



EFEITO ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE EXTRATOS DE FRUTOS VERMELHOS NATIVOS EM CÉREBRO DE RATOS

ALANA SEIXAS DE FARIAS¹; JULIANE DE SOUZA CARDOSO²; JULIANE TORCHELSEN SARAIVA³; FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA⁴; JULIA EISENHARDT DE MELLO⁵; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – alanaseixas510@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – ju.souza591@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – julianetorchelsen@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – fe.t@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – julia_eisenhardt@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é um quadro onde se observa um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) associado à diminuição das defesas antioxidantes, resultando em danos a biomoléculas (ANGELOVA et al. 2018). A oxidação de lipídeos, proteínas e DNA são processos que associados com a suscetibilidade do tecido cerebral contribuem com a perda da função neuronal, corroborando com o processo degenerativo de diversas doenças neurológicas (CHOI et al. 2012).

As antocianinas são compostos fenólicos amplamente encontrados nos frutos vermelhos (ARAÚJO et al. 2019). Seu potencial terapêutico baseia-se principalmente na capacidade biológica destes polifenóis e seus metabólitos em exercer atividades antioxidante e anti-inflamatória (SPECIALE et al. 2020). Frutos nativos como *Eugenia uniflora* (*E. uniflora*) e *Psidium cattleianum* (*P. cattleianum*), conhecidos popularmente como pitanga e araçá, respectivamente, são fontes naturais de flavonoides que, devido às suas características antioxidantes, apresentam efeito protetor promissor frente a alterações bioquímicas observadas nas doenças neurodegenerativas.

Diante da relação de estresse oxidativo com a fisiopatologia de diferentes doenças e da elevada concentração de compostos fenólicos como as antocianinas nos frutos vermelhos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de extratos hidroalcoólicos de frutos de *E. uniflora* e *P. cattleianum* em marcadores de estresse oxidativo induzido em cérebro total de ratos.

2. METODOLOGIA

Frutos de *E. uniflora* e *P. cattleianum* foram disponibilizados pela Embrapa Clima Temperado (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), localizada em Pelotas/RS, Brasil. Para preparação dos extratos hidroalcoólicos conforme descrito por BORDIGNON et al. (2009), frutos picados foram sonicados durante 30 minutos a 25 °C em etanol-água a 70:30 v/v (pH 1,0). Posteriormente, os extratos brutos foram filtrados e o pH ajustado para 4, sendo o etanol removido sob pressão reduzida e a solução aquosa restante liofilizada. Cérebro total de ratos Wistar de 35 dias de idade foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio (20 mM pH 7,4) contendo KCl (140 mM, 1:10, p/v) e centrifugados à 3500 rpm e 4°C por 10 minutos. (CEEA-5747/2015), O dano oxidativo foi induzido com adição de 10 µL de peróxido de

hidrogênio (5 mM) e 5 µL de sulfato ferroso (20 µM) em 225 µL do homogeneizado. Os grupos testados neste trabalho dividiram-se em: Controle (C), Controle Induzido (CI), o antioxidante padrão Ácido Ascórbico (AA) (100 µM), e os extratos dos frutos nativos utilizados nas concentrações de 25, 50, 100 e 250 µg mL⁻¹ diluídos em água destilada. Dez microlitros de AA ou das diferentes concentrações dos extratos foram adicionadas à mistura e incubadas sob 37 °C por 1 hora.

As análises dos parâmetros de estresse oxidativo incluíram as ERO, conforme descrito por ALI et al. (1992), e a peroxidação lipídica, mensurada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ESTEBAUER & CHEESEMAN, 1990). A determinação de proteínas utilizou albumina como padrão e azul de *Comassie* como reagente de coloração (BRADFORD, 1976). A análise estatística foi realizada com o software GRAPHPAD PRISM 5.0 (San Diego, CA, U.S.A.) através de ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Tukey. Dados foram expressos como média ± erro padrão onde $P < 0,05$ foi considerado significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes aos níveis de ERO e TBARS estão representados na Figura 1 e na Figura 2, respectivamente, e demonstram que a indução do estresse oxidativo aumentou significativamente ($P < 0,001$) os níveis de ERO e TBARS, no grupo CI quando comparado ao grupo C. Por outro lado, os extratos dos dois frutos vermelhos demonstraram uma importante capacidade de prevenção do aumento das ERO quando comparados ao grupo CI. O extrato de araçá demonstrou uma melhor capacidade de prevenção do aumento dessas ERO ($P < 0,001$) nas concentrações de 50, 100 e 250 µg mL⁻¹ de extrato testado. Já o extrato de pitanga foi capaz de prevenir totalmente, e de forma semelhante ao antioxidante padrão, o aumento de ERO somente na concentração de 250 µg mL⁻¹ ($P < 0,001$). Na Figura 2 podemos observar que os extratos de *E. uniflora* e *P. cattleianum* preveniram totalmente o aumento de TBARS nas concentrações de 100 e 250 µg mL⁻¹ ($P < 0,001$) de extrato testado. Essas concentrações aqui destacadas foram semelhantes a atividade do antioxidante padrão utilizado neste ensaio.

