

IDENTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS EM EXTRATO DE MIRTILLO E SEU POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DE MANIA

LUIZA SPOHR¹; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES²; PATHISE SOUTO OLIVEIRA³; NATÁLIA PONTES BONA⁴; BRUNA DA SILVEIRA DE MATTOS⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – luizaspohr@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – mspereirasoares@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – pathisesouto@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – natinhabona@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – bruna.mtt@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O transtorno de humor bipolar (THB) é uma doença psiquiátrica crônica caracterizada por graves oscilações de humor entre episódios de mania e depressão (SIGITOVA et al. 2016). O tratamento medicamentoso baseia-se no uso de estabilizadores de humor, dentre eles, o carbonato de lítio, o qual visa controlar sintomas agudos e prevenir a ocorrência de novos episódios, no entanto, a terapia ainda apresenta alguns efeitos adversos e um baixo índice terapêutico. Os mecanismos fisiopatológicos relacionados a esse distúrbio permanecem pouco claros, no entanto, dados da literatura têm apontado para a presença de alterações hipocampais (MOORHEAD et al. 2007), bem como prejuízo no estado redox na mesma estrutura (DEBOM et al. 2016).

Considerando que o THB tem um impacto negativo na vida dos pacientes, se torna essencial à busca por agentes neuroprotetores, onde pode-se destacar o mirtilo, o qual apresenta-se como uma excelente fonte de compostos bioativos, como as antocianinas (SINELLI et al. 2008). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o extrato de mirtilo, bem como avaliar seus efeitos em parâmetros de estresse oxidativo em hipocampo de ratos submetidos a um modelo experimental de mania.

2. METODOLOGIA

2.1 *Extrato de mirtilo e identificação de antocianinas*

Os frutos de mirtilo *Vaccinium virgatum*, obtidos da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, foram armazenados a -20°C e o extrato foi preparado de acordo com BORDIGNON et al. (2009). Os extratos foram filtrados, rotaevaporados e liofilizados. As antocianinas foram identificadas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução.

2.2 *Protocolo de mania e de prevenção com extrato de mirtilo e/ou lítio*

Foram utilizados ratos adultos *Wistar* (250-300g), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA 9085-2016). Os animais foram divididos em seis grupos: I (salina), II (cetamina 25 mg/kg), III (cetamina + lítio 45 mg/kg), IV (cetamina + extrato de mirtilo 200 mg/kg), V (cetamina + extrato de mirtilo 200 mg/kg + lítio 45 mg/kg) e VI (cetamina + extrato de mirtilo 200 mg/kg + lítio 22,5 mg/kg). Os animais receberam salina, extrato de mirtilo e/ou lítio via oral durante 14 dias. Entre o 8º e o 14º dia, os animais dos grupos II, III, IV, V e VI também receberam uma injeção de cetamina ou veículo

via intraperitoneal. No 15º dia receberam uma única dose de cetamina ou salina e após 30 minutos a atividade locomotora foi avaliada através do campo aberto (DEBOM et al. 2016). Após esse teste, foram submetidos à eutanásia e o hipocampo foi utilizado para as análises de estresse oxidativo.

2.3 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo

2.3.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Avaliado segundo o método descrito por ESTERBAUER; CHEESEMAN (1990), o qual mede a formação de malondialdeído.

2.3.2 Conteúdo tiólico total

Mensurado pelo método de AKSENOV; MARKESBERY (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB).

2.3.3 Atividade da enzima Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada de acordo com AEBI (1984), baseada na decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 240 nm.

2.4 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $P<0,05$ e expressos como média \pm erro padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação de antocianinas foi baseada no padrão de fragmentação e massa exata. Quinze antocianinas foram identificadas (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação das antocianinas no extrato de mirtilo.

