



Avaliação do efeito citotóxico/antitumoral do extrato encapsulado de trub

Evaluation of the cytotoxic/antitumor effect of encapsulated trub extract

Ana Beatriz Sousa Santana¹, Patricia Aline Bressiani², Ágatha Giovanna Fragoso³, Lilian Tatiani Düsman Tonin⁴, Elisângela Düsman⁵

RESUMO

O Trub é obtido no processo de fervura do malte da cerveja, sendo uma pasta com partículas de lúpulo, compostos fenólicos e proteínas coloidais. Por sua composição, este resíduo industrial pode possuir propriedades benéficas na área da saúde. O objetivo do trabalho foi avaliar o extrato puro de trub e de encapsulado contendo 10% do extrato de trub, em células tumorais mamárias humanas *in vitro*, pelo teste do MTT, por 24, 48 e 72 horas. O extrato puro de trub apresentou efeito citotóxico para as células tumorais nas concentrações de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (24 horas), 100, 300, 400, 500 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (48 horas) e 300 até 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (72 horas). O extrato de trub (10%) encapsulado com zeína – quitosana apresentou atividade antitumoral/citotoxicidade nas concentrações de 10, 50, 100, 200, 400 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (24 horas), 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (48 horas) e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (72 horas). A nano zeína contendo 10 % de extrato apresentou citotoxicidade concentrações de 5 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (48 horas) e 100, 300 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (72 horas). Os dados indicam que o extrato de trub possui compostos com atividade antitumoral para as células mamárias humanas.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de mama; Extrato de trub; Viabilidade celular.

ABSTRACT

Trub is obtained in the process of boiling beer malt, being a paste with particles of hops, phenolic compounds and colloidal proteins. Due to its composition, this industrial waste may have beneficial properties in the health area. The objective of the study was to evaluate the pure trub extract and encapsulated containing 10% of trub extract, in human breast tumor cells *in vitro*, by the MTT test, for 24, 48 and 72 hours. The pure trub extract showed cytotoxic effect for tumor cells at concentrations of 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (24 hours), 100, 300, 400, 500 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (48 hours) and 300 to 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (72 hours). The trub extract (10%) encapsulated with Zeína - chitosan showed antitumor/cytotoxicity activity at concentrations of 10, 50, 100, 200, 400 and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (24 hours), 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (48 hours) and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (72 hours). The nano zeína containing 10 % extract showed cytotoxicity concentrations of 5 and 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (48 hours) and 100, 300 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (72 hours). The data indicate that trub extract has compounds with antitumor activity for human breast cells.

KEYWORDS: Breast cancer; Trub extract; Cell viability.

INTRODUÇÃO

¹ Voluntária do Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: anabeatrizsousa2009@hotmail.com. ID Lattes: 7595083724715704.

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: pbressiani@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 6244294104014856.

³ Voluntária do Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: agatygf@gmail.com. ID Lattes: 3202338026278460.

⁴ Docente no Departamento Acadêmico de Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: liliandusman@utfpr.edu.br. ID Lattes: 5182710800072951.

⁵ Docente no Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: edusman@utfpr.edu.br. ID Lattes: 0834228211589445.



O Trub quente é o segundo produto obtido após a etapa de fervura da cerveja, sendo uma pasta com partículas de lúpulo, compostos fenólicos e proteínas coloidais instáveis de alto peso molecular (COSTA et al., 2021). O trub não possui aplicação no comércio devido ao fato de possuir uma complexidade maior e um amargor presente.

Na composição do trub se destacam as proteínas, ácidos do lúpulo, fibras, pectina e xantohumol (XN). O XN é gerado no processo de fervura do trub que pode ser convertido no isoxantohumol (IXN). O XN não possui efeitos significativos para a aplicação em fármacos e na saúde, porém o IXN, apresenta característica anti-inflamatórias, ação fitoestrogênica e efeito anticancerígeno (SILVA et al., 2023a).

O trub quente é formado por aproximadamente 85% de água e a parte de matéria seca por aproximadamente 50% de carbono orgânico total, 8% de nitrogênio total, 50% de proteína e 2-5% de cinzas. O trub é manejado como fertilizante ou para aterros por conter um alto poder calorífico superior, baixo poder calorífico inferior por causa de sua alta umidade, sendo de difícil descarte (WOLNY-KOŁADKA et al., 2021).

O câncer, também conhecido como tumor maligno, é o crescimento desordenado de células, que se multiplicam e dividem-se rapidamente, se agrupando formando tumores (INCA, 2020). De acordo com os dados da OPAS (2020), a segunda principal causa de morte no mundo é o câncer, ficando atrás somente de doenças cardiovasculares.