O excesso de ERO pode contribuir para o aumento da peroxidação lipídica e estes processos estão relacionados com a neurodegeneração encontrada em doenças como Alzheimer e Parkinson, uma vez em que há dano em células neuronais que são formadas por alto conteúdo lipídico (CHOI et al. 2012; ANGELOVA et al. 2018). Extratos hidroalcoólicos dos frutos de *E. uniflora* e *P. cattleianum* demonstraram em sua composição a presença de importante conteúdo de antocianinas (OLIVEIRA et al. 2017, 2018). A atividade antioxidante dessa classe de compostos pode ser resultado de diversos fatores, dentre eles a eliminação direta de radicais livres, devido a sua capacidade estrutural de doar elétrons, ou ainda, da ação antioxidante atribuída aos seus metabólitos gerados após digestão, pois alguns destes possuem a capacidade de permanecer estáveis, biodisponíveis e ainda atravessar a barreira hemato-encefálica (ULLAH et al. 2019). Estudos *in vivo* com extratos de *E. uniflora* e *P. cattleianum* em modelos experimentais que apresentaram aumento da lipoperoxidação demonstraram que estes frutos vermelhos foram capazes de prevenir o aumento de TBARS em estruturas cerebrais isoladas (OLIVEIRA et al. 2017, 2018).

Outro ponto discutido é a ação desses compostos na restauração direta das enzimas antioxidantes responsáveis por manter as ERO sob níveis fisiológicos (SPEER et al. 2020). Sabe-se que em doenças neurodegenerativas como o

Alzheimer, a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) encontra-se diminuída (AFZAL et al. 2019). Estudos *in vivo* com extratos ricos em antocianinas demonstraram a capacidade da pitanga (OLIVEIRA et al. 2017) em prevenir alterações na atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase (CAT) em modelos experimentais onde suas atividades estavam alteradas.

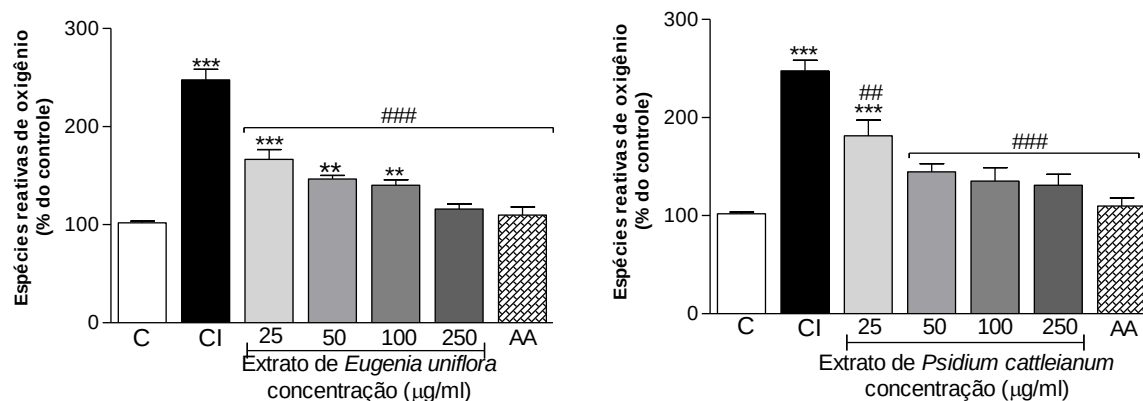


Figura 1: Efeito de diferentes concentrações do extrato de *Eugenia uniflora* e *Psidium cattleianum* nos níveis de espécies reativas de oxigênio frente ao estresse oxidativo induzido em cérebro de ratos. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão de % do controle (n=4-5). ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparado ao grupo C. ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ comparado o grupo CI. ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey. AA, ácido ascórbico; C, controle; CI, controle induzido.

