

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO FENÓLICO OBTIDO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DO AZEITE DE OLIVA

V.F. Amaral¹, A.C.M. Santos², V. Ziegler³, J. Castilhos⁴, C.D. Ferreira⁵

1 – Mestranda em Nutrição e Alimentos pelo Mestrado Profissional em Nutrição e Alimentos – Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS) - Instituto Tecnológico em Alimentos para Saúde – CEP: 93022-750 – São Leopoldo – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3591-1122 – Fax: 55 (51) 3591-1122 – e-mail: (v_amaral@terra.com.br)

2 – Acadêmica em Nutrição – Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS) – CEP: 93022-750 – São Leopoldo – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3591-1122 – Fax: 55 (51) 3591-1122 – e-mail: (angelacrimello@gmail.com)

3 – Docente do Mestrado Profissional em Nutrição e Alimentos - Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS) - Instituto Tecnológico em Alimentos para Saúde – CEP: 93022-750 – São Leopoldo – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3591-1122 – Fax: 55 (51) 3591-1122- e-mail: (valmorziegler12@unisinis.br)

4 – Docente do Mestrado Profissional em Nutrição e Alimentos - Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS) - Instituto Tecnológico em Alimentos para Saúde – CEP: 93022-750 – São Leopoldo – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3591-1122 – Fax: 55 (51) 3591-1122 – e-mail: (jdecastilhos@unisinis.br)

5 – Docente do Mestrado Profissional em Nutrição e Alimentos - Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS) - Instituto Tecnológico em Alimentos para Saúde – CEP: 93022-750 – São Leopoldo – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3591-1122 – Fax: 55 (51) 3591-1122 – e-mail: (cristianodietrich@unisinis.br)

RESUMO – A produção mundial de azeitonas triplicou nas três últimas décadas, em função do aumento no consumo de azeite de oliva devido ao seu potencial antioxidante conferido pelos compostos fenólicos, no entanto, durante a extração, a maior parte destes fenólicos mantém-se no bagaço, o qual representa 80%, em peso, das azeitonas. O conjunto desses compostos fenólicos pode contribuir para a redução da incidência de cânceres. O presente estudo tem como objetivo avaliar as propriedades antitumorais do extrato fenólico livre obtido do resíduo da extração do azeite de oliva do *blend* das variedades Arbequina e Arbosana. O resíduo da extração do azeite de oliva foi coletado em parceria com uma empresa de Caçapava do sul/RS e imediatamente transportado para o Itt-Nutrifor, onde foi congelado em ultra-freezer e posteriormente liofilizado. Após a liofilização, as amostras foram moídas e embaladas até a elaboração do extrato. Através do estudo conclui-se que os compostos fenólicos da fração livre extraídos do resíduo da extração do *blend* das variedades Arbequina e Arbosana apresentam atividade citotóxica, inibindo mais de 75% das células cancerígenas do cólon humano na concentração de 0,15mg.ml⁻¹.

ABSTRACT - The world production of olives has tripled in the last three decades, due to the increase in the consumption of olive oil due to its antioxidant potential conferred by phenolic compounds, however, during

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



extraction, most of these phenolics remain in the bagasse, the which represents 80% by weight of the olives. The set of these phenolic compounds can contribute to the reduction of cancer incidence. The present study aims to evaluate the anti-tumor properties of the free phenolic extract obtained from the residue from the extraction of olive oil from the blend of the Arbequina and Arbosana varietals. The residue from the extraction of olive oil was collected in partnership with a company from Caçapava do sul / RS and immediately transported to Itt-Nutrifor, where it was frozen in an ultra-freezer and later lyophilized. After lyophilization, the samples were ground and packed until the extract was prepared. Through the study it is concluded that the phenolic compounds of the free fraction extracted from the residue from the extraction of the blend of the Arbequina and Arbosana varietals present cytotoxic activity, inhibiting more than 75% of the cancer cells of the human colon at a concentration of 0.15mg.ml⁻¹.

PALAVRAS-CHAVE: azeitona; resíduos, fenólicos, citotoxicidade.