Segundo o órgão Internacional de padronização (International Standard Organization), ISO 10993 (ISO, 1992), o teste de citotoxicidade é o ensaio inicial para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para fins biomédicos. É um método *in vitro* que consiste na interação entre o material e uma cultura de células provinda de mamíferos, verificando as alterações celulares. O ensaio de brometo [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium], conhecido como MTT, avalia a atividade metabólica e a viabilidade celular, sendo um ensaio laboratorial, usado para caracterizar a citotoxicidade e proliferação, medindo a função mitocondrial da célula (BOCHNIE et al., 2015).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o extrato puro de trub e de encapsulados contendo 10% de extrato de trub, em células tumorais mamárias humanas *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

SOLUÇÃO TRATAMENTO

As soluções tratamento foram produzidas em parceria com a Profa. Dra. Lilian Tatiani Dusman Tonin, da UTFPR Câmpus Apucarana. O extrato de trub quente foi preparado pesando-se 1,0000 g do coproduto trub quente desidratado com 50,0 mL de solvente EtOH:H₂O 70:30 (v/v), agitação em shaker, a 150 rpm, durante 4 h a 60 °C. As nanopartículas foram preparadas pelo método de precipitação antissolvente, encapsulando-se o extrato em nanopartículas de zeína e zeína revestida com quitosana. Com o auxílio do vórtex, estes foram diluídos em 1 mL de meio de cultura. Mediante a essas soluções foram preparadas nas concentrações testes em: 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 µg mL⁻¹ de meio de cultura com soro bovino fetal.

ATIVIDADE CITOTÓXICA/ANTITUMORAL/ANTIPROLIFERATIVA

A linhagem de células tumorais humanas mamárias (MCF-7), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental da Universidade Estadual de



Maringá-UEM, foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo 10 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA) e incubadas em incubadora com 5% de CO₂ e temperatura de 37 °C.

Para realizar o teste de atividade citotóxica/antitumoral foi utilizado o ensaio de MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazolium bromide], de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações. Foram utilizadas placas de cultivo de 96 poços onde, em cada poço, foram semeadas 1x10⁴ células tumorais MCF-70. Após 24 horas, o meio de cultura de cada poço foi descartado e adicionou-se 100 µL de meio completo para os grupos: controle negativo (CO⁻) (meio de cultura), controle positivo (CO⁺) com o agente citotóxico metil metanossulfanato (MMS 500 µM) e os tratamentos para as diferentes concentrações de cada amostra.

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas e, após esse tempo, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de meio de cultura não suplementado, acrescido de MTT (0,167 mg mL⁻¹). A placa foi incubada novamente por mais 4 horas, sendo descartado esta solução após este tempo e adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido para solubilizar os cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em uma leitora de microplaca (Thermo Plate) a 492 nm.

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão das absorbâncias e submetidos à análise de variância (one way ANOVA), seguido do teste de Dunnet (n=4), com o uso do programa *Action Stat* (p<0,05). Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados pela razão da absorbância do tratamento pela absorbância do controle negativo.

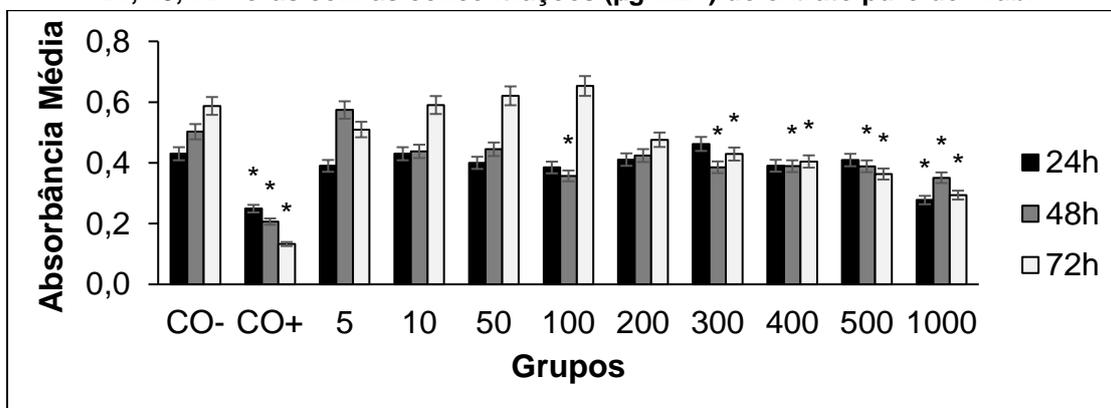
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com relação às células tumorais de mamas tratadas com o extrato puro de trub (Figura 1), pode-se observar que no tempo de 24 horas somente a concentração de 1000 µg mL⁻¹ resultou em absorbância média inferior à do controle negativo. No tempo de 48 horas as concentrações de 100, 300, 400, 500 e 1000 µg mL⁻¹ apresentaram este efeito. E, no tempo de 72 horas, as concentrações de 300 até 1000 µg mL⁻¹ obtiveram absorbâncias inferiores ao controle negativo, indicando a citotoxicidade e a atividade antitumoral deste extrato. Inclusive, as viabilidades celulares nas concentrações de 1000 µg mL⁻¹ atingiram 64,53% (24 horas), 69,85 % (48 horas) e 50,01 % (72 horas) (Tabela 1).