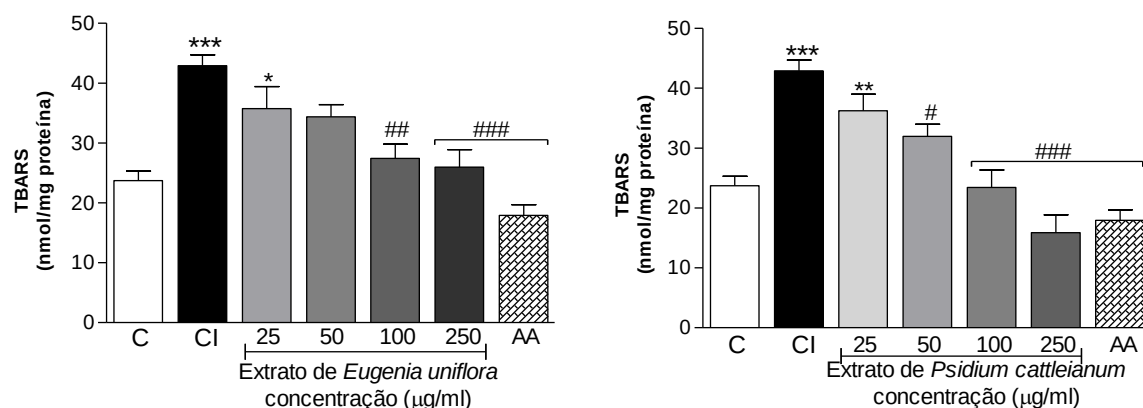


Figura 2: Efeito de diferentes concentrações do extrato de *Eugenia uniflora* e *Psidium cattleianum* nos níveis de TBARS frente ao estresse oxidativo induzido em cérebro de ratos. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão (n=4-6). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparado ao grupo C. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ comparado o grupo CI. ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey. AA, ácido ascórbico; C, controle; CI, controle induzido; TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.



4. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que os extratos de *E. uniflora* e *P. cattleianum* apresentam potenciais efeitos protetores frente ao dano causado pelo estresse oxidativo, que é um dos mecanismos envolvidos no surgimento e agravamento de diversas doenças neurodegenerativas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFZAL, M.; RADHA, A.; ALHASAN, R. Anthocyanins Potentially Contribute to Defense against Alzheimer's Disease. **Molecules**, Switzerland, v.24, n.23, p.4255, 2019.
- ALI, S.F.; LEBEL, C.P.; BONDY, S.C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, Arkansas, v.13, n.3, p.637-648, 1992.
- ARAÚJO, F.F. et al. Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food Research International**, Brasil, v.121, p. 57-72, 2019.
- ANGELOVA, P.R.; ABRAMOV, A.Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. **FEBS Letters**, London, v.592, n.5, p.692-702, 2018.
- BORDIGNON, C.L. et al. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.1, p.183-188, 2009.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Georgia, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.
- CHOI, D.Y. et al. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's Disease. **Brain Research Bulletin**, South Korea, v.87, n.2-3, p.144-153, 2012.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v.186, p.401-421, 1990.
- OLIVEIRA, P.S. et al. *Eugenia uniflora* fruit (red type) standardized extract: a potential pharmacological tool to diet-induced metabolic syndrome damage management. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Pelotas, v.92, p.935-941, 2017.
- OLIVEIRA, P.S. et al. Southern Brazilian native fruit shows neurochemical, metabolic and behavioral benefits in an animal model of metabolic syndrome. **Metabolic Brain Disease**, Pelotas, v.33, n.5, p.1551-1562, 2018.
- ULLAH, R. et al. Natural antioxidant anthocyanins – A hidden therapeutic candidate in metabolic disorders with major focus in neurodegeneration. **Nutrients**, Korea, v.11, n.6, p.1-32, 2019.
- SPEER, H. et al. Anthocyanins and Human Health – A focus on oxidative stress, Inflammation and Disease. **Antioxidants**, Australia, v.9, n.366, p.1-12, 2020.
- SPECIALE, A. et al. Anthocyanins as modulators of cell redox-dependent pathways in non-communicable diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v.27, n.12, p.1955-1996.