KEYWORDS: olive; residues, phenolic, cytotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se para o ano de 2020 a maior produção de azeitona para azeite dos últimos 80 anos, o que acompanha o crescimento alavancado na produção de azeite, que triplicou nos últimos 60 anos, atingindo 3.379.000 t na safra 2017/18. A estimativa de produção para a safra 2019/20 reduz em 2,3% a produção mantendo um total de 3.144.000 t. COI, (p.19, 2019) e apenas 20% deste volume é aproveitado através da extração, o armazenamento deste bagaço que representa 80% do volume compromete a produção podendo ocasionar um caos ambiental. (CONFAGRI, 2020)

Com o aumento do consumo, um número de diferentes subprodutos é originado durante a produção de azeite, tais como bagaço de azeitona, resíduos verdes com caroços, águas residuais e folhas da planta de oliveira (Rodrigues et al., 2015). Calcula-se que a produção de bagaço de azeitona atinge em torno de 2.881.500 toneladas/ano no globo terrestre. A degradação destes resíduos pode ocasionar efeitos nocivos ao meio ambiente, devido ao seu alto teor orgânico e fitotoxicidade, recorrente da alta concentração de compostos fenólicos, que são caracterizados pela dificuldade de deterioração biológica, e pelo efeito antimicrobiano, afetando os processos de digestão anaeróbica (Böhmer, 2018).

Após a extração 10 a 20% do azeite se retém preso ao bagaço. (Petursson et al., (2004) O bagaço resultante da extração de azeite, concentra 98% do total de compostos fenólicos das azeitonas inteiras, enquanto o azeite retém apenas 2% destes. o que garante maior quantidade de antioxidante no resíduo se comparado ao encontrado no azeite de oliva. (Böhmer, 2018).

De acordo com INCA (2018), câncer de cólon é o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens e o segundo entre as mulheres, com um percentual de incidência mundial de cerca de 9,0%. Estudos indicam que propriedades antioxidantes presentes na azeitona podem impedir a proliferação de células



cancerígenas no organismo. (Mueller, 2012). Nesse contexto, os resíduos agroindustriais, como o da extração do azeite de oliva pode ser uma fonte potencial para a extração destes compostos bioativos.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade citotóxica do extrato fenólico livre obtido do resíduo da extração do azeite de oliva do *blend* das variedades Arbequina e Arbosana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparo das amostras

O resíduo da extração do azeite de oliva foi coletado em parceria com uma empresa de extração de azeite localizada na cidade de Caçapava do Sul/RS. Esse resíduo é composto pela mistura das variedades Arbequina e Arbosana, formando um *blend* desses dois resíduos. Após a coleta, o resíduo foi imediatamente transportado para o Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor) da UNISINOS em São Leopoldo/RS, onde foi congelado em ultra-freezer e posteriormente liofilizado, em liofilizador da marca Liobras. Após a liofilização as amostras foram moídas e embaladas em embalagem impermeável até a elaboração do extrato e realização da análise de atividade antitumoral.

2.2 Elaboração do extrato e quantificação dos fenólicos totais

Os extratos dos fenólicos livres foram obtidos a partir do resíduo liofilizado. Para extrair os fenólicos livres, 2g de amostra foram pesadas em tubo Falcon de 50 mL e adicionado 20 mL de metanol 80%, seguido por agitação de 1 h e posterior centrifugação a 5000 rpm por 15 min. O processo foi repetido sequencialmente com 20 e 10 mL de metanol 80%; os sobrenadantes foram coletados e unidos, com volume total de 50mL do extrato (MIRA et al. 2009). O extrato foi rotaevaporado e ressuspenseo em 10 mL de metanol 80%, constituindo-se o extrato dos fenólicos solúveis, o qual foi utilizado para a quantificação dos fenólicos, realizado de acordo com o método proposto por Zielinski & Kozłowska (2000), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu.

2.3 Atividade citotóxica in vitro

Para avaliação da atividade antitumoral foi utilizado o extrato de fenólicos livres, conforme descrito no item 2.2, diferindo apenas na ressuspensão, sendo esse ressuspenseo em água esterilizada. As linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem HT-29 foi cultivada em meio McCoy's 5A (Gibco BRL Grand Island, US) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB; Life Technologies, Carlsbad, CA) e 200 UI de penicilina e 50 mg de estreptomicina/L (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO 63103, USA). O meio era trocado a cada dois dias. Todas as células cresceram em frascos de 75 cm² em atmosfera umidificada com 5% CO₂ e temperatura de 37°C.

