazólico). Foram utilizadas as diluições de 100mg/ml a 0,78mg/ml. O monitoramento das células foi realizado a partir de um microscópio invertido, e os resultados expressos em porcentagem de inibição de acordo com as células controle, esta sendo considerada 100%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o gráfico (FIGURA 1), observou-se que os compostos que estavam na concentração de 100mg/ml apresentaram baixa viabilidade celular frente as células MDBK. Já nas outras concentrações dos extratos aquosos a partir de 12,5 mg/ml todo os extratos apresentaram mais de 50% de viabilidade. Os extratos a partir de 6,25 mg/ml apresentaram alta viabilidade, sendo o de 0,78 mg/ml a concentração em que não observou-se nenhuma avaria nas células.

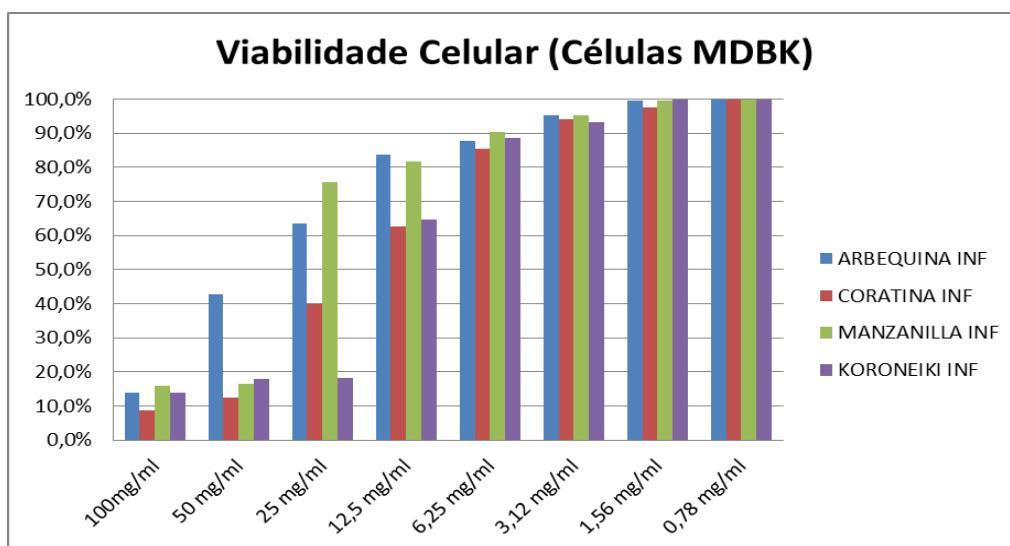


Figura 1: Viabilidade celular de extrato de infusão do bagaço de *Olea europaea* em células MDBK.

Ensaios com vermelho neutro já foram realizados utilizando células MDBK, o composto isolado peptídeo P34 testado apresentou viabilidade a partir da concentração de 1,07 µg/ml, em comparação com extrato aquoso do bagaço de oliveira possuiu maior toxicidade celular, pois apresentou viabilidade em concentrações mais baixas que no extrato da oliveira que apresentou viabilidade a partir de concentrações de 12,5 mg/ml (FERNANDES et al., 2013).

Estudos utilizando extratos aquosos de *Rosmarinus officinalis* testadas em células MDBK a partir do ensaio por MTT apresentaram viabilidade celular na concentração de 50 µg/ml enquanto que os extratos aquosos de *Origanum vulgare* apresentaram na concentração de 12,5 µg/ml, ambos extratos apresentaram concentrações viáveis mais baixas que a encontrada no presente estudo com extratos aquosos de oliveira (BLANK et al., 2016). Com a metodologia

semelhante, extrato hidroalcoólico de própolis a 15% teve de ser diluído em 200 vezes para obter viabilidade celular, demonstrando que em comparação com o extrato aquoso de oliveira, apresentou elevada toxicidade celular. (CUETO et al., 2010).