O xantohumol é um dos polifenóis mais importantes do lúpulo, pois tem ação anti-inflamatória contra células cancerosas, tendo capacidade de prevenir doenças hepáticas e cardíacas (SILVA et al., 2023b). Este pode ter sido o responsável pelo efeito citotóxico/antitumoral do extrato puro de trub para as células tumorais mamas.

A Nano zeína – quitosana contendo 10% de extrato de trub apresentou atividade antitumoral/citotoxicidade nas concentrações de 10, 50, 100, 200, 400 e 500 µg mL⁻¹, no tempo de 24 horas, na concentração de 100 µg mL⁻¹, no tempo de 48 horas, e na concentração de 1000 µg mL⁻¹, no tempo de 72 horas (Figura 2). As viabilidades celulares atingiram 64,41 % (24 horas) na concentração de 400 µg mL⁻¹, 68,32 % (48 horas) na concentração de 300 µg mL⁻¹ e 68,63 % (72 horas) na concentração de 1000 µg mL⁻¹ (Tabela 1). Os dados indicam que o extrato de trub e, os compostos com atividade antitumoral, conseguiram ser liberados de forma eficaz desta cápsula, apesar de não terem atingido o nível de citotoxicidade do extrato puro.

Figura 1 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais mamárias humanas tratadas por 24, 48, 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato puro de Trub.



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo. * Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).

Tabela 1- Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais mamárias humanas, tratadas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos de Trub puro e dos encapsulados contendo 10% do extrato de trub, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT

Grupos	Trub puro			Nano zeina – quitosana			Nano Zeina		
	24 h	48 h	72 h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
CO-	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
CO+	57,97	41,09	22,60	37,16	40,30	34,62	43,90	44,70	29,65
5	90,70	114,23	86,78	86,46	83,08	87,45	116,30	58,11	93,01
10	100,00	87,11	100,51	73,36	79,63	87,99	104,56	62,68	90,43
50	93,02	88,51	105,68	65,47	85,24	91,48	105,91	73,60	88,13
100	89,48	71,04	111,18	66,91	66,59	82,88	91,08	68,71	78,49
200	95,52	84,38	81,04	71,82	95,37	93,88	103,69	72,45	82,63
300	107,50	76,72	73,04	77,41	68,32	95,58	105,04	61,02	75,92
400	90,81	77,41	68,87	64,41	95,26	96,51	93,68	97,19	86,02
500	95,17	77,36	61,85	72,98	81,14	90,55	102,25	85,97	82,63
1000	64,53	69,85	50,01	81,35	82,76	68,63	96,66	79,00	79,17

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

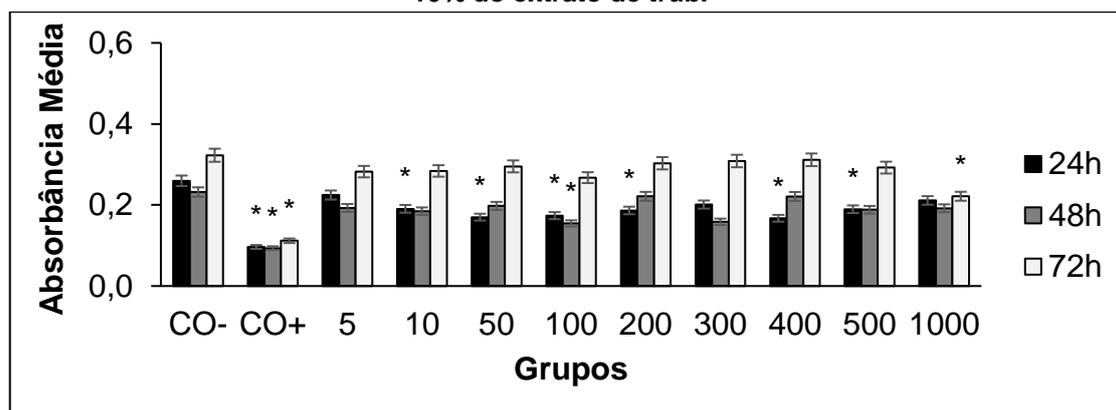
O xantohumol é um agente quimiopreventivo de amplo espectro do câncer, ou seja, ele age por inibição do crescimento tumoral em estágio inicial, inibe a atividade metabólica de pró-carcinógenos e induz enzimas cancerígenas-desintoxicantes. Os autores realizaram testes *in vitro* em células de câncer de mama (MCF-7), mesma utilizada no presente estudo, câncer de cólon (HT-29) e câncer de ovário (A-2780). O extrato de xantohumol inibiu a proliferação de células MCF-7 e A-2780 em forma dose-dependente com dois dias de tratamento (STEVENS e PAGE, 2004).