A atividade citotóxica in vitro foi determinada utilizando o ensaio de MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) com pequenas modificações. Resumidamente, 100 µL de meio contendo



1,5x10⁵ células foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas em 5% de CO₂ e à 37 °C overnight para permitir a aderência das células aos poços. Em seguida, o meio foi adicionado de 100 µL do extrato fenólico livre do resíduo diluído em série (0,03, 0,07, 0,15, 0,30, 0,63, 1,25 e 2,5 mg EAG/mL) e levadas à incubação por mais 24 h. Em seguida, 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL, Sigma-Aldrich) foram adicionados em cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C durante 2 horas. Após este período, foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço e as placas foram incubadas durante mais 30 minutos para dissolver os cristais de formazan. A absorbância de cada poço foi determinada por um espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) a 570 nm. Para o grupo controle positivo e negativo utilizou-se DMSO 3% e 0,1%, respectivamente. A inibição do crescimento foi calculada da seguinte fórmula: % viabilidade = (Absamostra – Absbranco/Abscontrole – Absbranco) × 10. Cada condição experimental foi analisada em triplicata, com três experimentos separados para cada extrato.

2.4 Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância (ANOVA) e as médias serão comparadas utilizando o teste de Tukey a um nível de significância de 95% para a avaliação das diferentes concentrações de extrato na avaliação da atividade citotóxica. A análise estatística será realizada utilizando-se o software SAS. Diferenças de p<0,05 serão consideradas significativas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Atividade citotóxica em células de cólon

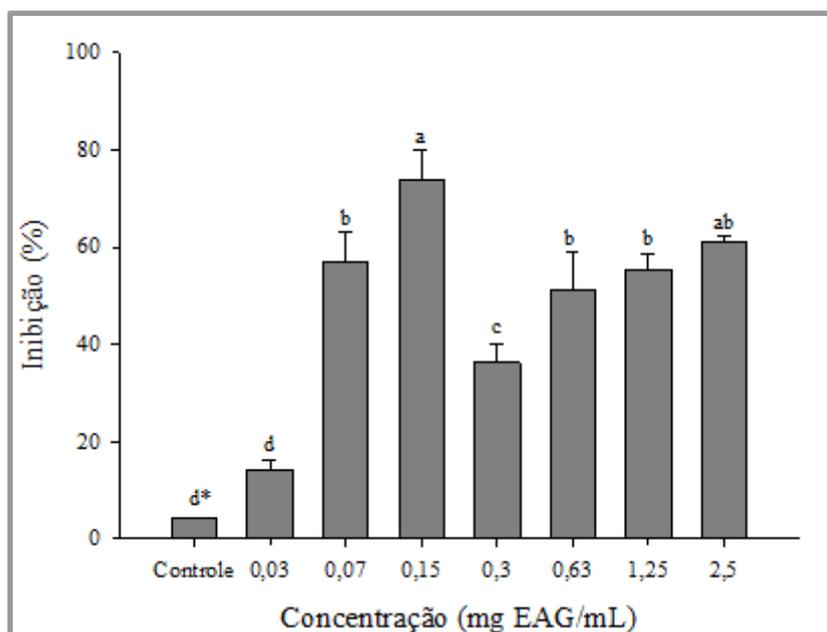
Na Figura 1 está apresentada a atividade citotóxica in vitro do extrato fenólico livre do resíduo da extração do azeite de oliva da *blend* das variedades Arbequina e Arbosana. Observa-se um aumento (p≤0,05) gradual no percentual de inibição do crescimento celular, do controle até a concentração de 0,15 mg EAG/mL, a qual apresentou um percentual de inibição superior a 75%. Observa-se ainda que as concentrações de 0,3 a 2,5 mg EAG/mL, apresentaram atividade inibitória menor ou igual a concentração de 0,15 mg EAG/mL. Esses resultados demonstram que não é necessário utilizar concentrações maiores que 0,15 mg EAG/mL, pois essas não convertem em maior atividade inibitória.

Estudo realizado por Böhmer (2018), avaliando a viabilidade celular de células do glioma de ratos, também verificou capacidade de inibição da proliferação dessas células, a partir de extratos obtidos de resíduos da extração do azeite de oliva de diferentes formas (variando o solvente, o tempo e a temperatura). Martins et al. (2017) avaliou a viabilidade de células Caco-2 (câncer de cólon) incubadas com bagaço de uva a partir de ensaio MTT, e verificaram uma redução da atividade antitumoral a partir da concentração de 250 µg/mL, conduta semelhante observada no presente estudo.

