

EFEITO *IN VITRO* DE *Rubus* sp. SOBRE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM TECIDO CEREBRAL DE RATOS

TAYNÁ AMARAL VELEDA¹; JULIANE DE SOUZA CARDOSO²; ALANA SEIXAS DE FARIAS³; FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA⁴; BERNARDO DE MORAES MEINE⁵; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – taynaaveleda@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – ju.souza501@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – alana_seixasfarias@hotmail.com

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

⁵Universidade Federal de Pelotas – bemeine15@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade de defesa antioxidante, culminando em dano tecidual. Esse fenômeno aumenta com a idade e está relacionado diretamente com inúmeras doenças crônicas, como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, renais e pulmonares (CABELLO-VERRUGIO et al, 2017), além de neoplasias e distúrbios neurológicos (GOTTLIEB et al, 2010). Grande parte dessas espécies reativas são produzidas durante o metabolismo normal em sistemas biológicos e são contrabalançadas por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. É importante mencionar que o cérebro é altamente vulnerável ao estresse oxidativo devido à sua alta taxa metabólica, responsável por 20% do consumo total de oxigênio (FEITOSA et al., 2018).

Considerando os danos causadas pelo estresse oxidativo e sua associação com diferentes doenças, em especial as neuropsiquiátricas, é de extrema importância encontrar compostos que previnam seus surgimentos. Nesse contexto, destaca-se o *Rubus* sp., fruto de coloração negra e sabor ácido à doce-ácido conhecido popularmente como amora-preta (VIZZOTO et al, 2012). Muitos compostos com efeitos benéficos à saúde são encontrados na amora-preta, como os carotenoides e os compostos fenólicos, destacando-se as antocianinas (VIZZOTO & PEREIRA, 2011). O efeito protetor desses compostos tem sido relacionado ao seu poder antioxidante, pois possuem a capacidade de doar hidrogênios ou elétrons aos radicais livres, já os carotenoides são considerados excelentes desativadores de oxigênio (FERREIRA et al, 2010). Com isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos *in vitro* do extrato de *Rubus* sp. sobre os níveis de ERO e mensuração da lipoperoxidação em tecido cerebral de ratos saudáveis.

2. METODOLOGIA

Os frutos de *Rubus* sp. foram disponibilizados pela Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS, Brasil) e o extrato hidroalcoólico preparado conforme descrito por BORDIGNON et al. (2009). 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 por 10 minutos à 3500 rpm e 4°C. O dano oxidativo foi induzido a partir da adição de 10 µL de peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) (5 mM) e 5 μL de sulfato ferroso (FeSO_4) (20 μM) em 225 μL do homogeneizado. Assim, neste trabalho temos os seguintes grupos: (1) Controle (C), contendo somente o homogeneizado e tampão, (2) Controle Induzido (CI), contendo o homogeneizado, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{FeSO}_4$, (3) ácido ascórbico (AA), que foi utilizado como antioxidante padrão e (4) extrato de *Rubus* sp. que foi testado nas concentrações de 25, 50, 100 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ambos adicionados (10 μL) em homogeneizado contendo $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{FeSO}_4$. Após a adição dos componentes de cada grupo, as misturas foram incubadas à 37 °C por 1 hora e, posteriormente, utilizadas para avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo. A mensuração dos níveis de ERO foi realizada conforme metodologia descrita por ALI et al. (1992) e expressa como % do controle, e a lipoperoxidação foi avaliada a partir dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e expressa como nmol de TBARS por mg de proteína (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.), utilizando ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Tukey e os dados expressos como média \pm erro padrão, considerando $P < 0,05$ como valor significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 estão representados os efeitos de diferentes concentrações do extrato de *Rubus* sp. nos níveis de ERO (A) e TBARS (B) em modelo *in vitro* de estresse oxidativo. Na figura 1A pode-se visualizar que houve um aumento na produção de ERO no grupo CI e *Rubus* sp. 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em relação ao grupo C. Por outro lado, o extrato de *Rubus* sp conseguiu prevenir esse aumento nas concentrações de 50, 100 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, assim como o antioxidante padrão AA. Na figura 1B, é possível observar um aumento nos níveis de TBARS no grupo CI em relação ao grupo C, por outro lado, verifica-se que houve a proteção contra este aumento ao utilizar o extrato de *Rubus* sp em todas as concentrações, assim como o antioxidante padrão.

Os efeitos protetores contra o aumento dos níveis de ERO e de TBARS demonstrados com o uso do extrato de *Rubus* sp. são atribuídos à presença de compostos fenólicos, que têm efeitos potencialmente benéficos à saúde, incluindo atividade anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana e antioxidante. A atividade antioxidante é definida como a capacidade de reduzir a formação de radicais livres e eliminar ERO (REYES-CARMONA et al., 2006). Em um estudo realizado por DE SOUZA et al. (2014) com diversos frutos vermelhos, a amora-preta destacou-se por ser o fruto com maior atividade antioxidante e mais elevado conteúdo fenólico. Outro estudo envolvendo esse fruto mostrou que seu consumo pode ajudar a prevenir ou reduzir episódios maníacos observados em animais, devido às propriedades neuroprotetoras, antioxidantes e anti-inflamatórias que o extrato apresenta (CHAVES et al., 2019).