Estudos realizados por Pereira et al. (2015) com extratos de oliveira demonstraram avaria em células da linhagem H460, reduzindo a viabilidade celular para $83,35 \pm 15,18\%$ e $62,37 \pm 2,85\%$ nas concentrações de 400 e 800 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, quando comparada ao controle negativo produzindo morte por apoptose. Apesar do objetivo dos estudos serem diferentes os extratos são da mesma planta, e apresentaram citotoxicidade alta, o que é favorável em células tumorais, pois a intensão é eliminá-las e não que elas permaneçam viáveis como no cultivo celular em células MDBK, e atualmente, o estudo de Pereira et al. (2015) é um dos poucos que realizou o teste de citotoxicidade utilizando extratos de oliveira.

4. CONCLUSÕES

Os extratos de infusão do bagaço das variedades arbequina, manzanilla, coratina e koroneiki apresentam viabilidade celular a partir da concentração de 12,5 mg/ml e seu uso torna-se totalmente seguro e sem inviabilização celular na concentração de 0,78 mg/ml.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução RDC n. 48/04. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2004a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução RE n. 90/04. Determina a publicação do “Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos”. Diário Oficial da União, Brasília, 2004b.

ALCAIDE, E. M.; GARCÍA, A. M.; RUIZ, D. R. Y. Los subproductos del olivar en la alimentación de rumiantes. **Albéitar: publicación veterinaria independiente**, n. 140, p. 32-34, 2010.

BLANK, D. E.; ALVES, G. H.; FREITAG, R. A., CORREA, R. A.; HUBNER, S. O.; CLEFF, M. B.. Composição química e citotoxicidade de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. **Science And Animal Health**, v. 4, n. 2, p. 117-130, 2016.

CUETO, A. P. S. Avaliação da citotoxicidade e atividade antiviral da própolis frente ao calicívirus felino (FCV), adenovírus canino 2 (CAV-2) e vírus da diarréia viral bovina (BVDV). 2010.

EIDI, A.; MOGHADAM-KIA, S.; MOGHADAM, J. Z.; EIDI, M.; REZAZADEH, S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of olive oil (*Olea europaea* L.) in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 3, p. 332 – 337, 2012.

FERNANDES, M. H. V.; SCOPEL, D.; DE CASTRO, C. C.; CORRÊA, R. A.; FISCHER, G.; DA MOTTA, A. D. S.; HÜBNER, S. O. Avaliação da citotoxicidade do peptídeo antimicrobiano p34. **Science And Animal Health**, v. 1, n. 1, p. 02-10, 2013.

GOEL, N.; ROHILLA, H.; SINGH, G.; PUNIA, P. Antifungal Activity of Cinnamon Oil and Olive Oil against *Candida* spp. Isolated from Blood Stream Infections. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 8, p. DC09 – DC11, 2016.

HASHMI, M. A.; KHAN, A.; HANIF, M.; FAROOQ, U.; PERVEEN, S. Tradicional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Olea europaea* (Olive). **Journal Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2015, p. 1-29, 2015.

KOMAKI E, Yamaguchi S, Maru I, Kinoshita, M., Kakehi, K., Ohta, Y., Tsukada, Y., 2003. Identification of anti- α -amylase components from olive leaf extracts. **Food Science and Technology Research**, 9, 35-39.

MEHTA, M. P. et al. Survival and neurologic outcomes in a randomized trial of motexafin gadolinium and whole-brain radiation therapy in brain metastases. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 13, p. 2529-2536, 2003.

NUNES, M. A.; COSTA, A. S. G.; BESSADA, S.; SANTOS, J.; PUGA, H.; ALVES, R. V.; FREITAS, V.; OLIVEIRAS, M. B. P. P. Olive pomace as a valuable source of bioactive compounds: A study regarding its lipid- and water-soluble components. **Science of the Total Environment**, v. 644, p. 229 – 236, 2018.

PALMEIRA FILHO, P. L.; PAN, S. S. K. Cadeia farmacêutica no Brasil: avaliação preliminar e perspectivas. 2003.

PEREIRA, W. L.; OLIVEIRA, T.; KANASHIRO, M.; COSTA, M. Ação antiproliferativa de flavonoide morina e do extrato da folha de oliveira (*Olea europaea* L.) contra a linhagem de célula H460. **Rev. bras. plantas med**, v. 17, n. 4, supl. 1, p. 798-806, 2015.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

WREGE, M. S.; COUTINHO, E. F.; PANTANO, A. P.; JORGE, R. O. Distribuição potencial de oliveiras no brasil e no mundo. **Embrapa Florestas- Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2015.