Hilbig (2017), analisou a atividade citotóxica in vitro do composto fenólico do extrato de casca de noz pecã e identificou citotoxicidade contra células MCF-7 (células câncer de mama) na concentração de 74,11µg/mL. A pesquisa aponta o efeito antiproliferativo do crescimento de células MCF-7, o que reforça a atividade citotóxica do extrato de casca de noz pecã e corrobora com os resultados do presente estudo, em que resíduos agroindustriais possuem potencial para inibir a proliferação de células de câncer.

De acordo com INCA (2018), câncer de cólon é o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens e o segundo entre as mulheres, com um percentual de incidência mundial de cerca de 9,0%. Upadhyaya et al. (2007) estuda estratégias de prevenção para combater os mais diversos tipos de câncer, desta forma, a utilização de alimentos enriquecidos com compostos bioativos oriundos de resíduos agroindustriais, aparentam contribuir efetivamente, atuando através de diferentes mecanismos de ação como, anti-carcinogênicos, antioxidantes, anti-inflamatórios e antiangiogênicos. Nesse contexto, os resíduos agroindustriais, como o da extração do azeite de oliva pode ser uma fonte potencial para a extração e utilização de compostos bioativos em alimentos.

Figura 1: Atividade citotóxica in vitro do extrato fenólico livre do resíduo da extração de azeite de oliva do blend das variedades Arbequina e Arbosana.*Médias aritméticas de 9 repetições \pm desvio padrão, seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de tukey ($p \leq 0,05$).



4. CONCLUSÕES

Os compostos fenólicos da fração livre extraídos do resíduo da extração do *blend* das variedades Arbequina e Arbosana apresentam atividade citotóxica, inibindo mais de 75% das células cancerígenas do cólon humano na concentração de $0,15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Mostrando que esses compostos podem agregar para enriquecimento de alimento e na indústria farmacêuticas no desenvolvimento de quimioterápicos auxiliando bloqueio do desenvolvimento de células adenocarcinoma de cólon humano.

Os avanços dessas pesquisas podem estar relacionados com a aplicação desses compostos e extratos em produtos alimentícios, na tentativa de vislumbrar novos conservantes e/ou antioxidantes naturais que poderão substituir alguns aditivos sintéticos.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Böhmer, B. W. (2018). *Potencial antimicrobiano e antitumoral de compostos fenólicos extraídos do bagaço oriundo da obtenção de azeite de oliva (Olea europaea L.)*. 2018. 77p. (Dissertação Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Confederação Nacional das Cooperativas Agrícolas e do Crédito Agrícola de Portugal CCRL – CONFAGRI,(2020), *Produção de azeitona para azeite será das maiores “dos últimos 80 anos”*, 10 de fevereiro de 2020. <https://www.confagri.pt/producao-azeitona-azeite-sera-das-maiores-dos-ultimos-80-anos/>

Conselho Oleícola Internacional – COI, (2019) *The world's olive oil production. Olive oil – Estimates 2019/20 Crop year*. The IOC on the front line against climate change. Boletim de notícias nº144, Dezembro de 2019. https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/12/NEWSLETTER_144_ENGLISH.pdf

Hilbig, J. (2017) *Perfil de compostos fenólicos e efeitos antitumoral in vivo e in vitro de extratos da casca de noz pecã* (Tese de doutorado), Programa de PósGraduação em Ciência dos Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal Santa Catarina, Florianópolis.

Instituto Nacional de Câncer – INCA. *Estimativa 2018. Incidência de Câncer no Brasil*. Ministério da Saúde. Brasil. Rio de Janeiro, 2018. Versão eletrônica ISBN 978-85-7318-361-0

Martins, I. M.; Macedo, G. A.; Macedo, J. A.; Roberto, B. S.; Chen, Q.; Blumberg, J. B.; Chen, C. Y. O (2017). Tannase enhances the antiinflammatory effect of grape pomace in Caco-2 cells treated with IL-1 β . *Journal of Functional Foods*, v. 29, p. 69-76. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.011>

Mueller, T. (2012) *Extravirgindade: o sublime e escandaloso mundo do azeite de oliva*. São Paulo: Tapioca.

Petursson, S.; Decker, E. A.; McClements, D. J. (2004). Stabilization of oil in-water emulsion by cod protein extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 3996-4001. <https://doi.org/10.1021/jf035251g>

Rodrigues, F.; Pimentel, F.B.; Oliveira, M.B.P.P. (2015). Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry. *Industrial Crops and Products* 70: 116-124. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.027>

Zielinski, H. and Kozłowska, H. (2000). Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *J. Agric. Food Chem.*48, 2008–2016.