

TOXICIDADE CELULAR *in vitro* FRENTE A TRÊS EXTRATOS AQUOSOS DE *Olea europaea*.

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 - carlabrasil@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

Globalmente, existem cerca de 60 países que cultivam oliveiras o objetivo principal é a obtenção de azeite e azeitonas de mesa, num total de 11,4 milhões de hectares (VILAR; PEREIRA, 2018). No Brasil o cultivo de azeitonas vem crescendo gradualmente. De acordo com o Instituto Brasileiro da Olivicultura, no ano de 2019 a safra atingiu um volume recorde de 1,4 milhão de toneladas, ao mesmo tempo que a produção de azeite foi de 240 toneladas (IBRAOLIVA, 2020).

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie frutífera da família botânica das *Oleaceae* cultivada há mais de 6 mil anos e tem seu plantio em pequenas e grandes propriedades de diversas regiões brasileiras que apresentam clima subtropical ou temperado (EMBRAPA, 2015; HASHIMI et al., 2015).

Seu cultivo e processamento industrial gera uma grande quantidade de resíduos, que vêm de partes não aproveitadas da planta (bagaço). Esses resíduos são divididos em líquidos e resíduos sólidos. Aproximadamente 20% da matéria prima é aproveitada para produção do azeite, portanto 80% torna-se resíduo industrial (ALCAIDE et al., 2010). Popular por apresentar propriedades medicinais, a *Olea europaea* L. apresenta na sua composição ácidos graxos, vitamina E, compostos fenólicos (entre eles a oleuropeína e o hidroxitirozol) (NUNES et al., 2018), e outras substâncias que lhe conferem atividade anti-inflamatória (EIDI et al., 2012; KIM et al., 2018), anticarcinogênica (IMRAN, 2018) e citoprotetora (ALY et al., 2018).

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 toxicidade celular. Tal modelo utiliza-se de células de diversos mamíferos, observando os danos causados avaliando a viabilidade celular (ROGERO et al., 2003). A partir dessa perspectiva o trabalho teve como objetivo testar extrato aquoso do bagaço de três variedades 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 três variedades de oliveira (arbosana, picual, frontoio) cedidos pela EMBRAPA - Cascata. Foi realizada infusão 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)-2,5-difeniltetrazólico). Foram utilizadas as concentrações 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), referente às cultivares Arbosana, Frontoio e Picual, observou-se que os compostos que estavam na concentração de 100mg/ml apresentaram uma baixa viabilidade celular frente as células MDBK. Nas outras concentrações dos extratos de infusão, apenas a cultivar frontoio na concentração de 25mg/ml apresentou mais de 50% de viabilidade celular. Já a partir da concentração de 12,5mg/ml os três extratos apresentaram mais de 60%, e a partir da concentração de 6,25mg/ml apresentaram alta viabilidade, sendo que nas concentrações de 1,56 e 0,78mg/ml não ocorreu nenhuma avaria nas células.

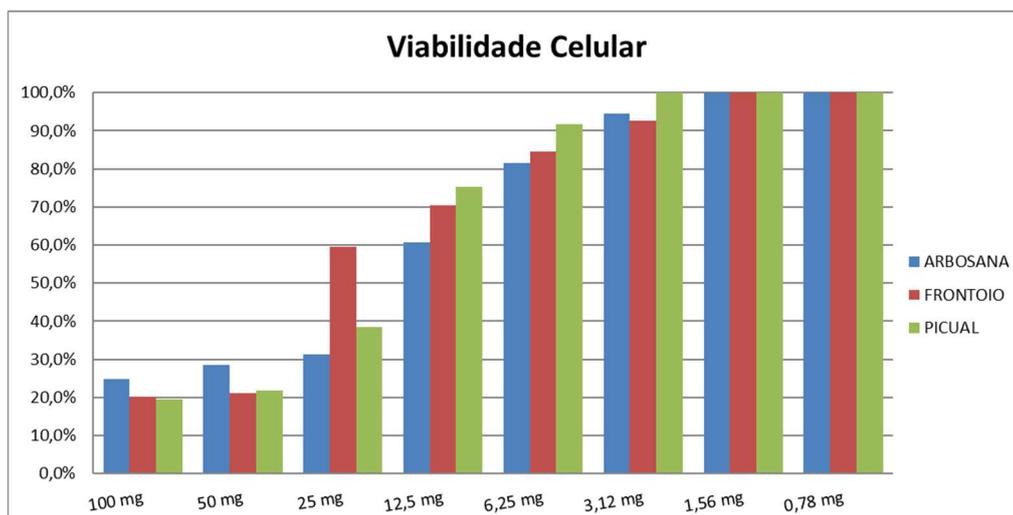


Figura 1: Viabilidade celular de extrato de infusão do bagaço de *Olea europaea* em células MDBK.

Em estudo realizado no ano de 2019 por Silva et al., utilizando o mesmo tipo de extrato do presente estudo pode-se observar que houve resultados similares entre todas as variedades. Sendo a concentração de 12,5 mg/ml onde apresentaram viabilidade de 50%. Porém, diferentemente das outras quatro cultivares utilizadas em outro estudo, não causaram avaria somente na

concentração de 0,78mg/ml, arbosana, frontoio e picual não provocaram danos às células nas de 1,56 e 0,78mg/ml, uma concentração a mais da escala

4. CONCLUSÕES

Os extratos de infusão do bagaço das variedades arbosana, frontoio e picual 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 1,56 e 0,78mg/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, AI M.; RUIZ, D. R. Y. Los subproductos del olivar en la alimentación de rumiantes. **Albéitar: publicación veterinaria independiente**, n. 140, p. 32-34, 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.

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.

IBRAOLIVA. **Projeção do mercado oleícola para os próximos anos**. 2020 Instituto Brasileiro de Olivicultura. Acessado: 07 ago. 2021. Online. Disponível em: <https://www.ibraoliva.com.br/sobre>

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.

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.

VILAR Juan. PEREIRA, Jorge Enrique. **Estado de la olivicultura mundial. Evolución y perspectivas. En prensa**. Caja Rural Jaén. 2017.

WREGGE, 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.