

## AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO METANÓLICO DE *Rubus* spp. EM CÉREBRO DE RATOS

JULIA EISENHARDT DE MELLO<sup>1</sup>; KARINA PEREIRA LUDUVICO<sup>2</sup>;  
ALESSANDRA DOS SANTOS<sup>3</sup>; JULIANE DE SOUZA CARDOSO<sup>4</sup>; MAYARA  
SANDRIELLY PEREIRA SOARES<sup>5</sup>; ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [julia\\_eisenhardt@hotmail.com](mailto:julia_eisenhardt@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [karina\\_luduvico@outlook.com](mailto:karina_luduvico@outlook.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [ales\\_santos@outlook.com](mailto:ales_santos@outlook.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [ju.souza591@gmail.com](mailto:ju.souza591@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [mspereirasoares@gmail.com](mailto:mspereirasoares@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [rspanevello@gmail.com](mailto:rspanevello@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre os compostos antioxidantes e pró-oxidantes, que causam danos aos lipídios de membrana, alterações em enzimas neuronais e gliais e danos estruturais ao DNA, podendo levar a disfunção celular e tecidual, bem como ao desenvolvimento de doenças que afetam o sistema nervoso central (SNC) (LJUBISAVLJEVIC, 2016). Dentre os compostos oxidantes, os mais comuns são as espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais, em condições fisiológicas podem ser neutralizadas por mecanismos antioxidantes não-enzimáticos, como as vitaminas, e enzimáticos endógenos, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (FINKEL e HOLBROOK, 2000; BÓ *et al.*, 2015).

Um dos principais danos causados pelo estresse oxidativo, é o processo de lipoperoxidação, que é baseado no processo de oxidação dos ácidos graxos insaturados das membranas celulares, causando alterações na funcionalidade das mesmas, podendo levar à morte celular. Ademais, o óxido nítrico (NO) em sua forma livre é prejudicial para as biomoléculas e por sua vez, corrobora com o excesso das ERO. Sendo assim, os nitritos, metabólitos do NO, podem ser mensurados para a avaliação do *status redox*. Ainda, como capacidade antioxidante, pode-se citar os tióis totais (SH), os quais permite mensurar as moléculas que possuem o grupo sulfidrila em sua estrutura, tendo em vista que estas apresentam potencial fortemente antioxidantes (SINGH *et al.*, 2019).

Com relação às propriedades naturais antioxidantes, pode-se citar as antocianinas, que são encontrados em maior quantidade em frutos vermelhos/roxos e que são bem descritos por seu alto poder antioxidante e anti-inflamatório. Em especial, a *Rubus* spp. popularmente, conhecida como amora preta, tem sido alvo de estudos por ser uma fonte rica em flavonoides e compostos fenólicos, que são compostos que apresentam atividade antioxidante já bem descrita na literatura (KAUME, HOWARD, DEVAREDDY, 2012; SPEER, H. *et al.*, 2020).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito antioxidante *in vitro* do extrato metanólico de *Rubus* spp. em cérebro de ratos expostos a compostos oxidantes.

### 2. METODOLOGIA

Os frutos de *Rubus* spp. foram disponibilizados pela Embrapa Clima Temperado (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Pelotas/RS. Para preparação dos extratos metanólicos, os frutos foram picados e 1 g de fruto foi pesado e adicionado de 60 mL de álcool metanólico, posteriormente levado ao

banho de ultrassom por 50 min. Após sonicado, o líquido foi filtrado e levado ao congelador por 24h. Esta solução foi levada posteriormente ao rotaevaporador para a evaporação total do solvente, no qual, por fim, foi lyophilizado e armazenado até o uso (CHAVES *et al.*, 2018).

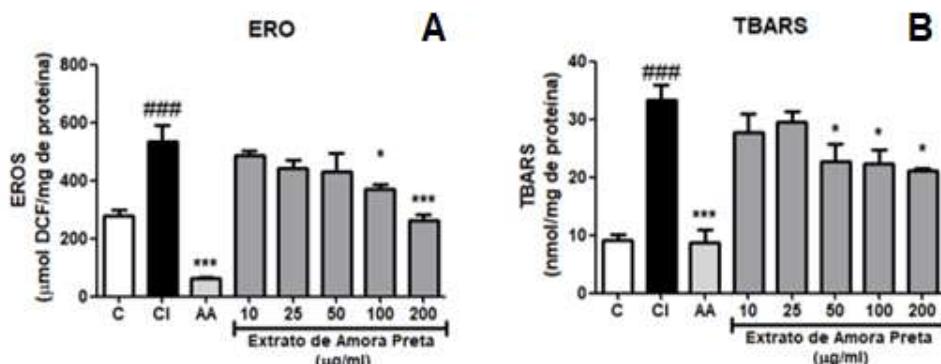
O cérebro total de ratos Wistar de 60 dias de idade foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio (pH 7,4) e centrifugados à 3500 rpm por 10 minutos (CEEA 42067-2019). Para induzir o estresse oxidativo *in vitro* foram adicionados 10  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e 5  $\mu$ L de sulfato ferroso ( $FeSO_4$ ) ao homogeneizado dos tecidos cerebrais (225  $\mu$ L). Para avaliar o potencial antioxidante do extrato de *Rubus* spp., 10  $\mu$ L do extrato em diferentes concentrações (10, 25, 50, 100 e 200  $\mu$ g/mL diluídos em água destilada) foram adicionados à mistura e incubados a 37°C por 1h. O ácido ascórbico (AA) foi utilizado como antioxidante padrão. Nesse sentido, obteve-se as seguintes condições experimentais: Controle (C) homogenizados não expostos ao  $H_2O_2 + FeSO_4$ ; Controle induzido (CI) homogenizados expostos ao  $H_2O_2 + FeSO_4$ ; e AA e as concentrações de *Rubus* spp. foram expostos  $H_2O_2 + FeSO_4$  e aos respectivos tratamentos.