O malondialdeído (MDA) é um biomarcador de dano oxidativo a lipídeos, pois é formado pela reação das ERO com os lipídeos da membrana celular, reação conhecida como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação. A detecção de MDA pela mensuração das chamadas TBARS permite a avaliação da lipoperoxidação (TSIKAS, 2017). Em um estudo realizado por COVAS (2008) comprova-se que o conteúdo fenólico de um azeite de oliva pode ser responsável por benefícios

sobre os danos oxidativos. Os resultados desse estudo fornecem evidências para recomendar o uso de azeite rico em compostos fenólicos como principal fonte de gordura, a fim de alcançar benefícios adicionais contra fatores de risco a doenças cardiovasculares (COVAS, 2008).

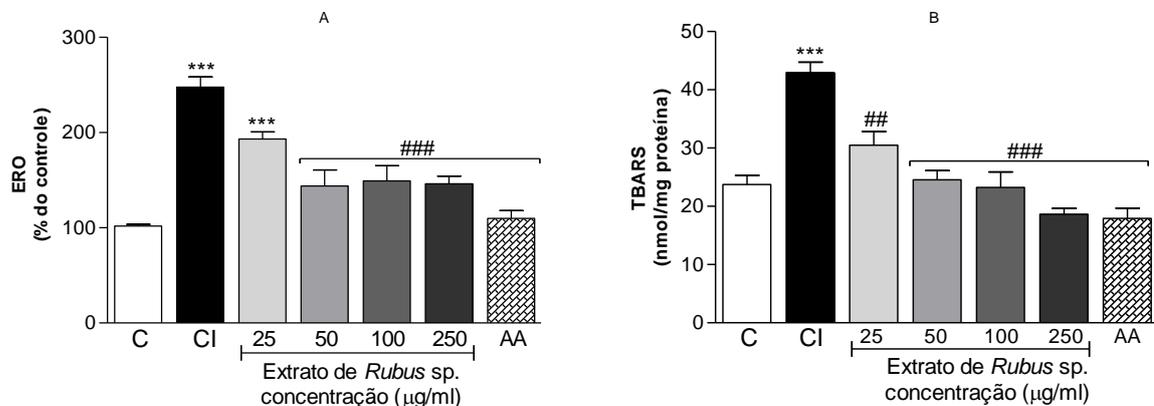


Figura 1: Efeito de diferentes concentrações do extrato de *Rubus* sp. nos níveis de ERO (A) e TBARS (B) frente ao estresse oxidativo induzido em tecido cerebral. Dados expressos como média \pm erro padrão (n=4-6). *** $P < 0,001$ comparado ao grupo C. ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ comparado o grupo CI. ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey. AA, ácido ascórbico; C, controle; CI, controle induzido; ERO, espécies reativas de oxigênio e TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

4. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram que o extrato de *Rubus* sp. possui uma elevada atividade antioxidante devido aos compostos fenólicos presentes em sua composição. Com isso, podemos concluir que esse fruto é eficaz na proteção contra o estresse oxidativo, podendo vir a ser também um potente protetor contra doenças neuropsiquiátricas resultantes desse processo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CABELLO-VERRUGIO, C., SIMON, F., TROLLET, C., SANTIBAÑEZ, J. F. Oxidative Stress in Disease and Aging: Mechanisms and Therapies 2016. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

CHAVES, V. C., SOARES, M. S. P., SPOHR, L., TEIXEIRA, F., VIEIRA, A., CONSTANTINO, L. S., PIZZOL, F. D., LENCINA, C. L., SPANEVELLO, R. M., FREITAS, M. P., SIMÕES, C. M. O., REGINATTO, F. H., STEFANELLO, F. M., Blackberry extract improves behavioral and neurochemical dysfunctions in a ketamine-induced rat model of mania. **Neuroscience Letters** v. 714, 2019.

COVAS, M. I. Bioactive effects of olive oil phenolic compounds in humans: reduction of heart disease factors and oxidative damage. **Inflammopharmacology**, v. 16, n. 5, p. 216–218, 2008.



DE SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A.; DA SILVA, T. L.; DE OLIVEIRA LIMA, L. C.; PIO, R.; QUEIROZ, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362–368, 2014.

FEITOSA, C. M., DA SILVA OLIVEIRA, G. L., DO NASCIMENTO CAVALCANTE, A., MORAIS CHAVES, S. K., RAI, M. Determination of Parameters of Oxidative Stress in vitro Models of Neurodegenerative Diseases - A Review. **Current Clinical Pharmacology**, v. 13 n. 2, p. 100 – 109, 2018.

FERREIRA, D. S.; ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.) **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 3, p. 664-674, 2010.

GOTTLIEB, M. G. V., CRUZ, I. B. M., SCHWANKE, C. H. A., BODANESE, L. C. Estresse oxidativo como fator de risco cardiometabólico emergente. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 20, n. 3, p. 243 – 249, 2010.

REYES-CARMONA, J., YOUSEF, G.G., MARTINEZ-PENICHE, R.A., LILA, M.A. Antioxidant Capacity of Fruit Extracts of Blackberry (*Rubus* sp.) Produced in Different Climatic Regions. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 7, p. 497-503, 2006.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Analytical Biochemistry**. v. 524, p. 13-30, 2017.

VIZZOTTO, M., BASSOLS RASEIRA, M. C., PEREIRA, M. C., DA ROSA FETTER, M. Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 853-858, 2012.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Amora-preta (*Rubus* sp.): Otimização do processo de extração e determinação de antioxidantes de compostos fenólicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1209-1214, 2011.