Antocianinas	λ_{max} (nm)	Fórmula molecular	$[M]^+ m/z$ (Erro - ppm)	Fragmento majoritário m/z
Delfnidina-O-galactosídeo	507	$C_{21}H_{21}O_{12}^+$	465.1060 (5.8)	303
Delfnidina-O-glicosídeo	507	$C_{21}H_{21}O_{12}^+$	465.1060 (5.8)	303
Cianidina-O-galactosídeo	515	$C_{21}H_{21}O_{11}^+$	449.1065 (-4.2)	287
Delfnidina-O-pentosídeo	505	$C_{20}H_{19}O_{11}^+$	435.0892 (3.0)	303
Cianidina-O-glicosídeo	515	$C_{21}H_{21}O_{11}^+$	449.1065 (-4.2)	287
Petunidina-O-galactosídeo	522	$C_{22}H_{23}O_{12}^+$	479.1161 (-6.1)	317
Petunidina-O-glicosídeo	522	$C_{22}H_{23}O_{12}^+$	479.1161 (1.1)	317
Cianidina-O-pentosídeo	517	$C_{20}H_{19}O_{10}^+$	419.0931 (-4.7)	287
Peonidina-O-galactosídeo	517	$C_{22}H_{23}O_{11}^+$	463.1215 (-5.4)	301
Petunidina-O-pentosídeo	517	$C_{21}H_{21}O_{11}^+$	449.1087 (-0.1)	317
Peonidina-O-glicosídeo	517	$C_{22}H_{23}O_{11}^+$	463.1215 (-5.4)	301
Malvidina-O-galactosídeo	530	$C_{23}H_{25}O_{12}^+$	493.1326 (-4.1)	331
Malvidina-O-glicosídeo	530	$C_{23}H_{25}O_{12}^+$	493.1326 (-4.1)	331
Peonidina-O-pentosídeo	515	$C_{21}H_{21}O_{10}^+$	433.1101 (-7.9)	301
Malvidina-O-pentosídeo	522	$C_{22}H_{23}O_{11}^+$	463.1207 (-7.1)	331

A administração de cetamina induziu um comportamento do tipo maníaco nos animais do grupo II quando comparado ao grupo controle, parâmetro observado através do aumento da atividade locomotora no teste do campo aberto ($P<0,05$). O tratamento com lítio ($P<0,001$), extrato de mirtilo ($P<0,01$) e a associação do lítio (45 mg/kg) com extrato de mirtilo ($P<0,01$) preveniram a hiperlocomoção induzida pela cetamina (Figura 1).

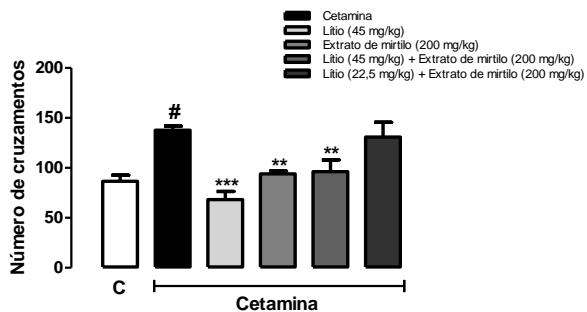


Figura 1. Efeito do tratamento com lítio (45 mg/kg), extrato de mirtilo (200 mg/kg) e a associação do lítio (45 ou 22,5 mg/kg) com extrato de mirtilo (200 mg/kg) na atividade locomotora de ratos submetidos ao modelo experimental de mania. (#) Denota $P<0,05$ quando comparado com o grupo controle. (**) $P<0,01$ e (***) $P<0,001$ quando comparado com o grupo cetamina.

Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo (Figura 2), foi possível observar um aumento nos níveis de TBARS nos animais do grupo II comparado ao grupo controle ($P<0,05$), no entanto, o tratamento com lítio ($P<0,05$), extrato de mirtilo ($P<0,01$) e a associação do lítio (45 mg/kg) com extrato de mirtilo ($P<0,01$) foram capazes de prevenir essa alteração. Verificou-se nos animais do grupo II uma inibição significativa na atividade da enzima CAT quando comparado ao grupo controle ($P<0,05$), alteração que foi prevenida pela administração de lítio ($P<0,01$), extrato de mirtilo ($P<0,01$) e a associação de extrato de mirtilo com o lítio em ambas as doses ($P<0,001$). Quanto ao conteúdo tiólico total, não foram observadas alterações significativas ($P>0,05$) (Figura 2).