Ao final do experimento, uma alíquota do homogenizado final foi utilizada para a análise dos níveis de EROS, nitritos, SH, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade da SOD, CAT (MISRA e FRIDOVICH, 1972; AEBI, 1984; ESTERBAUER e CHEESEMAN, 1990; ALI *et al.*, 1992; AKSENOV e MARKESBERY, 2001; HUANG *et al.*, 2009).

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, U.S.A.), pelo teste de ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Tukey. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão onde  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

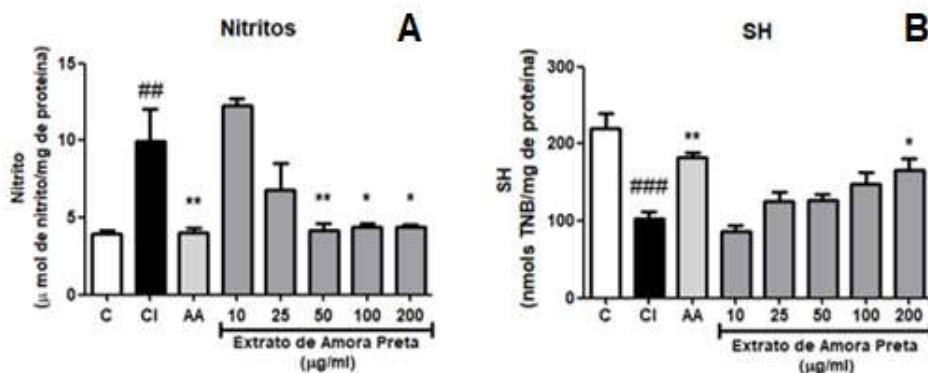
Os resultados obtidos demonstram um aumento dos níveis EROS e TBARS no grupo CI quando comparado com o controle ( $P < 0,001$ , Figura 1A e 1B). Entretanto, o extrato de amora preta nas concentrações de 100 e 200  $\mu$ g/ml e nas concentrações de 50, 100 e 200  $\mu$ g/ml foram capazes de prevenir o aumento de EROS e TBARS respectivamente ( $P < 0,05$ , figura 1A e 1B). O AA foi capaz de proteger contra o aumento de ERO e TBARS induzido pelo CI ( $P < 0,001$ , Figura 1). O excesso de EROS, pode contribuir com o aumento da peroxidação lipídica, sendo assim, corroborando o aumento dos níveis de TBARS.



**Figura 1:** Efeito do extrato de amora preta (10-200  $\mu$ g/ml) sobre os níveis de ERO (A) e TBARS (B) em um protocolo de estresse oxidativo induzido por  $H_2O_2 + FeSO_4$  em cérebro de ratos *in vitro*. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n=4$ ).  $###P < 0,001$

comparando ao controle (C) e  ${}^*P<0,05$ ,  ${}^{***}P<0,001$  comparado ao controle induzido (CI). Ácido Ascórbico (AA).

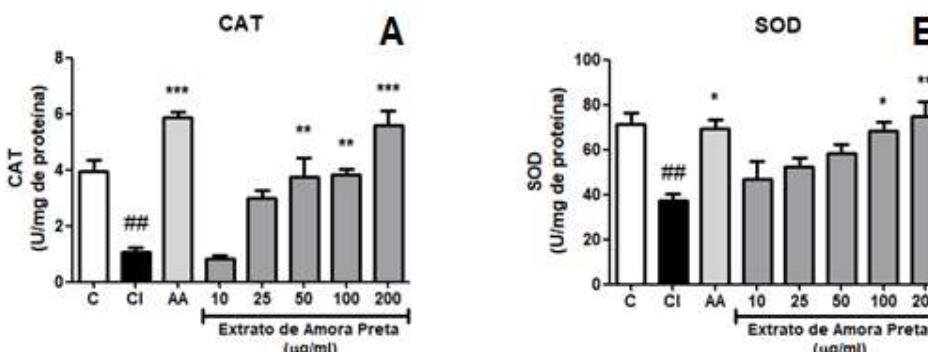
Na figura 2, pode-se observar que houve um aumento dos níveis de nitritos e uma redução dos níveis de SH induzido pela exposição do  $H_2O_2 + FeSO_4$  ( $P<0,01$ , Figura 2). No entanto as concentrações de 50-200  $\mu g/ml$  e 200  $\mu g/ml$  do extrato de amora preta foram capaz de proteger contra o aumento de nitritos e a redução dos níveis de SH ( $P<0,05$ , Figura 2). O AA também foi capaz de prevenir as alterações nos níveis de nitritos e SH causado pelo CI ( $P<0,05$ , Figura 2).