Já Nano zeina contendo 10 % de extrato de trub (Figura 3) apresentou absorbâncias médias menores que a do controle negativo nas concentrações de 5 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, no tempo de 48 horas, e nas concentrações de 100, 300 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no tempo de 72 horas. No tempo de 48 horas, as viabilidades celulares nas concentrações citadas foram de 58,11% e 61,02 %, respectivamente (Tabela 1). No tempo de 72 horas foram de 78,49%, 75,92% e 79,17%, respectivamente. Os dados mostram que esta nano foi mais eficiente na



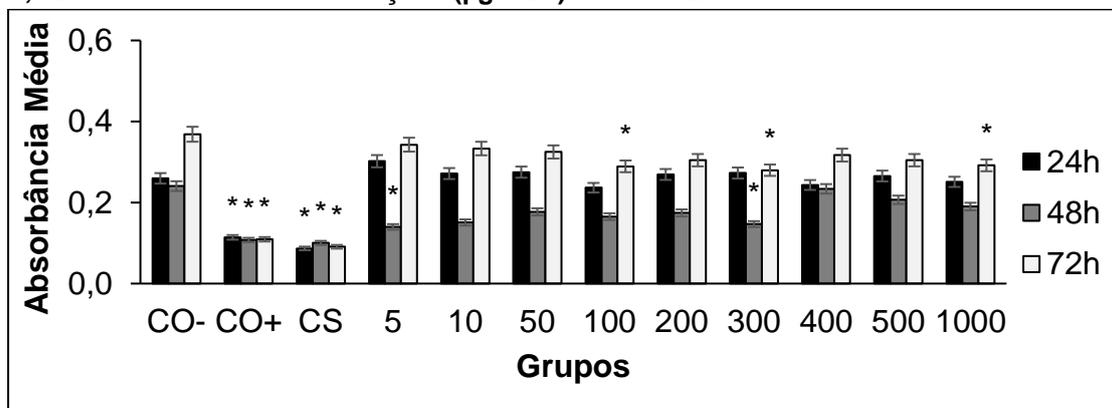
liberação dos compostos com atividade citotóxica do extrato de trub para o meio cultivado que a nano zeína. Apesar disso, assim como a nano zeína-quitosana, não atingiu o nível de citotoxicidade do extrato puro.

Figura 2 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais mamárias humanas tratadas por 24, 48, 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) da Nano zeína-quitosana contendo 10% do extrato de trub.



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo. * Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).

Figura 3 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais mamárias humanas tratadas por 24, 48, 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) da Nano Zeína contendo 10% de extrato de trub.



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo. * Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).

CONCLUSÃO

Por meio deste estudo foi possível concluir que os extratos de Trub na forma pura e encapsulada apresentaram citotoxicidade/atividade antitumoral para a linhagem celular tumoral mamária. Diante dos dados do presente trabalho indica-se que outras linhas tumorais e normais devam ser avaliadas, buscando identificar melhor atividade biológica do extrato de Trub puro e encapsulado.

Agradecimentos



À Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela Bolsa Produtividade concedida à Profa. Dra. Elisângela Düsman (CNPq#305029/2022-3).

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

BOCHNIE, K. A.; GREGÓRIO, P. C.; MACIEL, R. A. P. Análise da viabilidade celular por mtt em células tratadas com toxinas urêmicas – revisão. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 1, n. 15, 2017.

COSTA, F. S. F. et al. Reuse of Hot Trub as an Active Ingredient with Antioxidant and Antimicrobial Potential. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 4, p. 2037–2047, 2021.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – 6. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro, 2020.

ISO 10993 - **International standard: Biological Evaluation of Medical Devices** – Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods. ISO 10993-5, 1992.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. **Câncer, 2020**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>. Acesso em: 20/07/2023.

SILVA, G. V. DE A. et al. Xanthohumol properties and strategies for extraction from hops and brewery residues: A review. **Food Chemistry**, v. 404, 2023a.

SILVA, K. F. C. E. et al. Processing Strategies for Extraction and Concentration of Bitter Acids and Polyphenols from Brewing By-Products: A Comprehensive Review. **Processes**, v. 11, n. 3, 2023b.

STEVENS, J. F.; PAGE, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! **Phytochemistry**, v. 65, n. 10, p. 1317–1330, 2004.

WOLNY-KOŁADKA, K.; MALINOWSKI, M.; ZDANIEWICZ, M. Energy-related and microbiological evaluation of the effects of bulking agents on the brewery hot trub biodrying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 127, p. 398–407, 2021.