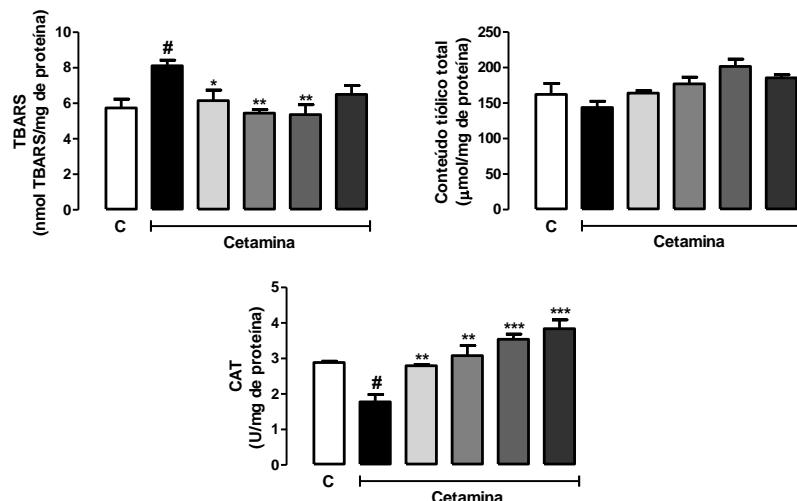


Figura 1. Efeito do tratamento com lítio (45 mg/kg), extrato de mirtilo (200 mg/kg) e a associação do lítio (45 ou 22,5 mg/kg) com extrato de mirtilo (200 mg/kg) nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e no conteúdo tiólico total, bem como na atividade da enzima catalase (CAT) em hipocampo de ratos submetidos ao modelo experimental de mania. (#) Denota $P<0,05$ quando comparado com o grupo controle. (*) $P<0,05$, (**) $P<0,01$ e (***) $P<0,001$ quando comparado com o grupo cetamina.

Sabe-se que a enzima CAT é capaz de metabolizar o H_2O_2 em água e oxigênio molecular (HALLIWELL, 2012), portanto, uma diminuição na atividade dessa enzima pode resultar em um acúmulo desse oxidante, o que pode estar associado ao aumento nos níveis de TBARS observado nesse estudo. Disfunções no hipocampo podem contribuir para as alterações neurológicas observadas durante o episódio maníaco, uma vez que essa estrutura desempenha um papel importante na regulação emocional (ARCINIEGAS et al. 2013).

Nesse estudo foi realizada a associação do lítio com o extrato de mirtilo, visando avaliar o efeito da mesma frente ao episódio tipo maníaco. Dados da

literatura têm demonstrado novas perspectivas para compostos naturais, como a associação com fármacos, visando potencializar efeitos benéficos e reduzir efeitos colaterais dos mesmos. No entanto, em nosso estudo, o efeito não foi potencializado quando associado o lítio ao extrato de mirtilo, o que pode estar relacionado com as atividades farmacológicas que ambos os compostos desempenham, o que pode resultar em interações.

O efeito antioxidante do extrato de mirtilo pode estar associado à presença das antocianinas, uma vez que as mesmas podem agir como antioxidantes (HAN et al. 2015).

4. CONCLUSÕES

O tratamento com extrato de mirtilo foi capaz de prevenir a hiperlocomoção, bem como os parâmetros de estresse oxidativo alterados pela cetamina, sugerindo potencial efeito na prevenção das disfunções encontradas durante o episódio maníaco, porém, mais estudos são necessários para avaliar os mecanismos envolvidos na associação do lítio com o extrato de mirtilo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v.105, n.1 p.121-126, 1984.
- AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, v.302, n.2-3, p.141-145, 2001.
- ARCINIEGAS, D.B.; ANDERSON, C.A.; FILLEY, C.M. **Behavioral neurology & neuropsychiatry**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.
- BORDIGNON JR., C.L.; FRANCESCATTO, V.; NIENOW, A.A.; CALVETE, E.; REGINATTO, F.H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, p.183-188, 2009.
- DEBOM, G.; GAZAL, M.; SOARES, M.S.P.; COUTO, C.A.T.; MATTOS, B.; LENCINA, C.; KASTER, M.P.; GHISLENI, G.C.; TAVARES, R.; BRAGANHOL, E.; CHAVES, V.C.; REGINATTO, F.H.; STEFANELLO, F.; SPANEVELLO, R.M. Preventive effects of blueberry extract on behavioral and biochemical dysfunctions in rats submitted to a model of manic behavior induced by ketamine. *Brain Research Bulletin*, v.127, p.260-269, 2016.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, v.186, n.1, p.407-421, 1990.
- HALLIWELL, B., Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, v.70, p.257–265, 2012.
- MOORHEAD, T.W.; MCKIRDY, J.; SUSSMANN, J.E.; HALL, J.; LAWRIE, S.M.; JOHNSTONE, E.C.; MCINTOSH, A.M. Progressive gray matter loss in patients with bipolar disorder. *Biological Psychiatry*, v.62, n.8, p.894-900, 2007.
- SIGITOVA, E.; FIŠAR, Z.; HROUDOVÁ, J.; CIKÁNKOVÁ, T.; RABOCH, J. Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v.71, n.2, p.77-103, 2016.
- SINELLI, N.; SPINARDI, A.; DI EGIDIO, V.; MIGNANI, I.; CASIRAGHI, E. Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, v.50, n.1, p.31-36, 2008.