**Figura 2:** Efeito do extrato de amora preta (10-200  $\mu g/ml$ ) sobre os níveis de nitritos (A) e SH (B) em um protocolo de estresse oxidativo induzido por  $H_2O_2 + FeSO_4$  em cérebro de ratos *in vitro*. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n=4$ ).  ${}^{##}P<0,01$ ,  ${}^{###}P<0,001$  comparando ao controle (C) e  ${}^*P<0,05$ ,  ${}^{**}P<0,01$  comparado ao controle induzido (CI). Ácido Ascórbico (AA).

Os nitritos elevados podem contribuir para formação de peróxido nitrito que é extremamente danosa as biomoléculas encontradas nas células. Ademais, em relação aos níveis de SH, vale ressaltar que muitas proteínas intracelulares têm grupos sulfidrila reativos em resíduos de cisteína, sendo assim, o efeito protetor do extrato de amora preta, é de grande relevância para prevenção de danos oxidativos causados pelas alterações nos níveis dessas moléculas.

Por fim, ainda avaliou-se os níveis de enzimas antioxidantes, SOD e CAT, responsáveis pela dismutação do ânion superóxido e neutralização do  $H_2O_2$  respectivamente. Foi possível observar uma redução da atividade da SOD e da CAT no CI em relação ao controle ( $P<0,01$ , Figura 3). No entanto, o extrato de amora preta e o AA foram capazes de prevenir a redução da atividade da SOD (100-200 $\mu g/ml$ ) e da CAT (50-200 $\mu g/ml$ ) ( $P<0,05$ , Figura 3).



**Figura 3:** Efeito do extrato de amora preta (10-200  $\mu g/ml$ ) sobre a atividade da SOD e da CAT em um protocolo de estresse oxidativo induzido por  $H_2O_2 + FeSO_4$  em cérebro de

ratos *in vitro*. Dados expressos como média ± erro padrão (n=4). ##P<0.01 comparando ao controle (C) e \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\* P<0,001 comparado ao controle induzido (CI). Ácido Ascórbico (AA).

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que o extrato de *Rubus* spp. apresentou efeito antioxidante frente ao dano causado pelo estresse oxidativo induzido *in vitro*. Ainda, é possível destacar que em todas as análises realizadas, a concentração de 200 µg/ml de extrato de amora preta demonstrou maior potencial quando relacionado às demais concentrações avaliadas. Sendo assim, o extrato de amora preta na maior concentração avaliada poderá ser alvo de novas pesquisas visando a diminuição do estresse oxidativo em cérebro.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* v.105, 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, p.141-145, 2001.
- ALI, S. F.; LEBEL, C.P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. v.13, p.637-648, 1992.
- BÓ, C.D.; MARTINI, D.; PORRINI, M.; KLIMIS-ZACASC, D.; RISO, P. Berries and oxidative stress markers: an overview of human intervention studies. *Food and Function*, v.6, p.2890–2917, 2015.
- CHAVES, V.C.; BOFF, L.; VIZZOTTO, M.; CALVETE, E.; REGINATTO, F.H.; SIMÕES, C.M.O. Berries grown in Brazil: Anthocyanins profiles and biological properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v.11, p. 4331-4338, 2018.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods of Enzymology*, v.186, p.407-421, 1990.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v.408, p.239–247, 2000.
- HUANG, W.C.; LIN, Y.S.; WANG, C.Y.; TSAI, C.C.; TSENG, H.C.; CHEN, C.L.; LU, P.J.; CHEN, P.S.; QIAN, L.; HONG, J.S.; LIN, C.F. Glycogen synthase kinase-3 negatively regulates anti-inflammatory interleukin-10 for lipopolysaccharide-induced iNOS/NO biosynthesis and production in microglial cells. *Immunology*, v.128, p.275-286, 2009.
- KAUME, L.; HOWARD, L. R.; DEVAREDDY, L. The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. *Journal of agricultural and food chemistry*. v. 60, p.5716-5727, 2012.
- LJUBISAVLJEVIC, S. Oxidative Stress and Neurobiology of Demyelination. *Molecular Neurobiology*, v.53, p.744-758, 2016.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, v.247, p.3170–3175, 1972.
- SINGH, A.; KUKRETI, R.; SASO, L.; KUKRETI, S. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*. v.8, p.1-20, 2019.
- SPEER, H.; D'CUNHA, N.M.; ALEXOPOULOS, N.I.; MCKUNE, A.J.; NAUMOVSKI, N. Anthocyanins and Human Health – A focus on oxidative stress, Inflammation and Disease. *Antioxidants*, Australia, v.9, p.1-12, 2020.